

METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE Ca^{2+} POR CROMATOGRAFIA PLANAR E ESPECTROFOTOMETRIA

José ZUANON NETTO*

Jairo Osvaldo CAZETTA**

■ **RESUMO:** O presente trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver nova metodologia para a eluição e quantificação de Ca^{2+} separado pela cromatografia em camada delgada, empregando-se o 1-butanol para extrair o complexo cálcio-alizarina diretamente da suspensão aquosa de celulose microcristalina, oriunda das manchas de Ca^{2+} retiradas do cromatograma, e determinando-se o teor de Ca^{2+} por espectrofotometria da fase orgânica. O método proposto utiliza reagentes e solventes comuns e é capaz de eluir, pré-concentrar e promover a reação colorimétrica em uma única operação. A *performance* dos resultados obtidos para amostras vegetais foi satisfatória e sugere a possibilidade da aplicação deste método para analisar outros tipos de amostras.

■ **PALAVRAS-CHAVE:** Cálcio; cromatografia planar; planta.

Introdução

A determinação quali-quantitativa de Ca^{2+} diretamente no extrato resultante da solubilização de amostras complexas é problemática devido à presença de grande número de outros íons que, geralmente, interferem nos métodos analíticos. Neste contexto, a cromatografia planar se apresenta como um método simples, versátil e acessível para separar interferentes durante as determinações quali-quantitativas.

A quantificação do Ca^{2+} após a separação cromatográfica, realizada através da medida do tamanho e intensidade da cor das manchas, oferece resultados muito grosseiros e pouco precisos. As técnicas comuns de eluição exigem a passagem de volumes relativamente grandes de um eluente através do material retirado do cromatograma,^{2-4,6,7,9,11-13} o que causa diluição demasiada, dificultando a quantificação

* Departamento de Química Analítica - Instituto de Química - UNESP - 14800-900 - Araraquara - SP - Brasil.

** Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - 14870-000 - Jaboticabal - SP - Brasil.

no eluato. Assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver uma nova metodologia para eluir e quantificar o Ca^{2+} , após a sua separação pela cromatografia em camada delgada de celulose microcristalina, tomando por base um método de extração por solvente orgânico apresentado por Natelson & Penniall.⁸

Material e métodos

A camada delgada foi preparada misturando-se 25 g de celulose microcristalina (Merck) com 90 ml de água deionizada com posterior agitação por dois minutos. Com o auxílio do conjunto espalhador (Desaga) regulado para 300 μ , aplicou-se uma camada uniforme da suspensão sobre cinco placas de vidro de 20 x 20 cm. Após a secagem ao ar ambiente por cerca de três horas, as cromatoplacas foram ativadas em estufa regulada para 105-110°C por dez minutos. A seguir, com o auxílio de um estilete e de uma régua, foram demarcadas na camada delgada seis pistas independentes, com 3,0 cm de largura e 12,5 cm de comprimento, sendo demarcada a linha de aplicação, a 1,5 cm da base, e a linha de chegada, distanciada de 10 cm da primeira.

As amostras de material vegetal (folhas de *Citros* e de *Cajanus*), secas em estufa a 60-70°C, foram incineradas em mufla a 550°C durante três horas. Posteriormente, 0,5 g de cinzas (pesadas com precisão de 0,1 mg) foram solubilizadas com 10,0 ml de HCl concentrado (Merck), e a solução obtida foi aquecida e evaporada até que o volume se reduzisse à metade, quando foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,0 ml, cujo volume foi completado com água deionizada.

Para averiguar o método quanto à recuperação, foram preparadas outras amostras de forma semelhante, porém, antes de completar o volume final dos balões volumétricos, adicionou-se 20,0 e 25,0 ml (respectivamente às amostras de *Citros* e *Cajanus*) de uma solução padrão 100 ppm em Ca^{2+} , de modo que estes novos extratos continham 40 e 50 ppm, respectivamente, a mais que os primeiros.

Em cada cromatoplaça, três pistas eram reservadas para a aplicação da amostra (triplícata) e as demais eram mantidas em branco, sem aplicação, a fim de serem usadas para determinar a contaminação da cromatoplaça. Em cada uma das pistas destinadas à amostra, aplicaram-se 150 μ l do extrato com o auxílio de um aplicador adequado, mantendo-se a cromatoplaça sob o fluxo de ar quente de um secador de cabelos para evaporar o solvente à medida que a solução era depositada sobre a linha de partida.

