



Química

# Métodos Cromatográficos

Antônia Fádia Valentim de Amorim



Geografia



História



Educação  
Física



Química



Ciências  
Biológicas



Artes  
Plásticas



Computação



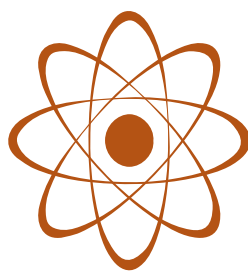
Física



Matemática



Pedagogia



# Química

## Métodos Cromatográficos

Antônia Fádía Valentim de Amorim

1ª Edição  
Fortaleza

Ed  
UECE  
2019



Geografia



História



Educação  
Física



Química



Ciências  
Biológicas



Artes  
Plásticas



Computação



Física



Matemática



Pedagogia

Copyright © 2019. Todos os direitos reservados desta edição à UAB/UECE. Nenhuma parte deste material poderá ser reproduzida, transmitida e gravada, por qualquer meio eletrônico, por fotocópia e outros, sem a prévia autorização, por escrito, dos autores.

Editora Filiada à



<b>Presidente da República</b> Jair Messias Bolsonaro	<b>Conselho Editorial</b> Antônio Luciano Pontes
<b>Ministro da Educação</b> Abraham Bragança de Vasconcellos Weintraub	Eduardo Diatahy Bezerra de Menezes
<b>Presidente da CAPES</b> Abílio Baeta Neves	Emanuel Ângelo da Rocha Fragoso
<b>Diretor de Educação a Distância da CAPES</b> Carlos Cezar Modernel Lenuzza	Francisco Horácio da Silva Frota
<b>Governador do Estado do Ceará</b> Camilo Sobreira de Santana	Francisco Josênio Camelo Parente
<b>Reitor da Universidade Estadual do Ceará</b> José Jackson Coelho Sampaio	Gisafran Nazareno Mota Jucá
<b>Vice-Reitor</b> Hidelbrando dos Santos Soares	José Ferreira Nunes
<b>Pró-Reitora de Pós-Graduação</b> Nucácia Meyre Silva Araújo	Liduina Farias Almeida da Costa
<b>Coordenador da SATE e UAB/UECE</b> Francisco Fábio Castelo Branco	Lucili Grangeiro Cortez
<b>Coordenadora Adjunta UAB/UECE</b> Eloísa Maia Vidal	Luiz Cruz Lima
<b>Direção do CED/UECE</b> José Albio Moreira de Sales	Manfredo Ramos
<b>Coordenadora da Licenciatura em Química</b> Evanise Batista Frota	Marcelo Gurgel Carlos da Silva
<b>Coordenação de Tutoria e Docência da Licenciatura em Química</b> Solange de Oliveira Pinheiro	Marcony Silva Cunha
<b>Editor da EdUECE</b> Erasmus Miessa Ruiz	Maria do Socorro Ferreira Osterne
<b>Coordenadora Editorial</b> Rocylânia Isídio de Oliveira	Maria Salette Bessa Jorge
<b>Projeto Gráfico e Capa</b> Roberto Santos	Silvia Maria Nóbrega-Therrien
<b>Diagramador</b> Francisco Oliveira	<b>Conselho Consultivo</b> Antônio Torres Montenegro (UFPE)
<b>Revisora</b> Ana Cristina Callada Magno	Eliane P. Zamith Brito (FGV)
	Homero Santiago (USP)
	Ieda Maria Alves (USP)
	Manuel Domingos Neto (UFF)
	Maria do Socorro Silva Aragão (UFC)
	Maria Lírida Callou de Araújo e Mendonça (UNIFOR)
	Pierre Salama (Universidade de Paris VIII)
	Romeu Gomes (FIOCRUZ)
	Túlio Batista Franco (UFF)



Editora da Universidade Estadual do Ceará – EdUECE  
Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi – Reitoria – Fortaleza – Ceará  
CEP: 60714-903 – Fone: (85) 3101-9893  
Internet: [www.uece.br](http://www.uece.br) – E-mail: [eduece@uece.br](mailto:eduece@uece.br)  
Secretaria de Apoio às Tecnologias Educacionais  
Fone: (85) 3101-9962

# Sumário

<b>Apresentação .....</b>	<b>5</b>
<b>Capítulo 1 – Introdução a métodos cromatográficos.....</b>	<b>7</b>
1. Histórico .....	9
2. Tipos de cromatografia .....	10
3. Classificações da cromatografia pelo mecanismo de separação .....	11
3.1. Adsorção .....	11
3.2. Partição.....	11
3.3. Troca iônica .....	12
3.4. Exclusão (cromatografia por permeação em gel) .....	14
4. Fases estacionárias .....	16
4.1. Fases não polares .....	17
4.2. Fases polares .....	17
4.3. Adsorventes usados como fase estacionária .....	18
4.4 Suporte .....	19
<b>Capítulo 2 – Classificação da cromatografia pela fase móvel.....</b>	<b>21</b>
1. Classificações .....	23
2. Cromatografia planar .....	23
3. Atividades de avaliação .....	24
<b>Capítulo 3 – Chromatotron.....</b>	<b>31</b>
Apresentação .....	33
<b>Capítulo 4 – Cromatografia em Coluna Clássica .....</b>	<b>35</b>
1. Cromatografia em coluna clássica .....	37
1.1. Empacotamento da coluna .....	37
2. Introdução da mistura para a separação cromatográfica .....	38
<b>Capítulo 5 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....</b>	<b>41</b>
1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	43
2. Equipamentos para CLAE.....	44
2.1. Reservatório da fase móvel.....	48
2.3. Bombas de seringas com pressão constante.....	50
2.4. Bombas recíprocadoras .....	50
2.5. Bombas recíprocadoras de duplo-pistão .....	51
2.6. Sistemas de injeção de amostras.....	51
3. Detectores usados em CLAE .....	52

3.1. Principais detectores .....	52
3.3. Detector de Índice de Refração .....	53
3.4. Fluorescência (FD) .....	54
3.5. Espalhamento de Luz (ELSD) .....	54
3.6. Espectrometria de Massas (MS) .....	54
3.7. Detectores eletroquímicos .....	54
<b>Capítulo 6 – Cromatografia Gasosa (CG).....</b>	<b>59</b>
1. Introdução à Cromatografia Gasosa .....	61
2. Reservatório de gás de arraste .....	63
3. Sistema de injeção de amostra .....	63
4. Coluna Cromatográfica e Controle de Temperatura da Coluna.....	64
5. Descrição detalhada de um cromatógrafo a gás.....	65
<b>Capítulo 7 – Cromatografia a Gás - associada a Espectrometria de Massas (CG-MS) e Cromatografia com Fluido Supercrítico-Espectrometria de Massas (SFC-MS).....</b>	<b>73</b>
1. Cromatografia a Gás-Espectrometria de Massas – CG-MS .....	75
2. Cromatografia com fluido supercrítico – espectrometria de massas (SFC-MS).....	76
<b>Capítulo 8 – Cromatografia de íons (CI).....</b>	<b>77</b>
1. Introdução à cromatografia de íons .....	79
2. Resinas de troca iônica .....	80
3. Classificação das resinas .....	81
4. Capacidade de troca dos trocadores iônicos .....	81
5. Seletividade .....	82
6. Fase móvel .....	82
7. Aplicações .....	82
<b>Sobre a autora.....</b>	<b>84</b>

# Apresentação

A cromatografia é um termo genérico, aplicado a um processo físico-químico de separação, o qual é baseado principalmente nos fenômenos de adsorção e partição.

O objetivo desta publicação é registrar de forma concisa a grande variedade de combinações entre a fase móvel e fase estacionária que proporciona um grande número de aplicações da cromatografia.

A forma como está organizado o livro evidencia os conceitos básicos, as técnicas cromatográficas mais simples e por fim faz-se uma introdução às técnicas mais sofisticadas, de forma a contribuir para o seu aprendizado.

Ao longo de algumas unidades, foram selecionadas algumas aplicações práticas da cromatografia para um melhor entendimento e fixação dos conteúdos.

Finalizando gostaria de agradecer a todos os que de forma direta ou indireta contribuíram para este trabalho.

A autora



# Capítulo

# 1

# Introdução a métodos cromatográficos





## Introdução

A cromatografia pode ser definida como um método físico-químico de separação, fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura. Esta migração diferencial se deve a diferentes interações entre a fase móvel e a fase estacionária.

Os componentes de uma mistura se distribuem entre a **fase<sup>1</sup>** móvel e a fase estacionária de tal forma que cada um dos componentes é retido seletivamente na fase estacionária, resultando em migrações diferenciadas.

A Figura 1 a seguir ilustra a separação de misturas por interação diferencial dos seus componentes com uma **fase estacionária** (líquido ou sólido) e uma **fase móvel** (líquido ou gás).

<sup>1</sup> A grande variedade de combinações entre a fase móvel e a fase estacionária proporciona um grande número de aplicações cromatográficas.

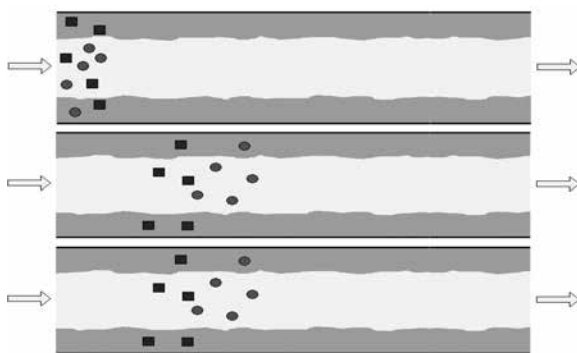


Figura 1 – Migração diferencial dos componentes de uma mistura

## 1. Histórico

Em 1906, o botânico russo Mikael S. Tswett usou o termo cromatografia para apresentar suas experiências com extratos de folhas. Neste experimento, Tswett usou colunas de vidro contendo carbonato de cálcio (fase estacionária) e adicionou o extrato no topo desta coluna como se quisesse fazer uma filtração, em seguida acrescentou éter de petróleo (fase móvel).

Desta forma, observou várias faixas coloridas ao longo da coluna. Possivelmente este é motivo pelo qual a técnica foi denominada de cromatografia. Os termos derivam das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphie* (escrita), entretanto o processo não depende da cor.

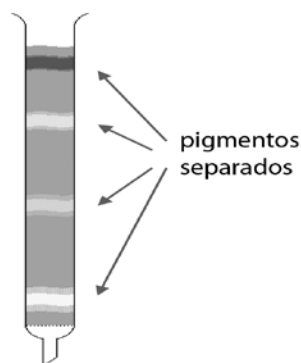


Figura 2 – Separação de pigmentos em uma coluna cromatográfica contendo como adsorvente carbonato de cálcio

Quando uma solução de éter de petróleo é filtrada através de uma coluna contendo um adsorvente (eu uso principalmente o carbonato de cálcio, que é introduzido firmemente num tubo de vidro), então os pigmentos são resolvidos de acordo com uma sequência de adsorção do topo até o fundo, em várias zonas coloridas, visto que os pigmentos adsorvidos mais firmemente deslocam os mais fracamente adsorvidos e forçam ainda mais para baixo. A separação estará completa quando, depois que a solução dos pigmentos tiver passado, então o solvente puro passa pela coluna. Como os raios de um espectro, os diferentes componentes da mistura são resolvidos na coluna de carbonato de cálcio e então podem ser determinados qualitativa e quantitativamente. Eu chamo tal preparação de cromatograma, e o método correspondente de método cromatográfico (CIOLA, 1998, p. 2).

No período, a técnica não foi tão bem entendida, até que os pesquisadores Kuhn e Lederer a utilizaram na separação de carotenoides.

Após os trabalhos de Tswett, Martin e Syngue desenvolveram um tipo de cromatografia na qual a fase móvel é um líquido e a fase estacionária também é um líquido suportado sobre um sólido. Logo depois veio a cromatografia em papel, estudada por Consden, Gordon e Martin. A partir desses estudos, vários trabalhos na área permitiram seu aprimoramento juntamente com o desenvolvimento tecnológico, que possibilitou então sua aplicação em diversas áreas.

A cromatografia pode ser usada na identificação de compostos, por comparação com padrões previamente testados, na purificação de substâncias, separando-se as indesejáveis e na separação de componentes em uma mistura.

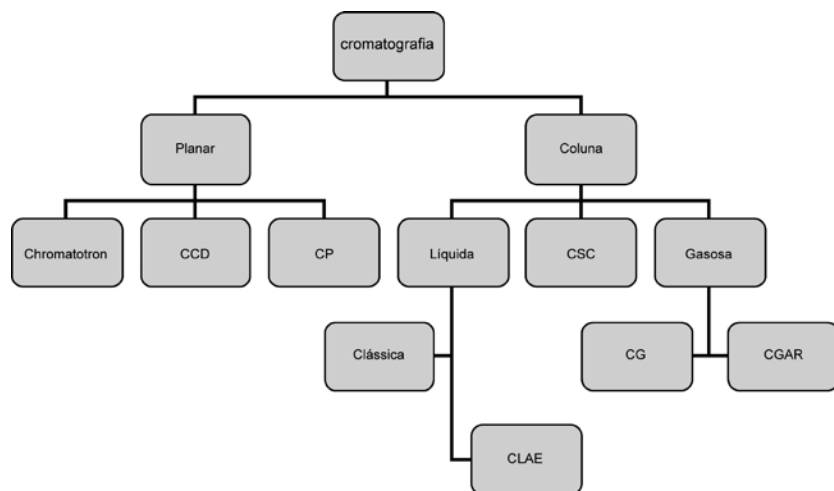


Figura 3 – Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia.

## 2. Tipos de cromatografia

Em relação à forma física do sistema, a cromatografia pode ser dividida em cromatografia em coluna e cromatografia planar. Enquanto a cromatografia planar divide-se em cromatografia em papel (CP), cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia chromatotron, a cromatografia em coluna divide-se em cromatografia líquida, cromatografia supercrítica e cromatografia gasosa, que se subdividem de acordo com critérios de separação que serão estudados mais detalhadamente.

### 3. Classificações da cromatografia pelo mecanismo de separação

A escolha do mecanismo de separação é normalmente feita com base na sensibilidade e na velocidade de aquisição dos resultados. Entretanto, alguns processos quando usados com atenção simplificam a técnica.

Os óleos essenciais constituintes voláteis das plantas são geralmente separados por cromatografia gasosa, enquanto proteínas com massas molares diferentes são separadas por cromatografia de exclusão. Portanto, separações cromatográficas se devem à adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou mistura desses mecanismos.

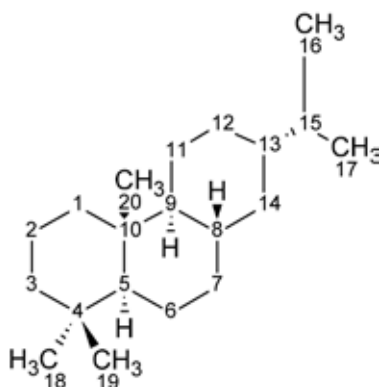


Figura 4 – Estrutura do abietano, terpeno presente em óleos essenciais de algumas plantas.

#### 3.1. Adsorção

Adsorção é um fenômeno físico-químico através do qual um sólido (adsorvente) fixa em sua superfície um líquido ou um gás, por meio de interações como as “forças de Van Der Waals”. Temos, como exemplo, a adsorção de gases e vapores em carvão ativo, bastante utilizado em residências para remoção de odores em exaustores de fogão. A sílica gel ou sílica e a alumina são bastante utilizadas como adsorventes em cromatografia.

Nas separações por adsorção, as substâncias são fortemente adsorvidas e, em alguns casos, poderão ocorrer dificuldades no processo de dessorção dessas substâncias. A substância mais fortemente adsorvida é mais dificilmente arrastada pela fase móvel.

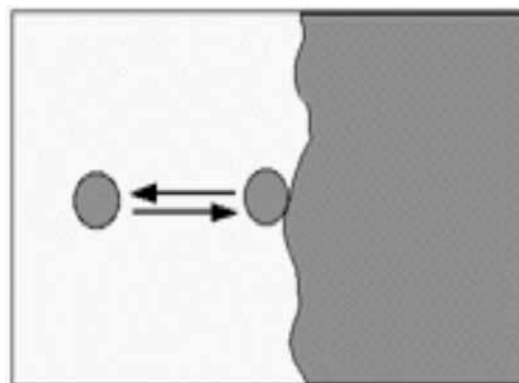


Figura 5 – Mecanismo de adsorção

#### 3.2. Partição

O mecanismo de separação neste tipo de cromatografia, ou mecanismo de distribuição, como também é chamado, baseia-se nas diferentes solubilidades que apresentam os componentes da amostra na fase móvel e na fase estacio-

nária. Desta forma, os componentes mais solúveis na fase estacionária são seletivamente armazenados por ela, enquanto os menos solúveis são conduzidos mais rapidamente pela fase móvel.

O maior inconveniente desta técnica é a solubilidade da fase estacionária na fase móvel, o que rapidamente inutiliza a coluna, levando a não reprodutibilidade nas separações repetitivas. Isto pode ser resolvido de duas maneiras. A primeira é saturando a fase móvel com a fase estacionária por meio de uma pré-coluna, colocada antes do injetor que contenha uma alta percentagem de fase estacionária. A segunda é utilizando materiais que contenham a fase estacionária, quimicamente ligada a um suporte sólido.

