

TRABAJO PRÁCTICO N° 3

Cromatografía

OBJETIVOS

- ✓ Incorporar los conceptos teóricos en los que se fundamenta la cromatografía en sus distintos tipos.
- ✓ Ejemplificar la utilidad de las técnicas cromatográficas como método de separación y como criterio de pureza e identificación.
- ✓ Aplicar las técnicas de capa delgada y columna para la separación de pigmentos de origen diverso.

INTRODUCCION TEORICA

Las técnicas cromatográficas tienen por objeto separar dos o más sustancias presentes en una mezcla, utilizando una fase fija o estacionaria y otra móvil que se desplaza a través de la primera.

La separación se debe a que, dependiendo de su estructura, las diferentes sustancias interactúan con distinta intensidad con la fase estacionaria, por lo tanto, algunas serán más retenidas (mayor interacción) mientras que otras, con menor interacción, serán desplazadas más rápidamente por acción de la fase móvil.

Esta técnica no sólo es separativa sino que se la emplea, bajo determinadas condiciones, como criterio de pureza y de identificación.

Existen varios tipos de cromatografía, según sea el proceso de separación que tiene lugar:

- ✓ *Cromatografía de Adsorción*
- ✓ *Cromatografía de Partición*
- ✓ *Cromatografía de Filtración con Geles (tamices moleculares)*
- ✓ *Cromatografía de Intercambio Iónico.*

Para algunos de los tipos mencionados, existen distintas técnicas de aplicación.

- ✓ *Cromatografía en capa delgada.*
- ✓ *Cromatografía en capa preparativa*
- ✓ *Cromatografía en columna*
- ✓ *Cromatografía en papel*
- ✓ *Cromatografía gaseosa*
- ✓ *Otras técnicas.*

Cromatografía de adsorción

Esta cromatografía sólido-líquido se basa en la ***competencia entre el soluto y el solvente por los sitios activos de la fase fija (adsorbente)***, y depende del equilibrio establecido en la interfase entre el soluto adsorbido y el eluyente, solvente de desarrollo, o fase móvil y ***no tiene relación directa con la solubilidad de la muestra en la fase móvil.***

Cuando una mezcla de analitos se deposita sobre la fase fija, éstos ocupan los sitios activos, fijándose a los mismos por medio de interacciones de tipo del tipo dipolo-dipolo y la formación de puentes de hidrógeno.

Al hacer pasar el solvente o fase móvil, se establece una competencia entre el solvente y los analitos por los sitios activos, produciéndose un equilibrio de adsorción-desorción. Como consecuencia de este equilibrio (adsorción-desorción), el solvente de elución o desarrollo removerá selectivamente los distintos componentes, arrastrándolos a medida que avanza sobre la fase estacionaria.

Los solutos que presenten interacciones débiles serán fácilmente desplazados por el solvente, mientras que aquellos que presenten interacciones más fuertes quedarán más retenidos. Como consecuencia de este fenómeno, los componentes de la muestra se moverán con diferente velocidad por acción del paso del solvente, produciéndose la separación.

- **Tipos de Adsorbente**

Existen muchos tipos de fases fijas o adsorbentes, como, por ejemplo, carbón activado (de menor utilidad), silicato de magnesio, óxido de aluminio (alúmina), silicagel, carbonato de calcio, talco, almidón, etc. Las más habituales son la sílica y la alúmina, las que pueden obtenerse con distinto grado de actividad (poder de adsorción) y granulometría. La sílica tiene ciertas características ácidas que pueden perjudicar algunas muestras sensibles a este medio, en esos casos se suele utilizar alúmina básica o neutra.

- **Solventes de Desarrollo o Elución**

La polaridad del solvente de desarrollo debe elegirse de acuerdo a las características de las sustancias que deban separarse. Solventes frecuentemente utilizados, ordenados según su polaridad creciente son: éter de petróleo, tetracloruro de carbono, ciclohexano, éter etílico, ésteres de ácidos orgánicos, cloroformo, acetona, alcoholes, agua. Usando mezclas de solventes se puede obtener una gradación de polaridad más fina.

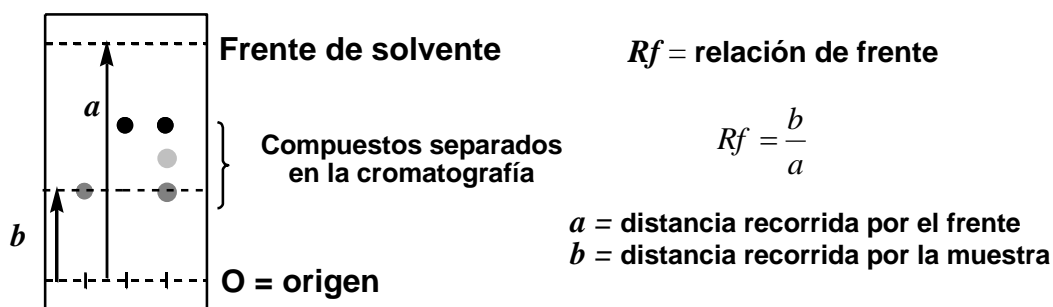
La cromatografía de adsorción se adapta a las tres técnicas anteriormente mencionadas: capa delgada (TLC o CCD), preparativa y columna, y su elección depende del objetivo del análisis.

Cromatografía en capa delgada

La capa delgada se utiliza **en forma exclusiva con fines analíticos** y la película fina de adsorbente está fijada a la superficie de un soporte inerte (polímero, vidrio o aluminio).

La muestra se deposita sobre esta capa y luego se pone en contacto con la fase móvil, que asciende por capilaridad. Durante el desarrollo, el solvente producirá la separación de los componentes de acuerdo con la fuerza con que estos interactúen con la fase estacionaria. La fuerza con que los solutos se fijan al adsorbente resulta, aunque no de forma exclusiva, de su polaridad relativa.

Una de las formas más habituales de caracterizar cromatográficamente cada componente en la mezcla, es medir el desplazamiento alcanzado por cada uno. Para que dicha medida resulte independiente de las diferentes variables como, por ejemplo, las dimensiones de la placa, se utiliza el concepto de relación de frentes (*R_f*). Se lo define como el cociente entre las distancias recorridas por las sustancias en estudio y el solvente de desarrollo.



Cálculo del R_f en una cromatografía de capa delgada

De la definición se desprende que el valor de R_f es siempre menor o igual a uno y es una medida de la movilidad de un compuesto en un proceso cromatográfico. Esta movilidad está determinada por el comportamiento individual de cada compuesto, y está directamente relacionada con su estructura química (polaridad, puentes de hidrógeno, interacciones π). Tanto en las cromatografías en placa como las cromatografías en papel (cromatografía de partición), el desarrollo se realiza dentro de una cuba que debe estar saturada con los vapores del solvente de desarrollo. Si la cuba no está debidamente saturada, el solvente, en vez de ascender por capilaridad continuamente, tenderá a evaporarse de la capa adsorbente para alcanzar la presión de vapor de equilibrio. Esto originará un ascenso inhomogéneo. Por otra parte, si se utilizan mezclas de solventes como fase móvil, dado que la volatilidad de los componentes líquidos es diferente, la falta de saturación de la cuba implicará que un componente se evapore más rápido que otro, ***cambiando la composición de la fase móvil*** a medida que avanza el frente. Como consecuencia, los desarrollos de CCD efectuados en cubas que no se llevaron a saturación, no serán reproducibles, afectando los valores de R_f de los componentes.

