

Técnicas cromatográficas: princípios, classificações e aplicações

| Amanda Danuello

UFU

| Carla de Moura Martins

IFGoiano

| Mário Machado Martins

UFU

| João Flávio da Silveira Petrucci

UFU

| Rafael Aparecido Carvalho Souza

UFU

| Sérgio Antônio Lemos de Moraes

UFU

| Michelle Nauara Gomes do Nascimento | Marcos Pivatto

UFU

UFU

RESUMO

A cromatografia pode ser definida como um conjunto de técnicas de separação físico-química que envolvem um sistema de duas fases, uma estacionária e outra móvel, que pode ser utilizado para separar compostos presentes em amostras sólidas, líquidas e gasosas. Essas técnicas permitem a separação, identificação e quantificação dos compostos através do uso de detectores. Técnicas cromatográficas são fundamentais para a separação e o isolamento de moléculas bioativas, a partir de matrizes complexas de origem natural, que possam ser utilizadas na terapêutica, na agricultura ou na pecuária. Assim, aqui apresentamos diretrizes que abrangem os princípios, classificações e aplicações da cromatografia.

Palavras-chave: Cromatografia, Fases Estacionária e Móvel, Separação de Matrizes Complexas.

■ INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos do uso da cromatografia foram na Antiguidade. Na literatura é descrito que o botânico russo Michael Semenovich Tswett apresentou um trabalho em 1903 à Sociedade de Ciências de Varsóvia, no qual ele descreveu os primeiros resultados de sua pesquisa com extratos de folhas para estudar as estruturas químicas das clorofilas das plantas, utilizando uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio. Os constituintes do extrato percorreram a coluna com velocidades diferentes, arrastados por éter etílico, o que resultou na separação dos componentes, e foi relatado por Tswett como um novo método de análise baseado no fenômeno de adsorção (ETTRE, 2000; COLLINS, 2006a). Em um segundo trabalho publicado em 1906, Tswett utiliza pela primeira vez, as palavras cromatografia, para o processo, e cromatograma para descrever as bandas separadas na coluna. A utilização desses termos por Tswett teve seu significado na origem das palavras, “cromo” do grego *chroma*, que significa cor, e “grafia” do grego *graphie*, que significa escrever. Porém, em seu segundo artigo, o botânico explicou que a separação na coluna não dependia da cor, mas das interações das substâncias, que podem ser coloridas ou não, com o “recheio” da coluna (fase estacionária) (COLLINS, 2006a).

As técnicas cromatográficas, em geral, permitem a separação, identificação e purificação de compostos presentes em uma mistura para análises qualitativa e quantitativa. As proteínas, por exemplo, podem ser purificadas com base em características como tamanho e forma, carga total, grupos hidrofóbicos presentes na superfície e capacidade de ligação com a fase estacionária. O objetivo da aplicação de técnicas cromatográficas é, além de quantificar, obter um perfil cromatográfico que permita uma separação satisfatória dos compostos presentes em uma amostra dentro de um intervalo de tempo adequado. Para esse fim, ao longo da história, vários métodos de cromatografia foram desenvolvidos, como a Cromatografia em Papel, Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Coluna, Cromatografia por Adsorção, Cromatografia por Troca Iônica, Cromatografia por Exclusão, Cromatografia por Bioafinidade e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) que serão na sequência discutidos mais detalhadamente (COSKUN, 2016).

■ CROMATOGRAFIA

A cromatografia é uma técnica de separação físico-química que envolve um sistema de duas fases, uma estacionária e uma móvel. A separação dos componentes de uma mistura ocorre através da distribuição diferenciada dos constituintes entre as duas fases. Esse método pode ser utilizado para amostras sólidas, líquidas e gasosas (ETTRE, 2000; SNYDER *et al.*, 2010). A seguir são mostradas algumas classificações da cromatografia, baseadas em

critérios como o tipo de fase móvel e estacionária empregados e os princípios de separação dos componentes da amostra.

Classificações da Cromatografia (DEGANI *et al.*, 1998; COLLINS, 2006b)

Pela forma física do sistema cromatográfico: a cromatografia pode ser subdividida em: cromatografia em coluna, na qual é utilizado um tubo cilíndrico; cromatografia planar, a qual se refere à cromatografia em papel; cromatografia por centrifugação; e cromatografia em camada delgada.