Um princípio básico fundamental na cromatografia de partição é: “semelhante separa semelhante”, ou seja, substâncias apolares dissolvem-se e são separadas em fases apolares. Substâncias polares demandam fases estacionárias ainda mais polares.

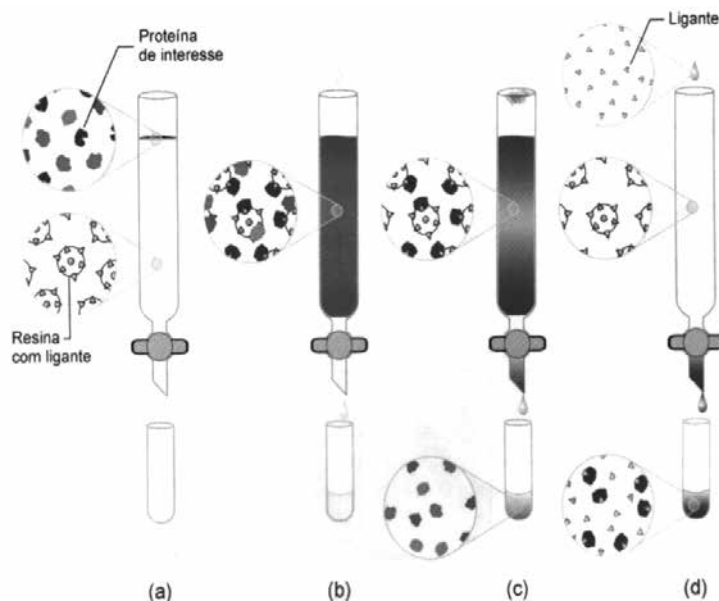


Figura 6 – Cromatografia de partição

Fonte: MARZZOCO, A., TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**, 3ª ed. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.

### 3.3. Troca iônica

O termo “troca iônica”, em regra, é entendido como a troca de íons de mesmo sinal entre uma solução e um material insolúvel em contato com ela. O sólido trocador de íons contém seus próprios íons. Em tese, para que a separação ocorra de forma eficiente é necessário que o sólido tenha uma estrutura molecular aberta e permeável para que os íons e as moléculas do solvente possam circular livremente pela estrutura.

Os trocadores de íons utilizados na análise química têm várias propriedades em comum: são praticamente insolúveis em água e em solventes orgânicos e contêm íons ativos (ou contra-íons) capazes de troca reversível com outros íons em solução, sem que ocorra nenhuma mudança física perceptível no material.

O trocador de íons é um complexo polímero no qual a carga elétrica é precisamente neutralizada pelas cargas dos contra-íons. Portanto, um trocador de cátions é um poliânion polimérico com cátions ativos e um trocador de ânions é um policátion polimérico com ânions ativos.

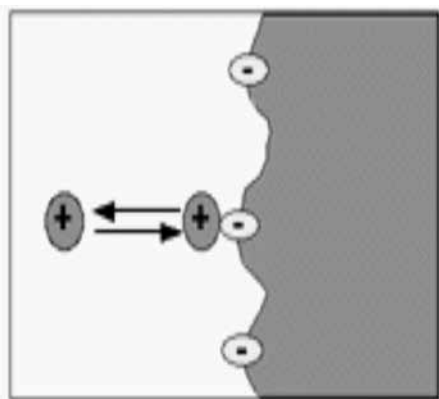


Figura 7 – Mecanismo de troca iônica

Quando uma resina trocadora de cátions com íons móveis  $x^+$  entra em contato com uma solução que contém cátions  $y^+$ , estes últimos penetram pela estrutura da resina ocupando as posições dos cátions  $x^+$ , que, por sua vez, passam para a solução até que o equilíbrio seja alcançado. A mesma coisa ocorre com uma resina trocadora de ânions.

As resinas de troca iônica devem apresentar quatro requisitos essenciais:

1. O grau ligações cruzadas de uma resina deve ser satisfatório para que não ocorra a sua solubilidade.
2. A resina deve ser bastante hidrofílica para permitir a propagação de íons pela estrutura em uma velocidade finita e possível na prática.
3. A resina deve ser quimicamente estável e possuir grupos de troca de íons suficientemente acessíveis.
4. A resina, quando ensoberbecida, deve ser mais densa que a água.

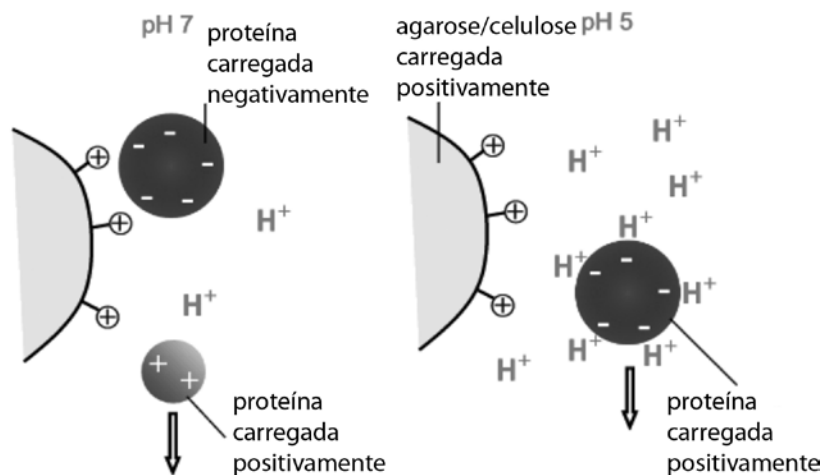


Figura 8 – Processo de separação de proteínas utilizando resinas de troca iônica

### 3.4. Exclusão (cromatografia por permeação em gel)

A cromatografia por exclusão, também denominada de cromatografia por permeação em gel, consiste num processo de separação das espécies segundo seu tamanho, ou seja, a sua resolução é baseada no tamanho efetivo das moléculas dos componentes da amostra em solução. A fase estacionária é um material polimérico conhecido como gel.

Atualmente, dispõe-se de um grande número de materiais para cromatografia por exclusão. Eles variam de acordo com a sua rigidez e com o intervalo de tamanho dentro do qual são úteis, isto é, o material a ser utilizado na coluna dependerá do tamanho efetivo das moléculas que devem ser separadas. Existem três tipos de materiais.

Os primeiros são os materiais fracos (não rígidos), constituídos de géis de polidextrano (Sephadex), poliacrilamidas (Bio-Gel P) e poliagaroses (Sephacrose e Bio Gel A), usados quase sempre com fases móveis aquosas. Sua capacidade é elevada, mas eles não resistem a pressões superiores a 3 bars; então são usados somente na CE clássica.

Os segundos são os materiais semi-rígidos que normalmente resistem a pressões da ordem de 100 a 150 bars. Estes materiais são constituídos de microesferas de algum copolímero, como o poliestireno-divinilbenzeno. Podem ser empregados com fases móveis aquosas ou não aquosas e existem em uma grande variedade de porosidade. São usados em CLAE e também em CE clássica.

Os terceiros são os materiais rígidos que resistem a qualquer pressão e são geralmente constituídos de partículas de sílica porosa ou de vidro poroso. Devido a sua rigidez, podem-se obter separações muito rápidas com fluxo de fase móvel muito alto, o que produz pressões elevadas, para o uso de CLAE.

Os materiais à base de sílica ou vidro podem ter a superfície muito ativa e apresentar adsorção ou degradação de certos materiais (por exemplo: desnaturação de proteínas). Existem tratamentos para eliminar estes efeitos mediante processos de desativação química, tais como silanizar a sua superfície de modo muito similar ao tratamento químico dos suportes em cromatografia gasosa.

Existem limites que determinam o intervalo de tamanhos em que um material é útil para a cromatografia por exclusão. O primeiro é o inferior, chamado de limite de permeação, abaixo do qual todas as moléculas de menor tamanho são igualmente difundidas dentro dos poros do material, e o segundo é o superior, chamado limite de exclusão, acima do qual todas as moléculas são muito grandes para penetrar nos poros.

Moléculas de tamanho intermediário entre ambos os limites serão separadas totalmente ou parcialmente de acordo com a seletividade característica de cada material. Então, serão eluídas sem resolução as moléculas menores que o limite de permeação e as maiores do que o limite de exclusão, separando somente as que se encontram dentro destes limites.

Na Figura 9, podemos observar uma mistura formada por duas proteínas (A e B), com massas molares diferentes, aplicada sobre uma coluna de gel formado por esferas porosas (a). As moléculas da proteína menor (proteína A) podem penetrar nos poros das esferas (b), percorrendo a coluna mais lentamente (c); a proteína maior (proteína B) é, então, eluída primeiramente (d), e a proteína menor (e).

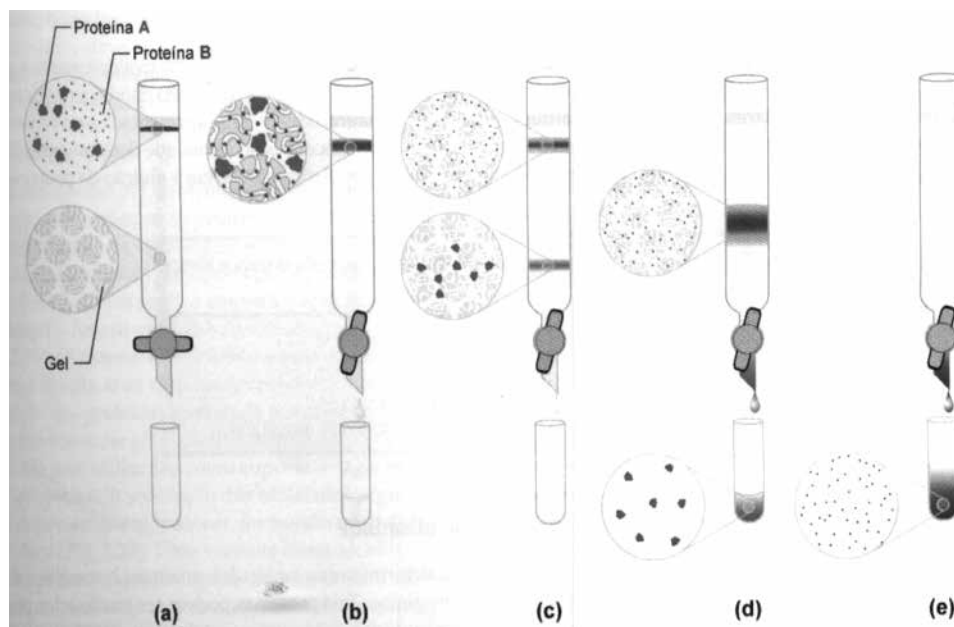


Figura 9 – Filtração em gel

Fonte: MARZZOCO, A., TORRES, B. B. *Bioquímica Básica*, 3ª ed. Ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2007.



## 4. Fases estacionárias

Diversos materiais foram estudados e estão sendo empregados como fases estacionárias em cromatografia. A fase estacionária é um sólido (Cromatografia de Adsorção) altamente poroso, ou, mais comumente, um líquido (Cromatografia de Partição). No segundo caso, o líquido é depositado sobre um sólido (suporte), que será discutido mais adiante.

Os principais fatores em uma fase estacionária que determinam a separação cromatográfica de uma mistura são: Interações entre dipolos, polaridade e pontes de hidrogênio. As figuras 10 (a) e 10 (b) a seguir esclarecerem a influência da polaridade e da ponte de hidrogênio sobre a separação. Em ambos, são usadas fases estacionárias polares, os picos aparecem na ordem crescente de polaridade dos componentes. Mas, no Cromatograma b, como a fase estacionária (diglicerol) interage com o etanol fazendo ponte de hidrogênio, o tempo de retenção deste aumenta consideravelmente. Esses fatores também são dependentes da temperatura, daí também a necessidade de um controle dessa variável.

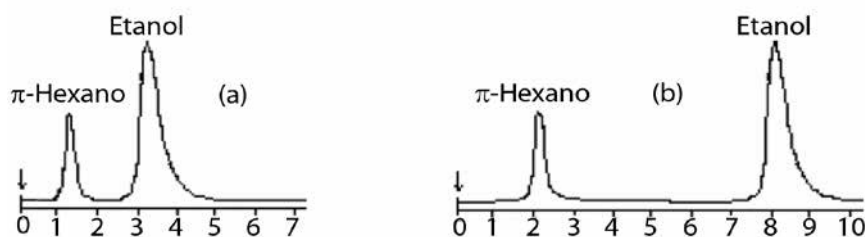


Figura 10 – Ausência (a) e presença (b) de ponte de hidrogênio entre Fase Estacionária (FE) e etanol

Fonte - Alexandre Schuler – Cromatografia, p. 17. 3ª ed. UFPE - 2007.

Dois fatores são importantes em uma fase estacionária: O alto ponto de ebulição e a inércia química e catalítica (em relação à amostra, à fase móvel e ao material de que é constituído o tubo da coluna). Em relação ao ponto de ebulição (PE), deve ser lembrado que a temperatura limite para operação com uma dada coluna é 150 °C abaixo do PE da fase estacionária. Acima dessa temperatura, ocorre perda excessiva por volatilização.

Atualmente é utilizada a FQL (Fase Quimicamente Ligada), em que a FE une-se ao suporte mediante uma reação química, ou seja, todas elas se baseiam nas possibilidades do grupo silanol reagir no hidrogênio por substituição da hidroxila, por uma sequência de reações totalmente análogas às da Química Inorgânica ou Orgânica.

## 4.1. Fases não polares

As fases não polares são muito importantes. Os principais grupos não polares ligados à sílica são:

- Grupos alquílicos com cadeias de 2, 4, 8, 18 e, em alguns casos, de 22 átomos de carbonos. Com exceção da cadeia de dois átomos de carbonos, que são metilas, as cadeias não têm ramificações e, portanto, são de natureza apolar.
- Grupos fenílicos ou alquil fenílicos ligados à sílica, porém, com poucas aplicações.

## 4.2. Fases polares

Os grupos ligados à sílica são polares. Exemplificando, temos:

- Ciano (-CN), amino, ésteres, fenóis e outros.
- Grupos sulfônicos, alquil amônio, carboxílicos e outros.

As fases não polares são também denominadas de *fases reversas*, e as polares denominadas de *fases normais*.

A Figura 11 a seguir ilustra a interação em *fase normal* por ligação de hidrogênio. A afinidade é maior na fase normal quanto menos impedido for o grupo polar da molécula.

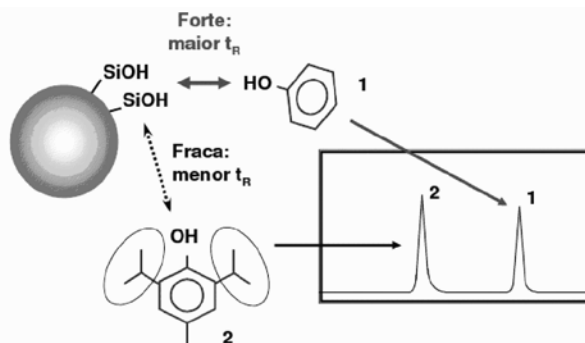


Figura 11 – Interação entre a fase normal por ligação de hidrogênio

A seguir, pode-se observar na Figura 12 as interações em *fase reversa*.

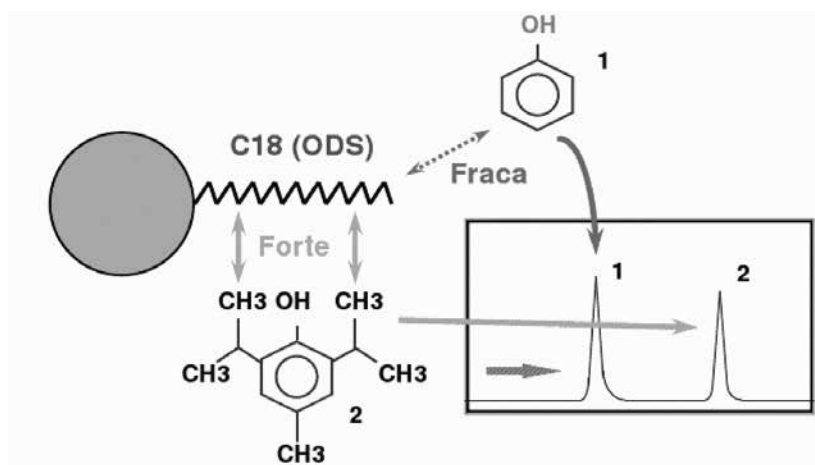


Figura 12 – Interações em fase reversa

As fases estacionárias mais frequentemente utilizadas, com um amplo espectro de aplicações são polímeros derivados de silício, as *polisiloxanas*

(ou *siliconas*), como a SE-30, por exemplo. Outra fase também bastante utilizada é o polietilenoglicol (Ex.: Carbowax 20M).

### 4.3. Adsorventes usados como fase estacionária

Também conhecidos como fases estacionárias, interagem com a amostra por diferentes mecanismos, ocorrendo assim a separação das substâncias.

