

Unidade 3 (6ª. e 7ª. Semanas):

Separação de Compostos Orgânicos por Cromatografia em Papel e Extração por Solventes.

Nessa Unidade, o experimento deverá ser realizado pelo Aluno em sua Casa envolvendo:

1) separação de pigmentos presentes em pó para refresco sabor uva ou em tinta de caneta hidrocolor por Cromatografia em Papel (usando papel de filtro e fase móvel composta por água, vinagre e álcool comum).

2) Extração dos pigmentos presentes na cenoura (betacaroteno) e na beterraba ou repolho roxo (antocianinas) em cozimento com água e com óleo, separadamente.

Deverá apresentar Relatório Científico detalhado.

Introdução Teórica.

I. Cromatografia.

A **cromatografia** é um conjunto de técnicas baseadas no princípio da retenção seletiva cujo objetivo é separar os distintos componentes de uma mistura e, em alguns casos, identificá-los, se não se conhece sua composição.

As técnicas cromatográficas são muito variadas, mas em todas elas há uma **fase móvel** que consiste em um fluido (gas, líquido ou fluido supercrítico) que arrastra a amostra através de uma **fase estacionária** que pode ser um sólido ou um líquido fixado em um sólido.

Os componentes da mistura interagem de forma diferente com a fase estacionária e com a fase móvel. Deste modo, os componentes atravessam a fase estacionária a diferentes velocidades e vão se separando. Depois que os componentes da amostra tenham passado pela fase estacionária e se separado, passam por um detector que gera um sinal que depende da concentração e do tipo de composto.

Classificação:

As diferentes técnicas cromatográficas podem ser divididas de acordo com o tipo da **fase estacionária**:

Tipos	Fase móvel	Fase estacionária
Cromatografia em papel	Líquido	Sólido
Cromatografia em camada delgada	Líquido	Sólido
Cromatografia de gases	Gás	Sólido ou líquido
Cromatografia líquida em fase reversa	Líquido (polar)	Sólido ou líquido (menos polar)
Cromatografia líquida em fase normal	Líquido (menos polar)	Sólido ou líquido (polar)
Cromatografia líquida de troca iônica	Líquido (polar)	Sólido
Cromatografia líquida de exclusão	Líquido	Sólido
Cromatografia líquida de adsorção	Líquido	Sólido
Cromatografia de fluidos supercríticos	Líquido	Sólido

- Cromatografia plana. A fase estacionária se encontra fixada sobre uma placa plana ou sobre um papel. As principais técnicas são:
 - Cromatografia em papel
 - Cromatografia em camada delgada
- Cromatografia em coluna. A fase estacionária se encontra dentro de uma coluna. De acordo com o fluido empregado como fase móvel, tem-se:
 - Cromatografia líquida
 - Cromatografia de gases
 - Cromatografia de fluidos supercríticos

A cromatografia de gases é útil para gases ou para compostos relativamente voláteis, o que inclui numerosos compostos orgânicos. No caso de compostos não voláteis, se recorre a processos denominados de "derivatização", a fim de convertê-los em outros compostos que se volatilizem nas condições da análise.

Dentro da cromatografia líquida, se destaca a Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), que é a técnica cromatográfica mais empregada na atualidade, normalmente em sua modalidade de fase reversa, na qual a fase estacionária tem caráter não polar, e a fase móvel tem caráter polar (geralmente água ou misturas com elevada proporção da mesma, ou de outros solventes polares como, por exemplo, metanol).

Uma série eluotrópica é uma série de substâncias de diferentes polaridades que atuam como fase móvel e que permitem observar um melhor deslocamento sobre uma fase estacionária.

Histórico

O botânico russo **Mikhail Tswett** (Mikhail Semenovich Tsvett, 1872-1919) empregou pela primeira vez em 1906 o termo "cromatografia" (que provém do grego **χρoμα** e **γραφο** que significam respectivamente "cor" e "escrever").

