



Separação de pigmentos naturais por cromatografia em coluna utilizando materiais alternativos

Fabio Michel Carvalho Barbosa, Sabrina Barros Nabuco de Araujo, Denis Luís da Silva Dutra e Isabela Cristina Aguiar de Souza



A cromatografia é um método de análise muito utilizado em indústrias e laboratórios de pesquisa e engloba conceitos fundamentais da química, como interações intermoleculares, adsorção, dessorção, polaridade e solubilidade. No entanto, a instrumentação, solventes e adsorventes necessários dificultam a elaboração de aulas práticas baseadas em cromatografia em escolas do Ensino Médio. Por isso, a busca por materiais alternativos torna-se constante e necessária. Neste artigo é apresentado um experimento que envolve a separação de uma mistura de pigmentos naturais provenientes da couve e da beterraba por cromatografia líquida clássica, utilizando areia como fase estacionária, uma seringa de plástico como coluna e álcool comercial 92,8° INPM e vinagre de álcool como fases móveis. Além do material utilizado ser barato e facilmente encontrado, a separação dos pigmentos ocorre de forma eficiente e rápida, podendo ser realizada em duas aulas de 50 minutos.

► cromatografia, pigmentos naturais, aulas práticas de Química ◀

Recebido em 18/02/2024; aceito em 20/02/2025

Introdução

Cromatografia

A cromatografia é um método físico-químico muito utilizado atualmente em indústrias e laboratórios de pesquisa com o objetivo de separar, purificar e identificar compostos em uma mistura. De forma geral, fundamenta-se nas diferentes interações que ocorrem entre os componentes da mistura e duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. Essa técnica possui diversas classificações que diferem quanto à forma física do sistema, à fase móvel empregada, à fase estacionária utilizada e ao modo de separação e, por isso, existem vários tipos de cromatografia como, por exemplo, a cromatografia em papel (CP), em camada delgada (CCD), cromatografia líquida clássica (CLC), entre outros (Degani *et al.*, 1998). No presente trabalho será dada ênfase à cromatografia líquida clássica, que é assim denominada por ser uma cromatografia em coluna cuja fase móvel é líquida (um solvente ou mistura de solventes), sendo arrastada por ação da gravidade através

a cromatografia líquida clássica pode ser realizada em aulas práticas do ensino médio, com o objetivo de introduzir conceitos fundamentais da química como interações intermoleculares, adsorção, dessorção, polaridade, solubilidade, entre outros.

de uma coluna contendo uma fase estacionária sólida. O mecanismo de separação ocorre por meio de adsorção. O analito presente na mistura com maior interação com a fase estacionária fica mais tempo adsorvido na interface entre o sólido e a fase móvel devido aos grupos ativos presentes

na fase estacionária, sendo recolhido posteriormente. O analito com maior interação com a fase móvel fica menos tempo retido, sendo primeiramente recolhido. Esta migração diferencial permite a separação dos componentes da mistura (Collins *et al.*, 1997). Se as frações coletadas forem coloridas são facilmente diferenciadas;

caso contrário, técnicas auxiliares devem ser utilizadas para a análise do material. Com base nisto, a cromatografia líquida clássica pode ser realizada em aulas práticas do ensino médio, com o objetivo de introduzir conceitos fundamentais da química como interações intermoleculares, adsorção, dessorção, polaridade, solubilidade, entre outros.

Materiais alternativos

A instrumentação básica necessária para a realização

da CLC consiste em uma coluna cromatográfica de vidro e sílica gel ou alumina como fase estacionária (Collins *et al.*, 1997). No entanto, devido a seus altos custos, podem ser facilmente substituídos por materiais alternativos mais acessíveis. Na literatura, encontram-se descritos alguns experimentos de cromatografia líquida clássica realizados com materiais como areia ou mármore como fase estacionária, caneta esferográfica com tubo incolor como coluna e água como fase móvel para separação de uma mistura contendo anilina para alimentos (Celeghini e Ferreira, 1998), giz como fase estacionária e álcool comercial como fase móvel para a separação de tintas de canetas hidrocor (Paloschi *et al.*, 1998), além de uma bureta como coluna cromatográfica, açúcar refinado como fase estacionária e removedor de ceras como fase móvel para a separação de pigmentos do espinafre (Fonseca e Gonçalves, 2004), entre outros.