#### Sílica

A sílica é formada por unidades –  $\text{SiO}_4$  possui um caráter fracamente ácido, pode ser usada na separação de compostos, como aldeídos, cetonas, fenóis, ácidos graxos, aminoácidos, alcaloides, terpenoides e esteroides. A técnica cromatográfica que utiliza a sílica é principalmente a CCD e Cromatografia em coluna.



Figura 13 – Sílica em pastilhas utilizada para retirar umidade e sílica em pó utilizada na cromatografia

#### Celulose

A celulose é um biopolímero de glicose que apresenta ligações cruzadas de ponte de hidrogênio e grupos hidroxilas que podem ser quimicamente modificados, podendo ser ligada covalentemente a grupos com cargas positivas ou negativas.

Tipos:

- Trocador aniônico: dietilaminoetil - celulose (DEAE - celulose).
- Trocador catiônico: carboximetil - celulose (CM - celulose).

## Gel de dextrana

É um polissacarídeo com unidades de glicose, obtido por fermentação de sacarose, sendo conhecido comercialmente por Sephadex. Apresenta diferentes diâmetros de partícula e separa substâncias de acordo com o tamanho e formas moleculares.

## Sílica modificada

Utiliza-se de grupos clordimetilalquisilanos ou cloroalcóxisilanos para transformar a fase estacionária polar (Si-OH) em apolar (Si-O-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-R).

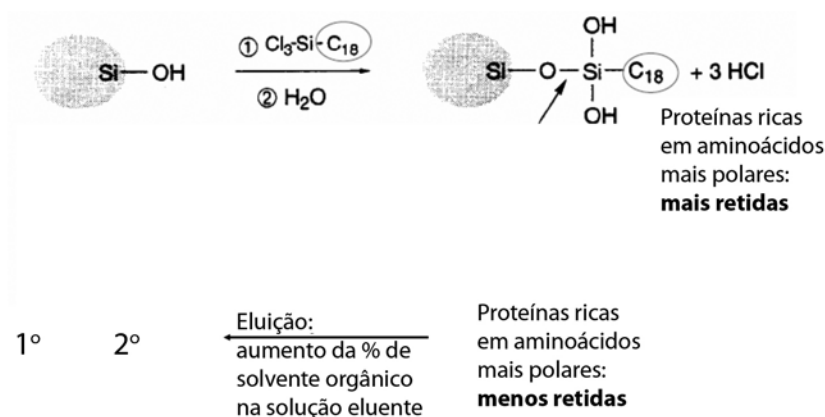


Figura 14 – Esquema de modificação da sílica polar em uma sílica modificada apolar.

A grande vantagem em se utilizar sílica modificada com grupos alquila é que tais modificações alteram completamente a seletividade da separação.

## Adsorventes quirais

Utilizam moléculas quirais ligadas à matriz, geralmente sílica. São utilizados na separação de enantiômeros através de diversos mecanismos.

## 4.4 Suporte

O suporte tem a função de fixar dentro da coluna a fase estacionária. É necessário que o suporte seja quimicamente e também cataliticamente inerte. O material a ser usado também não pode apresentar área superficial maior que 50 m<sup>2</sup>/g, alta porosidade, nem grande poder de adsorção. Centros ativos (ácidos ou básicos) podem provocar modificações estruturais na amostra, devendo ser removidos.

As terras diatomáceas, graças à sua baixa capacidade de adsorção e à sua baixa porosidade, são ainda bastante empregadas como suporte. Um excelente suporte à base de diatomácea é comercializado com um nome constituído da palavra Chromosorb. Atualmente, têm sido desenvolvidos materiais sintéticos, copolímeros do etilvinilbenzeno com divinilbenzeno.

Outros monômeros, como cianovinilbenzeno, também são empregados, para modificar a polaridade da fase estacionária. A depender do processo de fabricação, esses polímeros também podem ser empregados como fase estacionária (Ex.: Porapak Q, Chromosorb 101, etc). Permitem um bom empacotamento, graças à uniformidade na granulometria e na própria geometria das partículas. Também a porosidade pode ser controlada na fabricação.

# Capítulo

# 2

## Classificação da cromatografia pela fase móvel



## 1. Classificações

Em se tratando de fase móvel, têm-se três tipos de cromatografia: a cromatografia líquida, a cromatografia gasosa e a cromatografia supercrítica, usando-se na última um vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica. A cromatografia líquida apresenta uma importante divisão: a cromatografia líquida clássica (CLC), na fase móvel é arrastada através da coluna apenas por força da gravidade, enquanto que, na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utiliza-se fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para eluição da fase móvel.

Na cromatografia gasosa, as separações podem ser obtidas por cromatografia gasosa simples (CG) e por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR). A diferença entre as duas reside nos tipos de colunas utilizadas. Na CGAR, são utilizadas colunas capilares, nas quais a fase estacionária é um filme depositado na coluna.

## 2. Cromatografia planar

### 2.1. Cromatografia em papel

A **cromatografia em papel**<sup>2</sup> (CP) é uma técnica de partição líquido-líquido, estando um deles fixado a um suporte sólido. O suporte é saturado em água e a partição se dá devido à presença de água em celulose (papel de filtro). Este método, embora menos eficiente que a CCD, é muito útil para a separação de compostos polares.

Utiliza-se pequenas quantidades de amostras (microgramas a miligramas) retiradas com pequenos capilares de vidro que são depositadas sobre faixas de papel de filtro e em seguida colocadas em cubas de vidro contendo a fase móvel, como pode-se observar na Figura 15. Após o deslocamento por capilaridade da fase móvel pela fase estacionária, o papel é retirado da cuba (as manchas podem ser reveladas por meio de luz UV, vapores de iodo, soluções de cloreto férrico e tiocianoferrato de potássio, etc).

<sup>2</sup> Na cromatografia em papel a fase estacionária é a celulose. É uma técnica simples e precisa de poucos instrumentos para realização.



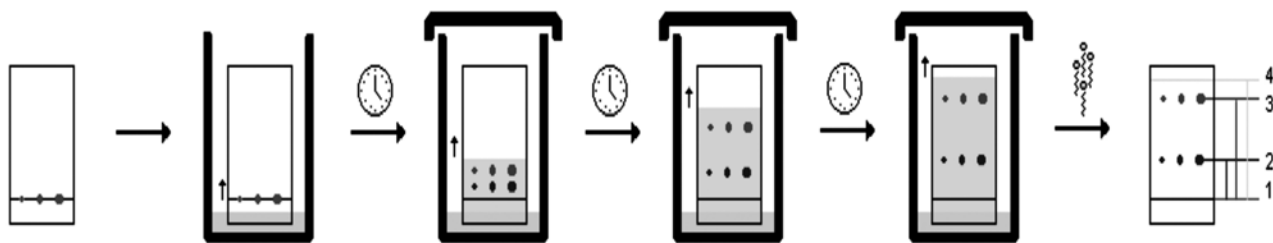


Figura 15 – Esquema para uma cromatografia em papel

### 3. Atividades de avaliação

#### Objetivos

- Demonstrar, por meio de materiais simples, a técnica da cromatografia em papel.
- Verificar as cores que compõem as canetas esferográficas.
- Utilizar a cromatografia como processo de separação.

#### Materiais necessários

- canetas esferográficas (Bic – preta, roxa, rosa, verde e azul)
- Proveta de 10 mL
- Proveta de 100 mL
- fita adesiva (50 cm)
- frasco de vidro (de café solúvel; pelo menos 14 cm de altura) e um becker de 250 mL
- 2 palitos usados na manicure ou 2 lápis
- papel-alumínio (30 cm)
- papel de filtro (em branco)
- porta-filtro e filtro de papel
- régua
- tesoura
- álcool etílico 96° GL (100 mL)
- bicarbonato de amônio –  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  – (10 g).

#### Procedimento

- Cortar, do papel de filtro, uma tira de 5 cm de largura e 21 cm de comprimento. Enrolar a extremidade superior no lápis ou caneta de modo que a parte posterior não ultrapasse 3 cm e fixá-la com um pedaço de fita adesiva. Cortar o papel em um comprimento tal que sua extremidade inferior fique a aproximadamente 0,5 cm do fundo do frasco de vidro a ser utilizado.

- b) Com um lápis, traçar, na tira de papel, uma linha 1,5 cm acima da extremidade inferior. Fazer, nessa linha, cinco marcas a lápis, distando 1 cm de cada uma, e nas extremidades deixar 0,5 cm de distância de cada margem. Escrever o número 1 sob a primeira marca, o 2 sob a segunda, e assim por diante, até o número 5. Nas marcas com os números 1, 2, 3, 4 e 5 aplicar uma mancha circular de 0,5 cm de diâmetro com canetas preta, roxa, rosa, verde e azul, respectivamente.
- c) Em um becker de 250 mL, adicionar 100 mL de álcool, 2,5 mL de água e 10 g de bicarbonato de amônio. Filtrar o material. O líquido obtido após a filtração será usado como eluente.
- d) Colocar o eluente no frasco de vidro, até atingir 1,5 cm de altura.
- e) Coloca-se a tira de papel preparada segundo os itens a e b bem reta, com o lápis ou a caneta apoiada no frasco de vidro, e cuidando para que a camada de eluente fique próxima, mas não molhe inicialmente as manchas de tinta. Se isso ocorrer, retire-se um pouco do eluente do frasco, até que o nível no frasco não alcance as manchas. Tampar o frasco de vidro com uma lâmina de papel-alumínio. Observar o papel à medida que o eluente sobe. Anotar as observações. Após 50 minutos de observação, retirar a tira de papel do frasco de vidro e verificar o que ocorreu com as cores. Anotar as observações.

### Reorganizando os conceitos

1. A tinta da caneta preta é uma substância ou uma mistura?
2. Quantos componentes você pode identificar em cada uma das amostras?
3. Qual dos componentes é o mais solúvel em álcool?

### 3.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A cromatografia em camada delgada (CCD<sup>3</sup>) é uma técnica de adsorção líquido-sólido. Nesse caso, a separação dos componentes da mistura ocorre em função da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente, fixo numa superfície plana, por meio de uma fase móvel (um líquido ou misturas de líquidos).

O mecanismo de separação ocorre principalmente por adsorção (partição ou troca iônica), a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. Os adsorventes comerciais mais utilizados são: sílica, alumina, celulose, terra diatomácea e poliamida.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de fácil desempenho, bastante usada em laboratórios de química orgânica. Amostras muito pequenas (1-100 µg) podem ser rapidamente avaliadas. Devido à conveniência e agilidade, usamos a técnica para: estabelecer se dois compostos são

<sup>3</sup> A CCD pode ser usada tanto na escala analítica quanto na preparativa.

idênticos, verificar a pureza de um composto, determinar o número de componentes em uma mistura, determinar o solvente apropriado para separação em uma coluna cromatográfica, monitorar a separação de uma mistura em uma coluna cromatográfica ou acompanhar o desenvolvimento de uma reação.

A técnica consiste em aplicar uma camada fina do adsorvente finamente pulverizado (geralmente sílica ou óxido de alumínio, às vezes adicionados de material fluorescente à luz ultravioleta) sobre uma placa lisa e plana que pode ser de vidro ou alumínio. O adsorvente é fixado à placa por adição de gesso ou álcool poli-vinílico.

Alguns micro-litros de solução da amostra a ser analisada são aplicados próximos a uma das bordas da placa, com ajuda de um capilar de vidro, e imersa alguns milímetros em um eluente mantido em recipiente fechado. O eluente, por força da capilaridade, percorre a fase fixa em movimento ascendente, carreando consigo os componentes da amostra.

Diferentes compostos ascendem a diferentes alturas dependendo de suas estruturas moleculares. A técnica é notadamente útil no caso de compostos pouco voláteis ou sensíveis ao calor, isto é, substâncias para as quais a cromatografia em fase gasosa é inadequada.

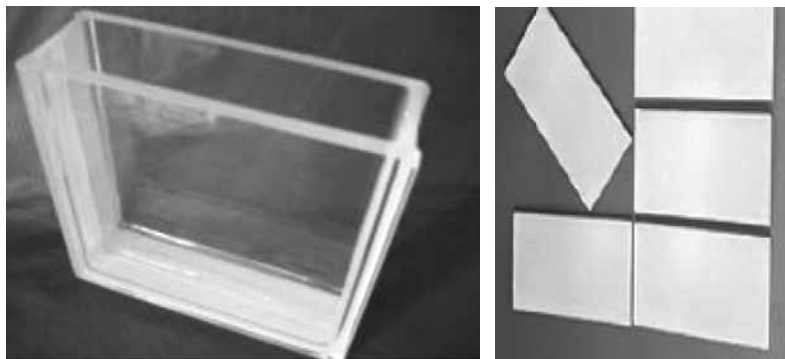


Figura 16 – Cuba cromatográfica e placas de sílica gel utilizadas em CCD

O parâmetro mais importante a ser considerado em CCD é o *fator de retenção* ( $R_f$ ), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Os valores ideais para  $R_f$  estão entre 0,4 e 0,6.

Na Tabela 1 indicamos uma relação, em ordem crescente de polaridade, dos solventes mais usados em cromatografia. Pode-se usar misturas de dois ou mais solventes como eluente, de forma a modular a polaridade. A mistura mais usada é a de acetato de etila com éter de petróleo ou hexano, por ser constituída de solventes razoavelmente baratos, voláteis e de regular ou baixa toxicidade.

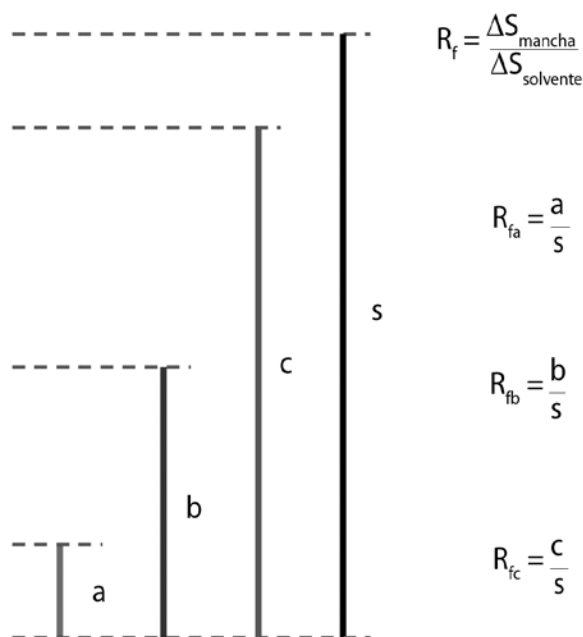
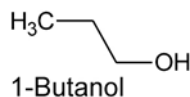


Figura 17 – Deslocamento da substância em uma placa de CCD para cálculo do  $R_f$ .

Tabela 1

Solventes para cromatografia em ordem crescente de polaridade*
Solvente
Éter de petróleo
Ciclohexano
Tetracloroeto de carbono
Benzeno
Cloreto de metileno
Clorofórmio
Éter etílico
Acetato de etila
Piridina
Acetona
Álcool n-propílico
Etanol
Metanol
Água
Ácido acético

\*Polaridade, neste contexto, só tem sentido para a cromatografia e não coincide, necessariamente, com a polaridade medida, por exemplo, pela constante dielétrica.



### Aplicações da CCD

#### Separação de corantes

Este experimento mostra uma técnica adequada para a separação de substâncias misturas por CCD.

#### Materiais necessários

- Placas de sílica gel
- cuba cromatográfica
- Micropipetas ou microcapilares
- Soluções de indicadores (~0,1% aquoso): azul de bromofenol, vermelho do congo e vermelho de fenol
- Mistura (M) de soluções dos três indicadores
- Solvente de desenvolvimento: 1-butanol: etanol: amônia 0.2 M (60 : 20 : 20) por volume.

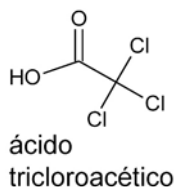
#### Procedimento

Coloque o solvente de desenvolvimento na cuba cromatográfica até cerca de 0,5 de cm de altura e feche-a com a tampa. Pegue uma placa com sílica gel e aplique cuidadosamente cada um dos indicadores, com auxílio de uma micropipeta, em pontos na linha de origem. Espere secar e coloque a placa na cuba. Deixe o cromatograma se desenvolver por cerca de uma hora usando a técnica ascendente. Remova a placa, marque a frente do solvente e seque a placa em uma estufa a 60 °C por aproximadamente 15 minutos. Meça o valor de  $R_f$  de cada um dos indicadores.

Pegue uma segunda placa e aplique, com uma micropipeta, 5  $\mu$ l da mistura M em três pontos separados da linha de origem. Coloque a placa seca na cuba cromatográfica, tampe e deixe o cromatograma se desenvolver por aproximadamente uma hora. Remova a placa e coloque na estufa para secar por 15 minutos. Identifique os compostos separados usando seus valores de  $R_f$ . (VOGEL, 2002, p. 141-142.).

#### Separação de carboidratos

Os carboidratos usados neste experimento produzem manchas bem definidas com boa separação entre elas.