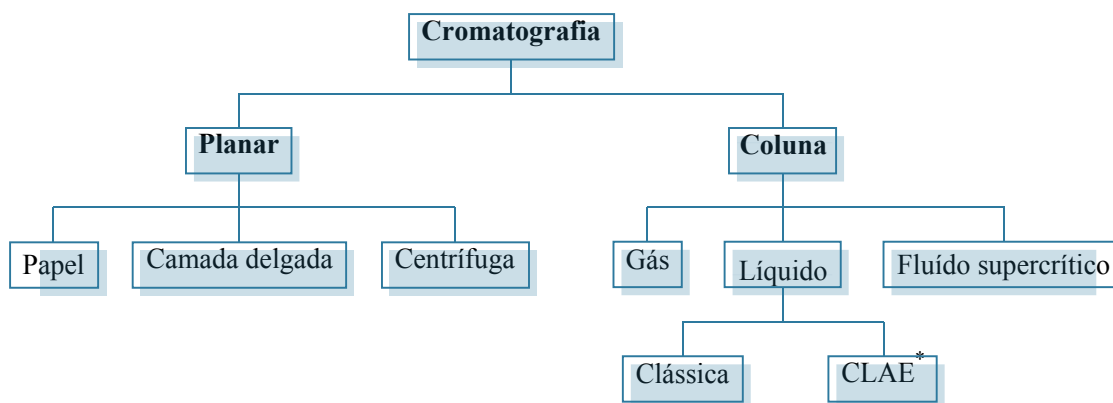
Pela fase móvel empregada: existem três tipos de cromatografia – cromatografia líquida (a fase móvel é um líquido), cromatografia gasosa (a fase móvel é um gás) e cromatografia supercrítica (a fase móvel é um vapor pressurizado). A cromatografia líquida é subdividida em cromatografia líquida clássica, na qual a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que faz uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel.

Pela fase estacionária utilizada: podem ser empregados dois tipos de fase estacionária – sólidas ou líquidas.

Pelo mecanismo de separação: a separação dos componentes por cromatografia pode ocorrer por processos físicos (adsorção e partição), químicos (troca iônica e bioafinidade), mecânicos (exclusão) ou misturas desses mecanismos.

O fluxograma a seguir resume os tipos mais comuns de cromatografia (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática dos tipos mais comuns de cromatografia.



* Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Fonte: Adaptado de Degani *et. al.*, 1998.

Nos processos físicos de separação em cromatografia, os princípios da separação dos componentes são baseados em atrações dipolares, coulômbicas e pela formação de ligações de hidrogênio. Na adsorção, quando a fase estacionária é um sólido, o soluto é retido na interface entre o sólido e a fase móvel através de grupos ativos em sua superfície. Na partição,

quando a fase estacionária é um líquido, o processo de separação é baseado na diferença de solubilidade dos componentes da mistura nas duas fases líquidas (COLLINS, 2006b).

No processo químico de separação por troca iônica, os íons da amostra se ligam aos grupos funcionais ionizáveis da fase estacionária. Nesse processo, a fase estacionária é formada por uma matriz em que são adicionados grupos ionizáveis e a fase móvel é constituída por uma solução iônica com propriedades tamponantes. Assim, a separação ocorre através de trocadores iônicos. Os trocadores aniônicos, os quais contêm carga positiva, retêm ânions e os trocadores catiônicos, que contêm carga negativa, retêm os cátions. Na bioafinidade, a mistura a ser separada possui ligantes bioespecíficos que vão se ligar covalentemente com o suporte da fase estacionária através de interações biológicas, como os antígenos, os quais vão se ligar com os anticorpos (componente complementar) presentes na amostra (COLLINS, 2006b; GE HEALTHCARE, 2007). E no processo por exclusão, o princípio de separação baseia-se no tamanho das partículas da amostra. Geralmente, as partículas menores passam com mais facilidade pela fase estacionária que é formada por uma matriz inerte com partículas de forma, tamanho e porosidade uniformes (COLLINS, 2006b).

Cromatografia em Papel (CP)

A cromatografia em papel pode ser considerada a técnica mais simples entre as cromatografias. Neste procedimento é necessária pequena quantidade de amostra para realizar a separação de compostos polares. A distribuição dos componentes de uma amostra durante a análise é baseada nas diferentes solubilidades dos compostos nas fases móvel e estacionária. Os componentes mais solúveis na fase móvel possuem maior movimentação do que aqueles que interagem mais com a fase estacionária, os quais ficam mais retidos no papel (BRAGA, 2006).

