

Metodologia para tratamento de clorofórmio comercial para uso em separações cromatográficas

João Oiano Neto¹
Humberto Ribeiro Bizzo²
Marco Antonio Silva Pinto³
Andressa Moreira de Souza⁴

Introdução

O clorofórmio ou triclorometano (CCl_3 ; M. M. 119,39 g/mol; $\text{bp}_{1\text{atm}}$ 61-62°C; d_{20} 1,484 g/mL) é um solvente orgânico amplamente utilizado em várias áreas de pesquisa como química, fitoquímica, bioquímica, biologia molecular, etc. (WINDHOLZ et al., 1983). Caracteriza-se como um líquido incolor, não inflamável, altamente volátil, irritante aos olhos e pele, nocivo se inalado ou ingerido, sendo classificado como carcinogênico pela *Environmental Protection Agency* - EPA (WINDHOLZ et al., 1983).

Pode se decompor na presença de luz, agentes oxidantes, ácidos e bases fortes, magnésio, sódio e lítio metálicos produzindo gás cloro, fosgênio ou cloreto de carbonila (COCl_2 , M. M. 98,92g/mol - explosivo) e ácido clorídrico (HCl) (SIGMA-ALDRICH, 2009). É comercializado em frasco âmbar e estabilizado com 0,5-1% de etanol ou 100-300ppm de amileno quando a pureza é de 99,8% (WINDHOLZ et al., 1983).

Industrialmente, o clorofórmio é produzido pela cloração do metano e esta reação ocorre sob aquecimento a 400-500°C via mecanismo radicalar (WINDHOLZ et al., 1983). A formação de cloro radicalar leva à cloração sucessiva do cloroalcano presente, dando origem a uma mistura de cloroalcanos: diclorometano (M. M. 84,94g/mol; $\text{bp}_{1\text{atm}}$ 39,75°C), clorofórmio e tetracloreto de carbono (M. M. 153,84g/mol; $\text{bp}_{1\text{atm}}$ 76,7°C) (Figura 1).

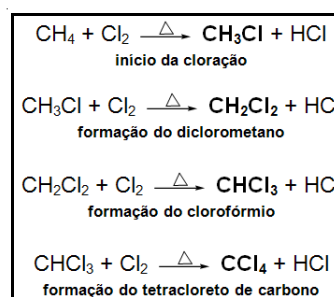


Figura 1: Reações de formação da mistura de cloroalcanos a partir do cloro gasoso e metano sob aquecimento.

¹Químico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, oiانو@cnpse.embrapa.br

²Químico Industrial, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, bizzo@ctaa.embrapa.br

³Farmacêutico, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, marcoasp@ctaa.embrapa.br

⁴Química, M.Sc. em Química, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ, andressa@ctaa.embrapa.br

A solubilidade do clorofórmio em água a 25°C é de 1:200 (v/v) $\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$, formando com esta um azeótropo a 56,12°C (MORITA; ASSUMPCÃO, 2001; WINDHOLZ et al., 1983).

O fosgênio presente no clorofórmio reage lentamente com água e álcalis, sendo eliminado pela agitação com solução alcalina. No entanto, devido à alta reatividade do clorofórmio à luz e ao oxigênio, a eliminação completa do fosgênio não é obtida (MORITA; ASSUMPCÃO, 2001).

Um processo simples de purificação do clorofórmio comercial envolve as etapas de lavagem com água para remover o etanol utilizado como estabilizante, secagem com cloreto de cálcio, refluxo sob pentóxido de fósforo e posterior destilação (PERRIN; ARMAREGO, 1988).

Outro método de purificação envolve a agitação com pequenas quantidades de ácido sulfúrico concentrado, lavagem com água, secagem com cloreto de cálcio, filtração e posterior destilação (PERRIN; ARMAREGO, 1988).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia alternativa para o tratamento de clorofórmio, de forma rápida e barata, sem envolver muitas etapas e o consumo de vários reagentes.

Experimental

Amostras

Dez litros de clorofórmio grau P. A., fora do prazo de validade, armazenados no almoxarifado foram utilizados no processo de purificação.