A seguir, colocou-se a cromatoplaça em uma cuba contendo a fase móvel 1-butanol, HCl concentrado, metanol e água, na proporção volumétrica de 6:5:48:1 (Cazetta & Zuanon¹). Após o desenvolvimento cromatográfico, a cromatoplaça foi retirada da cuba, seca com fluxo de ar quente, nebulizada uniformemente com alizarina 0,004% (m/v) em etanol e submetida a vapores de amônia para a localização dos íons Ca^{2+} no cromatograma.

As manchas referentes ao cálcio foram retiradas das pistas que continham as amostras, por raspagem, com o auxílio de uma lâmina para microscopia, sendo transferidas quantitativamente para balões volumétricos com capacidade para 20 ml, que foram usados apenas como recipiente para a reação e extração. O mesmo procedimento foi realizado para as três pistas em branco, retirando-se a camada delgada das regiões correspondentes às manchas de Ca^{2+} , de modo que as quantidades de celulose microcristalina retiradas eram iguais às retiradas das pistas com amostras.

A seguir, a cada frasco foram adicionados 3,0 ml de HCl 0,01 mol l⁻¹, seguido de leve agitação e repouso por cerca de três minutos. Após o repouso, adicionou-se 5,0 ml da solução de alizarina 0,004% (m/v) em 1-butanol e 3,0 ml de NaOH 0,08 mol l⁻¹, conforme as indicações de Natelson & Penniall.⁸ Os frascos foram tampados imediatamente após a adição da base, agitados vigorosamente durante três minutos e depois foram deixados em repouso por quinze minutos, para a adequada separação das fases e decantação da celulose, mantendo-se os frascos tampados.

A fase orgânica sobrenadante foi retirada cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, sendo transferida rapidamente para a cubeta do espectrofotômetro para a imediata determinação da absorbância a 560 nm. A retirada da fase orgânica e a determinação da absorbância deve ser realizada em um frasco de cada vez, que deve ser aberto apenas no momento destas operações, uma vez que a exposição da solução ao ar ambiente promove uma turvação, possivelmente devido à formação de Na_2CO_3 , que interfere nas medidas espectrofotométricas.

As absorbâncias foram determinadas em um espectrofotômetro Micronal, modelo B-341 II, com feixe simples e em uma cubeta com 1 cm de caminho óptico, ajustado (absorbância zero) com uma solução preparada em um frasco limpo, sem celulose, no qual foram adicionados os mesmos reagentes e seguido o mesmo procedimento dos demais frascos. Em aparelhos de feixe duplo, as absorbâncias das soluções poderiam ser determinadas contra a água. Entre uma medida e outra, a cubeta foi lavada com um jato de água deionizada, aplicada com o auxílio de um frasco lavador. A pequena quantidade de água que permanecia no fundo da cubeta não causava problemas na medida seguinte.

A absorbância média, obtida das três pistas sem amostra, correspondia à contaminação da cromatoplaça, e, portanto, este valor foi descontado das absorbâncias obtidas das pistas com amostra antes dos cálculos, para determinação da concentração.

A concentração das amostras foi calculada pela equação de regressão linear obtida de uma curva padrão, previamente preparada, cujos pontos foram obtidos por procedimento idêntico ao das amostras.

Os mesmos extratos também foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica, e estes, bem como as soluções padrões, foram diluídos 25 vezes para se adequarem à faixa de trabalho do espectrofotômetro de absorção atômica (marca Intralab, modelo AA-1475).

Resultado e discussão

Durante as várias tentativas visando estabelecer uma forma de eluir e quantificar os cátions Ca^{2+} após a separação cromatográfica, verificou-se que a celulose microcristalina, quando entra em contato com soluções de ácido clorídrico, absorve-as e passa a se comportar como um composto de elevada polaridade. Assim sendo, observou-se que a celulose permanecia suspensa apenas na fase aquosa, não se misturando à fase orgânica (butanol), que permanecia limpa após alguns minutos de decantação. Surgiu, assim, a possibilidade de se utilizar de um método de extração por solvente. A literatura^{10,5} não apresenta, para o cálcio, muitos métodos colorimétricos baseados na extração por solventes. Entretanto, o método proposto por Natelson & Penniall⁸ revelou-se bastante interessante pelo fato de que o cromógeno (alizarina) e o solvente (1-butanol) são empregados como revelador e componente da fase móvel, respectivamente, utilizados na obtenção do cromatograma.

