



Separação de pigmentos naturais por cromatografia em coluna: proposta de um experimento fácil e rápido

Luciana Araújo Xavier¹, Edineide Cristina A. de Souza ¹ e Elenilda de Lima Rebouças¹

¹Técnicas em laboratório na área de Química, Departamento de química, Universidade Federal Roraima, Boa Vista- RR

tecnicasdquimica.ufrr@gmail.com

Abstract. *Column chromatography is an experiment that makes it possible to discuss different chemical contents, however, it requires an extensive period of time. In this perspective, this article proposes an experiment involving the classical separation technique, chromatography in column, simple and quick realization, enabling application in disciplines of experimental organic chemistry. The results showed that the solvents used in the elution were efficient in separating bands of color well defined, resuming concepts pioneering concepts that originated the column chromatography, in addition to enable the experiment to be performed in a two hour period.*

Resumo. *A cromatografia em coluna é experimento que possibilita a discussão de diversos conteúdos de química, no entanto, requer um extenso período na sua realização. Nesta perspectiva, o objetivo deste trabalho é propor um experimento envolvendo a técnica de separação clássica, cromatografia em coluna, de fácil e rápida execução e que permite aplicação em disciplinas experimentais de química orgânica. Os resultados mostraram que os solventes empregados na eluição foram eficientes na separação de faixas de coloração bem definidas, retomando conceitos pioneiros que originaram a cromatografia em coluna, além de permitir que o experimento seja realizado em um período de duas horas.*

1. Introdução

No ensino superior a obrigatoriedade dos créditos práticos está regulamentada através da resolução do Conselho Nacional de Educação - CNE nº 02/2015 que estabelece 400 (quatrocentas) horas de prática como componente curricular, além de 200 (duzentas) horas de atividades teórico-práticas que compreende a iniciação científica, a iniciação à docência, a extensão e a monitoria, entre outras, consoante o projeto de curso da instituição.

Para o ensino de química, o desenvolvimento de atividades experimentais tem sido apresentado por vários estudos como sendo uma estratégia positiva para o processo de ensino e aprendizagem [Giordan, 1999; Galiuzzi et al. 2007; Silva, Machado e Tunes 2011; Soares et al, 2013; Novais, 2018]. A importância das práticas também é enfatizada na Lei de Diretrizes e Bases – LDB 9.394/96 em seu artigo 43, que aponta dentre as finalidades da educação superior o desenvolvimento do espírito científico e



pensamento reflexivo, além do incentivo ao trabalho de pesquisa e investigação científica, que tem por objetivo o desenvolvimento da ciência, tecnologia e da criação e difusão da cultura. Neste contexto, estas finalidades são alcançadas a partir do desenvolvimento de experimentos práticos inseridos por meio de aulas experimentais, desenvolvimento de trabalhos de conclusão de cursos no âmbito científico, bem como na inserção dos alunos em programas de iniciação científica.

As aulas experimentais como ferramenta para a inserção no universo científico possibilitam a construção do conhecimento através do desenvolvimento prático [Giordan, 1999], além da ampliação de competências como: leitura crítica do mundo e capacidade argumentativa que envolve domínio da linguagem [Luca e Santos, 2016].

Apesar de ser um componente de extrema importância, a realidade estrutural e econômica de muitas escolas e universidades públicas não favorecem a execução desta atividade. Para superar esses entraves, experimentos com materiais alternativos estão sendo empregados. Entretanto, quando se trata de ensino superior o uso de vidraria e reagentes de uso comum em laboratório possibilitará uma formação mais aprimorada, aproximando o aluno à realidade de laboratórios de pesquisa, além de acrescentar conhecimentos referentes a estes materiais e seu desenvolvimento em técnicas científicas. A cromatografia é uma técnica clássica, empregada corriqueiramente na separação de substâncias em laboratórios de pesquisa na área de química orgânica. É um método físico-químico de separação, que se baseia na migração de diferentes componentes de uma determinada mistura, que interagem entre duas fases imiscíveis [Degani, Cass, Vieira, 1998]. É um experimento que permite uma rica abordagem a diferentes conteúdos do ensino de química orgânica. No entanto, demanda um longo tempo na sua execução, fato que dificulta na aplicação em aulas experimentais, que necessitam de práticas com desenvolvimento em um período menor de tempo.

