

## Prática 2. Cromatografia em coluna aberta com detecção UV-Vis

Também chamada de cromatografia de adsorção é o processo mais simples depois da cromatografia em camada delgada. É feita em uma **coluna de vidro preenchida por um fase estacionária** e na ponta da coluna existe uma torneira permitindo o controle da vazão da fase móvel, como as buretas possuem.

**Fase móvel:** Tem como principal função servir como solvente para a amostra e ajudá-la a eluir pela coluna, inclusive ao final do processo para retirar toda a amostra, sendo por isso chamado de eluente.

**Fase Estacionária:** Para a preparação da coluna, ela deve ter seu **enchimento** feito de forma **uniforme** (sem deixar ar retido entre as partículas) com a fase estacionária. Para isso mistura-se a substância da fase estacionária com a fase móvel em um frasco, formando uma pasta e depois colocá-la na coluna. Então deixa-se o material assentar gradualmente e havendo uma **uniformidade no tamanho de partícula a homogeneidade da fase estacionária** será maior.

Não se deve deixar a coluna secar (evaporar completamente a fase móvel), mantendo sempre um fluxo de fase móvel durante o enchimento do tubo e eluição das amostras, pois quando seco aparecem rachaduras no material da coluna (na fase estacionária), deixando a separação cromatográfica bastante alterada.

Dessa forma, quanto **mais fracamente** um componente da amostra **for adsorvido** pela coluna **mais rápida será sua passagem** por ela.

Leitura introdutória:

ROSA, Elisa A. da; SCHELEDER, Michelle Z.. Pinhão, Quirera e Tapioca: das prateleiras para as bancadas dos laboratórios de Química. **Química Nova na Escola**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.383-386, 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160051>

## 2. Objetivo

- Conhecer os princípios técnicos da Cromatografia em coluna aberta;
- Separar corantes alimentícios de uma mistura;
- Construir um cromatograma para a separação realizada;
- Utilizar os resultados para avaliar parâmetros de qualidade da separação;

## 3. Materiais

	Qtde		Qtde
Etanol absoluto (99 %)	-	Pipeta pasteur	3
Tapioca granulada	pct	espátula	1
Quirera branca	Pct	Pipeta graduada 1 mL	1
Corantes alimentícios (azul e vermelho)	-	Pera	1
Amostra de gelatina sabor uva	pct	Mangueira de silicone	1
Coluna cromatográfica 20 mm i.d.	1	Balança semi-analítica	1
Funil de sólidos	1	Tubos de ensaio pequenos	20
Funil de vidro	1	Estantes de tubo	1
algodão	-	espectrofotômetro	1
Becker de 250 mL	3	Cubeta de plástico	1
Becher 50 mL	2	Caneta marcador retroprojeter	1
Suporte universal e garra	1	Bastão de vidro	1

## 4. Procedimento

### 4.1 Preparo da amostra

Adicionar 5 gotas de cada corante alimentício (azul e vermelho) com 10 mL de água deionizada em um Becker de 50 mL. Para a amostra de gelatina sabor uva, pese aproximadamente 0,5 g e complete com 10 mL de água em Becker.

### 4.2. Preparo e desenvolvimento da coluna

Preparo da coluna deve iniciar colocando-se um chumaço pequeno de algodão no fundo da coluna (use um bastão de vidro para acomodá-lo).

Com o auxílio de um funil de sólido, introduz-se na coluna aproximadamente 26 g da fase estacionária selecionada (tapioca granulada), imersa em etanol (2 cm acima do sólido e misture bem).

Atenção! À medida que o material vai sendo transferido, é necessário golpear levemente (chame o professor para dar orientações) com a mão ou usando uma mangueira de silicone a coluna pela parte externa, a fim de acomodar homogeneamente o material transferido e evitar a formação de bolhas.

A fase estacionária deve ser mantida sempre imersa no solvente e, para isso, pode-se reutilizar o solvente recolhido da coluna.

Fecha-se a torneira após manter o solvente no limiar da superfície superior formada pela fase estacionária dentro da coluna. Adiciona-se gotas da amostra da solução de corantes à coluna, e se permite que o material adentre a fase estacionária, abrindo-se rapidamente a torneira da coluna e fechando-a logo em seguida. Foram transferidos 10 mL de etanol para a coluna, e se desenvolveu a cromatografia com a adição contínua de solvente até que o produto coletado não apresentasse mais qualquer coloração. Os corantes são recolhidos em separado (frações), em tubos de ensaio, à medida que forem sendo arrastados pela FM. Posteriormente, usa-se mistura EtOH:H<sub>2</sub>O (5:1) como fase móvel, para eluir os constituintes mais polares da mistura e aumenta-se a força do solvente se necessário.