A adição da solução de NaOH antes dos demais reagentes, como indicado na literatura,⁸ impedia a eluição completa dos íons Ca^{2+} presentes na celulose, possivelmente devido à formação de seu hidróxido. Quando se iniciou o tratamento da celulose com HCl 0,01 mol l⁻¹ e o NaOH foi adicionado por último e imediatamente antes da extração, obtiveram-se bons resultados, como se pode observar pelos dados apresentados na Tabela 1 e na Figura 1.

Tabela 1 - Absorbâncias obtidas nas diferentes pistas de cada cromatoplaça durante a elaboração da curva padrão de Ca^{2+} . Nas pistas I, II e III nada foi aplicado, mas nas pistas IV, V e VI aplicaram-se 150 μl das soluções padrões

Cromatoplaça N°	Soluções padrões de Ca^{2+} (ppm)	Absorbância (560 nm)									
		Branco (B)						Pistas cromatográficas			
		I	II	III	Média		Padrões (P)		Média		MP - MB
1	25,0	0,036	0,044	0,078	0,053	0,302	0,311	0,308	0,307	0,254	
2	50,0	0,046	0,020	0,046	0,037	0,531	0,542	0,543	0,539	0,502	
3	75,0	0,048	0,039	0,040	0,042	0,769	0,800	0,763	0,777	0,735	
4	100,0	0,073	0,065	0,068	0,069	0,994	1,013	0,988	0,988	0,919	

Os valores médios (MB) obtidos para as pistas-controladas das diferentes cromatoplaças (Tabela 1) indicam que cada cromatoplaça pode possuir uma contaminação diferente, dependendo do lote e da exposição ao ambiente, o que justificou a necessidade de manter três pistas sem aplicação para determinar e descontar a contaminação que cada cromatoplaça possuía.