Os pigmentos naturais podem ser facilmente separados por cromatografia e, além de serem menos tóxicos ao ser humano e ao meio ambiente do que os sintéticos (Santos *et al.*, 2022), apresentam propriedades físicas e químicas diversas e são coloridos, o que dispensa o uso de técnicas complementares para a análise e confirmação das frações coletadas. A coloração verde da couve está associada à presença das clorofilas *a* e *b*, que são pigmentos naturais presentes em folhas e vegetais. Elas são encontradas na maioria das vezes em conjunto, sendo a clorofila *a* mais abundante (Maestrin *et al.*, 2009). A clorofila *a* difere da clorofila *b* devido à presença do grupo aldeído em vez de um grupo metila, conforme ilustrado na Figura 1.

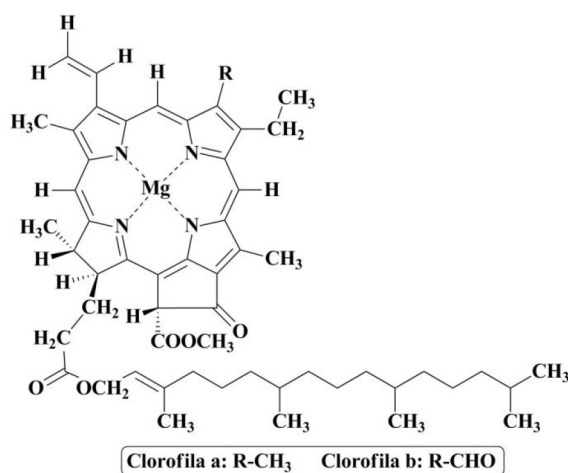


Figura 1: Estrutura química das clorofilas *a* e *b*. Fonte: elaborada pelos autores.

A coloração roxa da beterraba é resultante da presença de betalaínas, um grupo de pigmentos nitrogenados derivados do ácido betalâmico armazenado nos vacúolos das células desse vegetal (Santos *et al.*, 2022). Essas moléculas são divididas em duas classes, as betaxantinas, que possuem coloração amarelada, e as betacianinas, com coloração vermelha e arroxeada. A estrutura química básica das betalaínas encontra-se ilustrada na Figura 2a, na qual R1 e R2 definem se a molécula é uma betaxantina (anel diidropiridínico) ou

uma betacianina (glicose ou ácido glucurônico) (Pereira *et al.*, 2022). A betacianina encontrada em maior quantidade na beterraba é a betanina (Strack *et al.*, 2003; Gonçalves *et al.*, 2015), cuja estrutura está ilustrada na Figura 2b.

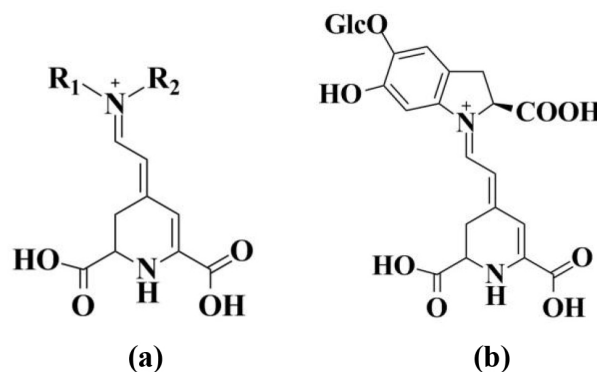


Figura 2: Estrutura química básica das betalaínas (a) e estrutura química da betanina (b). Fonte: elaborada pelos autores.