#### Materiais necessários

- Placas de terra diatomácea (Kieselgel G ou Kieselguhr G)
- Cubas cromatográficas
- Micropipetas ou microcapilares

- Solução de carboidratos: frutose, glicose, lactose, maltose e sacarose (aproximadamente 0,1 % da cada componente)
- Solvente de desenvolvimento: acetona: 1-butanol: água (50 : 40 : 10 por volume).
- Reagente revelador: ácido tricloroacético 20 % em água e 1,3-di-hidroxi-naftaleno 0,2 % em etanol (50 : 50 por volume).

### Procedimento

Use uma micropipeta ou um microcapilar para aplicar a mistura e as substâncias puras. Após a aplicação espere secar e, em seguida, coloque na cuba cromatográfica que já deve ter sido saturada com o solvente de desenvolvimento. Deixe a placa na cuba até que o solvente tenha alcançado 12-15 cm de altura na placa. Remova a placa, marque a frente do solvente e seque em estufa antes de borrifar o revelador. Os carboidratos devem se separar com  $R_f$  crescente na ordem frutose, lactose, glicose, maltose e sacarose. (VOGEL, 2002, p. 142).

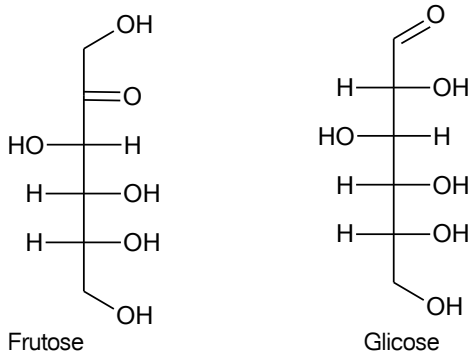


Figura 18 – Carboidratos pertencentes à classe das cetoses e aldoses, respectivamente.

### Separação de corantes artificiais de confeitaria

Muitos confeitos são fabricados com coberturas coloridas. Os corantes usados são muito solúveis em água e podem ser identificados por CCD.

### Materiais necessários

- Placas para CCD com cobertura de sílica gel 20 cm x 20 cm
- Cuba cromatográfica
- Micropipetas ou microcapilares
- Bécheres de vidro de 100 mL
- Um conjunto padrão com oito corantes em solução 1% em água e uma mistura apropriada.
- Solvente de desenvolvimento: propanol: amônia (4 : 1).

### Procedimento

Coloque 5 g de cada confeito colorido em um becher separado contendo 10 mL de água deionizada. Deixe por 5 minutos agitando levemente, tome cuidado para não desintegrar os confeitos. Decante a solução para outros bécheres e deixe depositar o pó suspenso até a solução clarear. Se necessário, decante novamente. Concentre as soluções em um banho de água até o volume de 1 mL.

Aplique 20  $\mu$ l de cada extrato na placa de CCD juntamente com os padrões de corante ou com a mistura de corantes. Desenvolva o cromato-

grama com a solução propanol-amônia pelo maior tempo possível. Quando o desenvolvimento estiver completo, remova a placa e marque a frente do solvente. Após secagem, os corantes devem poder ser claramente identificados por comparação com os padrões e as medidas dos valores de  $R_f$ . (VOGEL, 2002, p. 142).

## Atividades de avaliação



### Objetivo

Demonstrar experimentalmente a preparação artesanal de placas para uso na cromatografia em camada delgada.

### Procedimento

1. As placas limpas e secas não devem ser tocadas com os dedos. Segure-as pelas bordas.
2. Misture num béquer 30 g de sílica gel com 60 mL de água destilada até obter uma suspensão homogênea.
3. Mantendo-se as placas em posição horizontal, transferir uma porção adequada da suspensão para a superfície das placas, espalhando-a uniformemente com o auxílio de um bastão de vidro.
4. Para facilitar a distribuição homogênea da suspensão, manter a placa apoiada sobre a bancada, erguendo-se alternadamente as extremidades até que visualmente toda a superfície esteja uniforme. A espessura do recobrimento deve ser aproximadamente 0,3 mm.
5. Repousa-se a placa em uma superfície plana horizontal e deixa-se secar ao ar durante 15 a 30 minutos, quando o adsorvente adquire uma aparência opaca.
6. Para serem utilizadas, as placas devem ser ativadas por aquecimento em uma estufa a 110 °C durante 30 minutos. Este processo visa eliminar toda a água adsorvida no suporte.

As placas assim preparadas estão prontas para uso e podem ser guardadas em lugar protegido, tomando-se o cuidado para não tocar, contaminar ou ferir a camada de adsorvente.

**3**

**Capítulo**

**Chromatotron**





## Apresentação

Chromatotron é uma cromatografia de camada fina preparativa acelerada centrifugamente. Foi desenvolvida pelos autores do *Compendium of Organic Synthetic Methods*. Substitui as CCD preparativas, pequenas colunas e CLAE.



Figura 19 – Equipamento utilizado na técnica chromatotron

Fonte:

A amostra a ser separada é aplicada como uma solução no centro do disco giratório umedecido com o solvente. A eluição com solvente gera bandas circulares de separação dos componentes que são removidos juntamente com o solvente para um tubo de recepção.

Utiliza-se como adsorventes sílica gel, alumina e sílica gel-nitrato de prata. Possui compatibilidade com todos os solventes comumente usados em outras técnicas cromatográficas, incluindo ácido acético, sendo que o uso de ácidos minerais não é indicado. A utilização desta técnica de separação apresenta as seguintes vantagens:

- Não há necessidade de aplicação de “spot” ou raspagem de bandas;
- As separações são rápidas, ocorrem em cerca de 20 min;
- Permite a observação direta por UV ou de compostos coloridos durante a eluição;
- Camadas finas de 1, 2 a 4 mm apresentam alta capacidade;
- Utiliza-se pouco solvente e a eluição por gradiente é fácil. O solvente é regenerado *in situ*, podendo ser novamente utilizado;
- Atmosfera de nitrogênio previne oxidação das amostras;
- O equipamento é compacto (facilmente removido de um laboratório para outro), poucos controles e não necessita altas pressões;
- Economicamente viável, tendo em vista que o preço de um Chromatotron é menor que o preço de um aparelho para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência usado na separação preparativa.

# 4

## Capítulo

# Cromatografia em Coluna Clássica



## 1. Cromatografia em coluna<sup>4</sup> clássica

Esta técnica é bastante utilizada para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas. Essa técnica fundamenta-se basicamente na polaridade relativa das moléculas envolvidas. As fases estacionárias mais empregadas são sílica e alumina, no entanto estes adsorventes podem servir somente como suporte para uma fase estacionária líquida. Fases estacionárias sólidas levam à separação por adsorção e fases estacionárias líquidas por partição. Suportes quimicamente modificados também têm sido usados, sendo o processo de separação misto, neste caso.

<sup>4</sup> Quanto mais uniforme for o enchimento da coluna maior será a sua eficiência.

### 1.1. Empacotamento da coluna

Nesta técnica, utiliza-se colunas de vidro semelhantes a uma bureta. Suas dimensões, obviamente, dependem da quantidade da amostra a ser processada. Para a introdução do suporte na coluna (empacotamento), coloca-se uma pequena porção de algodão na base inferior da coluna para evitar a passagem do suporte sólido pela torneira e ela é preenchida até cerca da metade com solvente.

Com a ajuda de um funil adaptado na parte superior da coluna, introduz-se, lentamente, a fase estacionária em suspensão no solvente, tendo-se o cuidado de retirar quaisquer bolhas de ar formadas. O empacotamento poderá ser auxiliado com a introdução e o escoamento de novas quantidades de solvente. Nunca deixe a superfície do suporte livre de solvente<sup>5</sup>.

<sup>5</sup> Nunca se deve permitir que o nível do solvente desça abaixo do nível do adsorvente, o que poderia acarretar rachaduras, comprometendo a eficiência da coluna.

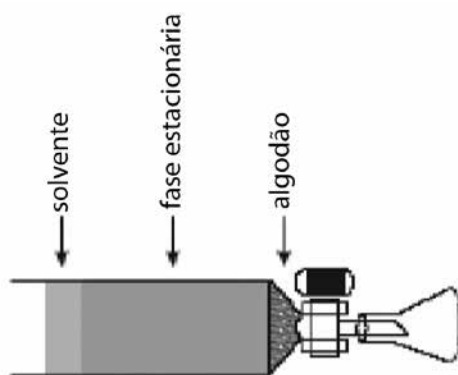


Figura 19 – Ilustração de uma coluna cromatográfica.

<sup>6</sup> Deve-se evitar deixar a coluna secar durante o enchimento ou a eluição, porque aparecem rachaduras na coluna, o que prejudicará a separação cromatográfica.

Durante o enchimento, o ar pode ficar retido entre as partículas. Para evitar que isso ocorra, deve-se agitar o adsorvente num frasco, com a fase móvel, até a constituição de uma pasta, a qual será colocada dentro da **coluna**<sup>6</sup>, já contendo 1/3 da fase móvel.

## 2. Introdução da mistura para a separação cromatográfica

Quando a coluna estiver preparada, deixa-se escoar o solvente até que uma pequena quantidade de solvente em torno de 1,0 cm fique na superfície. Deve-se evitar que o solvente escoe da coluna. Introduzir, na sequência, o material que se deseja separar, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, tendo cuidado para não perturbar a superfície do adsorvente. Se a mistura for líquida, ela poderá ser introduzida diretamente na coluna.

Uma metodologia alternativa envolve a impregnação da amostra em pequena quantidade do adsorvente, com o auxílio de um solvente, seguida de evaporação e introdução do pó resultante na coluna.

Esse procedimento é particularmente útil quando pelo menos um dos constituintes da amostra se dissolve apenas em solventes muitos polares. Inicialmente deixa-se eluir a amostra com um pouco de solvente até quase a secura. Introduce-se uma nova quantidade de solvente e repete-se a operação.

A coluna é, então, preenchida com o solvente, e iniciada a eluição propriamente dita. À medida que as **frações**<sup>7</sup> vão sendo recolhidas na base da coluna (usando vários Erlenmeyers, preferencialmente numerados) torna-se necessário adicionar mais solvente, cuja polaridade eventualmente pode ser modificada mediante mistura com outro solvente polar.

Faça-se então o monitoramento das frações recolhidas utilizando-se uma técnica cromatográfica auxiliar, como, por exemplo, a CCD, para verificar se todos os componentes da amostra foram eluídos e quais as frações podem ser combinadas, pois um componente individual pode estar presente em várias frações próximas. Algumas frações podem conter mais de um componente, essas frações não devem ser agrupadas com as que contêm apenas um componente.

As frações recolhidas encontram-se diluídas, é necessário evaporar todo o solvente para obter o componente puro. A escolha do eluente segue os princípios discutidos em CCD, mas, neste caso, ele pode ser mudado durante o processo cromatográfico. Se, por exemplo, a amostra é constituída por duas substâncias, uma apolar e outra polar, utiliza-se primeiramente um eluente apolar e, em seguida, um eluente polar.

<sup>7</sup> O volume das frações a serem coletadas é função da quantidade de amostra e do grau de dificuldade da separação.

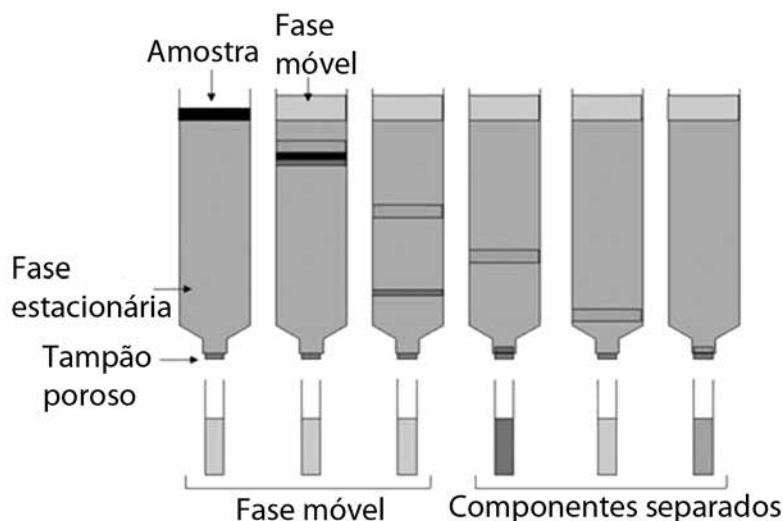


Figura 19 – Resultados de uma cromatografia em coluna

## Atividades de avaliação



**Objetivo:** Separação da mistura de *o*- e *p*-nitrofenol por cromatografia em coluna clássica.

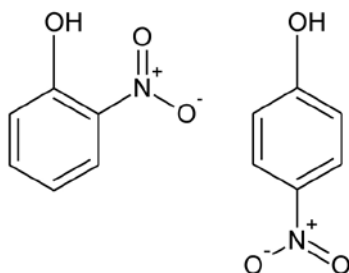


Figura 20 – Estrutura das moléculas de *o*-ortonitrofenol e *p*-nitrofenol, respectivamente

## Procedimento

### 1. Preparação da coluna

- Colocar um pequeno chumaço de algodão na base inferior da coluna com a ajuda de um bastão de tamanho adequado. Encher a coluna até cerca de 1/4 com hexano. Testar se a torneira não apresenta vazamentos.
- Pesar aproximadamente 20 g de sílica-gel em bquer de 100 mL; adicionar hexano em quantidade bastante para formar uma papa homogênea;
- Abrir a coluna de modo a gotejar o solvente em um frasco Erlenmeyer durante o processo de empacotamento.



- d) Com a ajuda de bastão de vidro colocar, de modo contínuo, a suspensão de sílica na coluna (o solvente recolhido no Erlenmeyer deve ser utilizado novamente para adicionar todo adsorvente para a coluna).
- e) Deixar gotejar o solvente 5-10 minutos após o enchimento da coluna para facilitar a sedimentação da sílica. Fechar a torneira quando o solvente apenas cobrir a coluna de sílica.

## 2. Preparação e aplicação da amostra

- a) Com o auxílio de pipeta introduzir, lentamente, no topo da coluna cerca de 2 mL da solução de nitrofenóis (para dissolver a amostra sugere-se uma mistura de hexano e acetato de etila 4 : 1 ou diclorometano 100%).
- b) Deixar a solução entranhar-se na coluna mediante controle da torneira. Com pequenas quantidades de solvente introduzir toda a amostra para dentro da coluna.

## 3. Eluição dos componentes da amostra

- a) Encher a coluna com o solvente menos polar (hexano) tomando cuidado para não perturbar a superfície do adsorvente.
- b) Recolher as frações eluídas em frascos Erlenmeyer de 50 mL ou tubos de vidros previamente numerados. O volume de cada fração deve ser, em média, de aproximadamente 1/10 do volume da coluna. Observar constantemente o volume de solvente na coluna, para não secar.
- c) Na sequência, preencher a coluna com uma mistura de hexano e acetato de etila 5 : 1 e continuar o recolhimento das frações com os mesmos cuidados descritos no item anterior. Pode-se ainda fazer o gradiente crescente de polaridade do solvente, partindo-se de uma proporção de acetato de etila inferior a 5 : 1 na mistura com hexano.
- d) Monitorar a separação e pureza de cada fração por cromatografia em camada delgada (CCD). A eluição deverá ser continuada até a saída total de todos os componentes.
- e) As frações contendo cada componente puro deverão ser reunidas em balões apropriados e o eluente evaporado com auxílio de roto-evaporador.

## Reorganizando os conceitos

1. Baseado em argumentos estruturais, comente sobre a separação cromatográfica do o-nitrofenol e p-nitrofenol. Que outras diferenças nas propriedades físicas desses dois isômeros podem ser explicadas usando-se os mesmos argumentos? (Pesquisar dados sobre PE e PF do o-nitrofenol e p-nitrofenol no Índice Merck.).

# Capítulo

# 5

## Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)



## 1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência é um tipo de cromatografia em coluna que foi desenvolvida utilizando-se de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel.

A CLAE tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficácia.

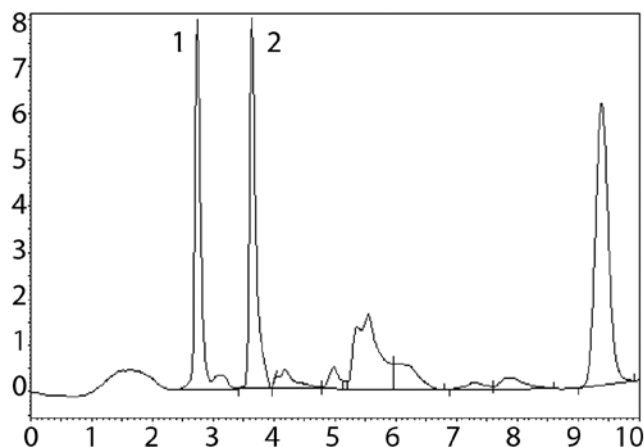


Figura 21 – Cromatograma obtido por CLAE dos padrões de ácido dehidro L-ascórbico (1) e do ácido L-ascórbico (2), utilizando uma coluna de fase reversa (C18) e detector UV em 254 nm, com fluxo de 0,8 mL.min<sup>-1</sup> e fase móvel composta por metanol e ácido acético 0,15 % em água ultra pura.