Diante das vantagens apresentadas pelo experimento de cromatografia em coluna, faz-se necessário a adequação desta técnica com o intuito de torná-la aplicável em uma aula prática. Nesse sentido, este trabalho tem por objetivo propor um experimento envolvendo a separação de pigmentos de três hortaliças, a ser desenvolvido por cromatografia em coluna com materiais tradicionalmente usados em laboratórios químicos, com fácil execução e em tempo reduzido.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

A cenoura, beterraba e folha de couve foram adquiridas no mercado local na cidade de Boa Vista-RR e armazenados em geladeira até a realização do experimento. Foram utilizados uma coluna cromatográfica com dimensões 18x390mm, tubos de ensaio com capacidade de 10mL, béquer de 50mL, bastão de vidro e erlenmeyer de 50mL, gral e pistilo. Os reagentes utilizados foram, hexano, etanol, ácido acético glacial, sulfato de sódio e sílica gel 60 para cromatografia em coluna.

2.2. Empacotamento da coluna:

Em uma coluna cromatográfica (18x390mm) foi introduzido um pequeno chumaço de algodão com auxílio de um bastão de vidro (para que a coluna contenha antes da torneira, um pequeno tampão de algodão). Pesou-se 2 g de sílica gel 60, 0,063 - 0,200mm, 70-230 MESH para cromatografia em coluna, adicionou-se cerca de 20 mL



de hexano, misturou-se com bastão de vidro para eliminar bolhas de ar. Adicionou-se toda mistura com auxílio de funil simples na coluna cromatográfica. Bateu-se levemente a coluna com os dedos para melhor sedimentação do adsorvente. Abriu-se a torneira para retirada parcial do solvente, deixando aproximadamente 1 mL de solvente acima da sílica gel.

2.3. Preparo da amostra

Cortou-se as hortaliças em pequenos pedaços e macerou-se com auxílio de um gral com pistilo, foram adicionados pequenas porções de sulfato de sódio, posteriormente o material foi submetido a secagem em estufa à 60°C por aproximadamente 10 minutos. Após a desidratação do material adicionou-se uma pequena porção de sílica gel até obter uma mistura seca e dispersa ("farofa"). Adicionou-se na coluna cromatográfica, cuidadosamente uma espátula pequena de "farofa" com auxílio de um funil simples, batendo levemente a coluna com os dedos para melhor sedimentação e distribuição uniforme do material na coluna. Adicionou-se a farofa até uma espessura aproximada de 0,3 cm.

2.4. Eluição

Após o acondicionamento da "farofa", iniciou-se a eluição, adicionando na coluna com auxílio de uma pipeta de Pasteur 3 mL de hexano. Abriu-se a torneira da coluna e iniciou-se a coleta do solvente em um erlenmeyer, continuou-se a adição aos poucos do solvente até o carreamento dos primeiros compostos, que foram coletados em um tubo de ensaio. Antes da completa eluição da fração hexânica, adicionou-se na coluna, 3 mL de álcool etílico para eluição da segunda fração. Mais 3 mL do solvente foram adicionados gradualmente até o início da coleta da fração etanólica em um segundo tubo de ensaio. Modificou-se o solvente, adicionando-se inicialmente 3mL de uma mistura álcool etílico/ácido acético (30%), o eluente foi adicionado progressivamente até a total eluição da terceira fração, coletada em um terceiro tubo de ensaio.