Cromatografía en capa preparativa

En ciertas ocasiones, sobre todo cuando se cuenta con ***pequeñas cantidades*** de muestra (menos de 50 mg), se pueden utilizar placas cromatográficas ***con fines preparativos***. Estas placas suelen prepararse a partir de suspensiones acuosas de mezclas de sílica, yeso y otros adsorbentes que permiten una mejor adhesión al soporte, luego se activan en estufa y se guardan en desecadores al abrigo de la humedad. La capa de sílica en la placa preparativa (depositada por diversas metodologías), presenta un espesor mayor que en la CCD, y por lo tanto tiene una mayor capacidad de carga de muestra.

Una vez desarrollada la placa, se individualizan las zonas donde se encuentran adsorbidos los diferentes componentes de la muestra y se remueve la sílica correspondiente a la zona de interés. El material removido se trata con un solvente que desorba el analito del adsorbente, generalmente cloroformo o acetona. El filtrado de la suspensión y la posterior evaporación del solvente permite obtener el material puro.

Cromatografía en columna

La técnica de cromatografía en columna, se suele utilizar para la ***recuperación cuantitativa*** de los diferentes componentes de una mezcla, por lo que las cantidades de muestra involucradas son mayores que en la cromatografía en placa. De acuerdo a la masa de muestra, se calculará la masa de adsorbente, lo cual determinará la elección de una columna de dimensiones adecuadas. En este caso, el adsorbente se coloca dentro de un tubo de vidrio que actúa como soporte, se deposita la muestra a separar en la parte superior de la columna de adsorbente y se deja pasar el solvente de desarrollo a través de la columna.

Dado que el solvente gotea por el extremo inferior de la columna, a medida que se van moviendo los componentes, éstos se recuperan a la salida del tubo, por lo que en la cromatografía en columna el solvente de desarrollo y el de elución coinciden.

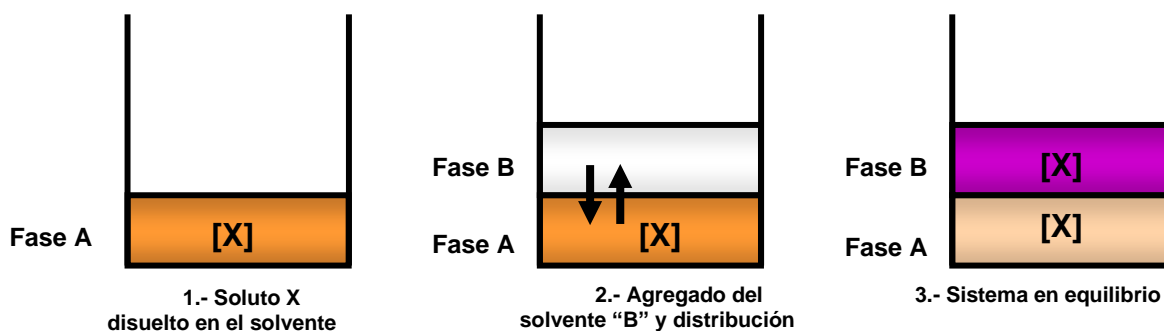
También debido a este hecho, se hace imposible la determinación de R_f ya que no es posible medir el frente del solvente. En caso de ser necesario se pueden determinar otros parámetros como por ejemplo el tiempo de retención (tiempo de residencia en la columna) o el volumen de elución.

Dado que en la cromatografía en placa el solvente se mueve por capilaridad, la velocidad de avance de la fase móvil no es una variable a tener en cuenta, sin embargo, en el caso de la cromatografía en columna la velocidad de desarrollo o elución es un factor clave para la resolución adecuada de las muestras.

Si bien el movimiento del solvente se produce por gravedad, la velocidad con la que éste atraviesa la columna es variable, ya que está influenciada por el tamaño de las partículas de adsorbente, el grado de empaque de la columna, la viscosidad del solvente, etc. Teniendo en cuenta que el éxito de la separación se basa en el establecimiento de los equilibrios de adsorción-desorción, se prefiere una baja velocidad para que se puedan lograr estos equilibrios. Sin embargo, también hay que tener en cuenta que bajas velocidades de elución provocan un aumento de la influencia de los fenómenos de difusión, que ensanchan las bandas y perjudican la separación, por lo que a veces se ejerce presión sobre el nivel del solvente para aumentar la velocidad (columnas flash) y buscar una solución de compromiso.

Cromatografía de partición

Esta modalidad cromatográfica se basa en la diferencia de solubilidad de una sustancia determinada entre dos fases líquidas. Cuando una solución de una sustancia **X** en el solvente **A**, se pone en contacto con un disolvente **B**, inmiscible con **A**, el soluto **X** se distribuye entre las dos fases. Cuando se llega al equilibrio, la relación $[X]_A/[X]_B$ es constante, y se denomina constante de partición (de distribución o de reparto). Habitualmente se requiere de agitación para que al aumentar la superficie de contacto el equilibrio se alcance más rápido.



Este concepto se aplica a la cromatografía de partición. La característica fundamental de la cromatografía de partición es que la fase estacionaria es agua, retenida sobre diferentes soportes (silicagel, almidón, polvo de celulosa, papel de filtro, algodón). La fase móvil es un líquido inmiscible con el agua (pero saturado con agua, para que no varíe la composición durante el desarrollo), o incluso agua, ya que se ha determinado que el agua ligada a estos soportes tiene diferentes características que el agua como solvente. La separación se basa en la distribución selectiva de los solutos entre las fases estacionaria y móvil según las constantes

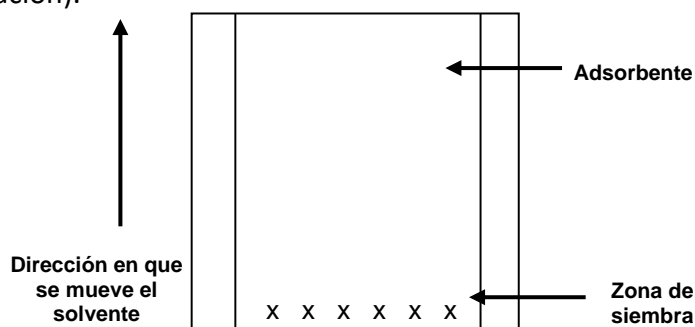
de partición particulares. Dado que ambas fases son líquidas la cromatografía de partición se denomina también cromatografía líquido-líquido.

Al igual que la cromatografía de adsorción, la cromatografía de partición puede llevarse a cabo en la modalidad de placa o de columna. Una de sus formas más habituales es la cromatografía sobre papel. Este tipo de cromatografía tuvo una gran aplicación en la separación de hidratos de carbono, aminoácidos y péptidos, aunque hoy en día ha sido reemplazada por otras técnicas como HPLC (high performance liquid chromatography) o CLAR (cromatografía líquida de alta resolución), electroforesis e incluso CGL (cromatografía gas-líquido).