Fonte- Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 2, p. 381-390, abr./jun. 2010

Na CLAE, emprega-se uma coluna fechada, reaproveitável; portanto, até centenas de separações individuais podem ser realizadas com a mesma coluna. Essas colunas são muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, ou seja, ela sofre uma perda de carga. Por esta razão é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão (até 400 bars) que fa-

zema a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada facilmente, resultando em operações mais reproduzíveis, que tornam as análises executadas por CLAE mais precisas.

## 2. Equipamentos para CLAE

As principais características que devem ser levadas em consideração na escolha de um equipamento para CLAE são:

- a) **Versatilidade:** o equipamento deve resolver amostras de diferentes tipos, servir a distintas técnicas cromatográficas e realizar o máximo de operações, tais como, gradiente de fase móvel, coleta das frações, reciclagem de frações, etc., necessárias às análises sofisticadas.
- b) **Rapidez:** Para se conseguir análises rápidas, deve-se obter as melhores condições de CLAE, isto é, fase móvel de baixa viscosidade, bomba de alta pressão e colunas com partículas de pequeno diâmetro (grande área de superfície, que ajuda os processos de separação).
- c) **Reprodutibilidade e Estabilidade:** características essenciais para obter do equipamento um bom funcionamento em longo prazo. O equipamento deve ter controle adequado sobre os parâmetros de operação, como vazão, temperatura, pressão e composição da fase móvel.
- d) **Sensibilidade:** Um bom equipamento, mesmo trabalhando com pequenas quantidades de amostra, deve gerar sinais de intensidade apreciável.

A Figura 22 mostra o equipamento utilizado na CLAE.

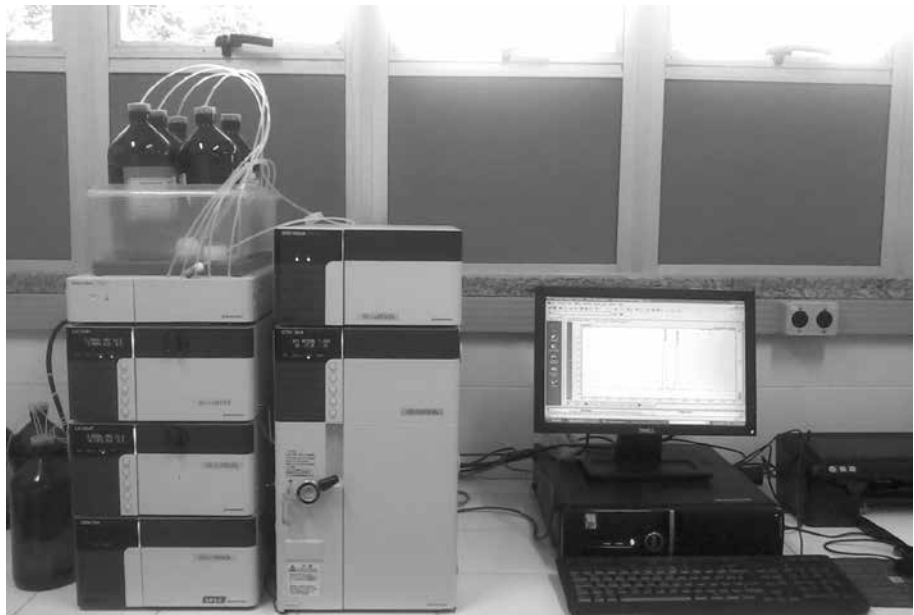


Figura 22 – Equipamento utilizado na CLAE – Laboratório de Biocatálise - UFC

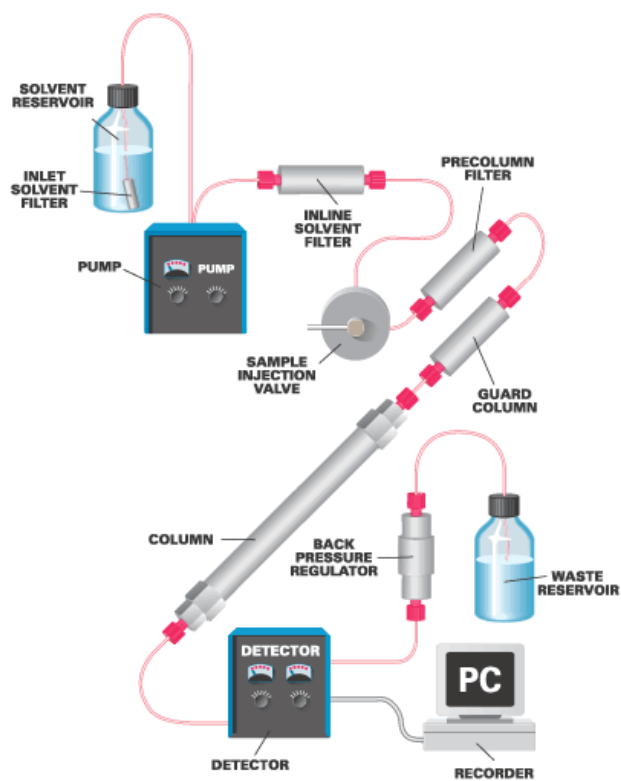


Figura 23 – Esquema do equipamento básico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador.

### a) Reservatório de Fase Móvel

A Fase Móvel (um líquido puro ou uma mistura de composição definida) deve ser filtrada em membranas com  $0,46 \mu\text{m}$  de diâmetro de poros e des-gaseificada.



Figura 24. Alguns solventes utilizados como fase móvel na CLAE

<sup>8</sup> A não degasagem do solvente pode criar perturbações durante a análise no nível da bomba e no nível do detector

### b) Sistema de degaseificação

A Fase Móvel deve ser **degaseificada**<sup>8</sup> para evitar a formação de bolhas, as quais podem provocar cavitação (com conseqüente dano à bomba) ou gerar picos falsos, ao passarem pela célula do detector. São conhecidas várias técnicas de degaseificação:

- aquecimento com agitação
- borbulhamento de gás hélio
- ultra-som
- vácuo

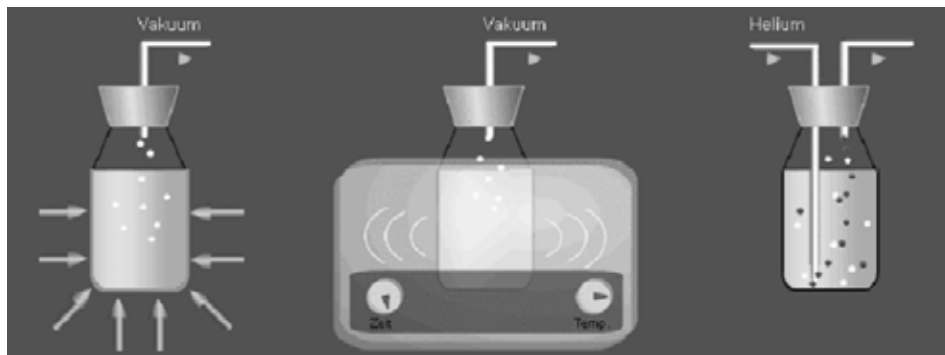


Figura 25 – Sistema para degaseificação

### c) Bomba

O bombeamento da Fase Móvel é realizado por uma bomba controlada por um microprocessador, o qual pode alterar a velocidade de sucção (para evitar vaporização de fase móvel mais volátil) e a vazão (importante quando a análise é realizada com Gradiente de Polaridade, em cujo caso há necessidade de uma segunda bomba; ver mais adiante).

### d) Válvula de injeção

A amostra é sempre introduzida com auxílio de uma válvula, porquanto a pressão de trabalho raramente é menor que 20 atmosferas.

### e) Coluna

As colunas empregadas em CL são retas, uma vez que seu comprimento raramente ultrapassa 30 cm, ocupando, portanto, muito pouco espaço no equipamento. Essas colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação.



Figura 26 – Colunas utilizadas na CLAE



Figura 27 – Compartimento do cromatógrafo para CLAE onde fica a coluna

### f) Detector

O **detector**<sup>9</sup> mais utilizado para separações por CLAE é o detector de ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência, de índice de refração, e eletroquímicos, entre outros. Detectores de polarimetria para CLAE, recentemente desenvolvidos, diferenciam compostos quirais, através da rotação de seus estereoisômeros frente luz plano-polarizada.

<sup>9</sup> Detectores são dispositivos que examinam continuamente o material eluído, gerando sinal quando da passagem de substâncias que não são o gás de arraste.

### g) Sistema de aquisição de dados

Os sistemas de aquisição de dados empregados em CL são os mesmos empregados em CG, ou seja, registradores, integradores ou microcomputadores. A banda é registrada como um pico, que idealmente deve ter formato gaussiano.



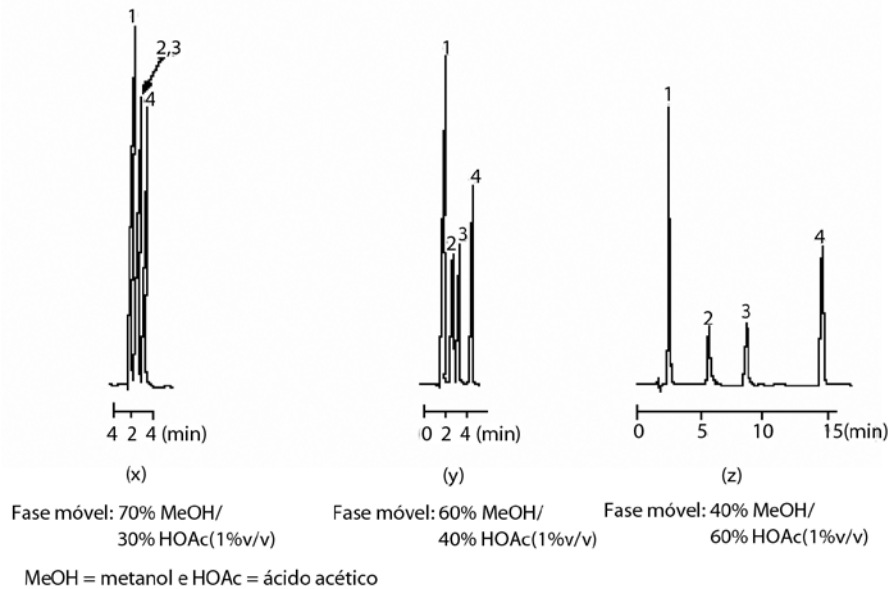


Figura 28 – Registro de separação de substâncias por CLAE variando a concentração de metanol e ácido acético.

## 2.1. Reservatório da fase móvel

O reservatório pode ser um frasco de solvente bem limpo (Figura 29). Para análise de íons não se utiliza reservatório de vidro comum, para evitar que a solução tenha íons provenientes da parede do reservatório. Utiliza-se frasco de frasco de polietileno quando se trabalha com soluções tampão, soluções contendo íons  $F^-$  ou soluções levemente alcalinas.

Não se deve lavar o reservatório com solução sulfocrômica, nem muito alcalina, pois estas corroem as paredes internas, favorecendo a transferência de íons para a solução.

O volume desses frascos varia de 1 a 3 litros de capacidade, o que normalmente é suficiente para um dia de trabalho. A captação da fase móvel é feita através de filtro, para remover partículas que possam obstruir e estragar o sistema de bombeamento e a coluna. Este filtro deve ter a capacidade de reter partículas sem produzir queda excessiva de pressão.

As fases móveis polares têm tendência a dissolver oxigênio e outros gases. Se esses gases são liberados dentro do equipamento, formam bolhas e podem afetar o funcionamento do detector e a eficiência da coluna. Por esse motivo é necessário remover os gases dissolvidos na fase móvel. Em muitos equipamentos, o próprio reservatório está condicionado a efetuar a remoção, por exemplo, pela aplicação de vácuo no reservatório e agitação da fase móvel sob ação de ultra-som e/ou aquecimento. O problema da formação de bolhas tem sido reduzido pela adição de um filtro na saída do detector, o que restringe um pouco a vazão e produz uma pequena pressão na cela do detector, impedindo a formação de bolhas.



Figura 29 – Frascos utilizados como reservatório para fase móvel na CLAE

## 2.2. Sistema de bombeamento

O desenvolvimento do sistema de bombeamento adequado foi o fator mais importante para o desenvolvimento da CLAE. A bomba tem que proporcionar uma vazão razoável através da coluna, para que a análise não seja lenta, e uma vazão constante, para não atrapalhar o sistema de detecção. Os aspectos mais importantes para o sistema de bombeamento são:

1. Geração de pressões até 6.000 psi;
2. Saída com ausência de pulsos;
3. Velocidades de fluxo de 0,1 a 10 mL/min;
4. Controle e reprodutibilidade de fluxo de 0,5% ou melhor;
5. Componentes resistentes à corrosão.

Podem ser considerados basicamente dois tipos de bombas, as mecânicas e as pneumáticas. Entre as bombas mecânicas, existem dois tipos diferentes, recíprocas (pistão ou diafragma) e do tipo seringa.

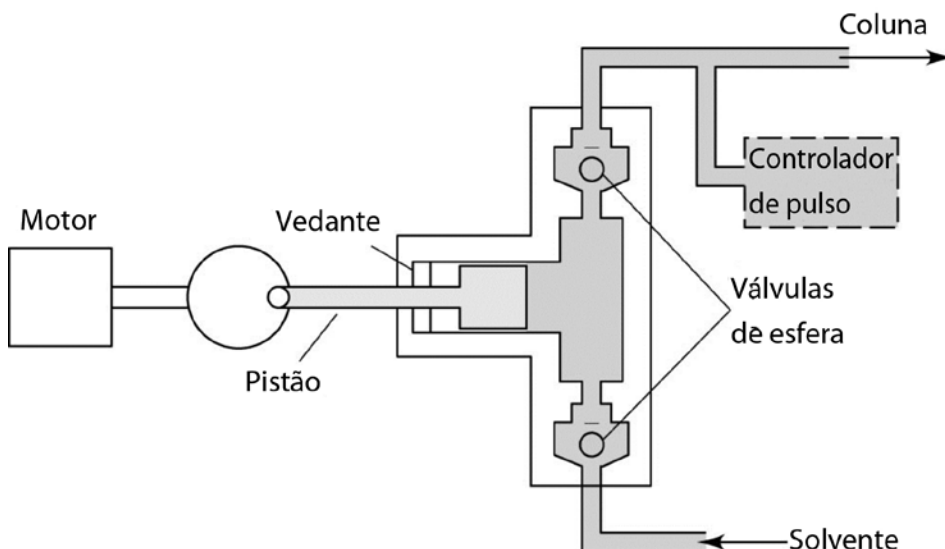


Figura 30 – Bomba recíproca (também são chamadas de bombas de pistão ou de diafragma)

### 2.3. Bombas de seringas com pressão constante

Esta bomba tem um pistão que se movimenta pela ação de agente pneumático. O reservatório da bomba é cheio pela força do ar comprimido, que desloca o pistão ou diafragma. As vazões obtidas são livres de pulsações e de pressão constante, mas isso significa que, se a resistência à pressão da coluna muda, a vazão também muda. As desvantagens deste sistema são:

- Instabilidade na velocidade do fluxo;
- Mudanças no tempo de retenção, dificultando a interpretação dos resultados;
- Capacidade limitada do volume total que pode ser bombeado.

### 2.4. Bombas recíprocadoras

São bombas que escoam volumes constantes de forma não contínua, isto é, pulsante. Essas bombas operam mediante o movimento de um pistão e através de um sistema de válvulas que alternadamente se abrem e fecham, onde se enche e esvazia de modo alternativo, uma pequena câmara. Estas bombas apresentam um volume interno de 100-200  $\mu\text{L}$ .

O selo do pistão é um disco de teflon fixo no interior do corpo da bomba, feito de aço inoxidável quimicamente resistente. Os pistões são de safira, que confere resistência ao ataque da maioria dos solventes utilizados em CLAE. Uma válvula (*check-valve*) típica consiste em uma esfera de rubi aparada em base de safira, formando um selo.

A pressão dentro do reservatório da bomba é a responsável pela abertura e o fechamento do selo. Estes movimentos dependem da localização da esfera (na entrada ou na saída da válvula). Existem dois tipos de válvula (*check-valve*). Na primeira, a esfera funciona através da força da gravidade. E, na segunda, a válvula tem uma mola metálica (aço inoxidável apoiada sobre a esfera de rubi). A mola mantém a válvula fechada até que a pressão desenvolvida pela bomba force a contração da mola, possibilitando a passagem do solvente. Além disso, a mola impede que a válvula abra em baixas pressões.

As principais vantagens deste tipo de bomba são vazões com volumes constantes, capacidade de alimentação contínua do sistema, facilidade na mudança da fase móvel e o trabalho com pequenos volumes. Uma das desvantagens deste tipo de bomba é que se obtém uma vazão pulsante e não uniforme e contínua. Isto pode causar perda de eficiência na coluna e instabilidade no detector.

Sistemas de amortização hidro-pneumáticos, localizados entre a bomba e a coluna, têm sido utilizados para solucionar esse problema. A forma mais simples de amortecedor utilizada consiste de uma secção normalmente espiralada

de espessura reduzida de aço inoxidável ou tubo de teflon (6 m x 1 mm). Este tubo capilar se deixa fluir livremente e assim absorve as pulsações produzidas pela bomba. A grande desvantagem desse tipo de amortecedor é seu grande volume morto, que pode provocar alargamento da banda cromatográfica, além de tornar o processo de mudança da fase móvel lento e dispendioso.