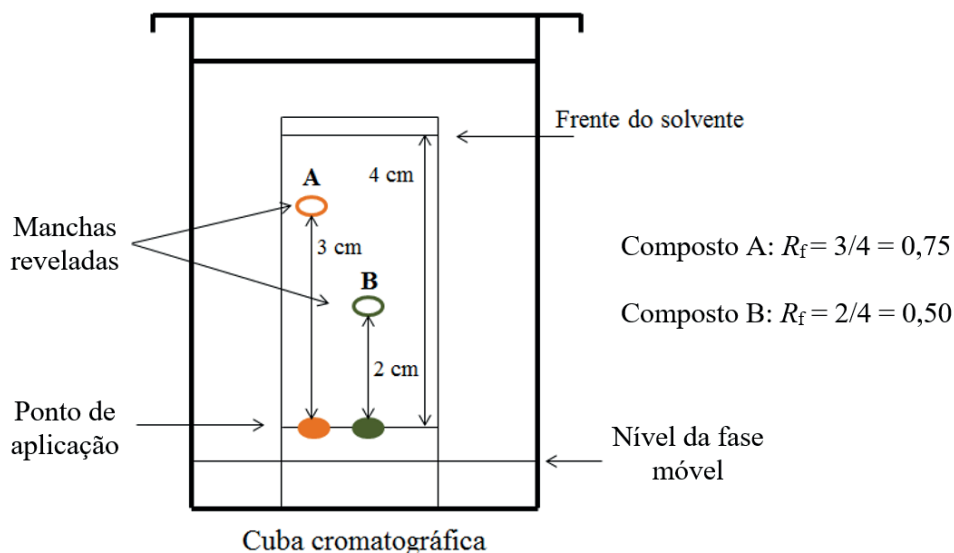
Nessa técnica os componentes de uma amostra são separados por extração líquido-líquido e não por extração sólido-líquido. A celulose absorve até 22% de água, sendo a água sobre a celulose considerada a fase estacionária (BRAGA, 2006; ENGEL *et al.*, 2012). A separação da mistura ocorre através da partição dos solutos entre a água presente nas fibras do papel e o solvente (fase móvel) (FAUST, 1997).

Uma análise qualitativa desta técnica pode ser obtida em função do fator de retenção (do inglês *Retention factor* – R_f), que é expresso pela seguinte relação (Equação 1):

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distância percorrida pela frente de solvente}} \quad (\text{Equação 1})$$

Quando a técnica é realizada em condições especificadas, o valor de R_f pode ser uma constante característica de um composto (Figura 2). Além disso, esse valor pode contribuir para a identificação de um composto desconhecido (ENGEL *et al.*, 2012).

Figura 2. Cálculo do R_f de dois compostos A e B.



Fonte: Adaptado de Okumura *et al.*, 2002.

De acordo com os valores de R_f calculados é possível inferir que o composto B apresenta maior afinidade com a fase estacionária, uma vez que possui menor valor de R_f . Já o composto A apresenta maior afinidade com a fase móvel, uma vez que possui maior valor de R_f .

Esse princípio de separação também é aplicado na cromatografia em camada delgada, que será abordado em seguida e serve como etapa inicial para a separação dos componentes utilizando a cromatografia em coluna. Antes da separação dos componentes de uma amostra por cromatografia em coluna é necessário realizar a otimização das condições em um sistema de cromatografia planar para selecionar o melhor sistema de solventes.

Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica de cromatografia em camada delgada permite a separação rápida e a análise qualitativa de pequena quantidade de amostra. Assim, nesta cromatografia planar os componentes de uma mistura são separados por adsorção. As placas cromatográficas são revestidas com uma fina camada de adsorvente, e quando são colocadas na vertical em uma cuba cromatográfica, o solvente sobe através dos interstícios do adsorvente por capilaridade. Dessa forma, ocorre a separação dos componentes da amostra, os quais são particionados entre a fase móvel líquida e a fase estacionária sólida (ENGEL *et al.*, 2012; LOPES, 2006).