Devido ao caráter tóxico do clorofórmio, toda manipulação foi realizada em capela com exaustão, com a utilização de EPI's (avental, óculos de segurança e luvas).

Medida do pH do Clorofórmio

A medida do pH do clorofórmio foi feita para verificar a presença de ácido clorídrico (HCl). Para isso, fez-se uma partição com água ultrapura (grau Milli-Q, pH 6) na razão de 1:1 (v/v) e o pH da fase aquosa foi medido com fita indicadora de pH (pH-fix 0-14 Macherey-Wagel®).

A presença de ácido clorídrico foi indicada pela medida do pH da fase aquosa (pH 1), obtida após a partição com o clorofórmio sem tratamento.

Filtração em Alumina

Nesta etapa, os dez litros de clorofórmio foram filtrados à pressão reduzida em um funil de vidro (d. i. 11cm) com placa porosa, contendo um leito com aproximadamente 7,0cm de espessura e 410 gramas

de alumina neutra Merck® 90 (63-200mesh) ativada a 110°C em estufa por 24 horas (Figura 2).

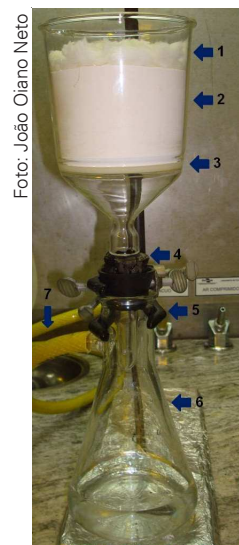


Figura 2. Sistema para filtração à pressão reduzida. (1) lâ de vidro; (2) leito de alumina neutra; (3) funil de vidro com placa sinterizada; (4) adaptador de borracha; (5) garra com suporte universal; (6) kitassato e (7) mangueira de vácuo.

A lâ de vidro é utilizada para evitar que a aplicação do solvente, diretamente sobre o leito de alumina, danifique seu empacotamento.

A etapa de filtração foi efetuada a fim de remover possíveis contaminantes mais polares presentes no clorofórmio, assim como o próprio fosgênio.

Após o processo de filtração, a alumina utilizada foi recuperada para posterior reutilização, mediante lavagem com metanol grau HPLC e água ultrapura. Em seguida, a alumina foi ativada a 110°C em estufa por 24 horas.

Neutralização com NaOH

O clorofórmio, obtido após a filtração sob leito de alumina neutra, foi deixado sob agitação com lentilhas de hidróxido de sódio (NaOH) durante a noite para neutralização do ácido clorídrico presente.

Ao final deste período, o clorofórmio foi filtrado para remoção das lentilhas e lavado com água grau Milli-Q (razão 1:1 v/v) sucessivamente até o pH da fase aquosa ser aproximadamente o mesmo da água ultrapura (pH 5 a 6).

Em seguida, o solvente foi armazenado em frasco âmbar contendo sulfato de sódio anidro como agente secante, sendo destilado em seguida.

A lavagem com água visa, além de eliminar resíduos de fosgênio e álcali presentes, neutralizar o

diclorocarbênio (CCl_2), espécie altamente reativa, formado durante a etapa de neutralização.

Destilação fracionada

A destilação do clorofórmio foi realizada em um sistema de destilação fracionada semi automatizado modelo NGW equipado com controle digital de temperatura de ebulição, coluna de destilação, manta de aquecimento, balão de fundo redondo, controlador de pressão e banho termostatzado para água de refrigeração.

Utilizou-se uma razão de refluxo de 0,75 descartando-se a fração inicial (*cabeça*) e final (*cauda*) no processo de destilação.

Após a destilação, o clorofórmio, antes de ser utilizado nas colunas cromatográficas abertas, foi armazenado em frasco âmbar contendo 1% (v/v) de etanol grau HPLC como agente estabilizante.

Análises por CG-EM

Em todas as etapas do processo, uma amostra do clorofórmio foi coletada e submetida à análise por CG-EM.

Utilizou-se um cromatógrafo a gás modelo Agilent® 6890 e detector de massas Agilent® 5973N com fonte de impacto eletrônico (EI) a 70eV.