## 2.5. Bombas reciprocadoras de duplo-pistão

Neste tipo de bomba, dois pistões são acionados por um mesmo eixo excêntrico, de forma que, quando um pistão succiona a fase móvel, o outro expulsa o líquido para fora da bomba. A vazão de ambos os pistões, já quase livre de pulsação, é encaminhada à coluna por uma via comum. Assim, o sistema de duplo pistão tem todas as vantagens da reciprocadora de pistão simples, além da vantagem adicional da grande diminuição do problema de pulsação.

## 2.6. Sistemas de injeção de amostras

Os equipamentos modernos empregam válvulas para amostragem, como a ilustrada esquematicamente na Figura 31.

A amostra, introduzida na válvula mediante seringa, deve encher o espaço interno da porção do tubo capilar de aço, a alça de amostragem (carga). Normalmente o volume contido na alça é de 1 a 100  $\mu\text{L}$ . A amostra é injetada na coluna, ao girar a válvula para que a posição de entrada e saída mude (injeção na coluna).

Desta forma pode injetar-se na coluna pressurizada um intervalo amplo de volumes de amostra, dependendo do tubo capilar (alça de amostragem) utilizado, com um alto grau de reprodutibilidade. As válvulas para amostragem são fabricadas somente de material inerte, como teflon e aço inoxidável, e seu desenho é tal que resistem a pressões muito elevadas.

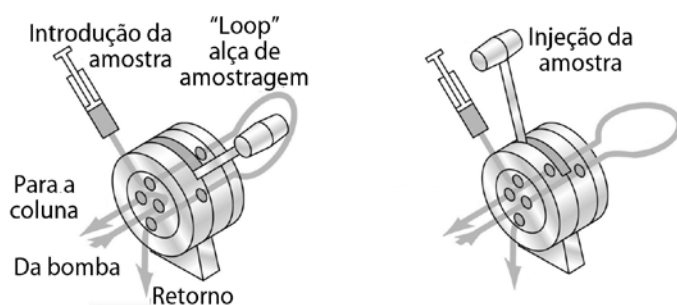


Figura 31 – Esquema da válvula de amostragem



Figura 32 – Fotografia de uma válvula de amostragem para CLAE

### 3. Detectores usados em CLAE

Os detectores têm a função de monitorar o efluente da coluna e fornecer a medida detectada do soluto. O seu funcionamento é de acordo com diferentes princípios, mas todos geram um sinal elétrico que é proporcional a alguma propriedade do **analito**<sup>10</sup>. A resposta do detector pode ser relacionada com a quantidade de analito, portanto o detector deve ser calibrado com cada espécie de interesse, portanto a escolha do detector é de acordo com as características dos analitos.

Uma variedade de detectores tem sido desenvolvida para CLAE, um detector ideal seria aquele com as seguintes **características**<sup>11</sup>:

- Alta sensibilidade: 10<sup>-8</sup> a 10<sup>-15</sup> g de soluto/s.
- Boa estabilidade e reprodutibilidade.
- Resposta linear para solutos que se estenda por várias ordens de grandeza.
- Tempo de resposta curto e independente da vazão.
- Alta confiabilidade e facilidade de uso.
- Similaridade de resposta para todos os solutos.
- Não destrutivo.
- Volume interno mínimo e compatível com a vazão e com a pressão.

#### 3.1. Principais detectores

- **Detector**<sup>12</sup> Espectrofotométrico (UV e Visível);
- Índice de Refração (RI);
- Fluorescência (FD);
- Espalhamento de Luz (ELSD);
- Espectrometria de Massas (MS);
- Detectores eletroquímicos

<sup>10</sup> Analito é a parte da amostra que é o foco da análise química.

<sup>11</sup> De uma forma ideal, cada substância separada aparece como um pico no cromatograma.

<sup>12</sup> 70% das análises publicadas utilizam CLAE com detectores de UV/VIS

### 3.2. Detector Espectrofotométrico (UV e Visível)

Mede as variações na absorção da luz na região de 190 a 370 nm (UV) e de 370 a 700 nm (Visível); são utilizados para compostos que absorvem no UV-Vis.

#### Vantagens

- Alta sensibilidade;
- Não é destrutivo;
- Permite trabalhar com gradiente;
- Responde à larga faixa de concentração;
- Relativamente insensível à variação de T e vazão da FM.

#### Desvantagens

- Detecta somente substâncias que absorvem no UV-Vis.

A Figura 32 a seguir ilustra um cromatograma obtido a partir da separação de ácidos graxos, usando-se como detector o UV-Vis.

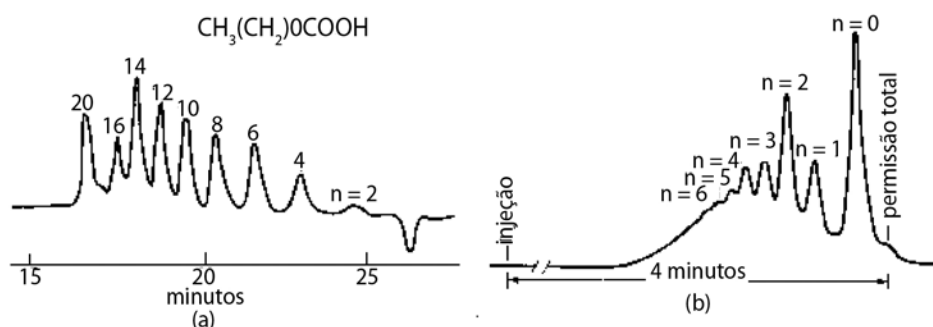


Figura 32 – Aplicação de cromatografia de exclusão. (a) Separação de ácidos graxos. Coluna à base de poliestireno, 7,5 cm x 600 nm, com limite de exclusão de 103. Tetrahydrofurano como fase móvel, numa vazão de 1,2 mL/min. Detector de índice de refração. (b) Análise de resina epóxi comercial ( $n = n^{\circ}$  de unidades monoméricas no polímero). Coluna de sílica porosa 6,2 x 250 mm. Fase móvel de tetrahydrofurano, numa vazão de 1,3 mL/min. Detector de UV.

Fonte - Análise Instrumental Cromatografia Líquida de Alta Resolução – CEFET – RJ.

### 3.3. Detector de Índice de Refração

Baseia-se na medida da diferença do índice de refração da FM na presença das substâncias. Para aplicações gerais.

#### Vantagens

- Praticamente todas as substâncias são detectáveis.
- Não é destrutivo.

### **Desvantagens**

- Sensibilidade menor que UV.
- Sensível a diferenças de T, vazão e pressão da FM.
- Não permite fazer gradiente.

### **3.4. Fluorescência (FD)**

Baseia-se na medida da luz emitida pelas substâncias previamente irradiadas com luz UV; é aplicada na detecção de compostos fluorescentes, vitaminas (ex. riboflavina), micotoxinas, HPAs, etc) e compostos derivatizados (ex. aminas).

#### **Vantagens**

- Muito sensível.
- Não é destrutivo.
- Permite gradiente.

#### **Desvantagens**

- Poucas substâncias são naturalmente fluorescentes.

### **3.5. Espalhamento de Luz (ELSD)**

As partículas de uma amostra passam através da cela onde são aquecidas com um feixe de luz incidente e a quantidade de luz espalhada é medida com uma fotomultiplicadora. Em alguns equipamentos um gás é usado para concentrar as partículas na câmara de detecção, tendo como aplicação principal a análise de lipídeos.

### **3.6. Espectrometria de Massas (MS)**

Fornece o registro da separação cromatográfica e informações a respeito da identidade dos analitos. Os analitos, após separação, são fragmentados no detector permitindo a identificação e a quantificação.

#### **Vantagens**

- Fornece massa molecular dos analitos.
- Identifica os fragmentos.

#### **Desvantagens**

- Requer operador experiente.
- São caros.

### **3.7. Detectores eletroquímicos**

#### **a) Detector da Constante Dielétrica**

Mede as mudanças na polaridade da FM que passa através da cela.

### b) Detector Amperométrico

Um potencial conhecido é aplicado através de um eletrodo (Ex: carbono vítreo), e a ocorrência de redução ou oxidação de uma espécie pode ser medida. O potencial do eletrodo de trabalho e auxiliar é mantido constante. Geralmente, o trabalho é limitado a uma classe específica em cada análise.

### c) Detector de Condutividade

Adequado para a detecção de íons em solução. Baseia-se na medida da condutância (G) das soluções eletrolíticas dos efluentes da coluna ou supressora. A Lei de Ohm [ $I = (V - E_d)/R$ ] é obedecida e a corrente medida (I) dependerá do potencial aplicado entre os dois eletrodos.

### Aplicações da CLAE

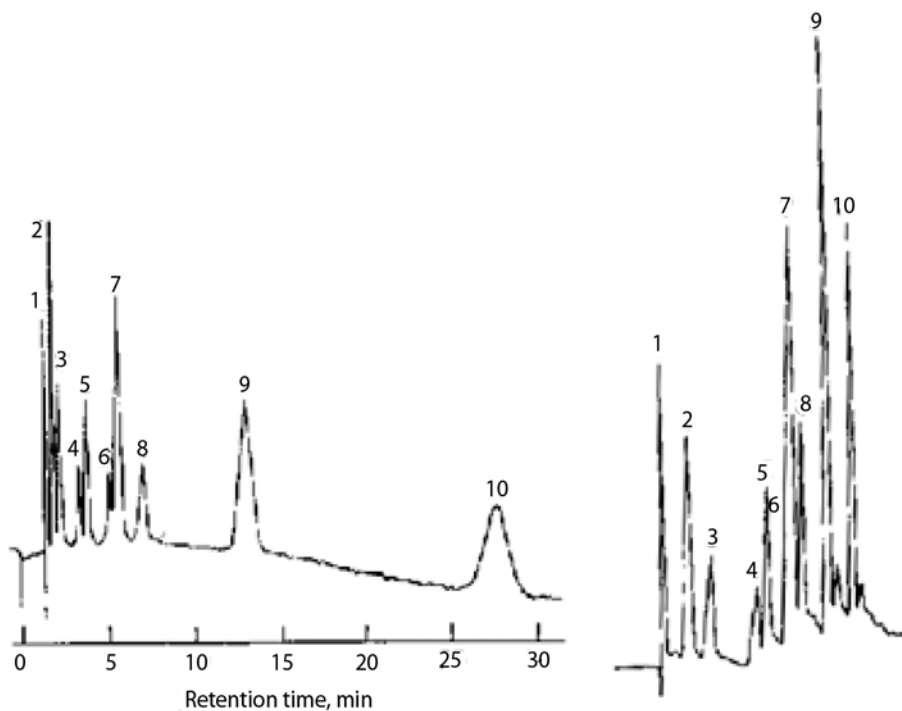


Figura 33 – Os cromatogramas referem-se a uma mistura de benzeno e clorobenzenos. No primeiro caso, a eluição foi de modo isocrático, com uma mistura de metanol/água 50/50. No segundo caso, a eluição foi por gradiente, partindo de metanol/água 40/60 e aumentando o teor de metanol em 8%/minuto. A coluna foi de 25 cm × 4,1 mm de diâmetro interno, com fase reversa C18. Sabe-se que os compostos analisados são (1) benzeno, (2) clorobenzeno, (3) odiclorobenzeno, (4) 1,2,3 triclorobenzeno, (5) 1,3,5-triclorobenzeno, (6) 1,2,4-triclorobenzeno, (7) 1,2,3,4-tetraclorobenzeno, (8) 1,2,3,5-tetraclorobenzeno, (9) pentaclorobenzeno e (10) hexaclorobenzeno.

Fonte - Análise Instrumental Cromatografia Líquida De Alta Resolução – CEFET – RJ.



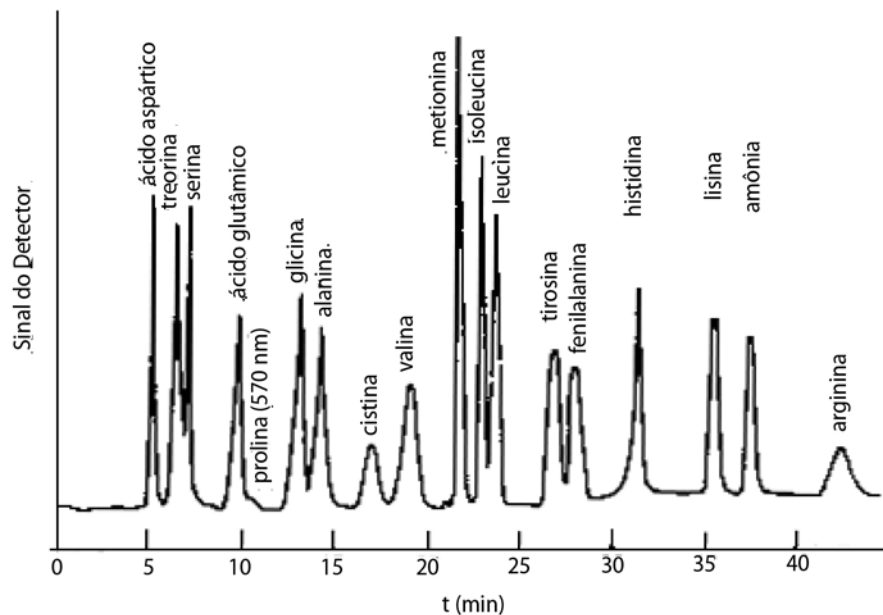


Figura 34 – Separação de aminoácidos em coluna de troca iônica. Empacotamento: troca catiônica com partículas de 8  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Fonte - Análise Instrumental Cromatografia Líquida De Alta Resolução – CEFET – RJ.

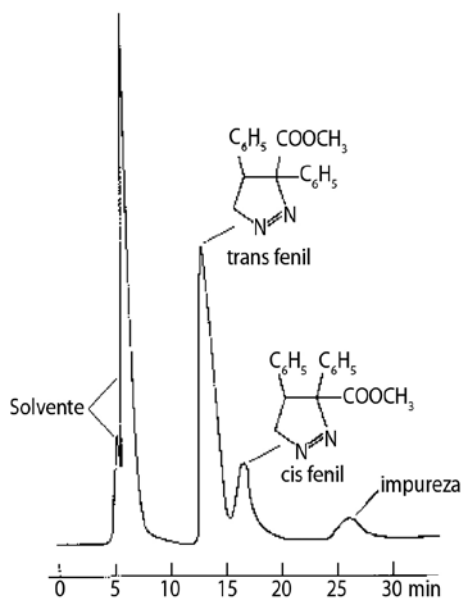


Figura 35 – Uma aplicação típica de cromatografia de adsorção: separação de *cis*- e *trans*pirazolina. Coluna 10 x 0,3 cm de sílica pelicular. Fase móvel 50/50 diclorometano/isooctano, temperatura ambiente e vazão de 0,25 mL/min. Detector UV 254 nm.

Fonte - Análise Instrumental Cromatografia Líquida de Alta Resolução – CEFET – RJ.

## Atividades de avaliação



### Objetivo

Buscar artigos científicos que mostrem a determinação de cafeína por CLAE. A cafeína é um alcaloide encontrado em bebidas como café, chás, refrigerantes, etc. Quando ingerida, atua como diurético e como estimulante do sistema nervoso central e cardiovascular.

### Reorganizando os conceitos

Com base no artigo científico, responda as seguintes perguntas:

1. Qual o tipo de equipamento utilizado na determinação da cafeína?
2. Qual o detector escolhido?
3. Qual o tipo de coluna utilizada?
4. Qual a fase móvel empregada?
5. Discuta a metodologia citada no artigo.



**Capítulo**

# **Cromatografia Gasosa (CG)**



## 1. Introdução à Cromatografia Gasosa

O principal mecanismo de separação da Cromatografia Gasosa (CG) está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida.

Na Cromatografia a Gás empregam-se colunas bem mais longas que aquelas usadas em Cromatografia a Líquido. O princípio é o mesmo, entretanto a força motora é a pressão do gás e não a força da gravidade, de modo que as colunas normalmente são dobradas em espiral, a fim de ocupar menos espaço dentro do cromatógrafo.

A cromatografia gasosa é uma das técnicas analíticas mais utilizadas. Além de possuir um alto poder de resolução, é muito atrativa devido à possibilidade de detecção em escala de nano a picogramas ( $10^{-9}$  a  $10^{-12}$  g).

A grande limitação deste método é a necessidade de que a amostra seja volátil ou estável termicamente, embora amostras não voláteis ou instáveis possam ser derivatizadas quimicamente.

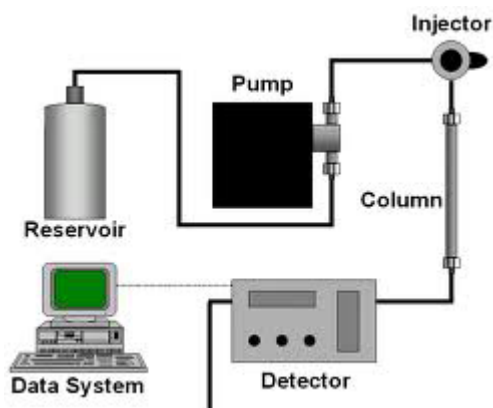


Figura 36 – Representação esquemática de um cromatógrafo a gás

A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado denominado de fase móvel (FM) ou gás de arraste.

O fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária FE (coluna cromatográfica), onde ocorre a separação da mistura.

A FE pode ser um sólido adsorvente (Cromatografia Gás-Sólido) ou,

mais comumente, um filme de um líquido pouco volátil, suportado sobre um sólido inerte (Cromatografia Gás-Líquido com Coluna Empacotada ou Recheada) ou sobre a própria parede do tubo (Cromatografia Gasosa de Alta Resolução).

A amostra (gás, líquido ou sólido em solução) é injetada com auxílio de uma microseringa ou válvula apropriada, no Injetor, que também é o Vaporizador (V) e os seus vapores são arrastados para o interior da coluna pela fase móvel (gás de arraste). Na saída da coluna, a amostra passa pelo Detector (D), que envia um sinal para o Registrador (R), este sinal é proporcional à quantidade de cada componente, o que permitirá uma análise quantitativa. Vale acrescentar que a Cromatografia a Gás é talvez o método de análise mais preciso.

Na cromatografia gás-líquido (CGL), os dois fatores que governam a separação dos constituintes de uma amostra são:

**Solubilidade na FE:** quanto maior a solubilidade de um constituinte na FE, mais lentamente ele caminha pela coluna.

**Volatilidade:** quanto mais volátil a substância (ou, em outros termos, quanto maior a pressão de vapor), maior a sua tendência de permanecer vaporizada e mais rapidamente caminha pelo sistema.

As substâncias separadas saem da coluna dissolvidas no gás de arraste e passam por um detector; dispositivo que gera um sinal elétrico proporcional à quantidade de material eluido. O registro deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise.

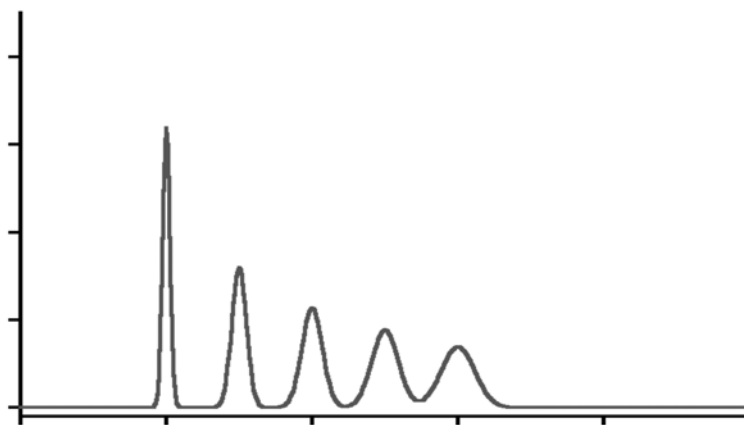


Figura 37 – Cromatograma de uma amostra com cinco componentes

## 2. Reservatório de gás de arraste

O gás de arraste fica contido em cilindros sob pressão. O parâmetro mais importante para escolha do gás é a sua compatibilidade com o detector. Os gases mais empregados são  $H_2$ , He e  $N_2$  e a vazão do gás de arraste, que deve ser controlada, é constante durante a análise.

## 3. Sistema de injeção de amostra

A introdução da amostra é feita no injetor (ou vaporizador). Na versão mais simples, trata-se de um bloco de metal conectado à coluna cromatográfica e à alimentação de gás de arraste. Este bloco contém um orifício com um septo, geralmente de borracha de silicone, pelo qual amostras líquidas ou gasosas podem ser injetadas com microseringas hipodérmicas. Amostras **sólidas**<sup>13</sup> podem ser dissolvidas em um solvente adequado. O injetor deve estar aquecido a uma temperatura acima do ponto de ebulição dos componentes da amostra, para que a amostra se volatilize completa e instantaneamente e seja carregada para a coluna. Se a temperatura for excessivamente alta, pode ocorrer decomposição da amostra.

<sup>13</sup> Sólidos: convencionalmente se dissolvem em um solvente adequado e injeta-se a solução.

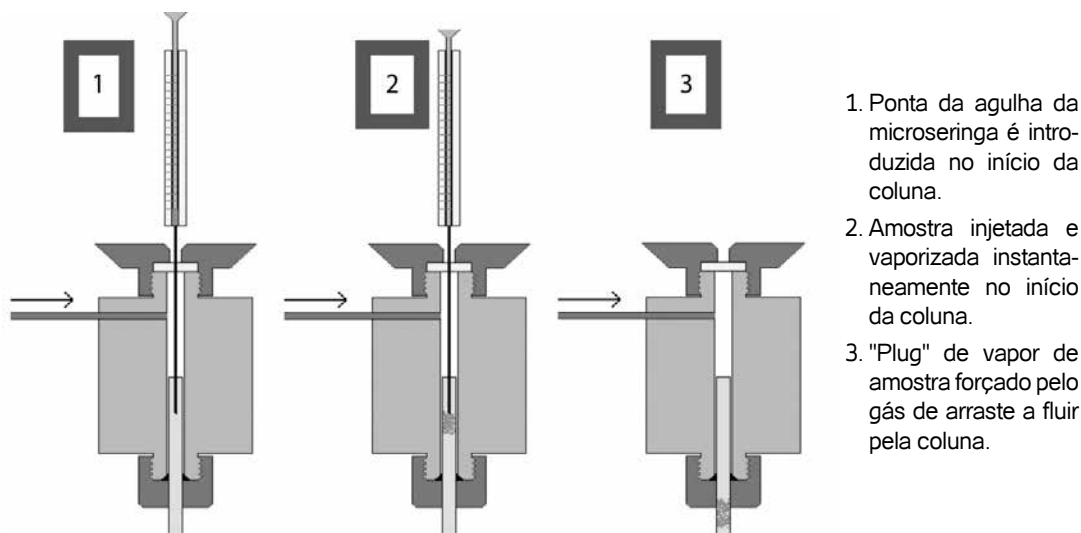


Figura 38 – Sistema de introdução de amostra

A quantidade de amostra injetada depende da coluna e do detector empregado. Para colunas empacotadas, volumes de 0,1  $\mu$ l a 3,0  $\mu$ l de amostra líquida são típicos. Volumes altos prejudicam a qualidade de injeção (alargamento dos picos) ou saturam a coluna cromatográfica.



## 4. Coluna Cromatográfica e Controle de Temperatura da Coluna

A amostra deve entrar na coluna na forma de um segmento estreito, para evitar alargamento dos picos. Após injetada e vaporizada, a amostra é introduzida na coluna cromatográfica, onde é efetuada a separação. Na CG a “afinidade” de um soluto pela FM é determinada pela volatilidade do soluto, sua pressão de vapor, que é função da estrutura do composto e da temperatura. Alterando-se a temperatura, altera-se também a pressão de vapor e, por conseguinte, a “afinidade” de uma substância pela FM. O controle de temperatura deverá ser rigoroso.



Figura 39 – Coluna capilar cromatográfica



Figura 40 – Equipamento utilizado na Cromatografia Gasosa – Cromatógrafo a Gás

## 5. Descrição detalhada de um cromatógrafo a gás

### a) Controles de temperatura

O cromatógrafo dispõe de termostatos para controle independente do aquecimento dos três principais setores: câmara de vaporização (é o próprio injetor), forno da coluna e bloco do detector.

O aquecimento da coluna, promovido por uma resistência elétrica localizada na base do forno, é homogeneizado por um ventilador que pode permanecer ligado após o final do aquecimento, de modo a acelerar o resfriamento. Nesse caso, o compartimento do forno deve permanecer aberto, exceto nos equipamentos que possuam dispositivo de resfriamento automático.

### b) Controles Pneumáticos

Os cromatógrafos a gás normalmente possuem uma válvula controladora de pressão e outra para ajuste da vazão da fase móvel. A vazão é medida com o auxílio de um fluxímetro de bolha (Figura 41), ou bolhômetro. A “pêra” (parte inferior) contém uma solução de sabão líquido. Comprimindo-se a “pêra”, o nível do líquido sobe e o gás forma uma bolha que ascende pelo tubo. Para se determinar a vazão, é suficiente marcar com um cronômetro o tempo gasto para a bolha percorrer os 20 mL do tubo. Na atualidade, existem no mercado alguns equipamentos totalmente microprocessados, tornando obsoletos esses acessórios.

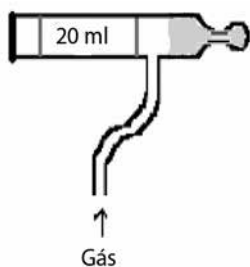
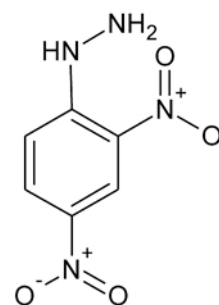


Figura 41 – Fluxímetro de bolha

Fonte: Alexandre Schuler – Cromatografia, p. 20

### c) Coletor de Frações

O coletor de frações é um acessório utilizado em Cromatografia preparativa. O material efluente da coluna pode passar por um divisor de fluxo de modo que uma parte é desviada para o coletor, onde cada componente, isoladamente, é condensado. Colunas de maiores dimensões permitem a injeção de uma maior quantidade de amostra, permitindo assim a produção de pequenas quantidades de um material com alta pureza (maior que 99,9999%), que poderá ser empregado como padrão.



2,4-dinitrofenilhidrazina

#### d) Detectores

Nos primórdios da Cromatografia, a visualização dos diversos componentes da amostra era possível porque eles eram coloridos (daí o nome da técnica). Os primeiros pesquisadores que trabalharam com substâncias incolores desenvolveram vários procedimentos para torná-las coloridas.

Surgiram então os reveladores. Reagentes, como o iodo, o ácido sulfúrico, a 2,4-dinitrofenil-hidrazina, entre vários outros, que borrifados sobre a placa desenvolvida, geram manchas coloridas (*spots*), permitindo assim a visualização do cromatograma. Tanto na placa quanto na coluna, iluminação com luz ultravioleta (UV) também permite a visualização das zonas ocupadas pelos componentes (evidentemente, apenas aqueles que absorvem luz UV).

Para a quantificação, Tswett e seus seguidores empregavam técnicas de *degradação* química, que consiste em transformar o analito desconhecido em alguma substância já conhecida e, em seguida, desenhar a reação (ou as reações) realizada(s), do fim para o começo, para chegar à estrutura do desconhecido.

A ideia de colocar um feixe de luz UV na saída da coluna e aproveitar a relação matemática associada à absorção da luz pelo analito (lei de Beer) é um exemplo do desenvolvimento de detectores (dispositivos que em contato com o analito geram um sinal que é registrado e quantificado).

O momento da detecção também é registrado (tempo de retenção), de modo que os detectores modernos fazem simultaneamente a identificação e a quantificação da amostra. As figuras 42, 43 e 44 mostram exemplos de cromatogramas obtidos por três diferentes tipos de detectores.

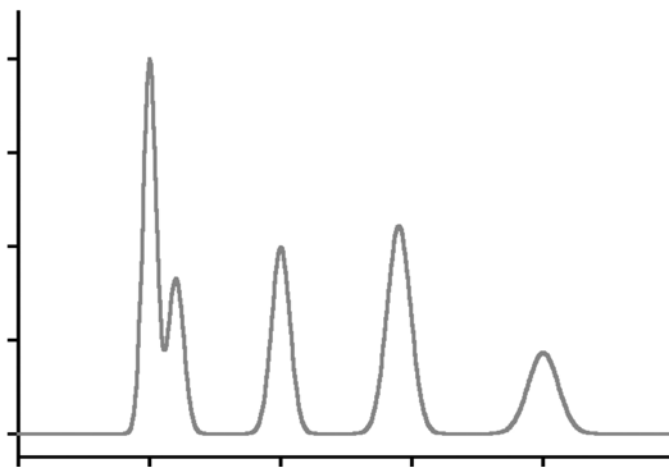


Figura 42 – Cromatograma obtido utilizando-se um Detector Universal, que gera sinal para qualquer substância eluída.

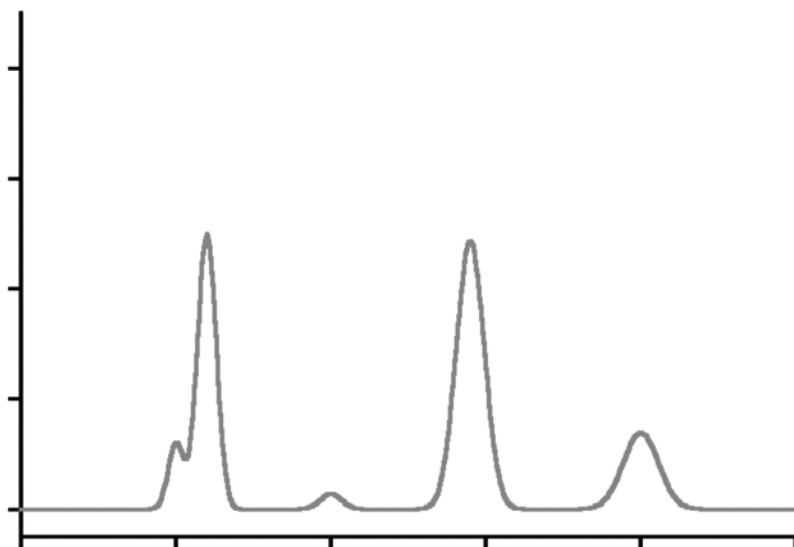


Figura 43 – Cromatograma obtido utilizando-se um Detector Seletivo que detecta apenas substâncias com determinada propriedade físico-química.

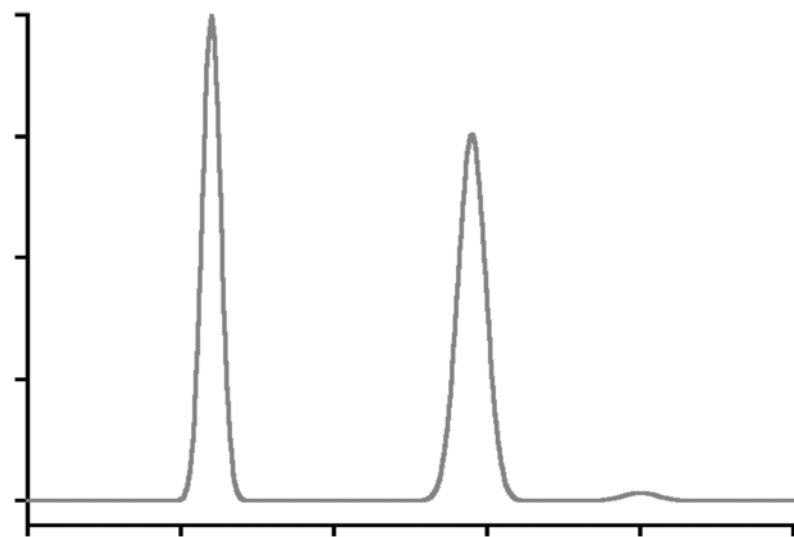


Figura 44 – Cromatograma obtido utilizando-se um Detector específico, que detecta apenas substâncias que possuem um determinado elemento ou grupo funcional em sua estrutura.

Um detector universal responde a todos os componentes de uma mistura. Um detector seletivo, porém, só responde a certos componentes da amostra. Pode ser uma vantagem quando ele responde apenas aos analitos de interesse porque o cromatograma é muito simplificado e não sofre interferências.

### Detector por condutividade térmica

O detector por condutividade térmica (DCT) é o detector de CG mais antigo. Devido ao seu grande volume, baixa sensibilidade e problemas de contaminação, ele foi logo descartado para o uso em sistemas capilares. Duas de suas características operacionais são, entretanto, muito interessantes para o uso em sistemas capilares.

A sensibilidade é inversamente proporcional à velocidade de fluxo, crescendo muito quando o fluxo passa de aproximadamente  $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  a  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . Por outro lado, a sensibilidade é máxima quando o gás de arraste é hidrogênio ou hélio (comumente usado em sistemas capilares) porque a diferença de condutividade térmica entre estes gases e as substâncias orgânicas é muito grande.

Os detectores por condutividade térmica usam um filamento metálico aquecido ou um termistor (um semicondutor de óxidos de metal fundidos) para mostrar diferenças de condutividades térmica do gás de arraste. Hélio e hidrogênio são os melhores gases de arraste para uso com estes detectores porque sua condutividade térmica é superior à dos demais gases. Por uma questão de segurança predomina-se a utilização do gás hélio por ser inerte.

### Detector por ionização de chama

O detector por ionização de chama (FID) baseia-se na queima do ar do efluente da coluna, misturado com hidrogênio, com produção de uma chama de energia suficiente para ionizar as moléculas de soluto cujos potenciais de ionização são baixos. Os íons produzidos são coletados por eletrodos e a corrente iônica produzida é medida. O jato do queimador é o eletrodo negativo. O anodo é usualmente filamento ou uma grade que atinge a extremidade da chama.