Existe uma grande variedade de adsorventes disponíveis no mercado para utilização em CCD. Dentre eles, podem ser citados a sílica (SiO_2), alumina (Al_2O_3), terra diatomácea,

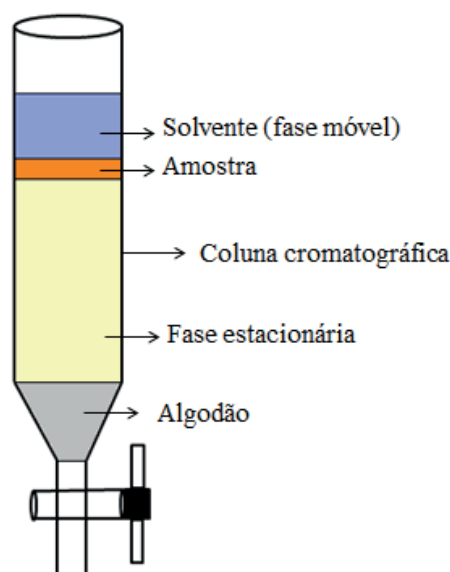
celulose e poliamida como os mais comuns (LOPES, 2006). A escolha do adsorvente depende da amostra a ser analisada. Por isso, sempre que for necessário utilizar a CCD para separação dos componentes de uma amostra, é recomendado consultar a literatura para auxiliar na escolha do adsorvente mais adequado, que promova a melhor separação, e assim garanta maior reprodutibilidade nas análises.

Cromatografia em Coluna

Na cromatografia em coluna é utilizada uma coluna cromatográfica para efetuar a separação dos componentes de uma mistura. Uma coluna cromatográfica é constituída de um tubo de vidro, semelhante a uma bureta, que é fixada em um suporte universal na posição vertical. A extremidade superior da coluna é aberta e a inferior é afilada possuindo uma torneira que controla a vazão do eluente (Figura 3). Existem diferentes dimensões de coluna, que influenciam no processo de separação. A escolha da dimensão correta depende da quantidade de material que será usado no procedimento (VICHENEWSKI, 2006).

Diferentes tipos de adsorventes podem ser utilizados como fase estacionária na cromatografia em coluna. Os mais empregados são: sílica, alumina, silicato de magnésio, óxido de magnésio, carvão ativo, dextrana e polímeros de estireno (VICHENEWSKI, 2006; ENGEL *et al.*, 2012). Para a execução da técnica, a amostra é aplicada no topo da coluna e o solvente (fase móvel) é passada pela coluna, assim, os componentes são separados pela migração diferenciada através da coluna (Figura 3) (SMITH, 2004).

Figura 3. Coluna cromatográfica.



Fonte: Adaptado de Degani *et al.*, 1998.

Os constituintes de uma amostra podem ser separados utilizando dois modos de eluição: isocrático, com a utilização de apenas um sistema de solvente ao longo de todo o procedimento cromatográfico; ou gradiente, onde são utilizados dois ou mais solventes em diferentes proporções que variam à medida que ocorre a eluição dos analitos na coluna. A mistura dos solventes é preparada para que a polaridade da fase móvel seja aumentada gradativamente, permitindo assim a separação dos compostos de acordo com as diferenças de polaridades (VICHENEWSKI, 2006). A escolha do gradiente de solventes depende das características da amostra a ser separada.

Com o desenvolvimento das técnicas cromatográficas, diversas fases estacionárias quimicamente modificadas estão sendo comercializadas com diâmetros de partículas cada vez menores, que proporcionam maior eficiência nas separações (maior número de interações entre os analitos com a fase estacionária – maior número de pratos teóricos). Com isso, surge a necessidade do uso de sistemas de bombeamento (bombas de baixa pressão) que forcem a passagem do solvente pela fase estacionária, daí o termo cromatografia *flash*, que inicialmente foi empregada para descrever o procedimento cromatográfico que utilizava sílica com partículas de diâmetro entre 230–400 mesh (ENGEL *et al.*, 2012).

A separação dos componentes na cromatografia em coluna pode ocorrer por diferentes métodos, tais como adsorção, troca iônica, exclusão e bioafinidade. Estes processos serão discutidos na sequência.

Cromatografia por Adsorção

O processo de separação por adsorção é baseado na interação dos componentes da amostra com os grupos ativos fixos da fase estacionária. Os adsorventes mais comuns são a alumina, carvão ativo e sílica gel. A escolha do solvente é outro fator importante para garantir uma boa separação dos analitos, sendo que a escolha da série eluotrópica pode ser baseada na intensidade das interações de adsorção (AQUINO NETO, NUNES, 2003). O processo de separação é dinâmico, ou seja, as moléculas adsorvidas na fase estacionária podem ser dessorvidas e voltar para a fase móvel (ENGEL *et al.*, 2012). Esse processo se repete sucessivamente até que os analitos percorram todo o caminho cromatográfico.