Aplicación de técnicas cromatográficas

1- Cromatografía en capa delgada

El depósito de la muestra sobre el adsorbente normalmente recibe el nombre de “siembra de la placa” o bien “sembrado de muestras”. La siguiente figura representa el esquema de una placa en el cual pueden verse marcados con cruces los puntos en los que se siembra la mezcla que se quiere analizar. En los diferentes puntos sobre la línea de siembra se puede depositar distintas concentraciones de una muestra particular (verificación de pureza) o en un punto la mezcla incógnita y lateralmente sobre la misma línea de siembra las sustancias puras que se supone que se hallan presentes en la mezcla y que se utilizan como testigos (identificación).

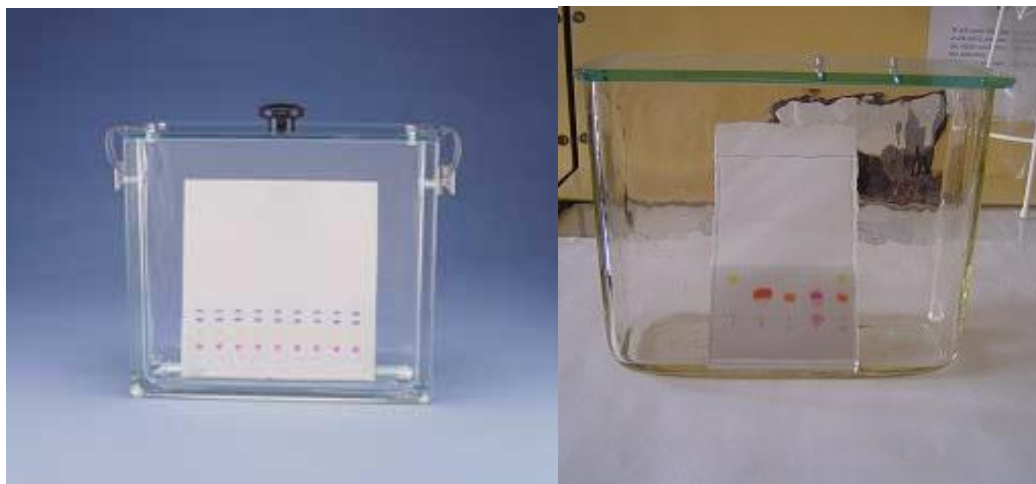


Sembrado de muestras

La muestra a sembrar se disuelve en un disolvente volátil con una concentración aproximada de 10 mg / mL. Para sembrar las muestras se introduce un tubo capilar en el recipiente que contiene la muestra en solución, observándose que el líquido asciende por capilaridad. Es recomendable llenar el capilar de manera tal que al retirarlo no gotee, ya que demasiado líquido produciría gotas demasiado grandes. Se deposita una pequeña gota sobre la placa, cuidando de no dañarla por una presión excesiva. Se seca rápidamente y se añade una nueva gota. Esta operación se repite hasta que se considera que se cargó una cantidad adecuada de producto en la placa. Las gotas deben sembrarse a una distancia del borde inferior de la placa **tal que no sean alcanzadas por el nivel del solvente de desarrollo**, ubicado dentro de la cuba. Si bien la bibliografía suele recomendar 0.5-1 cm, esta distancia dependerá de las dimensiones de la placa. En el desarrollo de la presente práctica se usarán placas pequeñas, de aproximadamente 2cm de ancho por 6 cm de longitud, por lo que la línea de siembra estará ubicada entre los 3 y los 5 mm del borde inferior, dejando una distancia similar con respecto a los bordes laterales y entre los puntos de siembra.

Una vez sembrada la placa con la muestra problema y con los testigos individuales, si se disponen, se desarrolla el cromatograma introduciendo la placa verticalmente en la cuba de

manera que su parte inferior se sumerja en el solvente de desarrollo hasta un nivel **por debajo de la línea de siembra**. Inmediatamente se tapa la cuba.



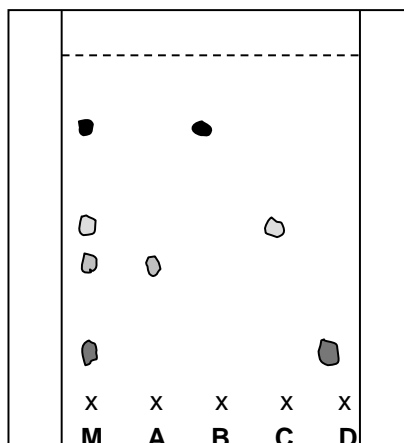
Cuba para cromatografía

La atmósfera de la cuba debe estar saturada con los vapores del solvente de desarrollo (para conseguir esto rápidamente, previo a la corrida, es aconsejable forrar la parte interna de la cuba con papel de filtro embebido en el solvente). Al tomar contacto con la parte inferior de la película adsorbente, el solvente asciende por capilaridad y al llegar a la línea de siembra comienza a separar los componentes de la mezcla. Cuando el solvente de desarrollo alcanza casi el tope de la placa, se retira ésta de la cuba y se deja secar al aire. Si las sustancias analizadas son coloreadas se marca su posición a simple vista. Si las sustancias son incolores es necesario utilizar reveladores.

Los reveladores pueden ser reversibles o irreversibles.

Dentro de los reversibles los más utilizados son el vapor de yodo y la luz ultravioleta (UV). El revelado con vapor de yodo se da por adsorción diferencial del halógeno sobre las zonas donde se encuentra la muestra, observándose manchas marrones sobre un fondo beige. La luz UV sólo puede ser usada cuando las muestras en estudio absorben en ese rango de longitudes de onda. Se utiliza sílica impregnada de un indicador fluorescente que se ve verde al ser irradiado en el UV. En aquellos lugares en los que hay muestras que absorben la radiación UV el indicador no fluoresce, por lo que se ven manchas violáceas sobre un fondo verde fluorescente.