3. Resultados e discussões

A proposta de experimentação foi criada levando em consideração as ementas de disciplinas de química orgânica aplicadas em diferentes instituições de nível superior do Brasil, que engloba tópicos como: interações intermoleculares, polaridade das moléculas e ligações, propriedades físicas, separação e purificação de compostos orgânicos, dentre outros. A disponibilidade de materiais para execução do experimento também foi pensada, solventes grau analítico e vidrarias típicas de laboratórios foram utilizadas, o que possibilita a inserção do aluno de nível superior em um ambiente mais similar ao da pesquisa científica. No entanto, materiais alternativos podem ser usados, como descritos em outros estudos [Celeghini e Ferreira, 1998; Fonseca e Gonçalves, 2004].

A escolha das hortaliças ocorreu pela presença de pigmentos com características conhecidas e pela fácil obtenção destas matérias-primas no mercado alimentício. As matérias-primas trabalhadas foram: a cenoura que é fonte de carotenoides pró-vitamínicos A especialmente o β -caroteno (Figura 1A) [Contado et al, 2010], são compostos de cadeias longas, conhecidos como um grande grupo de pigmentos presentes na natureza, são produtos do metabolismo secundários, conferindo coloração

amarelo ou vermelha aos vegetais e até mesmo a fungos [Maldonado-Robledo et al, 2003; Rodriguez-Amaya, Kimura e Amaya-Farfan, 2008] a folha de couve com coloração verde, atribuída às clorofilas (Figura 1B) que são os pigmentos mais abundantes na plantas [Streit et al, 2005] e a beterraba com o foco nas betalaínas (Figura 1C) que estão em todos os tecidos deste tubérculo e que lhe conferem a sua coloração roxa [Kluge e Preczenhak, 2016]. Além disso, o uso de alimentos amplamente conhecidos e que facilmente se encontram na mesa dos alunos, é um motivador para despertar o interesse pela química vinculando os conteúdos teóricos e práticos com a realidade do estudante.

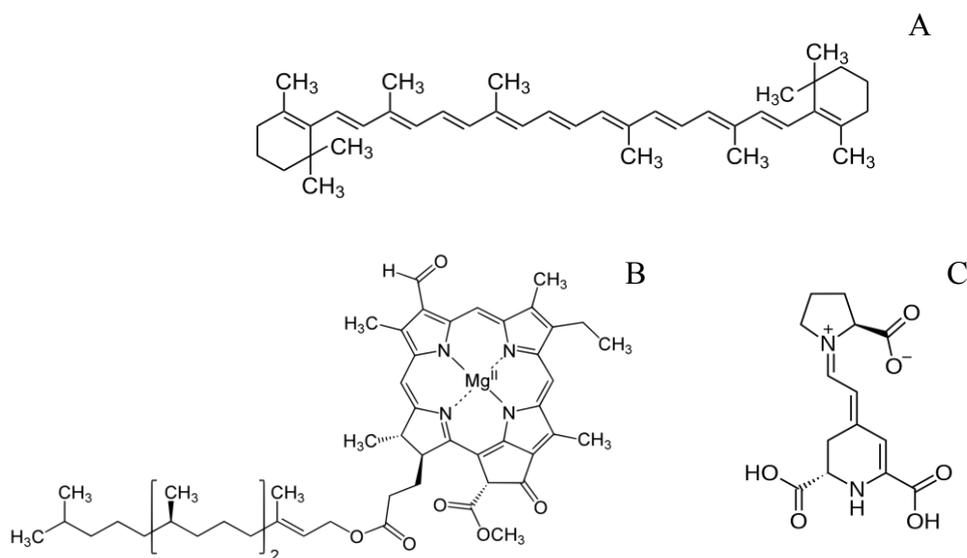


Figura 1- Estrutura química de A) β -Caroteno, B) Clorofila B e C) Indigoxantina

O empacotamento da coluna foi feito de forma que a fase estacionária se distribua homogeneamente pela coluna, o que permitiu uma maior eficiência na separação dos compostos, devido a uma interação mais uniforme dos constituintes que passavam por esta fase [Degani, Cass e Vieira, 1998]. Esta etapa do experimento, permite discussões relacionadas ao método científico inicial, como a escolha correta da fase estacionária, e a sua finalidade, sendo um material usado como suporte sólido e também participa do processo de separação por adsorção, que envolve a interação química e física das moléculas com a fase sólida e líquida.