Na literatura encontra-se descrito um procedimento realizado para a separação de pigmentos naturais extraídos da cenoura, couve e beterraba. No entanto, são utilizados materiais convencionais como coluna cromatográfica contendo sílica gel e hexano como um dos solventes (Xavier *et al.*, 2020). A utilização desses materiais dificulta a reprodução dos experimentos em escolas com poucos recursos, o que incentiva a elaboração de novas práticas mais acessíveis.

No presente trabalho, uma mistura dos pigmentos extraídos da couve e beterraba foram separados por CLC. Os materiais utilizados são baratos e de fácil acesso, sendo encontrados em mercados, farmácias e lojas de materiais de construção. A quantidade de material foi menor do que geralmente é necessário para a realização do experimento com a instrumentação convencional, além dos solventes escolhidos serem menos tóxicos ao meio ambiente.

Experimentação no Ensino de Química

Os temas abordados na disciplina de Química são, muitas vezes, abstratos e se distanciam da realidade do aluno, o que leva ao desinteresse e dificuldade de assimilar os conteúdos abordados. Uma estratégia metodológica utilizada para contornar esse problema e que tem sido discutida por diversos autores é a experimentação no Ensino de Química (Guimarães, 2009; Santos e Menezes, 2020; Silva, 2021). Ela tem se mostrado eficiente no processo de ensino-aprendizagem, uma vez que atrai a atenção do discente tornando-o protagonista na construção do conhecimento quando é realizada baseada em uma abordagem investigativa (Oliveira e Silva, 2017; Silva, 2021). Segundo Moran *et al.* (2013), o indivíduo aprende melhor quando vivencia e experimenta. No entanto, é importante destacar que os experimentos não devem ser meras reproduções de roteiros, buscando apenas confirmação de fatos, mas devem fazer com que o aluno seja capaz de explorar os conceitos abordados. Dessa forma, a experimentação no ensino pode contribuir para o desenvolvimento de uma aprendizagem significativa (Guimarães, 2009; Costa *et al.*, 2021).

Além de facilitar o ensino de Química, a realização de atividades práticas tem mostrado grande relevância no desenvolvimento de diversas habilidades no estudante como, por exemplo, a observação, o olhar investigativo, análise e coleta de dados e discussão de resultados, o que o torna capaz de tomar decisões para resolver problemas do dia a dia, sendo fundamental para a formação pessoal e profissional do indivíduo (Braga Neto e Pires, 2024). Isso revela a necessidade de serem divulgados cada vez mais experimentos contendo materiais acessíveis, de baixo custo e facilmente reproduzíveis, contribuindo para que todos tenham acesso a uma educação de qualidade capaz de formar cidadãos conscientes e com senso crítico.

[...] a realização de atividades práticas tem mostrado grande relevância no desenvolvimento de diversas habilidades no estudante como, por exemplo, a observação, o olhar investigativo, análise e coleta de dados e discussão de resultados, o que o torna capaz de tomar decisões para resolver problemas do dia a dia.

Procedimento experimental

Materiais

Suporte universal, almofariz de porcelana e pistilo, pinça para condensador com mufa, seringa de 10 mL, tubos de ensaio, béquer de 50 mL, areia lavada, pipeta Pasteur graduada de plástico, bastão de vidro, etanol comercial 92,8° INPM, algodão, vinagre de álcool, couve e beterraba.

Extração dos pigmentos

Cortou-se, em pedaços pequenos, 3 g de folhas de couve e 3 g de beterraba, sendo individualmente macerados em um almofariz de porcelana com o auxílio de um pistilo de mesmo material, utilizando-se 3 mL de etanol comercial 92,8° INPM para a extração de cada pigmento (Figura 3a e 3b). Com uma pipeta Pasteur graduada, adicionou-se, em um tubo de ensaio, 0,5 mL do pigmento extraído da couve e 0,25 mL do pigmento da beterraba, sendo formada a mistura que foi posteriormente separada por CLC (Figura 3c).

