

## Investigando a cinza da casca do arroz como fase estacionária em cromatografia: Uma proposta para aulas de Química Orgânica Experimental na Graduação

João R de Freitas Filho (PQ)<sup>1</sup>, Jucleiton José Rufino de Freitas (IC)<sup>2</sup>, Felipe Ragner Lima Lino (IC)<sup>1</sup>, Juliano C Rufino de Freitas (PG)<sup>3</sup>, Ladjane Pereira da Silva (PG)<sup>2</sup> e João Sales de Souza Filho (TC)<sup>1</sup>. joãoveronice@yahoo.com.br.

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE – Unidade Acadêmica de Garanhuns/UAG.

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

*Palavras-Chave: Cromatografia, pigmentos, experimentos.*

**Resumo:** Este trabalho descreve um experimento de cromatografia em camada delgada e em coluna de quatro horas, separando uma mistura de pigmentos das folhas de espinafre. No experimento usou-se a sílica extraída da cinza da casca do arroz como fase estacionária. O experimento permitiu ilustrar conceitos de solubilidade, polaridade, coeficiente de partição, adsorção e fator de retenção ( $R_f$ ), 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 éter de petróleo foi o solvente adequado e foi utilizado nos experimentos de cromatografia em coluna.

### INTRODUÇÃO

A cromatografia é uma técnica utilizada para separação dos componentes de uma mistura, no qual os componentes a serem separados distribuem-se em duas fases: fase estacionária e fase móvel (Fonseca e Gonçalves, 2004). A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido disposto sobre um suporte sólido com grande área superficial. A fase móvel, que pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico, passa sobre a fase estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura. É uma técnica de separação especialmente adequada para ilustrar os conceitos de interações intermoleculares, polaridade e propriedades de funções orgânicas, com uma abordagem ilustrativa e relevante.

Segundo Ribeiro e Nunes (2008), a cromatografia é uma técnica de separação especialmente adequada para ilustrar os conceitos de interações intermoleculares, polaridade e propriedades de funções orgânicas, com uma abordagem ilustrativa e relevante.

Segundo Degani et al (1998) A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura. Existem diferentes formas de cromatografia, a saber: cromatografia em coluna, cromatografia planar (cromatografia em papel, à cromatografia por centrifugação e à cromatografia em camada delgada), cromatografia gasosa, cromatografia líquida (que pode ser cromatografia líquida clássica - CLC e cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE) e a cromatografia supercrítica (CSC). Nosso trabalho os experimentos serão realizados utilizando a cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada (CCD).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido – sólido. Nesse caso, a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. O parâmetro mais importante a ser considerado em CCD é o fator de retenção ( $R_f$ ), o qual é a razão entre a distância percorrida pela

substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Os valores ideais para  $R_f$  estão entre 0,4 e 0,6.

A CCD pode ser usada tanto na escala analítica quanto na preparativa. Normalmente as placas utilizadas são de vidro, com espessura de 3 a 4 mm. Placas analíticas usualmente têm 10 cm x 2,5 cm e preparativas 20 cm x 20 cm.

A cromatografia em coluna é uma técnica muito utilizada para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas. A principal etapa ao se utilizar essa técnica é o empacotamento, o qual, entre outros fatores, definirá a eficiência da separação.

A sílica gel é a fase estacionária mais utilizada, sendo seguida pela alumina, tanto na cromatografia em camada delgada quanto cromatografia em coluna. Para a preparação das placas, faz-se uma suspensão do adsorvente em água, sendo a mesma depositada sobre a placa manualmente ou com o auxílio de um espalhador. Após a deposição, deixa-se a placa secar ao ar. A etapa final da preparação da placa é sua ativação. A sílica, por exemplo, é ativada a 105-110 °C por 30 a 60 minutos. A espessura da camada de sílica a ser depositada é de 0,25 mm para placas analíticas e de 1,0 mm para placas preparativas.

Na cromatografia em coluna, enquanto a alumina é empacotada em sua forma original, a sílica deve sê-lo na forma de suspensão. Sabe-se entretanto que a sílica gel tem custo elevado. Mediante isto estamos propondo a utilização da sílica extraída da cinza da casca do arroz.