Ao contrário do que é comumente realizado na fitoquímica, optou-se por não elaborar extratos, para facilitar a execução do experimento, desta forma, pequenas porções de cenoura, folhas de couve e beterraba foram desidratadas e, posteriormente pulverizadas, isso permitiu a obtenção de uma mistura sólida homogênea, que possibilitou a interação do solvente equitativamente por todo o material, sem interferência de agentes que prejudiquem a separação das fases, como por exemplo, a água. Nesta etapa podem ser abordados conceitos de tipos de mistura, interferências externas no experimento, propriedades da matéria, esta última sendo de fundamental importância, para evitar a realização de procedimentos que degradem a matéria estudada. Assim explica-se o porquê do uso de temperatura mais branda, do uso de produto dessecante e da necessidade de diminuir a dimensão das partículas, para haver

uma interação mais efetiva com os solventes usados (Figura 2).



Figura 2- Farofa obtida após a maceração dos vegetais com a adição de sílica gel

A separação dos compostos na coluna cromatográfica ocorreu pela adição de eluentes com aumento gradativo de polaridade. Iniciou-se com um solvente de baixa polaridade, o hexano, para carrear primeiramente os compostos de baixa polaridade, posteriormente eluiu-se com álcool etílico e por fim uma mistura álcool etílico/ácido acético (30%). O uso inicial de solventes em polaridade crescente na cromatografia líquida clássica é feito para facilitar o desenvolvimento da corrida cromatográfica, pois solventes de menor polaridade apresentam menor interação com a fase estacionária de caráter polar, no caso a sílica gel, eluindo os compostos menos polares com maior fluidez pela ação da gravidade. Esta etapa do experimento possibilita uma enriquecedora discussão em torno das interações intermoleculares e de funções, orgânicas existentes entre as diferentes moléculas de todos os materiais envolvidos. Discute-se também o uso de solventes de forma isolada ou em mistura, como é o caso da mistura álcool e ácido acético usada no experimento, que facilita o carregamento da amostra na coluna, devido a menor interação desta mistura com a sílica, caso que não aconteceria com o uso de 100% de ácido acético.

A primeira fração eluída apresentou-se como uma coloração amarela na extensão da coluna (Figura 3), esta faixa pode está associada a separação dos carotenoides, presentes na cenoura. Após adição de um solvente de maior polaridade, o álcool etílico, observou-se o aparecimento de uma faixa na coluna de coloração verde (Figura 4), atribuída a extração das clorofilas, obtidas da folha de couve. A terceira fração eluída com álcool etílico/ácido acético (30%), permitiu a separação de uma faixa de coloração vermelha, proveniente da beterraba (Figura 3). A mistura de solventes possui maior polaridade, possibilitando o arraste de compostos mais polares, como é o caso dos compostos presentes na beterraba.