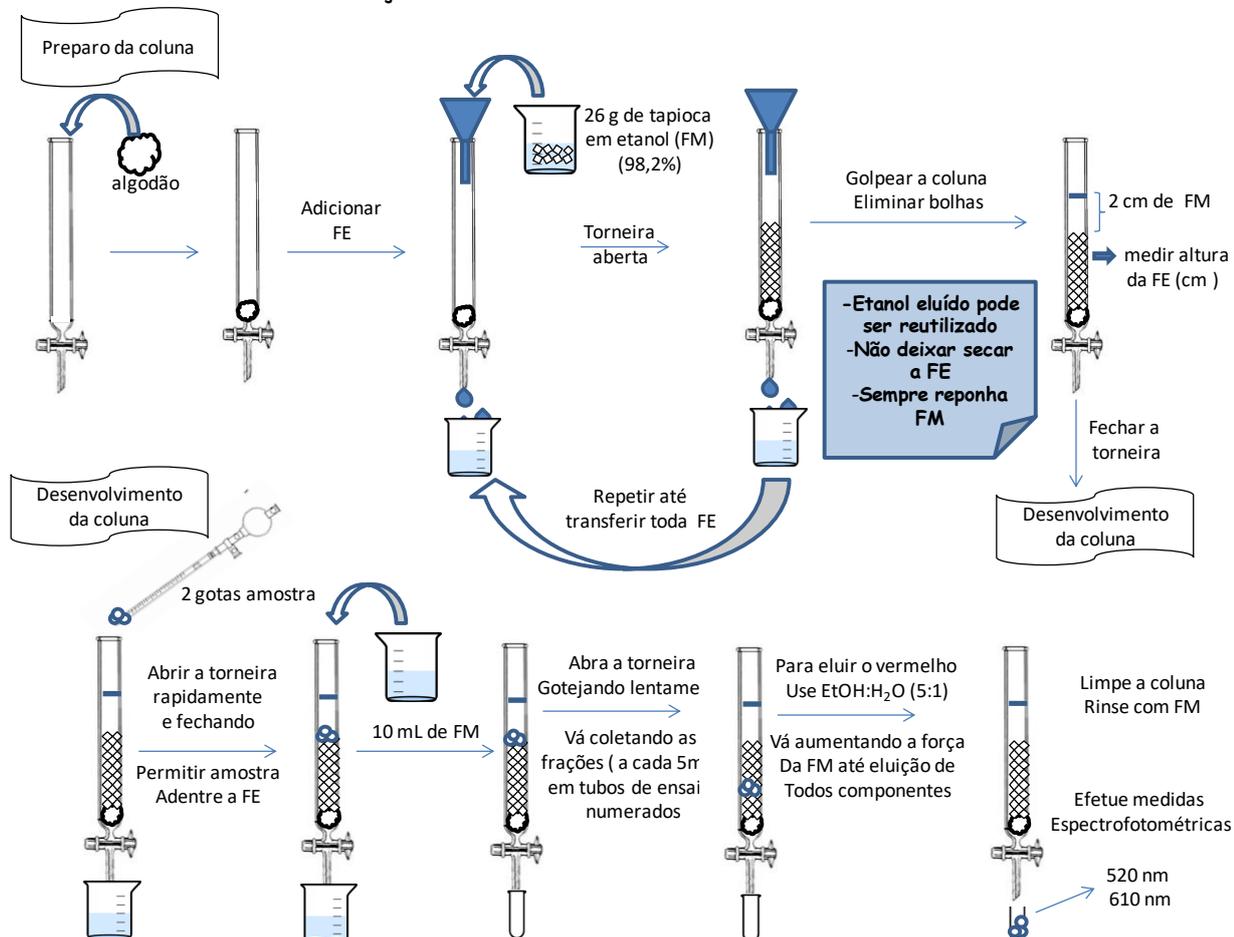


Figura 1. Fluxograma do preparo e desenvolvimento da cromatografia em coluna.

## 5. Resultados e Discussão

5.1. Execute pelo menos duas condições diferentes, anote na **Tabela 1 e 2**.

- a) variar a massa de fase estacionária;
- b) variar a temperatura da FM;
- c) variar massa de FE e temperatura;

5.2. Faça as leituras espectrofotométricas em 520 nm e em 610 nm e meça o volume de fase móvel de cada fração coletada anote na **Tabela 1a e 2a**.

**Tabela 1.** Separação na condição 1 da amostra de \_\_\_\_\_

Condição	1	2	3	Observações
Massa da FE	( ) 13 g	( ) 26 g	( ) 52 g	
Altura da Coluna	_____ cm	_____ cm	_____ cm	
Temperatura FM	( ) 10 °C	( ) 20 °C	( ) 30 °C	
Temperatura real				

**Tabela 1a.** Cromatograma da Separação na condição 1 da amostra de \_\_\_\_\_

Número da fração	Volume da fração (mL)	Vtotal eluído (mL)	Abs (520 nm)	Abs (610 nm)	Número da fração	Volume da fração (mL)	Vtotal eluído (mL)	Abs (520 nm)	Abs (610 nm)
1					11				
2					12				
3					13				
4					14				
5					15				
6					16				
7					17				
8					18				
9					19				
10					20				

**Tabela 2.** Separação na condição 2 da amostra de \_\_\_\_\_

Condição	1	2	3	Observações
Massa da FE	( ) 13 g	( ) 26 g	( ) 52 g	
Altura da Coluna	_____ cm	_____ cm	_____ cm	
Temperatura FM	( ) 10 °C	( ) 20 °C	( ) 30 °C	

**Tabela 2a.** Cromatograma da Separação na condição 2 da amostra de \_\_\_\_\_

Número da fração	Volume da fração (mL)	Vtotal eluído (mL)	Abs (520 nm)	Abs (610 nm)	Número da fração	Volume da fração (mL)	Vtotal eluído (mL)	Abs (520 nm)	Abs (610 nm)
1					11				
2					12				
3					13				
4					14				
5					15				
6					16				
7					17				
8					18				
9					19				
10					20				

- Construa dois cromatogramas, um que relacione o Volume total eluído (mL) de FM versus Abs (610 nm) e outro Abs (520 nm) no mesmo gráfico para cada uma das condições testadas.

-Traga na próxima aula.

## 6. Referências

ROSA, Elisa A. da; SCHELEDER, Michelle Z.. Pinhão, Quirera e Tapioca: das prateleiras para as bancadas dos laboratórios de Química. *Química Nova na Escola*, [s.l.], v. 34, n. 4, p.383-386, 2016. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0104-8899.20160051>