Empacotamento da coluna

A areia utilizada como fase estacionária foi previamente lavada com água até que a água de lavagem saísse limpa,

deixada em repouso para secar e peneirada. Em um suporte universal, acoplou-se uma pinça para condensador com mufa para fixar uma seringa de 10 mL de plástico sem êmbolo e sem agulha, utilizada como coluna (Figura 4a). Com o auxílio de um bastão de vidro, adicionou-se um pequeno pedaço de algodão até a marcação de 1 mL da escala da seringa, com o objetivo de impedir a passagem da areia pela saída da coluna. Em seguida, com o auxílio de um funil, adicionou-se vagarosamente a areia lavada e seca, juntamente com pequenos volumes de álcool 92,8° INPM para evitar que a areia secasse, até atingir a marcação entre 7-8 mL da escala da seringa (Figura 4b). Para que a fase estacionária fosse mantida sempre imersa no solvente, o álcool foi recolhido da coluna com um béquer de 50 mL e reutilizado até finalizar o empacotamento. Um bastão de vidro foi utilizado para compactar a fase estacionária, prevenindo a formação de bolhas que podem prejudicar a eficiência da separação dos pigmentos. No total, 7 mL de álcool 92,8° INPM foram empregados na preparação da coluna.

Separação dos pigmentos em coluna cromatográfica

Para a coleta das frações, foram posicionados, embaixo da coluna, tubos de ensaio de vidro, sendo trocados para cada fração recolhida. A mistura de pigmentos foi introduzida na coluna, seguida pela adição gradual de álcool 92,8° INPM. Adicionou-se cerca de 4 mL do solvente até que a fração de coloração verde fosse obtida, sendo necessário acrescentar mais 3 mL para a completa eluição do pigmento verde da coluna (Figura 5a). Posteriormente, foi coletada uma fração incolor, proveniente do solvente utilizado. Para a eluição da terceira fração, foi necessário modificar o solvente, sendo utilizada uma mistura de álcool 92,8° INPM e vinagre com proporção de 10:3. Após a adição de 3 mL da referida mistura na coluna, a fração roxa foi obtida, sendo necessário o uso de 10 mL da mistura de solventes para a completa eluição do pigmento da beterraba (Figura 5b e 5c).

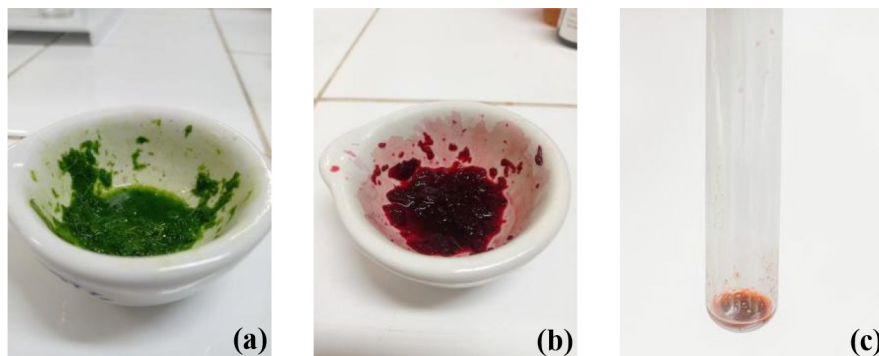


Figura 3: Pigmento extraído da couve (a), pigmento extraído da beterraba (b) e mistura dos pigmentos (c). Fonte: elaborada pelos autores.

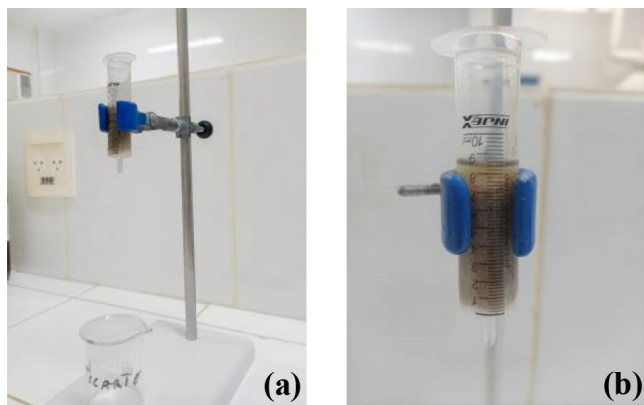


Figura 4: Aparelhagem utilizada na cromatografia em coluna com materiais alternativos (a) e preparação da coluna (b). Fonte: elaborada pelos autores.