A cromatografia em papel é uma alternativa da técnica de cromatografia em coluna, utilizando uma folha ou tira de papel adsorvente. Utiliza-se o papel de filtro de celulose, por ser altamente hidrófilo, mantendo um revestimento de água imperceptível. Os líquidos polares terão grande afinidade pelas hidroxilas da molécula de celulose, formando pontes de hidrogênio, ficando retido e funcionando como fase estacionária, e os líquidos menos polares serão repelidos por esta estrutura, funcionando como fase móvel. Coloca-se a amostra a ser analisada um pouco acima da extremidade inferior do papel seco, que após ter esta extremidade inferior mergulhada numa mistura de solventes, terão os seus constituintes arrastados, juntamente com esta mistura que tende a subir por capilaridade. Os diferentes constituintes apresentarão variação na velocidade de deslocamento, de acordo com os seus coeficientes de partição. Os componentes menos solúveis na fase estacionária (água) terão uma movimentação mais rápida. Pode ser utilizada para análise de mistura de aminoácidos ou misturas de açúcares. A cromatografia em papel pode ser também realizada no sentido descendente e bidimensional, este último realizado em duas etapas com solventes apresentando diferentes propriedades.

No início do ano de 1903, Mikhail Tswett usou colunas de adsorção de líquidos para separar pigmentos vegetais (por exemplo, clorofilas). As soluções eram passadas através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio finamente dividido; o material poroso interagiu de forma diferente com os componentes da mistura, de forma que estes se separaram em distintas bandas ao longo da coluna.

Os primeiros equipamentos de cromatografia de gases apareceram no mercado na metade do século XX. Por sua vez, a cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) começou a desenvolver-se a partir de 1960, aumentando sua importância nas décadas seguintes, até converter-se na técnica cromatográfica mais empregada. Sem dúvida, isso se irá modificando com o passar dos anos.

A cromatografia em coluna usa atualmente uma grande variedade de adsorventes sólidos, incluindo sílica, alumina e sílica gel. Os líquidos também podem ser adsorvidos por estes sólidos e assim atuarem como adsorventes - num processo chamado de cromatografia de partição - que permite aos químicos construir colunas com propriedades muito diferentes para utilizações particulares. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, ou HPLC do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), uma variável desta técnica que hoje tem uso bastante comum, promove a adsorção de líquidos em partículas extremamente pequenas e uniformes para promover alta sensibilidade. Uma bomba é requerida para levar a mistura até a coluna.



Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE)
High Performance Liquid Chromatograph (HPLC)

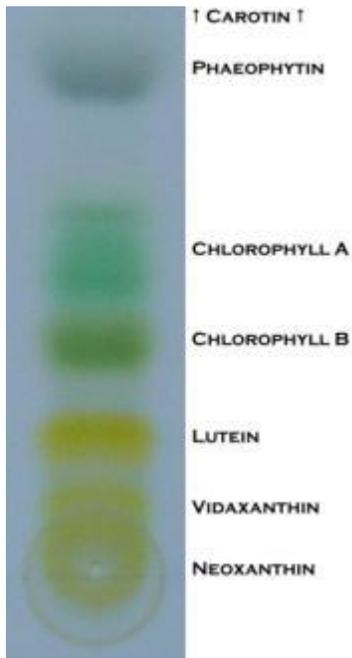
A Separação de Compostos por Cromatografia

Suponha você tenha uma mistura de compostos. Seria possível separar uns dos outros? Você pode pensar em uma maneira? Você certamente não pode catá-los à mão! O método que os cientistas usam para agrupar os diferentes componentes de uma mistura é conhecido como cromatografia. Assim, é possível separar algumas misturas em cerca de minutos com papel e água! Quando o papel é usado na separação de uma mistura, a técnica é conhecida como cromatografia em papel.