Los reveladores destructivos o irreversibles se pulverizan sobre la placa, produciendo una reacción coloreada con las sustancias, lo que permite su localización. Uno de los más utilizados es el sulfúrico etanólico, que por calentamiento carboniza la materia orgánica observándose manchas marrones o negras sobre un fondo blanquecino. El aspecto que presenta una placa después de la corrida se asemejaría al de la figura:



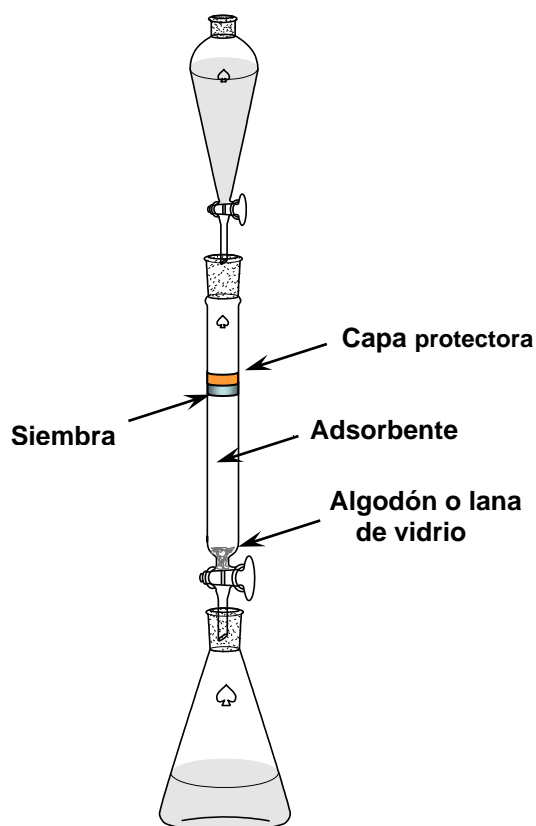
Placa desarrollada

Si se suponía que la mezcla **M** contenía cuatro sustancias **A**, **B**, **C** y **D**, al correr simultáneamente **M** con los testigos individuales se puede demostrar, por comparación visual, su presencia. Sin embargo, la cromatografía, salvo excepciones, **no puede utilizarse como criterio de identificación positivo**, es decir que no podemos afirmar que dos sustancias que tienen el mismo R_f en diferentes solventes sean la misma cosa. No obstante, la cromatografía representa un criterio de identificación por la vía negativa: si dos cosas tienen diferente R_f en un determinado solvente, seguro que no son el mismo compuesto.

2-Cromatografía en columna

Una columna para uso cromatográfico consiste en un tubo, generalmente de vidrio, de diámetro entre 0,5 y 6,0 cm aproximadamente y longitud que puede variar desde unos pocos centímetros hasta más de un metro, colocado en posición vertical. En la parte inferior de la columna vacía, se coloca un trozo de lana de vidrio o de algodón para retener el adsorbente. Luego se carga el adsorbente, suspendido en el solvente puro seleccionado: el sólido se va depositando sobre la lana de vidrio formando una columna compacta. Simultáneamente se abre el robinete de manera que el líquido vaya drenando lentamente, permitiendo así el agregado de nuevas porciones de adsorbente en suspensión hasta completar la columna (debe quedar libre entre 1/3 y 1/5 de la longitud del tubo). Tanto durante la preparación como durante la elución de la columna debe cuidarse que la superficie del adsorbente esté permanentemente cubierta por el líquido para evitar que la columna se “seque”, pues en ese caso se forman canales en el sólido y la separación de las sustancias no se produce satisfactoriamente.

El sembrado de la columna se puede realizar utilizando una solución de la mezcla si ésta es soluble en el solvente de armado de la columna. En este caso, para evitar perturbaciones por el agregado de



Esquema de una columna cromatográfica

la fase móvil, suele agregarse una capa de arena o un disco de papel de filtro y luego se incorpora la mezcla a separar que se carga en el tope de la columna. Si la muestra es insoluble en el solvente de armado, se recurre a la siembra en polvo o pastilla. Para esta técnica se solubiliza la muestra en un solvente volátil en el que sea soluble, se adiciona una pequeña cantidad de adsorbente y se evapora el solvente. Una vez absorbida la mezcla sobre el adsorbente, se introduce el polvo o pastilla por el tope de la columna, de manera tal que se ubique sobre la columna de adsorbente de manera uniforme. Luego se agrega la arena o el papel de filtro como en el caso anterior.

Una vez sembrada la mezcla se comienza el agregado del solvente o mezcla de solventes que actuará como fase móvil. Para ello, en el extremo superior de la columna, se adapta una ampolla de decantación que permite el agregado continuo de la fase móvil (eluyente) que irá desplazándose lentamente a través de la fase estacionaria.

Puede aplicarse succión a la salida o bien presión sobre el líquido para acelerar el proceso si fuera necesario. En algunos casos, se utilizan las llamadas columnas de media presión (paso intermedio entre la cromatografía normal y HPLC), en las cuales el solvente es suministrado a través de una bomba que regula la velocidad del mismo

En la parte inferior de la columna se coloca un erlenmeyer o tubos de ensayo para ir recogiendo las distintas fracciones del eluyente, que contienen los componentes individuales de la mezcla de productos que inicialmente se ha cargado en el tope de la columna.

Los sólidos utilizados como adsorbentes se usan en estado finamente dividido, para que presenten mayor superficie total de adsorción y mejoren la resolución.

El método más usado en la operación de una columna consiste en pasar el eluyente y recoger fracciones relativamente pequeñas, las cuales se evaporan siendo los sólidos residuales los componentes eventualmente puros de la mezcla inicial, que salen escalonadamente de la columna.

Este mismo método se aplica al caso de cromatografía de partición en columnas rellenas con celulosa.



PARTE EXPERIMENTAL

1. Aplicación de la cromatografía de adsorción para la separación de los pigmentos presentes en tintas para bolígrafos.

Nota importante: La estructura química de los pigmentos presentes en los bolígrafos suele ser de naturaleza altamente polar, e interactúan fuertemente con la sílica. Esta fuerte interacción implicará utilizar solventes altamente polares, ***lo que habitualmente no es aconsejable el uso de la técnica de adsorción.*** No obstante, dado que se trata de las primeras prácticas, esta actividad se ha seleccionado con el objetivo de que los alumnos manipulen solventes más seguros y visualicen mejor el comportamiento de los diferentes componentes. Un ejemplo más adecuado de la aplicación de la técnica de cromatografía de adsorción en columna, está detallado como parte del cuestionario.

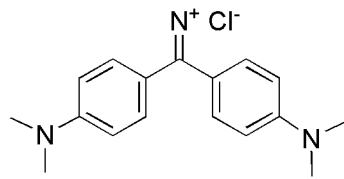
Las tintas para bolígrafos no solamente contienen los pigmentos que permiten visualizar lo escrito, sino que son una mezcla compleja de sustancias, cada una de las cuales cumple diferentes funciones. Los solventes, generalmente glicoles, sirven como vehículo de los pigmentos y/o colorantes, ya sea por disolución de los mismos o como medio de dispersión. Los fabricantes suelen agregar agentes lubricantes para asegurarse que la pequeña bolilla metálica no se pegue y ruede de forma adecuada. También entran en la composición de la tinta los aglutinantes, que aumentan la viscosidad para evitar fugas y escurrimientos de la tinta y ayudan a que la misma se adhiera a la superficie del papel. También suelen aparecer en la composición, diversos agentes inorgánicos como óxidos de titanio, negro de carbón y metales en polvo. Algunos de los componentes más habituales se resumen en el siguiente cuadro:

Solventes	Fijadores/Aglutinantes	Aditivos
Dietilenglicol	Polivinilpirrolidona	Acido Oleico
Fenoxietanol	Sílice pirogénica	Esteres del ácido fosfórico
Alcohol bencílico	Resinas sintéticas	Oleilamina
Dietilenglicol metil éter		

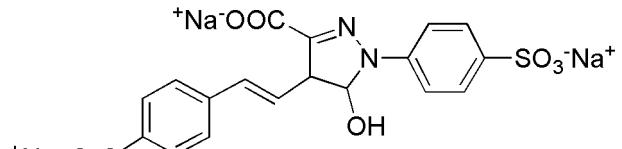
Las tintas obtienen su color característico de los pigmentos, que son compuestos coloreados insolubles, suspendidos en un solvente, o bien de los colorantes, que son solubles. Las tintas usadas para escribir tienden a usar colorantes antes que pigmentos, ya que los pigmentos pueden obstruir la punta del bolígrafo. El color de la tinta suele obtenerse por mezcla de dos o más colorantes o pigmentos. En los colores azules se suelen encontrar colorantes derivados del trifenilmetano, mientras que en los rojos suelen aparecer derivados de la eosina.