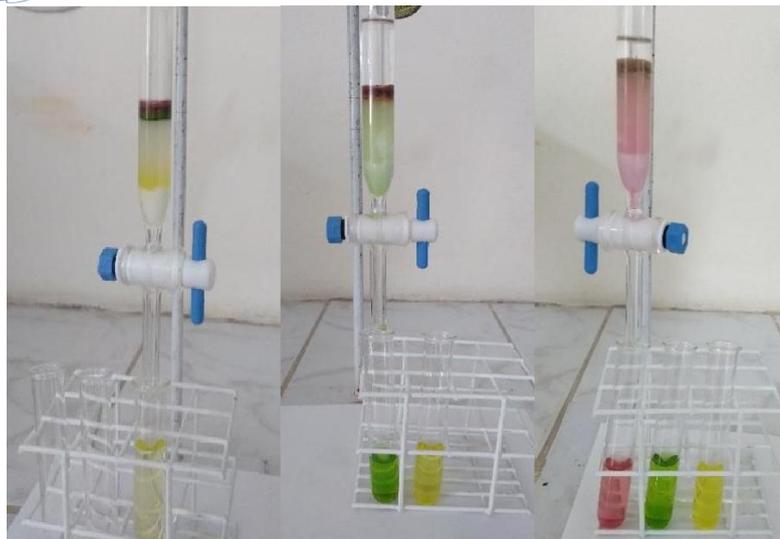


Figura 3- Fracionamento da mistura desidratada de cenoura, folhas de couve e beterraba

A técnica de cromatografia líquida clássica, apresentou-se como uma ótima alternativa para o estudo da separação destes compostos, com grande representatividade, pois inicialmente esta técnica ficou conhecida como separação de compostos pela cor, apesar de estar estabelecido que o processo não depende desta característica [Degani, Cass e Vieira, 1998].

Propostas similares de experimentos envolvendo a cromatografia já foram apresentadas, com abordagens diferenciadas, umas utilizaram materiais alternativos [Celighini e Ferreira, 1998; Freitas Filho et al., 2012], outras empregaram corantes artificiais para a separação [Carneiro e Carneiro, 2004]. A sugestão deste trabalho, é de rápida execução, considerando o uso de diferentes vegetais ricos em determinadas classes de compostos com intensa coloração, para facilitar a visualização do fracionamento, obtendo frações de coloração bem definida (Figura 4), além da diferença nas características de cada composto, que facilita discussões em relação às interações envolvidas com a fase móvel e estacionária.



Figura 4- Frações obtidas no experimento



A proposta de experimentação se adequa às demandas de disciplinas experimentais de orgânica e correlatas, pois abre caminho para diferentes discussões. Foi adaptada para a execução em tempo mínimo de 2 horas, pois não é necessária a prévia produção de extratos. A partir deste experimento podem ser geradas outras práticas complementares, como é o caso da cromatografia em camada delgada (CCD), técnica amplamente empregada e que também aborda os conteúdos já mencionados. Além disso, alterações e/ou complementações do experimento podem ser consideradas pelo professor que o conduzir, por exemplo, determinar a massa e, conseqüentemente os rendimentos das frações obtidas.

4. Conclusão

Diante dos resultados obtidos, é possível constatar que o experimento proposto, permite discussões mais profundas sobre os fenômenos físicos e químicos envolvidos no experimento, isto é facilitado pelo fato de o experimento de cromatografia em coluna, não se processar de maneira instantânea, o que provavelmente permitirá uma maior fixação dos conteúdos teóricos e práticos que estão envolvidos na aula experimental. Os materiais utilizados no experimento direcionam a aplicação em aulas experimentais de química orgânica no ensino superior, entretanto, adaptações com materiais de baixo custo podem ser testadas para tornar factível a realidade de alunos do ensino médio.