A casca do arroz é um material fibroso, composto basicamente por celulose, lignina e matéria orgânica. A principal utilização desse rejeito é na geração de energia térmica, entretanto desse uso é gerado um resíduo negro, de difícil degradação e com alto teor de silício que, se depositado de maneira incorreta, pode causar danos ao meio ambiente e aos seres humanos. (Della et al., 2006)

Durante o processo de beneficiamento do arroz, resulta como subproduto a casca de arroz, que representa cerca de 23% do peso do arroz. Esta casca devido a sua alta dureza, fibrosidade e natureza abrasiva, leva a obtenção de produtos de baixa propriedade nutritiva, boa resistência ao desgaste e muita cinza (Fonseca, 1999). Atualmente, parte desta casca está sendo utilizada na fabricação de blocos e painéis empregados na construção civil, onde substitui a fibra de madeira comumente utilizada (Santos, 1997). Uma grande quantidade desta casca é reaproveitada dentro da própria usina de beneficiamento do arroz onde, a partir da sua combustão, é gerado calor para a parboilização dos grãos. Como resíduo desta combustão, é produzida a cinza de casca de arroz. Esta cinza, até então útil somente para estabilização de solos (ainda sem comprovação técnica) e aterros sanitários, devido ao seu elevado teor de óxido de silício, está sendo utilizado, segundo Fonseca (1999), na fabricação de vidros, isolantes térmicos, tijolos prensados e materiais refratários, bem como na produção de cimento portland e na forma de agregado em argamassas e concretos (Santos, 1997).

Se a cinza da casca de arroz for aquecida para eliminar o carbono residual, pode-se obter aproximadamente 95% de sílica pura ( $\text{SiO}_2$ ). Este processo é relativamente simples e barato e pode vir a substituir a sílica gel comercializada a alta custo. Por outro lado, se essa cinza for descartada no meio ambiente, provocará poluição, pois se sabe que a cinza gerada na combustão apresenta certa quantidade de carbono residual, que é um grave poluente para o solo. Fica evidente que seu aproveitamento adequado resultará em benefício ao processo de conservação ambiental.

Diante do exposto neste trabalho propomos a utilização da cinza da casca de arroz (após tratamento para eliminação do carbono residual e outros materiais

orgânicos e inorgânicos) como fase estacionária para separação os diferentes pigmentos das folhas de espinafre fresco. Utilizamos cinza de arroz, tanto para preparação da coluna como também para preparar placas analíticas, pois realizar experimentos de cromatografia em aula experimental, em turmas de graduação apresenta uma série de dificuldades, como o alto custo da sílica gel e das placas analíticas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais e reagentes

Coluna cromatográfica ou Bureta de 10 mL ou seringa plástica; folhas de espinafre fresco; béqueres de 20 mL (ou copo de vidro transparente ou frasco da nestlé); béquer de 400 mL; algodão; papel de filtro; chapa de aquecimento ou lamparina, suporte universal, garra, pipeta de Pasteur ou conta-gotas, vidro de relógio de 4 cm de diâmetro (ou pires), proveta, funil de separação ( ou seringa de plástica com , peneira fina de cozinha, 50 g de cinzas de arroz, gral com pistilo, .massa corrida usada na construção, álcool, éter de petróleo, lâmina, ácido muriático, água destilada, cuba cromatográfica ou vidro de maionese de 250 g com tampa ou copo transparente, tubo de ensaio, mufla, capilar ou a parte fina da pipeta de Pasteur.

### Procedimentos experimentais

#### ***Parte 1 — Preparação do suporte para fase estacionária***

Coloque 50g de cinza da casca de arroz em uma cápsula de porcelana e aqueça em mufla a uma temperatura de 700 °C por 24 horas.

Lave o produto obtido até que a água de lavagem saia limpa. Coloque o produto obtido no béquer de 400 mL e adicione o ácido muriático até que todo o produto seja coberto. Deixe em repouso com o béquer coberto por pelo menos um dia. Lave o produto até que todo o ácido seja eliminado e deixe secar. Depois de seca a areia, passe-a pela peneira.

OBS: Ao usar o ácido muriático alguns cuidados devem ser tomados como: manipulação em local ventilado; sempre utilizar de óculos de segurança; pois ele pode causar graves queimaduras, pois seus vapores são extremamente irritantes para a pele, os olhos e o sistema respiratório.