Para garantir uma boa separação alguns fatores devem ser considerados antes de iniciar o processo cromatográfico, como a escolha do adsorvente, a polaridade do solvente, o tamanho da coluna e a taxa de eluição. Estes parâmetros devem ser ajustados de acordo com a amostra analisada, caso possua constituintes quirais será necessário a utilização de um adsorvente opticamente ativo para que o processo de separação seja eficiente (VICHENEWSKI, 2006; ENGEL *et al.*, 2012).

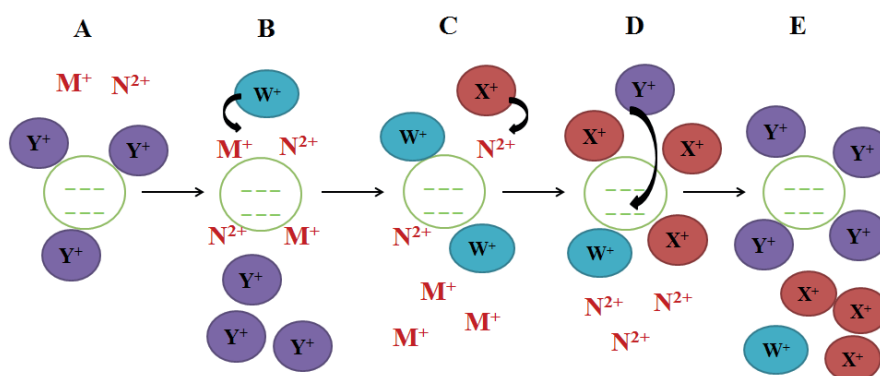
Cromatografia por Troca Iônica

A cromatografia por troca iônica é um método de separação e determinação de íons que utiliza resinas de troca iônica. Os primeiros estudos sobre essa técnica retomam o século XIX, com o trabalho sobre solos dos químicos Way e Thompson em 1850 (AQUINO NETO, NUNES, 2003; SPADARO, 2006a).

O princípio de separação é baseado em equilíbrios de troca entre íons do eluente e íons de mesmo sinal na superfície da fase estacionária. Nesse método, se o íon a ser separado tiver carga positiva, a fase estacionária deverá ter carga negativa (McGUFFIN, 2004).

A Figura 4 ilustra um esquema de separação por troca iônica. Em A, o trocador catiônico, ou seja, que troca íons positivos, está em equilíbrio com a fase móvel inicial que contém íons Y^+ e os íons M^+ e N^{2+} são as espécies a serem separadas de uma amostra. Em B, quando o eluente começa a ser passado pela coluna, ocorre uma reação de troca liberando quantidade equivalente de íons Y^+ , os quais estavam ligados à matriz. Após a adsorção dos íons da amostra na resina, é aplicado um eluente que contém íons W^+ , que possuem afinidade um pouco maior pelos grupos trocadores da resina. Em C, os íons W^+ promovem a liberação da substância M^+ , a qual está ligada mais fracamente à resina do que a substância N^{2+} , em seguida é passado o segundo eluente, que contém íons X^+ , os quais possuem maior afinidade pela matriz, permitindo a liberação dos íons N^{2+} . Em D, a separação de M^+ e N^{2+} está concluída. Para a remoção dos íons de maior afinidade pela resina que Y^+ , ou seja, os íons W^+ e X^+ é aplicado na coluna concentrações crescentes de eluente que contém íons Y^+ , sendo necessário passar volumes de 5 a 10 vezes a capacidade da resina. Em E, o equilíbrio entre a fase móvel e fase estacionária é reestabelecido e a resina pode ser novamente utilizada (SPADARO, 2006a).

Figura 4. Esquema de separação na cromatografia por troca iônica.



Nota: A–E: Etapas do processo de separação por troca iônica. M e N: Compostos a serem separados. Y^+ , W^+ e X^+ : Íons contidos no eluente.

Fonte: Adaptado de Spadaro, 2006a.

A fase estacionária exerce um efeito significativo na eficiência da separação cromatográfica. Existe um grande número de fases estacionárias para aplicação na cromatografia por troca iônica, que pode ser formada por materiais orgânicos e inorgânicos. É importante que todos os materiais possuam grupos funcionais carregados em sua superfície, que possam trocar íons. Os materiais mais comumente usados nessa técnica são: resinas de polímeros orgânicos modificadas, sílica gel modificada, sais inorgânicos, vidros, zeólitas, óxidos metálicos e derivados de celulose (LUCY, HATSIS, 2004; EITH *et al.*, 2006-07; SPADARO, 2006a).