A cromatografia funciona graças ao fato das moléculas possuírem uma propriedade chamada polaridade em comum e tenderem a se atrair mutuamente. Uma molécula polar é simplesmente aquela que possui uma região rica em elétrons e uma outra região que é pobre em elétrons. Estas regiões às vezes são representadas como sendo negativamente e positivamente carregadas, respectivamente. Moléculas polares são unidas por forças de atração entre cargas opostas de moléculas diferentes. Moléculas de água têm regiões ricas em elétrons nos átomos de oxigênio e regiões pobres em elétrons nos átomos de hidrogênio. Assim, as moléculas de água são polares e, por conseguinte, organizam-se de maneira que a região de carga positiva de uma molécula é atraída pela região de carga negativa de outra. Estas interações provêm uma explicação para o elevado ponto de ebulição da água. A água (H_2O) é uma molécula muito mais simples que o etanol (H_3C-H_2C-OH), mas tem um ponto de ebulição muito mais alto - etanol = $46^{\circ}C$; água = $100^{\circ}C$, 1atm.

A cromatografia é uma técnica da química analítica utilizada para a separação de misturas e substâncias. De maneira mais completa, a técnica baseia-se no princípio da adsorção seletiva (que não deve ser confundida com absorção), um tipo de adesão. A técnica foi descoberta em 1906 pelo botânico italiano naturalizado russo Mikahail Tswett, mas não foi largamente utilizada até os anos 30. Tswett separou pigmentos de plantas (clorofilas) adicionando um extrato de folhas verdes em éter de petróleo sobre uma coluna com carbonato de cálcio em pó em um tubo de vidro vertical. Enquanto a solução percolou através da coluna os componentes individuais da mistura migraram para baixo em taxas

diferentes de velocidades e então a coluna apresentou-se marcada com gradientes horizontais de cores. A esse gradiente deu-se o nome de *cromatograma*.



separação de clorofilas mediante cromatografia em papel

O exemplo de cromatografia mais clássico é a *cromatografia em papel*. Neste tipo de cromatografia, uma amostra líquida flui por uma tira de papel adsorvente vertical, onde os componentes depositam-se em locais específicos. O papel é composto por moléculas extremamente longas chamadas *celulose*. A celulose é um polímero, o que significa que ela é composta por milhares de moléculas menores que se organizam juntas. Esta organização molecular que compõe as cadeias de celulose é polar e, como resultado, a celulose tem muitas regiões de altas e baixas densidades de elétrons. As regiões "carregadas" em uma cadeia de celulose são atraídas para as regiões de cargas opostas de outras cadeias adjacentes, e isto ajuda a unir as fibras de papel. O fato das longas cadeias de celulose serem alinhadas em uma direção pode ser demonstrado rasgando um pedaço de jornal. Perceber-se-á que aquele jornal rasga facilmente e ao longo de uma linha bastante reta, se rasgado em uma direção, mas quando rasgado a um ângulo de 90°; o papel não rasgará facilmente ao longo de uma linha reta. Pelo que foi dito até agora, você poderia estar pensando que só são moléculas polares aquelas idênticas entre si. Mas o que acontece quando você mergulha uma das pontas de uma tira de papel, como um filtro de café, em uma xícara de água? A água realmente escala o papel! Este processo acontece porque as moléculas polares de água que estão em contato com a tira de filtro de café começam a subir pelas fibras do papel (por efeitos de micro-capilaridade) conforme acham novas regiões de celulose carregadas para interagir e são substituídas por outras moléculas de água na xícara, que vem de baixo.