Na análise cromatográfica utilizou-se uma coluna da J&W Scientific HP₅ (5% fenil + 95% dimetilsilicone; 30m x 0,25mm x 0,25um), volume de injeção 1mL em *splitless*, T_{inj} . 250°C, T_{ini} . 40°C, gradiente de temperatura 40-150°C a 5°C por min., depois 150-240°C a 10°C por min. e hélio como gás de arraste a uma vazão de 1,0mL/min.

Resultados e Discussão

Análise do Clorofórmio por CG-EM

O cromatograma da análise do clorofórmio, sem qualquer tipo de tratamento pode ser observado na Figura 3.

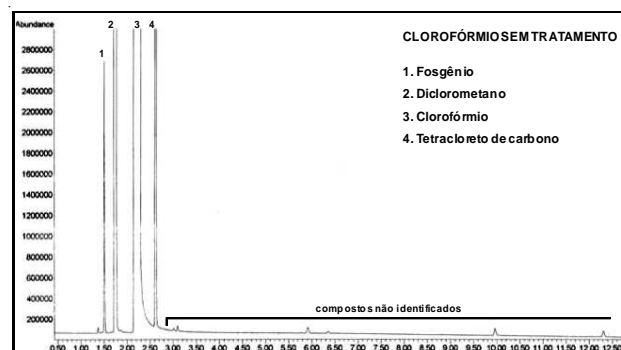


Figura 3. Cromatograma da análise por CG-EM do clorofórmio sem tratamento.

Estas substâncias foram identificadas comparando-se os espectros de massas dos picos presentes no cromatograma das amostras de clorofórmio com os espectros de massas da biblioteca NIST do equipamento de CG-EM.

Os valores de relação massa-carga (m/z) e a estrutura para cada fragmento utilizado na identificação dessas substâncias estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Relação massa-carga (m/z) e estrutura dos fragmentos utilizados na identificação das substâncias presentes nas amostras de clorofórmio.

COMPOSTO	RELAÇÃO M/Z	FRAGMENTO
FOSGÊNIO (COCl ₂ ; M. M. 98,92g/mol)	63	[M-HCl] ³⁵ +
	65	[M-HCl] ³⁷ +
DICLOROMETANO (CH ₂ Cl ₂ ; M. M. 84,94g/mol)	84	M ⁺
	49	[M-Cl] ³⁵ +
CLOROFÓRMIO (CHCl ₃ ; M. M. 119,39g/mol)	119	M ⁺
	83	[M-HCl] ³⁵ +
	47	[M-(HCl) ³⁵] ₂ ⁺
TETRACLORETO DE CARBONO (CHCl ₄ ; M. M. 153,84g/mol)	153	M ⁺
	117	[M-HCl] ³⁵ +
	82	[M-H(³⁵ Cl)] ₂ ⁺

Inicialmente o clorofórmio apresentou pH 1 na partição com água, indicando uma alta concentração de ácido clorídrico, sendo assim tratado com NaOH para eliminar o ácido presente.

Em estudos de separação cromatográfica de extratos vegetais, a presença de ácido em solventes como clorofórmio, metanol e acetona, juntamente com o leito particulado de sílica gel, age como meio catalítico para a geração de metabólitos (*artefatos*) que não são oriundos do metabolismo secundário do vegetal. Estes artefatos são produzidos, principalmente, pela ocorrência de reações de hidrólise de ésteres e glicosídeos, O-metilação, clivagem de epóxidos, formação de acetonídeo, etc.

O teor de fosgênio encontrado no clorofórmio sem tratamento foi 1,23% e os teores de diclorometano e tetracloreto de carbono foram 21,79% e 6,77%, respectivamente.

Como observado nas Figuras 4 e 5, os processos de filtração sobre leito de alumina e a neutralização com NaOH eliminaram o fosgênio presente na amostra, assim como o ácido do meio. Além disso, também reduziram a concentração de outros contaminantes da amostra (compostos não identificados).