Cromatografia por Exclusão

A cromatografia por exclusão, também conhecida como cromatografia de permeação em gel, separa as moléculas de uma amostra de acordo com o tamanho molecular. As moléculas de diferentes tamanhos passam pelos poros da fase estacionária de maneira diferenciada, sendo as moléculas maiores eluídas mais rapidamente do que as menores, as quais ficam mais retidas na coluna, por passarem por interstícios menores (FAUST, 1997; SILBERRING *et al.*, 2004). Essa técnica é aplicada na separação de moléculas de tamanho entre 0,5 e 1000 kDa e também pode ser utilizada para separar moléculas maiores, como proteínas (SILBERRING *et al.*, 2004).

Nesse tipo de separação geralmente são empregados fases estacionárias poliméricas ou géis, os quais possuem poros de tamanhos variados que ordenam a entrada e a saída das moléculas, que podem atravessar parcialmente ou completamente a fase estacionária, sem que haja interação com ela. De maneira ideal, as moléculas que não ficam retidas são excluídas e eluídas rapidamente da coluna, enquanto as que ficam retidas saem no volume final da eluição (COLLINS, 2011).

Diferentes tipos de fases estacionárias são utilizadas na cromatografia por exclusão, sendo que a inércia química, estabilidade e baixo teor de íons, são característica fundamentais para estes recheios. Os géis devem conter partículas de tamanho e distribuição controlados, resistência ao fluxo e rigidez mecânica para garantir boa resolução na separação cromatográfica. Os principais géis empregados nessa técnica são géis de dextrana, poliacrilamida, ágar, agarose, sepharose e sephadex (ROTHSCHILD, 2006).

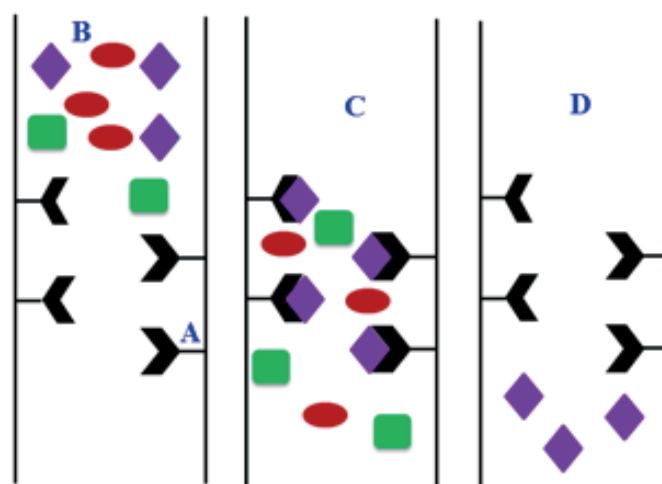
Cromatografia por Bioafinidade

A cromatografia por bioafinidade é diferenciada das demais categorias descritas anteriormente, porque é baseada nas propriedades biológicas ou funcionais da fase estacionária e da substância a ser separada (SPADARO, FONSECA, 2006b; COLLINS, 2011). Neste tipo de cromatografia a fase estacionária é modificada através da imobilização de ligantes específicos. Em seguida a mistura é aplicada na coluna contendo o ligante que é seletivo para os compostos que se deseja separar. Aqueles compostos que não apresentam afinidade

com os sítios ativos dos ligantes imobilizados na fase estacionária passam pela coluna sem serem retidos, enquanto que os compostos que interagem com os sítios ativos ficam retidos, de acordo com a intensidade da afinidade (Figura 5) (COLLINS, 2011).

Os componentes que não ficaram retidos na coluna saem primeiro. Aqueles que ficaram retidos podem ser eluídos alterando o pH da fase móvel ou a força iônica do meio, utilizando um solvente específico, ou ainda modificando a temperatura. Estas alterações desestabilizam o complexo composto-ligante, levando à sua dissociação. A eluição também pode ser feita utilizando compostos que apresentem maior afinidade pelo ligante do que o composto que se deseja separar (Figura 5) (COLLINS, 2011).

Figura 5. Esquema de separação na cromatografia por bioafinidade.



Nota: A: Ligante imobilizado. B: Amostra a ser separada. C: Composto desejado retido pelo ligante. D: Eluição do composto retido.

Fonte: Adaptado de Collins, 2011.

Essa técnica pode ser aplicada para separação de uma grande variedade de macromoléculas, tais como na purificação de enzimas, antibióticos, antígenos, ácidos nucleicos, proteínas, hormônios, entre outros sistemas biológicos. Uma boa separação é alcançada com a escolha correta da matriz, do ligante específico e das condições de retenção e eluição das moléculas da amostra (SPADARO, FONSECA, 2006b).