A continuación, se muestran las estructuras de los pigmentos y colorantes más habitualmente encontrados en las tintas de los bolígrafos:

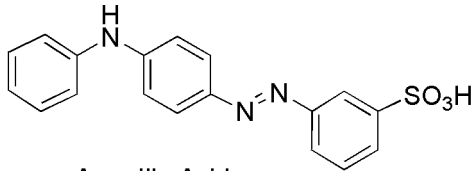
Pigmentos Amarillos



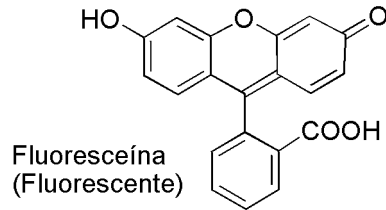
Auramina O ó Amarillo Básico 2
(Fluorescente al UV)



Tartrazina

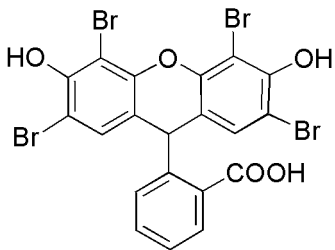


Amarillo Acido

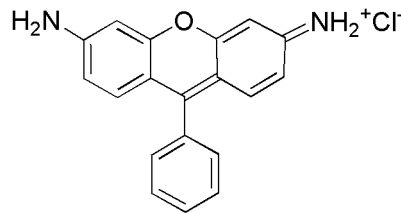


Fluoresceína
(Fluorescente)

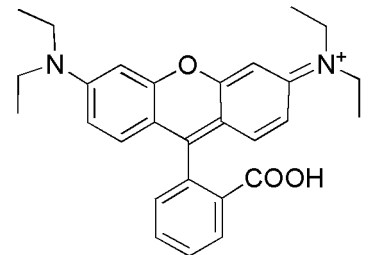
Pigmentos Rojos-Rosas



Eosina Y

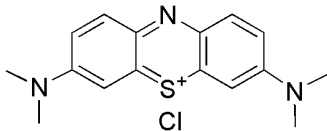


Rodamina

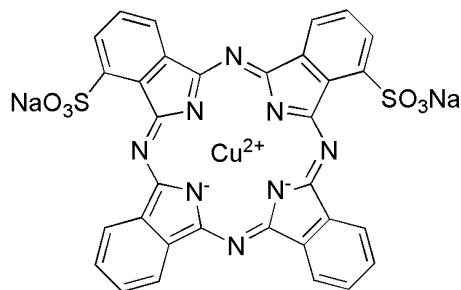


Rodamina B o
Violeta básico 10
(fluorescente al UV)

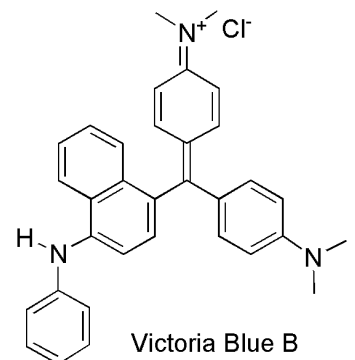
Pigmentos Azules



Azul de Metileno

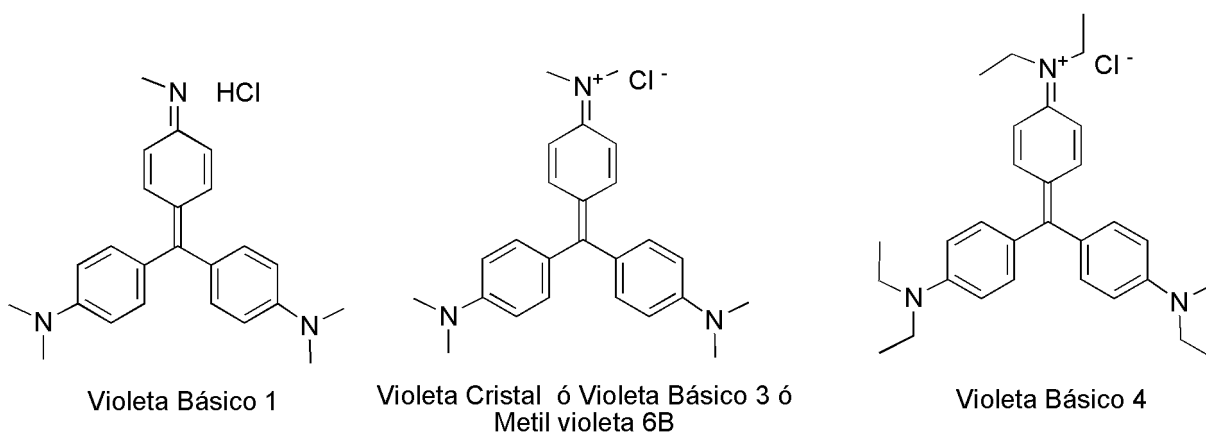


Solvent Blue 38



Victoria Blue B

Pigmentos Violetas



Tal como puede observarse, la mayor parte de los pigmentos y colorantes empleados presentan cargas formales (sales sódicas o cloruros) o bien presentan grupos polares, lo que les permite una fuerte interacción con la sílica, y por este motivo se usarán solventes no habituales para cromatografías de adsorción.

1.- Extracción de los pigmentos

Se extrae el depósito de tinta del bolígrafo y se retira la cabeza. Se coloca el tanque dentro de un tubo de ensayos y se vierten 3 mL de etanol para disolver la tinta. Dado que sólo se sembrarán 3 a 5 gotas del extracto, con un bolígrafo alcanza para todo el curso.

2.- Cromatografía en columna:

Se prepara la columna de acuerdo a lo explicado anteriormente, utilizando para su llenado una suspensión de sílica en etanol. Alternativamente, podría colocarse la sílica en la columna, compactarla con pequeños golpes en los laterales de la columna, realizados con un elemento de goma o bien con una varilla de vidrio recubierta con goma de mechero, y luego agregar el solvente. De usarse este último método, tener cuidado con el manejo de la sílica seca, ya que es sumamente liviana y queda en suspensión en el aire si se la manipula de forma incorrecta.¹ Poner especial atención a la eliminación de las burbujas. Al eliminar el exceso de solvente la columna termina de compactarse.

La altura final de la columna de sílica debe ser de entre 8 y 9 cm.