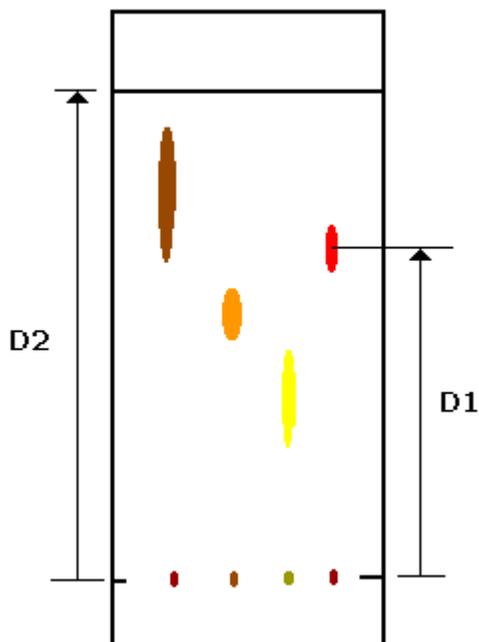
Misturas de tinturas são usadas para fazer tintas de cores diferentes. Cada tintura individual é composta por uma combinação diferente. Suponha que você tocou de leve o fim de uma tira de papel com uma caneta tinteiro preta. O que aconteceria se você mergulhasse então o fim desta tira de papel na xícara de água, assegurando-se de que a marca de caneta esteja sobre o nível de água? A água escalaria o papel como antes, mas a tinta também seria levada pela água através do papel. De fato, as tinturas diferentes da tinta original seriam arrastadas para cima no papel, em extensões diferentes que dependem se elas forem mais atraídas pelas moléculas de celulose do papel ou pela água que caminha por ele. Eventualmente todas as tinturas diferentes que compunham a tinta original seriam separadas umas das outras.

Cromatografia de aminoácidos em papel

Na cromatografia em papel, por exemplo, a resolução de uma mistura de solutos sobre um papel de filtro pode depender de uma variedade de fenômenos, tais como adsorção à superfície do papel, troca iônica ou na partição entre solventes.

Embora os efeitos de adsorção e de troca iônica possam estar presentes em maior ou menor extensão em todos os procedimentos cromatográficos realizados com papel de filtro, o fator predominante é usualmente o de **partição da mistura de soluto** a ser fracionada entre duas fases imiscíveis. Nos trabalhos iniciais realizados com a separação de misturas de aminoácidos, foi encontrado que as melhores separações eram obtidas com solventes que eram apenas parcialmente miscíveis com água. Após o equilíbrio do papel com o vapor de um solvente saturado com água, o desenvolvimento do solvente produz a separação.

Os aminoácidos podem ser separados por cromatografia em papel devido a sua solubilidade que os diferentes tipos desta substância apresentam pela água de hidratação ao redor das fibras de celulose e pela fase orgânica móvel que flui através destas fibras. A solubilidade relativa dos aminoácidos nestas duas fases pode ser mudada por alterações na polaridade do solvente, ou no pH da solução, o qual irá alterar o estado iônico dos aminoácidos. Sob um conjunto adequado de condições, então, cada molécula de uma mistura irá se deslocar a uma diferente velocidade sobre a fase estacionária e estará a uma distância específica de um do ponto de origem, quando cessar o fluxo de solvente. Este fenômeno pode ser convenientemente expresso como um **fator de retardo** ou **fator de retenção** (R_f), definido como:



$$R_f = \frac{\text{distância da amostra (D1)}}{\text{distância da frente do solvente (D2)}}$$

Assim, se duas amostras da mesma molécula (uma conhecida, usada como padrão, e outra desconhecida) são analisadas sob condições idênticas, ambas terão o mesmo R_f . Esta razão será também diferente (de forma ideal) do R_f de qualquer outra molécula presente na mistura, suportando, desta forma, a identificação do desconhecido. Um princípio básico dos processos cromatográficos é que uma **diferença** de R_f é considerada como *prova* de que as amostras são diferentes, entretanto valores **idênticos** apenas *suportam* a **identidade** dos compostos, porque duas diferentes estruturas podem ter o mesmo R_f sob um determinado conjunto de condições.