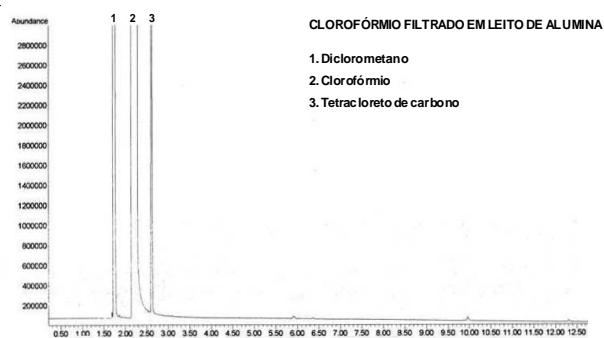


Figura 4. Cromatograma da análise por CG-EM do clorofórmio filtrado sob leito de alumina.

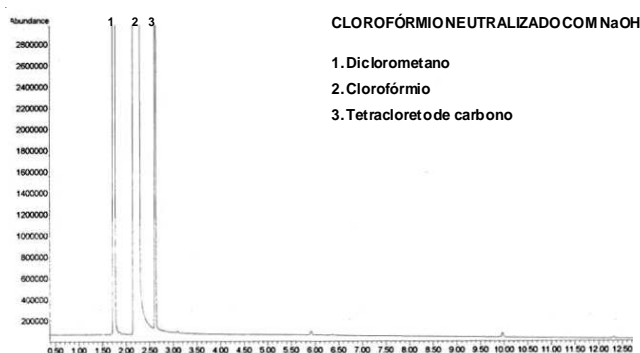


Figura 5. Cromatograma da análise por CG-EM do clorofórmio após neutralização com NaOH.

A análise do clorofórmio após a destilação (Figura 6) indicou a remoção dos contaminantes não eliminados nas etapas anteriores. Porém, a destilação fracionada, com a razão de refluxo utilizada, não foi eficiente para remover completamente o diclorometano e o tetracloreto de carbono.

Após essa etapa, os teores de diclorometano e tetracloreto de carbono presentes no clorofórmio foram 21,06% e 3,25%, respectivamente.

A destilação não alterou a porcentagem do diclorometano presente no clorofórmio, porém reduziu em 48% o teor de tetracloreto de carbono em relação à amostra inicial.

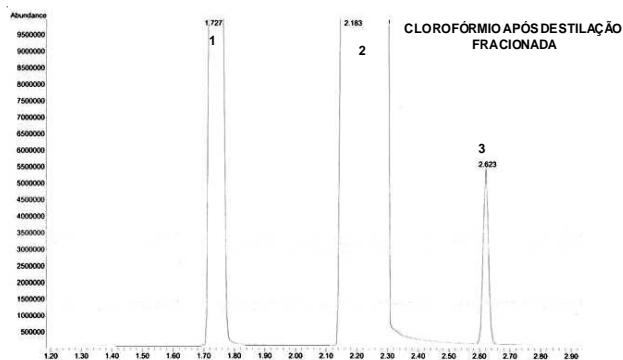


Figura 6. Cromatograma da análise por GC-EM do clorofórmio após destilação.

Análise Cromatográfica em Camada Fina (CCD)

O tratamento de 10 litros de clorofórmio grau P. A. resultou em aproximados 8,5 litros de solvente a ser utilizado nas separações em coluna cromatográfica aberta.

Esse lote de clorofórmio tratado foi testado no Laboratório de CLAE como fase móvel na separação cromatográfica do extrato cetônico das sementes de *Citrus sp.* utilizando-se coluna aberta de baixa pressão.

Dessa separação em coluna foram obtidas várias frações contendo uma mistura de limonóides e algumas destas frações foram analisadas em placas de sílica comparando-se o perfil cromatográfico obtido quando a fase móvel continha o clorofórmio tratado no laboratório e o clorofórmio grau HPLC Tedia® (Figura 7).

Como observado na figura abaixo, as amostras apresentaram o mesmo perfil cromatográfico quanto ao número de componentes presentes, assim como os mesmos valores de fator de retenção (R_f).

Estes resultados mostram que não há diferença de seletividade na separação cromatográfica quando se utiliza o clorofórmio tratado em comparação ao clorofórmio comercial.