#### ***Parte 2 — Empacotamento da coluna***

Coloque um pequeno pedaço de algodão dentro da coluna ou bureta (o suficiente para impedir a passagem da sílica, obtida da cinza pela torneira). Adicione a sílica obtida na coluna ou bureta até 10 cm do topo. Esse espaço será utilizado como reservatório de solvente. Coloque o solvente adequado na bureta (éter de petróleo para separação dos pigmentos menos polares e sistema éter de petróleo – álcool, 9:1 para os pigmentos mais polares). Observe que o ar contido entre a sílica irá sendo eliminado até que comece a gotejar o solvente pela torneira. Nunca deixe a coluna ou bureta secar. Se necessário, adicione mais solvente. Mesmo após a completa eliminação do ar, mantenha o fluxo até que o nível de solvente fique bem próximo à fase sólida (sílica). Feche a torneira da coluna bureta ou introduza a solução preparada, conforme descrito na Parte 2. Esse processo é denominado empacotamento da coluna, pois a

fase sólida (fase estacionária) terá suas partículas acomodadas de maneira a evitar uma distribuição muito heterogênea pela coluna e, conseqüentemente, promover um aumento no número de pratos teóricos, assim como ocorre em uma destilação fracionada.

### **Parte 3 — Preparação de placas analíticas (ccd)**

Para a preparação das placas, fez-se uma suspensão do adsorvente em água (mistura de 3g sílica obtida das cinzas de arroz e 0,5g massa corrida usada na construção civil), sendo a mesma depositada sobre a placa manualmente. Após a deposição, deixou-se a placa secar ao ar. A etapa final da preparação da placa foi a ativação. A sílica, por exemplo, é ativada a 105-110 °C por 30 a 60 minutos. No nosso caso deixamos ativar por 16 horas. A espessura da camada de sílica a ser depositada foi de 0,25 mm. As placas foram confeccionadas com dimensões de 2,5 por 7,5 cm, utilizando lâminas descartáveis.

### **Parte 4 — Preparação das amostras**

Folhas de espinafre fresco foram picados em pedaços pequenos. Foram pesados cerca de 30 g, aos quais foram adicionados 10 mL de etanol e 30 mL de éter de petróleo. As misturas foram maceradas separadamente, em gral de porcelana com pistilo, e deixadas em repouso por 1 hora. Após esse período, a mistura foi filtrada em funil comum, com papel de filtro pregueado Whatmann nº 1 e, em seguida, as fases aquosas dos filtrados foram separadas em funil de separação, resultando cerca de 20 mL da fase de éter de petróleo. A amostra foi concentrada até o volume de 1 mL, com aquecimento em banho-maria mantido a 70 °C e sob agitação.

### **Parte 5 — Aplicação da amostra e preparação da cuba cromatográfica**

O concentrado resultante do extrato foi aplicado em uma placa analítica com dimensões de 2,5 por 7,5 cm. Duas gotas da amostra foi aplicada em ponto diferentes, com um capilar, próxima à base da placa (cerca de 1 cm acima da borda), cuidando para que o diâmetro da mancha não ultrapassasse 0,5 cm.

A cuba cromatográfica foi preparada com um recipiente cilíndrico de vidro com tampa (um béquer ou copo transparente) e contendo um pedaço de papel de filtro embebido com fase móvel, deixando a atmosfera interna do recipiente saturada com vapores da fase móvel para facilitar a “corrida” cromatográfica (desenvolvimento do cromatograma).

Após a evaporação do solvente no qual a amostra estava diluída para aplicação, a placa analítica (ccd) foi posicionada na cuba cromatográfica de modo que o nível da fase móvel ficasse abaixo do ponto onde a amostra havia sido aplicada. O extrato aplicado foi eluído com éter de petróleo com 10% de etanol.

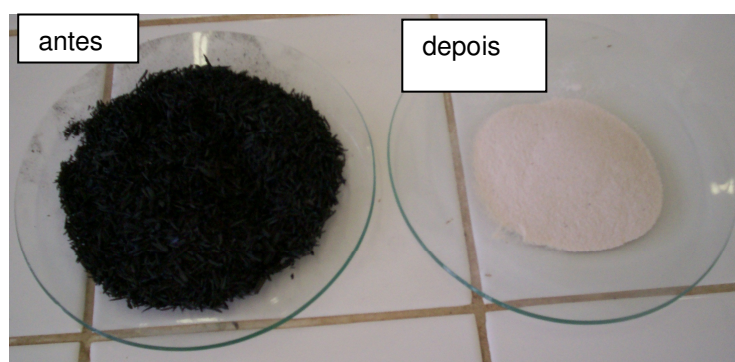
### **Parte 6 — Aplicação da amostra na coluna e separação cromatográfica**

Adicione o extrato obtido anteriormente à coluna empacotada e abra a torneira da coluna ou bureta até que ocorra a penetração da amostra na fase estacionária. Adicione o solvente adequado (conforme descrito acima) à amostra adicionada à coluna. Observe que os pigmentos irão se separando à medida que percolam pela coluna. Assim que um dos pigmentos atingirem a saída da coluna, troque o tubo de

ensaio (ou frasco da nestlé) por um outro limpo e recolha essa fração. Os outros pigmentos deverão ser coletados em tubos diferentes. Para obtenção de cada pigmento puro, basta evaporar o solvente em condições brandas de calor.