Se abre el robinete de la columna dejando salir el solvente y cuando el nivel del líquido está justo sobre la sílica, se agregan el cuidadosamente entre 3 y 5 gotas del extracto etanólico con una pipeta Pasteur (agregar un par de gotas más si se parte de un bolígrafo verde). Cuidar de que el extracto NO toque las paredes de la columna. Si así sucediera, se vierte un pequeño volumen de solvente por las paredes de la columna para arrastrar la sustancia que hubiese quedado adheridas.

¹ La aspiración incidental de silicagel puede provocar irritación del tracto respiratorio y en casos severos y de exposición prolongada, enfisema y muerte.

Se inicia el desarrollo cromatográfico usando como eluyente el mismo solvente de armado, es decir, etanol, produciéndose la separación de los pigmentos. Si la columna fue bien armada, las diferentes zonas tendrán bordes netos.

Cuando se note la presencia de líquido coloreado a nivel del algodón, se cambia el recipiente colector (tubos de ensayo o hemólisis). Si alguna banda no termina de eluir con el solvente inicial, se puede utilizar una mezcla de etanol:NH₃ 4:1 (v/v) o bien diferentes proporciones de etanol:agua (75:25; 50:50), aunque el uso del agua no esté recomendado para silicagel.

3.-Cromatografía en capa delgada

- i. Se sembrarán dos placas de silicagel idénticas (A y B). Se siembra el extracto original según la técnica descrita, juntamente con las fracciones coloreadas extraídas de la columna (una calle para el extracto y una por cada pigmento separado). Incluir calles con pigmentos patrón si hay disponibles (tartrazina, rodamina, azul de metileno, etc).
- ii. Desarrollar la placa A con etanol como fase móvil.
- iii. Dejar secar y anotar las observaciones que resulten aplicando luz visible y calcular el R_f de los pigmentos.
- iv. Repetir las observaciones aplicando luz UV.
- v. Repetir las observaciones con cámara de yodo.
- vi. Desarrollar la placa B con una mezcla butano:etanol:amoníaco (3:1:1) si el bolígrafo era azul, negro o rojo. Si el bolígrafo era verde, desarrollar la placa B con una mezcla butanol:etanol (1:1).
- vii. Repetir las operaciones iii) a v) sobre la placa B.

II. Cromatografía en papel de colorantes para alimentos

1.-Extracción de colorantes de confites M & M.

Colocar 4 confites de un mismo color en un vaso de precipitado pequeño. Agregar 3 mL de una solución agua:etanol 1:1 y dejar que el colorante se disuelva. Desechar los confites antes de que se vea el centro de chocolate.

2.-Preparación de la cuba de desarrollo

Como cuba se usará un vaso de precipitado de 400 mL cubierto con un vidrio de reloj o una placa de Petri para lograr una buena saturación de la atmósfera. Agregar al vaso 10 mL de la fase móvil que consiste en una solución de cloruro de sodio al 0,1%.

3.-Preparación del standard

Se utilizará como standard el colorante Amarillo de Tartrazina. Preparar la solución de colorante disolviendo 0,1g en 3 ml de agua.

4.-Siembra

Con un lápiz trazar una línea a 1,5 cm del borde inferior del papel que se va a utilizar para la corrida cromatográfica.

Usando un tubo capilar para cada solución coloreada efectuar la siembra de las soluciones, guardando 2 cm de distancia entre los puntos de siembra (**Figura 1**). Dejar secar las gotas y repetir la siembra unas 5 veces para lograr una mayor concentración de los colorantes. Dejar secar y preparar el papel como se indica en la **Figura 2**.

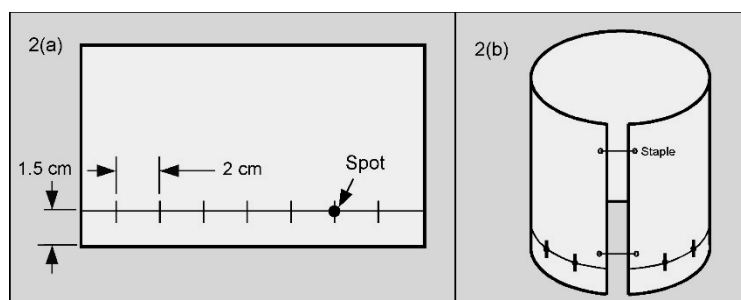


Figura 1

Figura 2

5.-Desarrollo de la cromatografía

Colocar el papel dentro de la cuba. Dejar correr hasta que el solvente alcance 0,5 – 1 cm por debajo del borde superior. Retirar el papel e inmediatamente marcar el frente del solvente.

INFORME DE RESULTADOS

a) Extracción y cromatografía en capa delgada y columna.

- Realizar un diagrama de flujo de las operaciones extractivas realizadas sobre los bolígrafos, indicando cómo realizó la siembra en las cromatografías analíticas y en la columna.
- Registrar los valores de R_f (*relación de frentes*) obtenidos para los diferentes pigmentos, en los distintos solventes de desarrollo de las placas. Compararlos relacionando i) la posible estructura y polaridad de los analitos; ii) la polaridad de los solventes de elución empleados.
- Indicar los resultados según el método de revelado empleado.
- Redactar **CONCLUSIONES** justificando los resultados obtenidos en función de los conceptos teóricos.
- Explicar esquemáticamente cómo realizó la separación de pigmentos por cromatografía en columna, indicando cómo determinó la eficiencia del proceso (si los componentes fueron separados).
- Redactar las **CONCLUSIONES** que surgen de la comparación de las dos técnicas cromatográficas aplicadas.

- Listar las características de seguridad y manejo responsable de los reactivos utilizados en esta práctica (NO ADJUNTE LAS HOJAS DE SEGURIDAD). Resalte la información de seguridad importante para el trabajo en el laboratorio.

b) Cromatografía en papel

- Calcular e informar los valores de R_f para cada colorante, en el solvente de desarrollo utilizado.
- Indicar qué revelador se utilizó.
- Completar el cuadro siguiente

Color del confite	Nº de manchas	Distancia _{solvente}	Distancia _{colorante}	R_f

- Redactar **CONCLUSIONES** en función de los conceptos teóricos. Indicar qué tipo de cromatografía se aplicó.

Bibliografía Adicional

- R. L. Galagovsky, "Química Orgánica. Fundamentos teórico-prácticos para el laboratorio", Serie Cuadernos Universitarios, EUDEBA, 1986.
- Abeer Alyami, Killian Barton, Liam Lewis, Antonio Mirabile, Daniela Iacopino. "Identification of dye content in colored BIC ballpoint pen inks by Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering". *J Raman Spectrosc.* 2019; 50:115–126.
- Dilara Akhmerova, Alina Krylova, Andrey Stavrianidi, Oleg Shpigun, Igor Rodin, "Forensic Identification of Dyes in Ballpoint Pen Inks Using LC–ESI–MS". *Chromatographia* (2017) 80:1701–1709.
- Shah, M.; Shah, S.; Malshe, V. WO 2010/052729 A1.
- Willard, H.H.; Lynne, L.; Dean, J.; Settle, F. "Instrumental methods of analysis" 7º Ed. 1988.
- Orio, O; López, A.; Herrero, E.; Pérez, C.; Anunziata, O. "Cromatografía en fase gaseosa" EDIGEM S.A. Bs. As. 1986.
- McNair, H.M.; Benjamín Esquivel, H. "Cromatografía líquida de alta presión", Monografía OEA.
- Snyder, L.; Kirkland, J. "Introduction to modern liquid chromatography" 2º Ed, J. Wiley 1979.