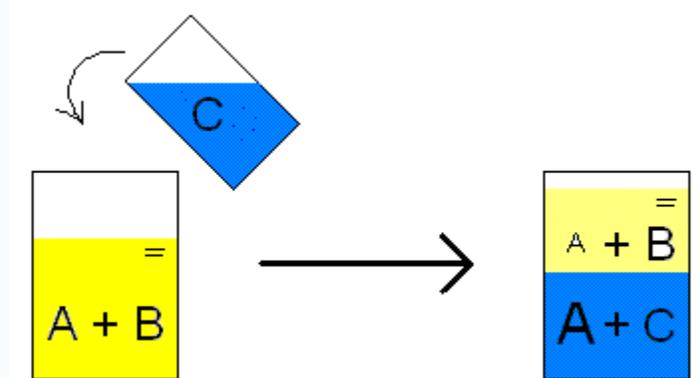
A cromatografia em papel é uma das técnicas mais simples e que requerem menos instrumentos para realização, porém também apresenta as maiores restrições para realização em termos analíticos.

As técnicas cromatográficas são essenciais para a separação de substâncias puras de misturas complexas e são amplamente utilizadas nas análises de alimentos, drogas, sangue, produtos derivados de petróleo e produtos de fissão nuclear.

II. Extração Líquido-Líquido

A **extração líquido-líquido (ELL)** é um processo de separação que se utiliza da propriedade de miscibilidade de líquidos. Por exemplo, em uma situação onde temos dois líquidos, A e B, miscíveis entre si, e queremos separar A de B, podemos usar um terceiro líquido, C, que seja mais miscível com A do que com B (veja figura). A separação entre o **extrato**, A e C, e o **refinado**, A e B, é feita com uma ampola de decantação ou um funil de separação. O refinado pode ser mais purificado com etapas adicionais sucessivas de

extração líquido-líquido. A recuperação de A a partir do extrato é geralmente feita por destilação.



Utilização

A ELL (extração líquido-líquido) ou extração é empregada como alternativa a outros processos de separação, quando estes não são recomendáveis ou não são viáveis. Desta forma, aparece como alternativa a processos como a destilação de componentes com volatilidade relativas muito próximas da unidade ($\alpha=1$) e a destilação de componentes termo-sensíveis.

Vantagens

- Processo realizado à temperatura ambiente ou temperatura moderada;
- Possibilidade de utilização de solventes com boa capacidade de extração ou seletivos;
- Possibilita controle de pH, força iônica e temperatura, de forma a evitar a desnaturação de enzimas e proteínas (sistemas aquosos bifásicos de biomoléculas);

Desvantagem

- A ELL gera produtos intermediários (transfere-se o soluto A do solvente B para outro solvente C) e portanto será necessário utilizar um outro processo posteriormente (p.ex. destilação, evaporação) para obter o soluto A, livre do solvente C.

Extração de Produtos Naturais a partir de Vegetais

Existem diversas maneiras de se extrair substâncias a partir de vegetais. O método da escolha depende das propriedades físicas e químicas das substâncias existentes no vegetal. Nos casos em que se deseja extrair substâncias voláteis (pressão de vapor alta, ou seja, de 5 a 10 mmHg a 100°C), o método mais indicado é o do arraste por vapor.

Para se extrair substâncias orgânicas ou líquidas (poucos voláteis), o método mais comumente usado é o da extração por solvente. Esse método se baseia simplesmente na maior solubilidade de certos compostos orgânicos em determinados solventes. Assim, os compostos pouco polares (hidrocarbonetos) são mais solúveis em solventes pouco polares (hexano, éter de petróleo); os compostos de polaridade média (álcoois, aldeídos, cetonas) são solúveis em solventes mais polares (acetona, benzeno, diclorometano); já os compostos muito polares (ácidos, aminas, poliálcoois, etc.) são mais solúveis em solventes muito polares (metanol, etanol, etc.).