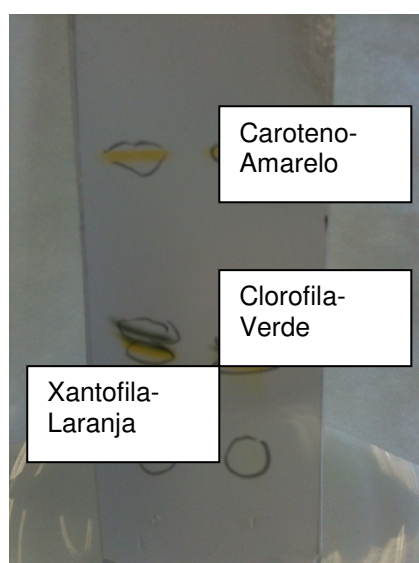
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sílica usada no empacotamento da coluna e na confecção das placas preparativas foi obtida da cinza da casca de arroz após tratamento de aquecimento para retirada do carbono residual e lavagem com ácido para eliminação de outros constituintes orgânicos e inorgânicos. A figura 1 mostra-nos o antes e depois do tratamento da cinza da casca de arroz.



**Figura 1:** Sílica obtida da cinza da casca de arroz após 18 de aquecimento em mufla a uma temperatura de 700 0C e lavagem com ácido muriático e água destilada.

O extrato de folhas de espinafre fresco foi obtido por maceração com éter de petróleo/ e um pouco de etanol comercial. A fase aquosa, contendo etanol, foi separada e a fase extrato/reter de petróleo foi “secada” com sulfato de sódio anidro durante alguns minutos (uma vez que usamos álcool comercial) e aplicada dois pontos em uma placa analítica confeccionada com sílica, extraída da cinza de casca de arroz (ccd).. Os experimentos de cromatografia em camada delgada indicaram o sistema éter de petróleo – etanol (9:1) como o eluente para corrida e separação dos produtos, conforme figura 2.



**Figura 2:** Cromatograma em camada delgada. Eluente: éter de petróleo-etanol (9:1).

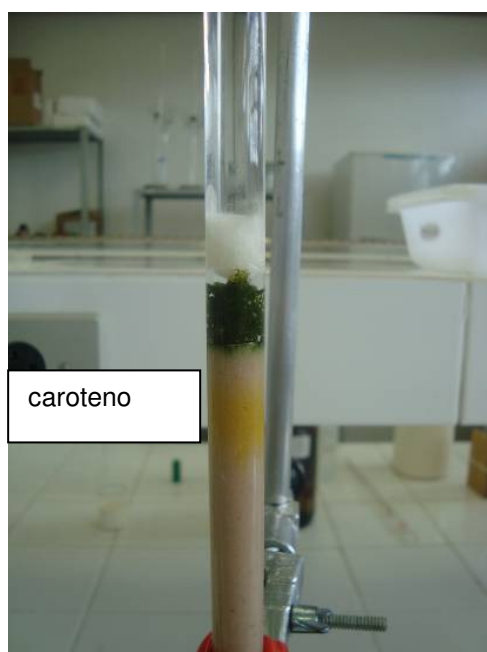
Após realização do cromatograma partimos para o empacotamento da coluna, o mesmo foi realizado usando éter de petróleo. A fase estacionária usada no experimento foi sílica extraída da cinza da casca do arroz, e a fase móvel (eluente) inicial utilizada foi o éter de petróleo usado na extração.

Por cromatografia em coluna, usando cinza da casca de arroz, previamente tratada, foi possível isolar com pureza aceitável dois pigmentos de cor amarela a  $R_f \approx 0.95$  e  $0.46$  e um pigmento de cor esverdeada a  $0.53$ .