Resultados e discussão

A areia utilizada como fase estacionária é formada por um conjunto de partículas proveniente do desgaste de rochas, composta majoritariamente por sílica (SiO_2)_n (Celeghini e Ferreira, 1998), um adsorvente muito utilizado em cromatografia e que apresenta caráter polar, restando mais fortemente componentes mais polares. Após a adição da mistura na coluna, utilizando-se apenas álcool 92,8° INPM como solvente, observou-se primeiramente a eluição do pigmento verde, característico da clorofila. A molécula de clorofila (Figura 1) possui grupos polares como cetona e éster, além do anel porfirínico que contém quatro nitrogênios coordenados ao metal magnésio. No entanto, a presença de uma longa cadeia carbônica também lhe confere um pequeno caráter apolar, apresentando maior interação com o álcool 92,8° INPM do que com a fase estacionária, já que o álcool, apesar de ser um composto polar, possui uma cadeia carbônica apolar.

Após a completa eluição da clorofila, observou-se que a

[...] para a eluição da betalaína foi utilizada uma mistura de álcool 92,8° INPM e vinagre com proporção de 10:3, aumentando a polaridade da fase móvel, uma vez que o vinagre contém ácido acético, sendo essa proporção suficiente para remover completamente a fração roxa da coluna.

segunda fração coletada foi proveniente do solvente, uma vez que o pigmento da beterraba permaneceu fortemente retido na areia. As betalaínas possuem vários grupos polares em sua estrutura (Figura 2a) como ácido carboxílico e amina, o que lhes conferem um caráter mais polar quando comparado com a clorofila. Dessa forma, para a eluição da betalaína foi utilizada uma mistura de álcool 92,8° INPM e vinagre com proporção de 10:3, aumentando a polaridade da fase móvel, uma vez que o vinagre contém ácido acético, sendo essa proporção suficiente para remover completamente a fração roxa da coluna.

Sendo assim, a separação da clorofila e da betalaína ocorreu de forma rápida e satisfatória, com uma boa separação entre as frações recolhidas, devido à diferença entre as interações dos dois pigmentos com as fases móvel e estacionária escolhidas.

Considerações finais

Este trabalho mostra que a cromatografia em coluna clássica é uma técnica que pode ser realizada em aulas práticas do Ensino Médio para explorar conceitos básicos e essenciais da Química. O experimento descrito apresenta a separação de uma mistura dos pigmentos naturais da couve (clorofila) e da beterraba (betalaínas), utilizando uma seringa de plástico como coluna, areia como fase estacionária e álcool 92,8° INPM e vinagre como fases móveis. Os materiais alternativos utilizados são acessíveis, o que torna o procedimento facilmente reproduzível. Além disso, a reduzida quantidade de rejeitos gerados, juntamente com a utilização de solventes não tóxicos e pigmentos naturais, fomenta nos alunos maior conscientização ambiental. Uma aula prática pode ser realizada em dois tempos de 50 minutos, sem a necessidade de técnicas complementares mais complexas, uma vez que os pigmentos são coloridos e as frações apresentam uma boa separação.