Esse método de extração de substâncias é usado em uma área da Química, denominada “Química de Produtos Naturais”. Quando um químico deseja saber quais substâncias uma determinada planta contém, ele submete partes da planta (caule, folhas, casca) a um tratamento com solventes de polaridades diversas e analisa, posteriormente, as substâncias extraídas. Por outro lado, quando se deseja extrair de uma determinada planta uma substância que se conhece, o tratamento é feito com um solvente no qual a substância é muito mais solúvel. Esse processo também retira da planta outras substâncias e o químico tem que executar então, processos para purificar a substância desejada.

Extração por Solventes

Quando as partes de um vegetal são tratadas com um solvente é possível extrair substâncias que são solúveis no solvente utilizado. Esse processo é um exemplo de uma extração por solventes, que em geral, fornece uma solução contendo um número muito grande de composto.

Trabalhos feitos por diversos pesquisadores (inspirado pelo hábito popular de tomar chá ou café) mostraram que a cafeína é solúvel em água quente. Assim, ao se aquecer água na presença de um vegetal que contém cafeína, esta é extraída do vegetal e fica dissolvida na água. Esse processo é outro exemplo de uma extração por solvente. O extrato contém, além de cafeína, outras substâncias dissolvidas e dispersadas. Para obter a substância cafeína, torna-se necessário submeter o extrato aquoso a outros processos de separação.

Novamente, a extração por solventes pode ser utilizada para se retirar a cafeína do extrato aquoso. A extração por solvente pode, então, ser definida como um processo para a separação de um dado composto de um material, mistura ou solução, por meio de um solvente. Na prática, o maior emprego da extração se faz nos casos em que se quer retirar um composto orgânico de uma solução (mistura ou suspensão) aquosa.

Nesse caso, o processo consiste em agitar o sistema aquoso com um solvente orgânico imiscível em água e, em seguida, deixar as duas fases se separarem (fase aquosa e fase Orgânica). Os vários compostos presentes então, se distribuem entre as duas fases de acordo com suas solubilidades relativas.

Assim, os sais inorgânicos, que são inteiramente insolúveis em certos solventes orgânicos mais comuns (tais como éter etílico, benzeno, clorofórmio, diclorometano, etc.), irão permanecer na fase aquosa. Por sua vez, os compostos orgânicos pouco polares e não formadores de pontes de hidrogênio irão se transferir para a fase orgânica.

Os compostos orgânicos capazes de formar pontes de hidrogênio com a água, tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres e aminas são parcialmente solúveis em água e a eficiência da extração vai depender do coeficiente de partição (K_D), definido como:

$$K_D = C_{\text{org}}/C_{\text{água}}$$

onde C_{org} será a concentração do composto orgânico na fase orgânica e $C_{\text{água}}$ a concentração do mesmo composto na fase aquosa, após as fases se separarem. C_{org} e $C_{\text{água}}$ são proporcionais à solubilidade do composto no solvente orgânico e na água a uma dada temperatura. Portanto, para um composto parcialmente solúvel em água, recomenda-se que sua extração, a partir de uma fase aquosa, seja feita por extrações sucessivas.

Referências Bibliográficas:

Silva, R. R., Bocchi, N. & Rocha Filho, R. C. "Introdução à Química Experimental". São Paulo:McGraw-Hill, 1990. p. 206-209.

[http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatografia/Processos de Separación](http://es.wikipedia.org/wiki/Cromatografia/Processos_de_Separación)

[http://wikipedia.org/wiki/Extração líquido-líquido](http://wikipedia.org/wiki/Extração_líquido-líquido)

Robert Becker, John Ihde, Kersti Cox e Jerry Sarquis, "Diário da Educação em Química," Vol. 69, nº 12; p. 979-980.

<http://br.geocities.com/chemicalnet/cromatografia.htm>

http://server2.iq.ufrj.br/~joab/iqb201/tutorial/cromatografia/cromatografia_em_papel.html

Relatos de Sala de Aula/QUIMICA NOVA NA ESCOLA Nº 17, Maio de 2003.