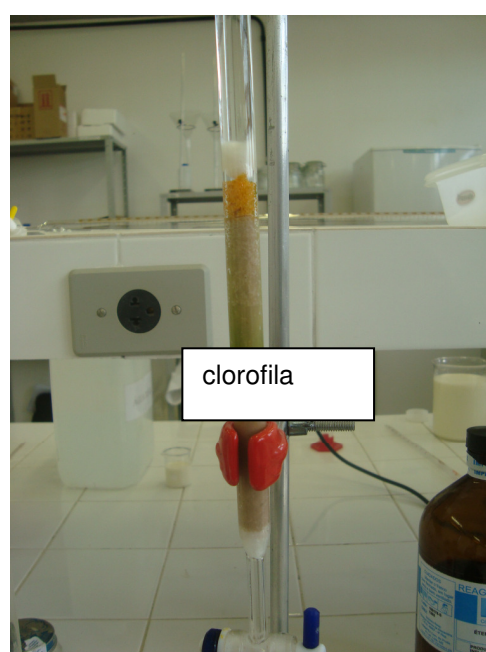
O caroteno cujo  $R_f$  foi  $0,95$  foi isolado primeiro. Os carotenos, como o  $\beta$ -caroteno, são hidrocarbonetos apolares, nos quais prevalecem interações do tipo forças de London (forças de atração entre dipolos temporários). Têm pouca afinidade com a fase estacionária e maior afinidade com a fase móvel utilizada nesse experimento, o mesmo foi isolado com éter de petróleo. Esses hidrocarbonetos devem, portanto, ser eluídos com facilidade pela fase móvel e são os que, durante a “corrida” cromatográfica, mais se distanciam do ponto de aplicação da amostra. O  $\beta$ -caroteno é o mais importante dos precursores da vitamina A e utilizado como corante na indústria alimentícia

O segundo produto isolado da coluna foi a clorofila (pigmento verde), cujo  $R_f$  foi  $0,53$ . A clorofila é facilmente identificada nas plantas, pois é a responsável pela coloração verde das mesmas. A clorofila a é a mais abundante no reino vegetal, sendo encontrada, juntamente com a clorofila b, numa proporção de  $3:1$ , respectivamente. A clorofila foi isolada usando um sistema de éter de petróleo/etanol na proporção de  $9:1$ .

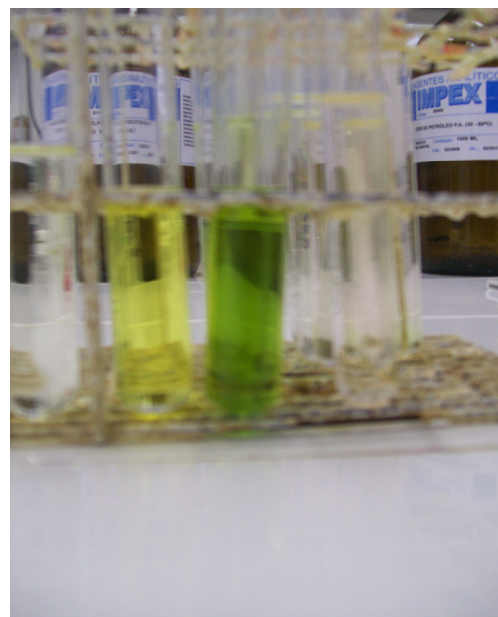
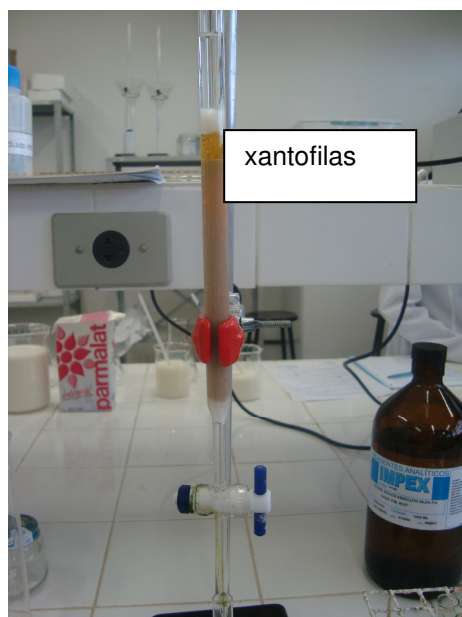
Finalmente, as xantofilas ( $R_f = 0,46$ ) como apresentam um grupamento hidroxila e têm moderada afinidade com a fase estacionária utilizada nesse experimento. Assim, as xantofilas monooxigenadas apresentam certa tendência à retenção pela fase estacionária e, durante a “corrida” cromatográfica, distanciam-se moderadamente do ponto de aplicação da amostra. Este produto por ser o último, foi isolado com etanol. A figura 3 demonstra as etapas de isolamento dos pigmentos.