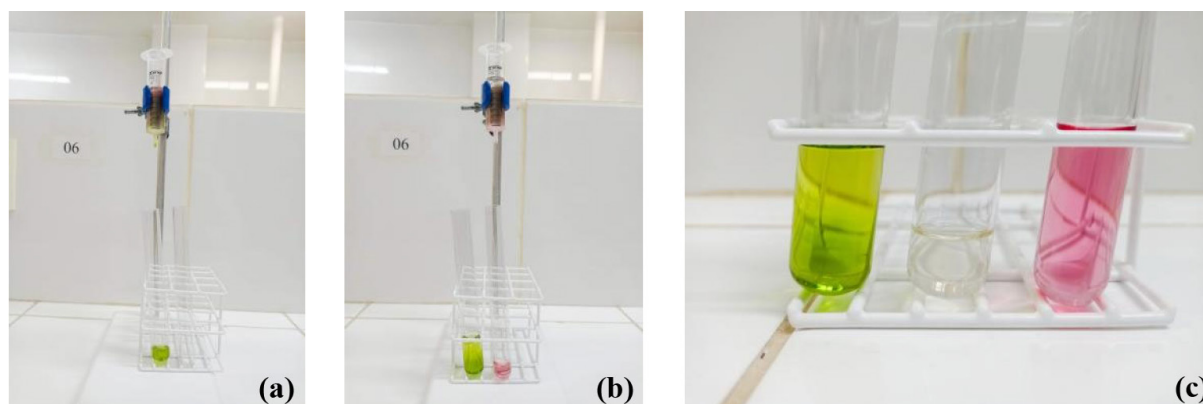


Figura 5: Eluição do pigmento verde (a), eluição do pigmento roxo (b) e as três frações coletadas no experimento (c). Fonte: elaborada pelos autores.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj) pelo apoio financeiro através do Programa Jovens Talentos para a Ciência.

Fabio Michel Carvalho Barbosa (fabio.michel.carvalho@gmail.com) é técnico em Química pela Escola Técnica Estadual Santa Cruz da Fundação de Apoio à Escola Técnica do Estado do Rio de Janeiro (ETESC/FAETEC) e bacharelado em Engenharia Química na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Rio de Janeiro, RJ - BR. **Sabrina Barros Nabuco de Araujo** (araujo.sabrina293@gmail.com) é licenciada em Química pela Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e mestre em Ciência e Tecnologia de Polímeros pelo IMA-UFRJ. Atualmente é

docente da Escola Técnica Estadual Santa Cruz da Fundação de Apoio à Escola Técnica do Estado do Rio de Janeiro (ETESC/FAETEC). Rio de Janeiro, RJ - BR. **Denis Luís da Silva Dutra** (denis.etesc@gmail.com) é licenciado e bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e mestre em Química Biológica pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Atualmente é docente da Escola Técnica Estadual Santa Cruz da Fundação de Apoio à Escola Técnica do Estado do Rio de Janeiro (ETESC/FAETEC) e do C. E. Marechal João Baptista de Mattos da Secretaria de Estado de Educação do Estado do Rio de Janeiro, SEEDUC/RJ. Rio de Janeiro, RJ - BR. **Isabela Cristina Aguiar de Souza** (isabela.borguignon@gmail.com) é bacharel em Química Industrial pela Universidade Federal Fluminense (UFF), licenciada em Química pela Universidade Católica de Brasília (UCB), mestre e doutora em Química pela Universidade Federal Fluminense (UFF). Atualmente é docente da Escola Técnica Estadual Santa Cruz da Fundação de Apoio à Escola Técnica do Estado do Rio de Janeiro (ETESC/FAETEC). Rio de Janeiro, RJ - BR.

Referências

CELEGHINI, R. M. S. e FERREIRA, L. H. Preparação de uma coluna cromatográfica com areia e mármore e seu uso na separação de pigmentos. *Química Nova na Escola*, v. 7, p. 40-41, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas: Editora da Unicamp, 1997.

COSTA, T.; BRASILEIRO FILHO, S. e LEMOS, P. B. S. A prática influenciando a formação e a aprendizagem na Educação Profissional e Tecnológica. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 6, p. 1-13, 2021.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B. e VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nova na Escola*, v. 7, p. 21-25, 1998.

FONSECA, S. F. e GONÇALVES, C. C. S. Extração de pigmentos do espinafre e separação em coluna de açúcar comercial. *Química Nova na Escola*, v. 20, p. 55-58, 2004.