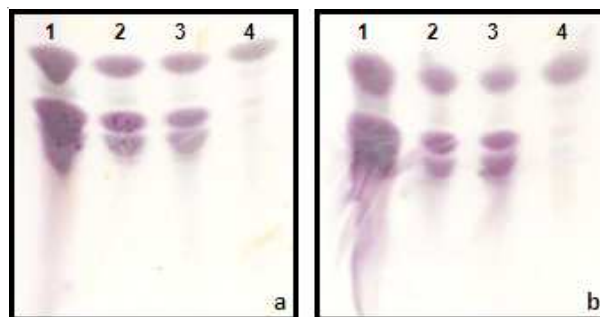


Figura 7. Análise em placas de sílica das amostras contendo misturas de limonóides utilizando clorofórmio tratado (a) e clorofórmio grau HPLC Tedia® (b). Fase móvel hexano: clorofórmio: metanol 8:6:1 (v/v/v); revelação com vanilina: ácido acético: ácido sulfúrico.

Em função da presença de água nos solventes orgânicos, as placas de sílica são muito susceptíveis à perda de seletividade e consequente resolução cromatográfica.

Nesse caso, isso não foi observado mesmo tendo-se utilizado apenas sulfato de sódio como agente secante antes da etapa de destilação, ao invés de pentóxido de fósforo durante a destilação, como descrito por Perrin e Armarego (1988).

A presença desses dois solventes no clorofórmio não

interferiu na eficiência de separação cromatográfica, visto que o tetracloreto de carbono estava em pequena concentração, sendo um solvente apolar em relação à sílica gel.

O diclorometano, por outro lado, mesmo estando em maior concentração (21,06%) também não alterou a força da fase móvel, assim como a seletividade da separação.

Isto se deve ao fato do clorofórmio e o diclorometano apresentarem constantes dielétricas (ϵ°) ou polaridades relativas praticamente iguais ($\epsilon^\circ_{\text{diclorometano}}$ 0,30; $\epsilon^\circ_{\text{clorofórmio}}$ 0,31) em relação à sílica gel.

Conclusão

O método desenvolvido mostrou-se rápido e de fácil execução, permitindo o tratamento de grandes quantidades do solvente em pouco tempo, com um rendimento aproximado de 85%.

O clorofórmio obtido ao final desta metodologia apresentou características apropriadas para ser utilizado na purificação de extratos vegetais utilizando cromatografia.

A recuperação e reutilização da alumina no processo de filtração contribuem para a diminuição dos custos desta metodologia.

Além de contribuir para a redução dos custos com a compra de novos lotes de solvente, este procedimento

gera uma significativa economia evitando o envio de grandes quantidades de material para descarte e incineração.

Referências

MORITA, T.; ASSUMPCÃO, R. M. V. **Manual de soluções, reagentes e solventes**: padronização, preparação, purificação. 11. ed. São Paulo: E. Blücher, 2001. 629 p.

PERRIN, D. D.; ARMAREGO, W. L. F. **Purification of laboratory chemicals**. 3rd ed. O: Pergamon Press, 1988. 391 p.

SIGMA-ALDRICH. **Material safety data sheet and product information sheet**. Product number C2432 - chloroform. 2009. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/c2432pis.Par.0001.File.tmp/c2432pis.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2010.

WINDHOLZ, M.; BUDAVARI, S.; BLUMETTI, R. F.; OTTERBEIN, E. S. (Ed.). **The Merck Index**. 10th ed. Rahway: Merck, 1983.

Comunicado Técnico, 164

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (0XX21) 3622-9600
Fax: (0XX21) 3622-9713
Home Page: <http://www.ctaa.embrapa.br>
E-mail: sac@ctaa.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2010): tiragem (50 exemplares)

Comitê de publicações

Presidente: *Virgínia Martins da Matta*
Membros: *Renata Torrezan, Renata Galhardo Borguini, Marília Penteado Stephan, Marcos José de Oliveira Fonseca, Daniela de Grandi Castro Freitas, André Luis N. Gomes, Luciana Sampaio de Araújo.*

Secretária: *Michele Belas Coutinho*

Expediente

Supervisão editorial: *Renata Galhardo Borguini*
Revisão de texto: *Janine Passos Lima da Silva*
Normalização bibliográfica: *Luciana S. de Araújo*
Editoração eletrônica: *Riane Rodrigues Tovar*