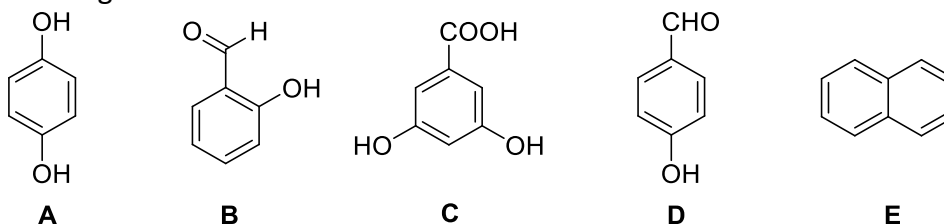
Cuestionario

1.-Discuta cuáles son los fundamentos de las cromatografías de adsorción y partición. ¿En qué casos se utilizan las técnicas cromatográficas? Son métodos cualitativos o cuantitativos. ¿Qué técnicas cromatográficas aplicó en el trabajo práctico?

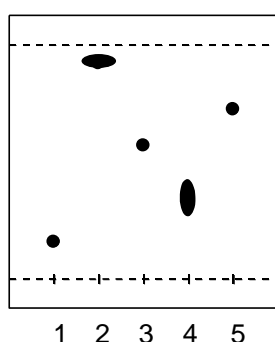
2.- ¿Por qué la cromatografía en capa delgada es un criterio parcial de identificación? Defina coeficiente de reparto y explique brevemente de qué variables depende.

- 3.- ¿Qué significa que una sustancia tenga R_f menor, igual o mayor que 0,5?
- 4.- Escriba una lista de eluyentes utilizados en cromatografía en columna en orden de polaridad decreciente. En el laboratorio: ¿Qué criterio utiliza en el orden de los solventes de elución?
- 5.- ¿Cuál es la diferencia entre cromatografía en capa fina y la cromatografía en papel? Explique cuáles son las fases móviles y estacionarias en cada caso.
- 6.- Conteste las siguientes preguntas, justificando detalladamente:
- ¿Qué diferencias hay entre cromatografía analítica y preparativa?
 - Si las sustancias que va a analizar son incoloras, ¿cómo las visualiza sobre la placa?
 - ¿Qué es un revelador? Indique por lo menos cuatro.
 - ¿Qué es un revelador universal? ¿y uno específico? Dé ejemplos.
7. -Dadas las siguientes afirmaciones, conteste a cada una si es Verdadera o Falsa y justifique:
- Por cromatografía en capa delgada se pueden obtener puros los componentes de una mezcla de colesterol, ácido benzoico y cloruro de metileno.
 - Una sustancia **A**, que en c.c.d. sobre sílica con benceno da $R_f = 0,7$, al usar benceno:metanol (1:1) dio $R_f = 1,2$.

8.- Los compuestos **A**, **B**, **C**, **D** y **E** se sometieron a una cromatografía de adsorción en capa delgada de sílica gel:



Utilizando tolueno:etanol (3:1) como solvente de desarrollo, se obtuvo el cromatograma que se indica a continuación:



Indique qué siembra corresponde a cada compuesto. Justifique brevemente.

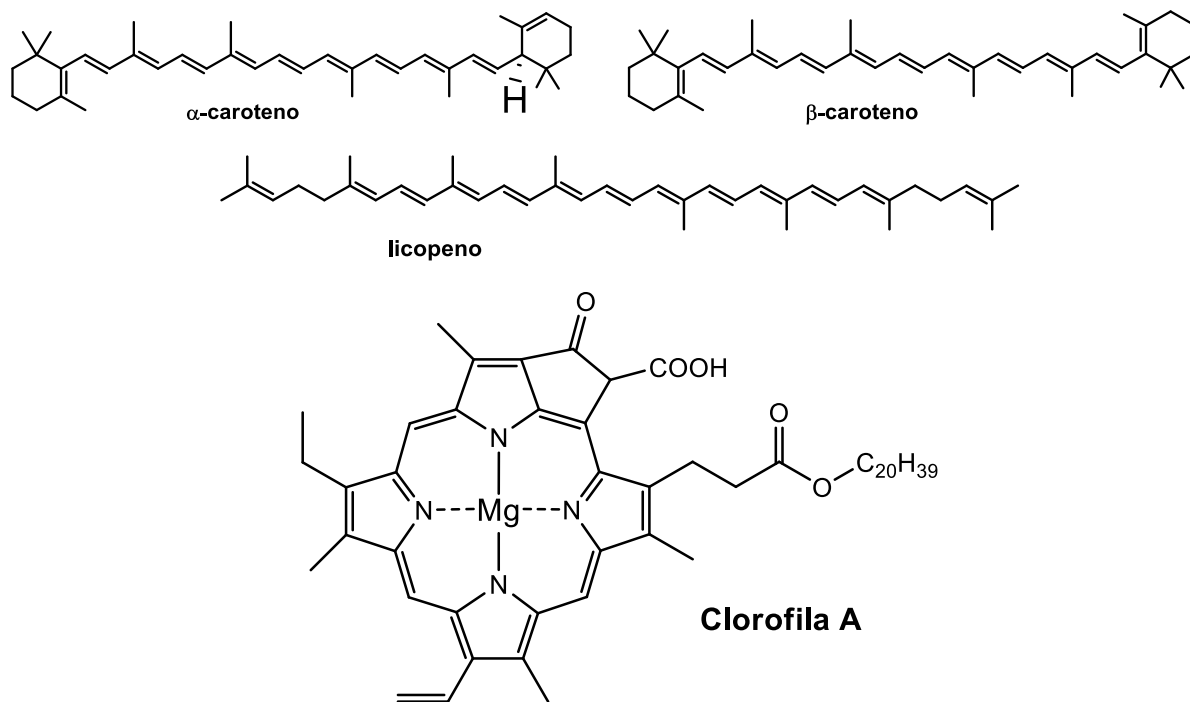
A partir de la gráfica de la placa, calcule el R_f para cada compuesto.

9.- Se realiza la siguiente técnica para la separación de pigmentos vegetales por cromatografía de adsorción:

Las hojas verdes deben su color principalmente a la clorofila, sin embargo, también cuentan con otros pigmentos como los carotenos y su precursor, el licopeno, cuya presencia no es tan evidente, ya que habitualmente su color no alcanza a manifestarse.