A separação de biomoléculas também pode ser feita através da Cromatografia de Afinidade de Íons Metálicos (IMAC), essa técnica se baseia na interação entre espécies doadoras de elétrons presentes na superfície de biomoléculas em solução e íons metálicos quelatados imobilizados em um suporte sólido (BRESOLIN *et al.*, 2009).

O método IMAC é baseado na afinidade de íons metálicos imobilizados em uma matriz sólida por meio de ligações covalentes (agentes quelantes) por grupamentos expostos na superfície de uma molécula em solução. A afinidade entre o agente quelante e as biomoléculas resulta de ligações de coordenação reversíveis formadas entre os dois componentes. Os íons metálicos mais utilizados na técnica são Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} e Ca^{2+} ,

porém, outros íons podem ser utilizados desde que possuam a capacidade de interagir com biomoléculas de maneira reversível (KARMALI, 2000; BRESOLIN *et al.*, 2009).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) surgiu como um método instrumental moderno, com alto poder de resolução e sensibilidade, capaz de fornecer resultados qualitativos e quantitativos com reprodutibilidade (SMITH, 2004). Nessa técnica são utilizadas colunas fechadas, com fases estacionárias diversas de tamanhos de partículas muito pequenos (micrômetros), que permitem alta resolução nas separações. Estas colunas podem ser utilizadas diversas vezes para diferentes separações, no entanto, apresentam resistência à vazão, sendo necessário o uso de bombas de alta pressão para permitir a passagem da fase móvel. Assim, a vazão do eluente é controlada, promovendo análises mais reprodutíveis e precisas. No final da coluna há um detector que registra de modo contínuo, os componentes presentes no efluente, na forma de um cromatograma que permite a identificação e quantificação (JARDIM *et al.*, 2006; SNYDER *et al.*, 2010).

A CLAE tornou-se um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos devido a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com aplicação na indústria farmacêutica e na medicina. Grande parte dos laboratórios de análises utiliza a CLAE em fase reversa, onde são utilizadas fases estacionárias de menor polaridade e fases móveis de maior polaridade (TONHI *et al.*, 2002). Além disso, a mesma instrumentação é utilizada para diferentes métodos de separação, como partição, adsorção, troca-iônica e exclusão (SMITH, 2004), os quais foram explicados anteriormente neste capítulo.

A fase estacionária é um dos componentes de maior importância para a realização das separações cromatográficas na CLAE (SILVA *et al.*, 2011), sendo a fase reversa a mais empregada, pois possibilita o uso de fases móveis de menor custo como metanol e água. As fases estacionárias reversas modernas são estáveis, permitem rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel e foram desenvolvidas para permitir a separação no modo gradiente, com maior rapidez nas análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção (TONHI *et al.*, 2002; SNYDER *et al.*, 2010).

As fases estacionárias quimicamente ligadas mais utilizadas em CLAE são do tipo C_8 e C_{18} , as quais possuem baixa polaridade (fase reversa). Na separação de biomoléculas, como peptídeos e proteínas, são utilizadas fases estacionárias cujos poros das partículas são maiores que 300 Å. Também estão disponíveis no mercado fases estacionárias de sílica modificadas com antibióticos de glicopeptídeos, ciclodextrinas e outros componentes quirais, as quais são aplicadas na separação de estereoisômeros (SILVA *et al.*, 2011).

APLICAÇÕES DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Hoje temos conhecimento que quase toda informação biológica dos seres vivos está armazenada no DNA (ácido desoxirribonucleico), o qual é constituído por quatro principais bases nitrogenadas – adenina, citosina, timina e guanina e que as proteínas são principalmente formadas por 20 aminoácidos. A genômica funcional descreve a função específica de genes e proteínas e inclui o estudo da atividade molecular, como transcriptoma, proteômica e metabolômica (FRAGOSO *et al.*, 2011).

A proteômica envolve o estudo das proteínas provenientes de uma célula, organismo ou fluido biológico. O estudo de um proteoma possui diferentes aplicações, como a descoberta das vias metabólicas dos estágios do ciclo celular, identificação de novas moléculas bioativas em produtos naturais e caracterização de marcadores biológicos. Dentre as principais técnicas utilizadas no estudo do proteoma estão a cromatografia líquida de alta eficiência, a eletroforese bidimensional, e a espectrometria de massas.