a)



b)



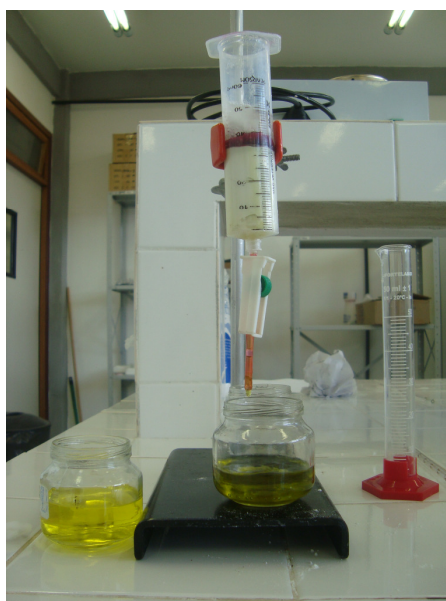
c)

d)

**Figura 3:** Etapas de isolamento dos pigmentos: a) isolamento do caroteno; b) isolamento da clorofila; c) isolamento da xantofila; d) pigmentos separados da coluna.

Convém destacar que os produtos foram identificados pela coloração, por exemplo, carotenos (cor amarela), xantofilas (cor laranja) e clorofilas (cor verde). Não foi possível neste experimento isolar a clorofila b, porque no sistema usado para “corrida” da placa analítica os  $R_f$  eram idênticos.

Após realizar o experimento usando coluna ou bureta, reproduzimos o experimento utilizando uma seringa (Figura 4) para separação de pigmentos de extratos do espinafre. Observe que para uma boa visualização dos resultados dessa separação, o extrato deve estar bem concentrado. Todos os materiais usados no experimentos foi alternativos, inclusive o solvente usados que foram thinner, removedor de esmalte de unhas ( a base de acetato de etila) e etanol comercial.



**Figura 4:** Coluna cromatográfica usando materiais alternativos

## CONCLUSÕES

Este trabalho aborda os resultados de experimentos de cromatografia, focalizando as técnicas em placas e em coluna, realizados em quatro aulas de química orgânica experimental, inicialmente com preparação da fase estacionária, placas analíticas e extração dos pigmentos das folhas de espinafre fresco. Foi proposta para empacotamento da coluna e preparação de placas analíticas sílica obtida da cinza de arroz. Os experimentos de cromatografia em camada delgada indicaram o sistema éter de petróleo – etanol (9:1) como o eluente para corrida e separação dos produtos. Na separação dos pigmentos em cromatografia em coluna, inicialmente usamos éter de petróleo para retirar o  $\beta$ -caroteno, em seguida o sistema éter de petróleo – etanol (9:1) para clorofila e finalmente apenas etanol para retirada da xantofila.

O experimento descrito é facilmente executado em sala de aula ou laboratório e, utilizando materiais de fácil acesso, permite ao estudante entrar em contato com vários conceitos envolvidos, desde a extração de compostos de plantas com o auxílio de solventes até a cromatografia do extrato obtido. Conceitos como solubilidade, polaridade, coeficiente de partição, adsorção e fator de retenção ( $R_f$ ) podem ser abordados durante a execução do experimento, que também proporciona ao estudante o conhecimento de uma poderosa técnica de análise empregada cotidianamente em laboratórios de pesquisa e em algumas indústrias, como a farmacêutica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Degani, A.L.G.; Cass, Q. B. ; Vieira, P. C. Cromatografia um breve ensaio. Química Nova na Escola. n 7, p 21-25, 1998
- Della, V. P.; Hotza, D.; Junkes, J. A.; Oliveira, A. P. N.; Química Nova 2006, 29, 1175.
- Fonseca, M.R.G.; Tese de Doutorado; UFRGS, Porto Alegre, RS, 1999.
- Fonseca, S.F. e GONÇALVES, C.C.S. Extração de pigmentos do espinafre e separação em coluna de açúcar comercial. *Química Nova na Escola*, São Paulo, n. 20, p. 55-58, novembro, 2004.
- Ribeiro, N. M.; Nunes, C. R. Análise de Pigmentos de Pimentões por Cromatografia em Papel. *Revista Química Nova na Escola* São Paulo, n. 29, p. 34-37, 2008.
- Santos, S.; Dissertação de Mestrado; UFSC, Florianópolis, SC, 1997.