Los carotenos y licopenos están dentro del grupo de los terpenos, formados por un número entero de moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) como unidad estructural. Dado que

tienen ocho unidades de isopreno son denominados tetraterpenos y tienen la fórmula general $C_{40}H_x$, debido a los diferentes grados de insaturación. Los carotenos más importantes son los isómeros α y β -caroteno, los cuales, en estado puro, se obtienen como placas de color rojo. Las soluciones son amarillas y se oxidan rápidamente al aire, sobre todo en presencia de luz. El licopeno es el precursor directo del β -caroteno y tiene una coloración rojiza. Está presente en ajíes, zanahorias y tomates, al igual que los carotenos tiene propiedades antioxidantes y se suele utilizar como colorante alimentario.



Para la extracción de los pigmentos, se toman 20 g de hojas verdes (espinaca, acelga, etc.) se cortan en finos trozos con tijera y se colocan en el mortero. Se agregan 20 mL de acetato de etilo y se maceran por 5 minutos realizando un movimiento giratorio con el pilón. La solución debe quedar de color verde intenso.

Una vez pasado los 5 minutos se exprime el sólido para extraer la mayor cantidad de pigmentos posibles. La solución obtenida se filtra por gravedad, recogiéndose en una ampolla de decantación. A la ampolla se le adicionan 10 mL de solución de cloruro de sodio al 0,1%, se extrae, se separan las fases y se reserva la fase orgánica.

El extracto de color verde intenso se seca con una punta de espátula de sulfato de sodio anhidro.

Se prepara la columna utilizando para su llenado una suspensión de sílica en éter de petróleo. Se siembra el cuidadosamente extracto con una pipeta Pasteur. Se inicia el desarrollo cromatográfico usando como eluyente una mezcla de éter de petróleo-acetona 9:1, dejándola gotear lentamente desde una ampolla de decantación adaptada al extremo de la columna.

Se verá extender la zona verde de la clorofila que luego comienza a separarse, adelantándose una banda de color amarillo de unos 4 mm. de espesor que contiene los carotenos. Se colecta la fracción correspondiente.

Luego de eluir los carotenos, se reemplaza el eluyente por otro más polar, como el etanol, pueden eluirse las clorofilas.

Las fracciones obtenidas se estudian por cromatografía en capa delgada, usando sílica como adsorbente y el mismo solvente de elución empleado para el análisis del producto

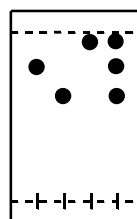
original. Sembrar la fracción de carotenos, de clorofilas y el extracto original y comparar la composición de las fracciones.

Los cristales de carotenos obtenidos por evaporación del solvente, se toman con cloroformo y se los hace reaccionar con H_2SO_4 concentrado y con Br_2/CCl_4 .

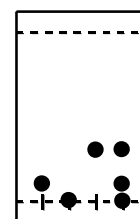
Responda:

- Realizar el diagrama de flujo para el proceso utilizado en la de extracción de los pigmentos vegetales. ¿Por qué se adiciona solución de NaCl al extracto con acetato de etilo?
- ¿Por qué es necesario sacar el agua del material vegetal durante la extracción de los pigmentos naturales? ¿Por qué no se seca directamente con Na_2SO_4 anhidro el primer extracto?
- ¿Por qué los pigmentos de espinaca se eluyen de la columna con éter de petróleo:acetona 9:1?
- ¿Por qué es necesario pasar a etanol para separar las clorofilas?
- Los carotenos tratados con ácido sulfúrico producen la formación de una coloración azul. ¿A que se debe el cambio de coloración?
- ¿Qué señal espera visualizar de la reacción de los carotenos con el bromo? ¿cuál es la reacción asociada? ¿Qué indica la observación del desprendimiento de humos blancos cuando acerca un tubo con amoníaco concentrado a la boca del tubo co el caroteno en reacción?
- ¿Qué espera ver si irradia la cromatografía de las clorofilas con luz UV?

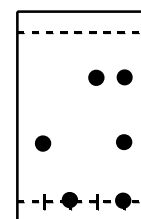
10.-Se necesita separar una mezcla de tres componentes por cromatografía en columna, para lo cual se realizan las TLC que se muestran más abajo. Indique que solvente o secuencia de solventes elegiría para llevar a cabo dicha separación, justificando su elección y la razón por la cuál descarta los demás.



Acetona



Hexano



Diclorometano

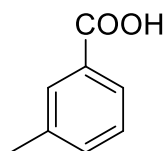
11.- ¿Cuál es la estructura del amarillo de tartrazina? ¿Se podrían analizar en una misma placa los colorantes de M&M y los pigmentos carotenoides? ¿Por qué?

12.-Para los siguientes casos, elija el método cromatográfico que considere más apropiado y justifique su respuesta.

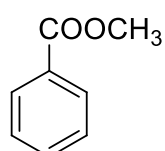
- Se desea conocer la cantidad de componentes de un extracto vegetal, realizado en hexano, y se dispone de 0.3 mg.
- Se desea separar los componentes una muestra proveniente de síntesis (300 mg) para posterior análisis estructural.
- Se desea corroborar la identidad de un analgésico, extraído de una muestra comercial de una farmacia (0.500 mg).
- Se desea separar en sus componentes individuales, 300 g de una mezcla de ácido benzoico, antraceno y fenol.

13.- Ordene los siguientes compuestos en orden de polaridad decreciente. Justifique.

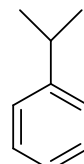
i)



A

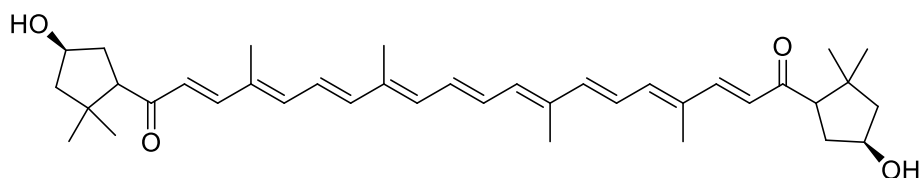


B

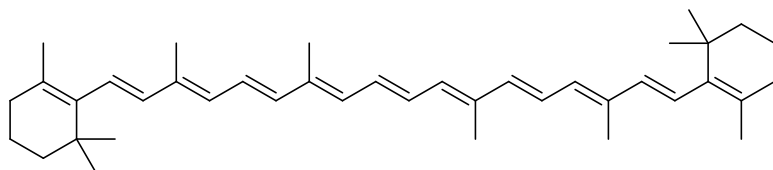


C

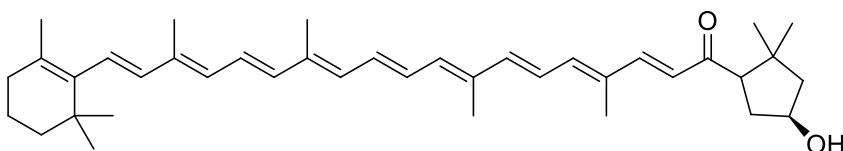
ii)



D



E



F

14.-a) Indique que resultado espera obtener al cromatografiar por placa analítica una mezcla de tolueno, benzaldehído y fenol, suponiendo la utilización de un solvente de desarrollo óptimo.

b) Sería apropiada la utilización de CGL para la separación de una mezcla de azúcares. Justifique.