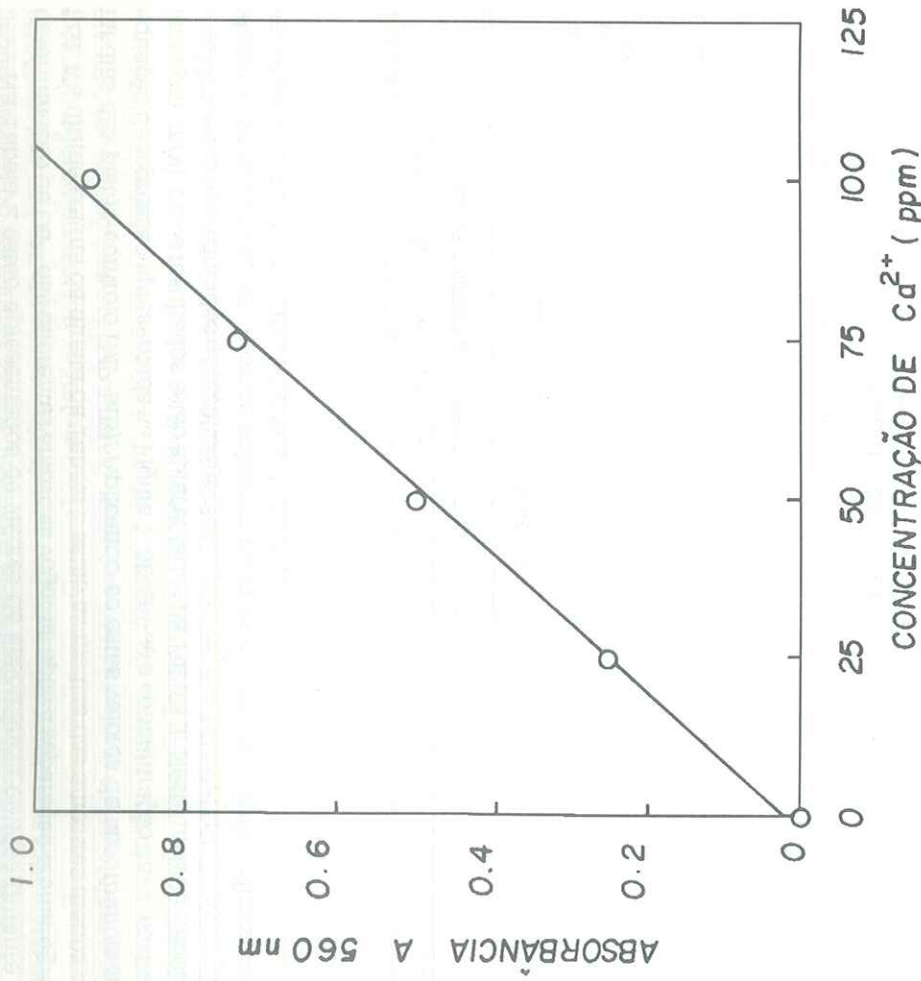


FIGURA 1 - Curva padrão de Ca^{2+} , obtida pelo método apresentado no presente trabalho. Os pontos (o) representam a média de três repetições e a linha cheia refere-se à reta obtida por regressão linear ($Y = 0,041 + 0,009036 \cdot X$), que apresentou um coeficiente de correlação linear (r) de 0,998.

Tudo leva a crer que, se todo o processo fosse conduzido em um ambiente completamente isento de poeira e fossem utilizadas cromatoplaças obtidas de uma mesma partida de celulose microcristalina e de um mesmo lote de preparação, os valores referentes às pistas em branco seriam menores e mais uniformes.

Um rigoroso controle da contaminação em todas as etapas do trabalho possivelmente permitiria a preparação da curva padrão aplicando-se as soluções 0, 25, 50, 75 e 100 ppm em cinco pistas demarcadas em uma mesma cromatoplaça. Entretanto, como se pode observar pela Figura 1, bons resultados podem ser obtidos utilizando-se o esquema apresentado no presente trabalho, mesmo utilizando-se cromatoplaças preparadas em diferentes lotes e com diferentes graus de contaminação.

A análise dos dados da Tabela 3 indicou que os resultados do teor de cálcio, determinados nas amostras por ambos os métodos, apresentaram boa concordância nas quatro amostras analisadas. Os resultados obtidos por cromatografia planar e espectrofotometria apresentaram, em geral, maiores desvios padrões, possivelmente devido ao maior número de etapas a que a amostra foi submetida durante a determinação, mas não foram muito discrepantes.

Os valores referentes à percentagem de recuperação (apresentados entre parênteses na Tabela 3) indicaram que as determinações realizadas pelo método proposto apresentaram a tendência de superestimar os resultados (recuperação maior que 100%), enquanto as realizadas por espectrofotometria de absorção atômica tenderam a subestimar o cálcio adicionado às amostras (cerca de 96%).

O bom desempenho do método proposto deve-se ao fato de eluir, concentrar e promover a reação colorimétrica em apenas uma operação. Além disso, apresenta a vantagem de que os reagentes são os mesmos utilizados durante a fase de separação e revelação do cromatograma e são ordinariamente encontrados nos laboratórios que trabalham com cromatografia de íons inorgânicos.

Conclusão

O método proposto mostrou-se apropriado para a quantificação de Ca^{2+} após separação por cromatografia em camada delgada de celulose microcristalina, oferecendo resultados bastante concordantes com os obtidos por espectrofotometria de absorção atômica. Apresenta a vantagem de eluir, pré-concentrar e promover a reação colorimétrica em uma única operação, e ainda utiliza o mesmo tipo de reagentes e solventes nas etapas de separação, revelação e quantificação. A performance dos resultados obtidos para amostras vegetais sugere a possibilidade da aplicação do método proposto para analisar outros tipos de amostras.

ZUANON NETTO, J., CAZETTA, J. O. A quantitative method for Ca^{2+} determination by planar chromatography spectrophotometry. *Ecl. Quím.*, São Paulo, v. 19, p. 67-74, 1994.

■ **ABSTRACT:** This paper presents a method for Ca^{2+} elution and quantification after separation by cellulose microcrystalline thin layer chromatography. The Ca-alizarin complex was extracted with 1-butanol, directly from cellulose microcrystalline water suspension obtained by removal of Ca^{2+} spots from chromatogram. The Ca^{2+} concentration was determined by spectrophotometry of organic phase. The proposed method employ common substances and is able to elute, to concentrate and improve de colorimetric reaction in a single operation. The results performance on vegetal samples indicates that this method may be useful for other materials.

■ **KEYWORDS:** Calcium; planar chromatography; plant.