GONÇALVES, L. C. P.; MARCATO, A. C.; RODRIGUES, A. C. B.; PAGANO, A. P. E.; FREITAS, B. C.; MACHADO, C. O.; NAKASHIMA, K. K.; ESTEVES, L. C.; LOPES, N. B. e BASTOS, E. L. Betalainas: das cores das beterrabas à fluorescência das flores. *Revista Virtual de Química*, v. 7, n. 1, p. 292-309, 2015.

GUIMARÃES, C. C. Experimentação no ensino de Química: caminhos e descaminhos rumo à aprendizagem significativa. *Química Nova na Escola*, v. 31, n. 3, p. 198-202, 2009.

MAESTRIN, A. P. J.; NERI, C. R.; OLIVEIRA, K. T.; SERRA, O. A. e IAMAMOTO, Y. Extração e purificação de clorofila a, da alga *Spirulina maxima*: um experimento para os cursos de química. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1670-1672, 2009.

MORAN, J. M.; MASSETO, M. T. e BEHRENS, M. A. *Novas Tecnologias e Mediação Pedagógica*. Campinas: Editora Papirus, 2013.

BRAGA NETO, W. C. P. e PIRES, D. A. T. A experimentação no ensino de Química: desafios para as atividades práticas na

visão de professores da Educação Básica no interior de Goiás. *Revista Tópicos*, v. 2, n. 14, 2024.

OLIVEIRA, G. A. e SILVA, F. C. Cromatografia em papel: reflexão sobre uma atividade experimental para discussão do conceito de polaridade. *Química Nova na Escola*, v. 39, n. 2, p. 162-169, 2017.

PALOSCHI, R.; ZENI, M. e RIVEROS, R. Cromatografia em giz no ensino de química: didática e economia. *Química Nova na Escola*, v. 7, p. 35-36, 1998.

PEREIRA, T. R. C.; CIPRIANO, L. C.; TOLEDO, B. S.; AZEVEDO, T. M.; MANO, S. B.; ESMERINO, E. A. e MARSICO, E. T. Propriedades funcionais e tecnológicas da beterraba: um levantamento bibliográfico. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, v. 8, n. 9, p. 1-5, 2022.

SANTOS, L. R. e MENEZES, J. A. A experimentação no ensino de Química: principais abordagens, problemas e desafios. *Revista Eletrônica Pesquiseduca*, v. 12, n. 26, p. 180-207, 2020.

SANTOS, N. S.; SILVA, F. L. A. T. e LEITE NETA, M. T. S. Corantes naturais: importância e fontes de obtenção. *RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar*, v. 3, n. 3, p. 1-15, 2022.

SILVA, R. S. Experimentação no Ensino de Química: uma sequência didática sobre a formação da ferrugem. *REAMEC*, v. 9, n. 2, p. 1-17, 2021.

STRACK, D.; VOGT, T. e SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, v. 62, n. 3, p. 247-269, 2003.

XAVIER, L. A.; SOUZA, E. C. A. e REBOUÇAS, E. L. Separação de pigmentos naturais por cromatografia em coluna: proposta de um experimento fácil e rápido. *RCT - Revista de Ciência e Tecnologia*, v. 6, 2020.

Para Saber Mais

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. Trad. O. E. Barcia e J. C. Afonso. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

Abstract: Separation of natural pigments by column chromatography using alternative materials. Chromatography is an analysis method widely used in industries and research laboratories and involves fundamental chemistry concepts such as intermolecular interactions, adsorption, desorption, polarity, and solubility. However, the instrumentation, solvents and adsorbents required make difficult to develop practical classes based on chromatography in high schools. Therefore, the investigation for alternative materials becomes constant and necessary. This paper presents an experiment that involves the separation of a mixture of natural pigments from green kale and beetroot by classical liquid chromatography, using sand as the stationary phase, a plastic syringe as the column, and commercial alcohol 92.8° INPM and alcohol vinegar as mobile phases. In addition to the cheap and easily found material used, the separation of pigments occurs efficiently and quickly, and can be carried out in two 50-minute classes.

Keywords: chromatography, natural pigments, practical Chemistry classes