A metabolômica envolve o estudo do metabolismo secundário de diversas classes de compostos, como alcaloides, flavonoides, terpenos, entre outros. Com a descoberta e identificação de novos compostos biologicamente ativos, levando em conta que muitos são complexos e estão presentes em pequenas quantidades, é possível através dos estudos de engenharia genética, identificar os genes e as rotas biossintéticas com o objetivo de expressá-los de modo a intensificar a produção dos compostos de interesse. Neste sentido para que se possam identificar os metabólitos, genes e alvos biológicos é imprescindível o uso das técnicas cromatográficas, como CLAE e a CCD (FRAGOSO *et al.*, 2011).

■ CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto neste capítulo, fica destacada a importância e a versatilidade das diferentes técnicas cromatográficas. Com aplicações em diversas áreas da ciência, o uso da cromatografia tem permitido a separação de uma vasta gama de compostos, assim como de macromoléculas como enzimas, proteínas e biomarcadores genéticos. Nesse sentido, o conhecimento das técnicas cromatográficas é fundamental para os estudos genômicos (proteômica, metabolômica e transcriptômica).

■ REFERÊNCIAS

1. AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003, 187 p.
2. BRAGA, G. L. Cromatografia em papel. In: COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. Cap. 2, p. 47–66.
3. BRESOLIN, I. T. L. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) de biomoléculas: aspectos fundamentais e aplicações tecnológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1288–1296, 2009.
4. COLLINS, C. H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 889–890, 2006a.
5. COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006b. Cap. 1, p. 18–45.
6. COLLINS, C. H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 2, p. 107–114, 2011.
7. COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.
8. DEGANI, A. L. G. *et al.* Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21–25, 1998.
9. EITH, C. *et al.* **Práticas em cromatografia de íons: uma introdução**. Herisau: Metrohm, 2006–2007, 142 p.
10. ENGEL, R. G. *et al.* **Química orgânica experimental: técnicas de escala pequena**. São Paulo: Cengage Learning, 2012, 1010 p.
11. ETTRE, L. S. Chromatography: the separation technique of the 20th century. **Chromatographia**, v. 51, n. 1/2, p.7–17, 2000.
12. FAUST, B. **Modern chemical techniques: an essential reference for students and teachers**. Royal Society of Chemistry, 1997. Cap. 5, p.116–159.
13. FRAGOSO, R. R. *et al.* Genômica funcional. In: FALEIRO, F. G. *et al.* **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. Cap. 5, p. 143–173.
14. GE HEALTHCARE. **Affinity chromatography: principles and methods**. GE Healthcare Bio-Sciences AB. 2007. 159 p.
15. JARDIM, I. C. S. F. *et al.* Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. Cap. 9, p. 273–398.
16. KARMALI, A. **Cromatografia de afinidade com metal imobilizado e suas variantes**. Póvoa de Santa Iria: Sociedade Portuguesa de Biotecnologia, 2000. 24 p. (Boletim de Biotecnologia, 67).
17. LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. In: COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. Cap. 3, p. 67–86.

18. LUCY, C. A.; HATSIS, P. Ion chromatography. In: HEFTMANN, E. **Chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration**. Amsterdam: ELSEVIER, 2004. Cap. 4, p. 171–211.
19. McGUFFIN, V. L. Theory of chromatography. In: HEFTMANN, E. **Chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration**. Amsterdam: ELSEVIER, 2004. Cap. 1, p. 1–93.
20. ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. Cap. 6, p. 139–166.
21. SILBERRING, J. *et al.* Size-exclusion chromatography. In: HEFTMANN, E. **Chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration**. Amsterdam: ELSEVIER, 2004. Cap. 5, p. 213–251.
22. SILVA, R. G. C. *et al.* Cromatografia líquida capilar: estado da arte e aplicações. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 841–849, 2011.
23. SMITH, R. M. Column liquid chromatography. In: HEFTMANN, E. **Chromatography: fundamentals and applications of chromatography and related differential migration**. Amsterdam: ELSEVIER, 2004. Cap. 2, p. 95–138.
24. SNYDER, L. R. *et al.* **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.
25. SPADARO, A. C. C. Cromatografia por troca iônica. In: COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006a. Cap. 5, p. 103–137.
26. SPADARO, A. C. C.; FONSECA, M. J. V. Cromatografia por bioafinidade. In: COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006b. Cap. 7, p. 167–202.
27. TONHI, E. *et al.* Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE–FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.
28. VICHENEWSKI, W. Cromatografia por Adsorção. In: COLLINS, C. H. *et al.* **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006. Cap. 4, p. 87–101.