Referências

- BRASIL, (1996). “Lei de Diretrizes e Bases da Educação Nacional, n. 9.394 de 20 de Dezembro”, <https://www2.senado.leg.br/bdsf/bitstream/handle/id/70320/65.pdf>, Fevereiro.
- BRASIL, (2015). “Resolução do Conselho Nacional de Educação, n. 02 de 1º de julho”, vinculados-82187207/21028-resolucoes-do-conselho-pleno-2015, Fevereiro.
- Carneiro, E. B. B. and Carneiro, P. I. B. (2004) “Experimentos de cromatografia em coluna no ensino de graduação.” Publicatio UEPG Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias, Ponta Grossa, 10 (2): 15-21.
- Celeghini, R. M. S. and Ferreira, L. H. (1998) “Preparação de uma coluna cromatográfica com areia e mármore e seu uso na separação de pigmentos.” Química Nova na Escola, nº 7.
- Contado, E. W. N. F., Patto, L. S., Rocha, D. A.; Abreu, C. M. P.; Corrêa, A. D., Santos, C. D. (2010) “Estudo dos métodos de extração de carotenóides em cenoura por fluido supercrítico (efs) e convencional.” Ciência agrotecnologia, Lavras, v. 34, Edição Especial, p. 1617-1623.
- Degani, A. L. G., Cass, Q. B., Vieira, P. C. (1998) “Cromatografia um breve ensaio.” Química Nova na Escola, nº 7.
- Fonseca, S. F. and Gonçalves, C. C.S. (2004) “Extração de pigmentos do espinafre e separação em coluna de açúcar comercial.” Química Nova na Escola, nº 20.



Freitas Filho, J. R., Freitas, J. J. R., Silva, L. P., Freitas, J. C. R. (2012) “Investigando cinza da casca do arroz como fase estacionária em cromatografia: uma proposta de aula experimental nos cursos de graduação.” Química Nova, v. 35, nº. 2, 416-419.

Galiazzi, M. C.; Martins, B. B.; Nunes, M. T. O. ; Ruffato, G. P.; Madeira, V. C. D. ; Bulhosa, M. C. S. (2007). “A Experimentação na Aula de Química: uma aposta na abordagem histórico-cultural para a aprendizagem do discurso químico.” In: Galiazzi, M. C, Auth, M., Moraes, R., Mancuso, R.: (Org.). Construção Curricular em Rede na Educação em Ciências: uma aposta de pesquisa na sala de aula. 1ª ed. Ijuí: Unijuí, v. 1, p. 375-390.

Giordan, M. (1999) “O Papel da experimentação no ensino de ciências.” Química Nova na Escola, n.10.

Kluge, R. A. and Preczenhak, A. P. (2016) “Betalaínas em beterraba minimamente processada: perdas e formas de preservação.” Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, n. 2, v. 17.

Luca, A. G.; Santos, S. A.(2016). “A experimentação contextualizada e interdisciplinar como promotora da escrita e da leitura na construção de conceitos científicos”. In: II Colbeduca. 5 e 6 de setembro de 2016 – Joinville,SC, Brasil

Maldonado-Robledo, G., Rodríguez-Bustamante, E., Angeles, S. C., Rodriguez-Sanoja, R., Sánchez, S. (2003) “Production of tobacco aroma from lutein. Specific role of the microorganisms involved in the process.” Applied microbiology and biotechnology., v.62,p. 484-8.

Novais, M. R. (2018). “Experimentação no ensino de química: analisando reflexões de licenciados durante uma disciplina de prática de ensino.” Rede Latino-Americana de Pesquisa em Educação – ReLAPEQ, v.2, n.02, p. 24-50.

Rodriguez-Amaya, D. B., Kimura, M., Amaya-Farfan, J. (2008) “Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos.” Organizadores: Lidio Coradin e Vivian Beck Pombo, Brasília: MMA/SBF.

Silva, R. R.; Machado, P. F. L.; Tunes, E. (2011). “Experimentar sem medo de errar.” In: Santos, W. L. P. e Maldaner, O. A. (Org.). Ensino de Química em Foco. Ijuí: Editora Unijuí, p. 231- 262.

Soares, A. B.; Munchen, S.; Adaime, M. B. (2013). “Uma análise da importância da experimentação em química no primeiro ano do ensino médio”, <https://www.publicacoeseventos.unijui.edu.br/index.php/edeq/article/view/2807>, Fevereiro.

Streit, N. M., Canterle, L. P., Canto, M. W., Hecktheuer, L. H. H.(2005) “As clorofilas.” Ciência Rural, nº 3, v. 35, p. 748-755.