Na Tabela 2 estão apresentados os valores de absorbância obtidos durante a determinação de Ca^{2+} das diferentes amostras vegetais após a separação cromatográfica. Na última coluna da direita da Tabela 2 estão as médias das amostras menos as médias das pistas-controle (MP-MB). Aplicando-se estes valores de absorbância na equação de regressão apresentada na Figura 1, obtém-se a concentração das amostras (em ppm, m/v), cujos resultados estão apresentados na Tabela 3. Nesta mesma Tabela, também estão apresentados os resultados obtidos por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando-se as mesmas soluções padrões e extratos, porém diluídas 25 vezes para se adequar à faixa analítica do aparelho.

Tabela 2 - Absorbâncias obtidas durante a determinação de Ca^{2+} nas amostras. Nas pistas I, II e III nada foi aplicado, mas nas pistas IV, V e VI aplicaram-se 150 μ l de extrato das diferentes amostras

Cromatoplaça Nº	Absorbância (564 nm)										
	Pistas cromatográficas										
	I		II		III		IV		V		VI
	Branco		B3		B2		B1		Média		MP - MB
5	0,061	0,077	0,098	0,098	0,079	0,365	0,398	0,424	0,396	0,317	
6	0,035	0,029	0,009	0,024	0,825	0,816	0,835	0,825	0,801		
7	0,057	0,042	0,001	0,033	0,445	0,411	0,427	0,428	0,395		
8	0,027	0,024	0,040	0,030	0,820	0,859	0,833	0,837	0,807		

Tabela 3 - Concentração de Ca^{2+} (ppm) obtida para os diferentes extratos através da cromatografia-espectrofotometria e através da espectrofotometria de absorção atômica. Os valores que sucedem os resultados referem-se aos respectivos desvios padrões e os números entre parênteses correspondem à recuperação do cálcio adicionado às amostras

Amostras	Método de análise	
	Cromatografia-espectrofotometria	Espectrofotometria de absorção atômica
Cajanus	30,6 \pm 3,2	33,0 \pm 1,2
Cajanus + 50 ppm	84,1 \pm 1,1 (107%)	81,0 \pm 2,1 (96%)
Citros	39,2 \pm 1,9	43,1 \pm 1,2
Citros + 40 ppm	84,8 \pm 2,2 (114%)	82,0 \pm 1,7 (97%)

Referências bibliográficas

1. CAZETTA, J. O., ZUANON NETTO, J. Separação de cátions de amostras vegetais pela cromatografia em papel e em camada delgada. *Quím. Nova*, v. 14, p. 74, 1991. (Suplemento)
2. COLLINS, H. C., BRAGA, G. L. *Introdução a métodos cromatográficos*, 3. ed. Campinas: Ed. Unicamp, 1988.
3. KAISER, R. E. *Chromatographic methods - Planar chromatography*. Hemsbach/Bergstr, Hüthig, 1986.
4. LEDERER, E., LEDERER, M. *Cromatografía - Revisión de sus principios e aplicaciones*. 2. ed. Buenos Aires: El Ateneo, 1960.
5. MARKZENKO, Z. *Spectrophotometric determination of elements*. Chichester: Ellis Horwood, 1976.
6. MICHAL, J. *Inorganic chromatographic analysis*. London: VNR, 1973.
7. MIKES, O. *Laboratory handbook of chromatographic methods*. London: VRN, 1970.
8. NATELSON, S., PENNIAL, R. Colorimetric estimation of ultramicro quantities of calcium in human serum as the complex with alizarin. *Anal. Chem.*, v. 27, p. 434-7, 1955.
9. POLLARD, F. H., MCOMIE, J. F. W. *Chromatographic methods of inorganic analysis*. 2. ed. London: Butterworths, 1956.
10. SANDELL, E. B. *Colorimetric determination of trace metals*. 3. ed. New York: Interscience, 1959, 7 v., v. 3.
11. SCHWEDT, G. *Chromatographic methods in inorganic analysis*. Hemsbach/Bergstr: Hüthig, 1981.
12. STHAL, E. *Thin layer chromatography - A laboratory handbook*. 2. ed. New York: Springer, 1969.
13. STOCK, P., RICE, C. B. F. *Chromatographic methods*. 3. ed. Norwich: Chapman and Hall, 1974.

Recebido em 3.1.1994.

Aceito em 25.2.1994.