A combustão de misturas de hidrogênio e ar produz poucos íons e, assim, quando só o gás de arraste se queima, obtém-se um sinal praticamente constante. Na presença de compostos que contêm carbonos, ocorre a ionização e a condutividade elétrica aumenta fortemente. Como a amostra é destruída na chama, usa-se um dispositivo para dividir o fluxo do efluente quando se deseja continuar a análise da amostra. O divisor de fluxo é colocado entre a coluna e o detector, e permite que o grosso da amostra evite o detector.

### Aplicabilidades do detector por ionização de chama - (FID)

O FID tem uma grande aplicabilidade, sendo quase que de uso universal na cromatografia a gás de compostos orgânicos. Levando-se em conta ainda o fato de ser altamente sensível e estável, ter resposta rápida e uma faixa de resposta linear muito grande ( $\sim 10^7$ ) faz com que este tipo de detector seja o mais popular em uso.

O FID é sensível à massa e não à concentração, devido a isso, a resposta de detector não é afetada por alterações do fluxo do gás de arraste e alta sensibilidade ( $2 \times 10^{-12} \text{ g.s}^{-1}$ ) se mantém mesmo em fluxos muito baixos.

A sensibilidade é normalmente expressa em massa por unidade de tempo, logo, os efeitos de alargamento do pico não precisam ser considerados. Deste modo, um pico no efluente com largura de 2 segundos que resulta de  $10^{-8} \text{ g}$  do material é tão fácil de ser visualizado como um pico de largura de 2 segundos que contém 10 vezes o analito.

A sensibilidade alta ajustada com uma grande faixa de resposta linear e a pequena contaminação que sofre, faz com que o FID também seja um detector mais usado na rotina de CG capilar. No entanto, ocorrem problemas, pois se observa baixos fatores de resposta para certos compostos oxigenados como álcoois e compostos carbonilados. Alguns compostos contendo halogênios ou nitrogênios também apresentam baixos fatores de resposta.

### Detector por ionização de chama modificado

Conhecidos frequentemente como detectores de chama alcalina (AFD), estes FID modificados têm uma pequena esfera de silicato de rubídio aquecida eletricamente colocada entre a chama e o eletrodo coletor. Mantém-se a chama em torno de 200 V entre a esfera e o coletor.

Usa-se a chama a  $800 \text{ }^\circ\text{C}$ , mantida em uma razão baixa hidrogênio/ar para suprimir a ionização normal dos hidrocarbonetos, dirigida para a esfera. Acredita-se que se forma um pequeno plasma perto da superfície da esfera que permite a produção de muitos íons dos compostos que contém nitrogênio ou fósforo, inibindo ao mesmo tempo a resposta do carbono.

Este detector, entretanto, não é de uso simples como o FID comum porque a resposta para o nitrogênio ou fósforo depende das condições exatas de operação, particularmente a temperatura da esfera que, por sua vez, depende em parte do tamanho da chama de nitrogênio que atinge. Isto significa que manter a reprodutibilidade no trabalho cotidianamente é difícil. Deve-se atentar também que a faixa de resposta linear não é tão grande como a dos FID comuns. No entanto, o detector modificado é muito útil na detecção e quantificação de muitos compostos que contém fósforo e nitrogênio, como podemos citar os pesticidas de última geração.

### Detector de chama fotométrico

Detector de chama fotométrico (FPD) é um terceiro tipo de detector de chama que também se baseia nos FID. Nele, compostos que contém fósforo ou enxofre são queimados em uma chama hidrogênio/oxigênio com produção de luz a 536 nm no caso do fósforo e 394 nm no caso do enxofre.

Após passar por um filtro óptico de banda estreita, a emissão é detectada em uma fotomultiplicadora convencional colocada a 90° em relação ao eixo da chama. O detector fotométrico, que pode ser equipado com dois sensores ópticos diferentes para a determinação simultânea de enxofre e fósforo é muito mais sensível para estes elementos do que para hidrocarbonetos o que o torna mais seletivo.

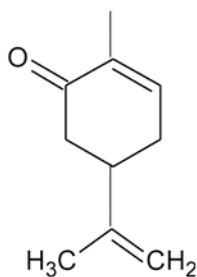
### Desvantagens

A desvantagem do FPD<sup>14</sup> é a resposta não linear. A resposta é aproximadamente quadrática e depende da natureza exata do composto que está sendo analisado. Alguns cromatógrafos têm a função de linearização em sua programação que pode ser controlada pelo usuário dentro de certos limites (1,2 a 2,5). Apesar destas desvantagens, este tipo de detector é muito útil, particularmente, na análise de enxofre em baixa concentração podendo ser de interesse para resolver problemas ambientais.

### Detectores por captura de elétrons

Os detectores por captura de elétrons (ECD) diferem dos demais detectores de ionização porque exploram o fenômeno da recombinação baseado na captura de elétrons por compostos que têm afinidade por elétrons livres. O detector mede, então, a diminuição e não o aumento da corrente.

Usa-se uma fonte de raios  $\beta$  (comumente uma lamínula contendo  $^3\text{H}$  ou  $^{63}\text{Ni}$ ) para gerar elétrons “lentos” por ionização do gás de arraste pelo detector (prefere-se o nitrogênio). Os elétrons assim gerados migram para o anodo sob um potencial fixo e provocam uma corrente de fundo estável. Quando um gás capaz de capturar elétrons sai da coluna e reage com um elétron, o resultado é a substituição do elétron por um ânion de massa muito maior e redução da corrente. A resposta do detector relaciona-se visivelmente à afinidade das moléculas do eluato por elétrons e o detector é notadamente sensível para compostos que contêm halogênios ou enxofres, anidridos, compostos em que a carbonila está conjugada, nitritos, nitratos e compostos organometálicos.



Carvona - apresenta carbonila conjugada.

### Detector por fotoionização

O detector por fotoionização (PID) é um dos detectores mais recentes, portanto faremos uma descrição mais delineada. Trata-se de um detector de ionização de funcionamento semelhante ao FID ou a um ECD, no qual a resposta depende da quantidade de íons e amplificação do sinal em um grande eletrodo colecionador de cargas positivas usando um amplificador convencional de alta impedância. As moléculas orgânicas, ao sair da coluna juntamente com

<sup>14</sup> Os FID, AFD e FPD podem operar temperaturas até 400° C, logo, podem ser usados com colunas de alta temperatura. Isto reduz a contaminação por condensação.

eluente, são irradiadas com luz ultravioleta de alta intensidade, proveniente de uma lâmpada que produz fótons na faixa de 9,5-11,7 eV, dependendo do comprimento de onda da radiação. As espécies orgânicas geralmente apresentam as energias de ligação nesta faixa, portanto o PID pode ser usado como um detector universal para compostos orgânicos ou pode ser usado para ionizar seletivamente alguns tipos de moléculas da amostra para as quais a energia de ionização é baixa.

Este detector tem potencial apreciável e poderá ser uma alternativa para os FID, pois apresenta sensibilidade semelhante e resposta universal.

Ao contrário dos FID normais, o PID não precisa de gases auxiliares, necessitando apenas do gás de arraste, o que é uma vantagem considerando os sistemas portáteis.

Comercialmente são vendidos para a determinação de gases e vapores no trabalho de campo, alguns monitores portáteis para compostos orgânicos que usam um PID e uma bomba simples para levar o ar, que age simultaneamente como gás de arraste e amostra, até uma coluna curta.

### Detector de emissão atômica

O detector de emissão atômica (AED), que é constituído por duas partes independentes, poderá ter muitas aplicações. O gás de arrasto (hélio) passa pela coluna capilar e carrega o eluente que passa, ao sair da coluna, por uma cavidade de micro-ondas resfriada com água onde se produz um plasma<sup>15</sup> de hélio, a temperatura alta do plasma é suficiente para decompor a amostra em átomos que, por sua vez, emitem um espectro atômico característico.

A radiação resultante é focalizada, passa por uma rede de difração, onde sofre dispersão, e continua até um conjunto de diodos móvel, como na espectroscopia de plasma convencional. Esta montagem permite a detecção de elementos (com exceção do hélio, usado como gás de arrasto) com sensibilidade muito alta.

Como o detector de diodos pode ser ajustado para cobrir uma faixa selecionada de comprimentos de ondas no ultravioleta/visível, pode-se detectar um número muito grande de elementos em uma amostra, tornando a injetá-la e examinando sucessivamente regiões diferentes do espectro. A especificidade característica para os elementos é muito útil na determinação simultânea de halogênios, fósforo, enxofre, nitrogênio e oxigênio, que são analisados separadamente como outros detectores.

O detector de emissão de chama também pode ser usado na determinação de outros elementos potencialmente importantes como o silício, metais pesados (Pb e Hg), estanho, arsênico, cobre e ferro, ou como um detector

<sup>15</sup> Em Física e em Química, o plasma é um dos estados físicos da matéria, similar ao gás, no qual certa porção das partículas é ionizada.



de substâncias orgânicas, monitorando carbono e hidrogênio. Ele pode ainda detectar seletivamente isótopos como  $^{13}\text{C}$  e deutério, permitindo a determinação de razões isotópicas.

Os AED, além de possibilitar a detecção de amostras cujas características não permitem a análise com detectores convencionais, possuem faixa de resposta linear muito grande e podem oferecer rapidamente informações quantitativas sobre cada elemento analisado.

O programa de que controla o detector pode usar a resposta do conjunto diodos ainda para monitorar eventuais sangramentos da coluna ou do fluxo de gás de arrasto e deduzir este sinal da resposta da amostra para dar um sinal correto.

### Aplicações dos AED

- Hidrocarbonetos;
- Produtos farmacêuticos;
- Substâncias de interesse ambiental.

### Desvantagens

- Alto custo
- Difícil manutenção.

### Detectores de CG acoplados

A cromatografia com fase gasosa pode ser acoplada com vários tipos de espectrômetros, compondo sistemas capazes de combinar a capacidade de separação da cromatografia com a capacidade de identificação da espectroscopia.

# Capítulo

# 7

## **Cromatografia a Gás associada a Espectrometria de Massas (CG-MS) e Cromatografia com Fluido Supercrítico-Espectrometria de Massas (SFC-MS)**



## 1. Cromatografia a Gás-Espectrometria de Massas – CG-MS

A Cromatografia a Gás-Espectrometria de Massas (CG-MS) foi uma das primeiras técnicas associadas, sendo, ainda hoje, uma das técnicas mais empregadas.

A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas é relativamente simples, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade de alto vácuo do espectrômetro de massas.

Hoje, quase toda cromatografia gasosa é a base de colunas capilares, predominantemente de quartzo, com a fase estacionária ligada quimicamente às paredes da coluna para evitar perdas. Estas colunas podem ser diretamente ligadas à maior parte das fontes de íons através de um anel de compressão.

A coluna passa normalmente por um tubo de aço inoxidável que a fixa em uma posição correta. O tubo é aquecido para evitar condensação na linha de transferência. Quando a coluna está em posição, as bombas do espectrômetro suportam vazões de até  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  na coluna, mantendo ainda o vácuo adequado na fonte de íons. Muitos sistemas de CG-MS suportam as vazões da ordem de  $3$  a  $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  usadas em capilares de grande diâmetro. Assim, a interface física entre o cromatógrafo e o espectrômetro não é um problema, podendo-se escolher diversos tipos de espectrômetros de massas (Figura 45).



Figura 45 – Cromatógrafo Gasoso - Espectrômetro de Massa GCMS-QP2010 SE - é uma versão do modelo Ultra, direcionado para análise de alta produtividade e com excelente relação custo/benefício. É uma ótima ferramenta para laboratórios que utilizam análises de rotina abrangendo diversas aplicações como, por exemplo, análises ambientais e controle de qualidade.

A cromatografia com fase gasosa só separa moléculas voláteis (predominantemente orgânicas), portanto o espectrômetro de massas só precisa garantir uma faixa modesta de massas de aproximadamente 750 unidades, com resolução inferior a 1000. Entretanto, devem ter uma resposta rápida e sensível, para detectar os picos menos intensos do cromatograma, permitindo a obtenção de seus espectros de massas.

Os métodos de ionização mais empregados em CG-EM são ionização por impacto de elétrons ("electron ionization") - IE e a ionização química (*chemical ionization*) - IQ<sup>1,3</sup>. Na IE o analito de interesse, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV). As moléculas do analito absorvem esta energia desencadeando vários processos, dentre os quais o mais simples é aquele em que o analito é ionizado pela remoção de um único elétron ( $M+\bullet$ ).

Este processo requer tipicamente 10 eV e o restante da energia gera fragmentação dos analitos<sup>2,3</sup>. Isto consiste em um dos maiores problemas encontrados na aplicação de IE, pois a fragmentação rápida pode conduzir a não observação do íon molecular no espectro, perdendo-se, portanto, uma das mais importantes informações analíticas oferecidas pela EM<sup>2</sup>.

A IQ é a técnica que foi desenvolvida especialmente para aumentar a produção do íon molecular e reduzir as fragmentações associadas à ionização por elétrons. Nesta técnica, as moléculas do analito, em fase gasosa, são introduzidas na câmara de ionização do espectrômetro de massas, que contém um gás reagente.

Esta mistura (moléculas do analito + gás reagente) é bombardeada com elétrons, assim como na IE. Mas, como o gás reagente está em excesso em relação ao analito (geralmente em proporção maior que 1000:1), ele é ionizado quase que exclusivamente e passam a ocorrer reações entre os íons em fase gasosa do gás reagente e as moléculas neutras do analito, dando origem aos íons pseudomoleculares do analito  $[M+H]^+$ . Por este processo ser relativamente de baixa energia, quase não é observado fragmentação.

## 2. Cromatografia com fluido supercrítico – espectrometria de massas (SFC-MS)

A cromatografia com fluido supercrítico<sup>16</sup> compatibiliza as vantagens da cromatografia a gás com as vantagens da cromatografia líquida de alta eficiência, especialmente quando esta técnica é acoplada a espectrometria de massas, pois as colunas podem ser conectadas diretamente à fonte de íons sem a necessidade de interfaces complicadas como na CLAE. O fluido de cromatografia mais comum é o dióxido de carbono que não causa problemas na espectrometria de massas ou em seu sistema de bombeamento.

<sup>16</sup> Os fluidos supercríticos são produzidos pelo aquecimento de um gás, acima de sua temperatura crítica ou compressão de líquido acima de sua pressão crítica.

# 8

## Capítulo

# Cromatografia de íons (CI)



## 1. Introdução à cromatografia de íons

A cromatografia de íons é definida como a técnica de separação e quantificação de cátions e ânions, utilizando colunas com resinas trocadoras de íons ou seus equivalentes. A detecção, nessa técnica, geralmente é realizada por condutibilidade elétrica.

A técnica da cromatografia de íons (CI) permite, portanto, análise de íons em soluções aquosas, empregando como fase móvel soluções iônicas escolhida de forma a ser compatível com o tipo de trocador usado. Desta maneira, se a fase estacionária retém cátions, a fase móvel deve conter cátions capazes de substituí-los um valor de pH especificado para cada caso, uma vez que o pH é dos fatores principais para o sucesso do método.

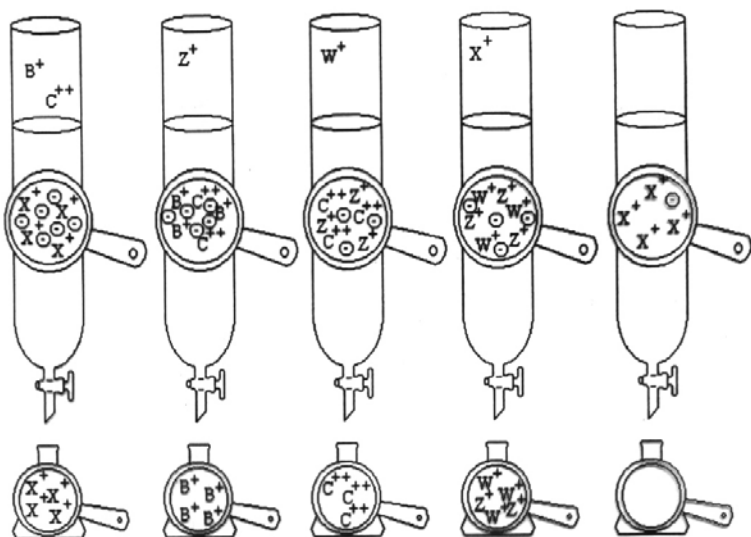


Figura 46 – Esquema do mecanismo de troca iônica

Na cromatografia de íons, a fase estacionária é altamente carregada, sendo que solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamento com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador de íons da fase móvel regem este tipo de cromatografia. A separação de materiais por



cromatografia iônica está baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz. A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e a matriz é devido à diferença de carga, sendo possível controlá-la utilizando fatores como pH e a força iônica.

Os íons adsorvidos são removidos por eluição e a solução empregada é chamada de eluente. A solução eluente é chamada de eluato. Se uma solução de eluente adequado for passada através de uma coluna carregada com o íon **A**, hipoteticamente, o desenvolvimento da reação poderá ser seguido analisando-se continuamente o eluato. A concentração de **A** nas frações sucessivas do eluato pode ser lançada num gráfico versus o volume do eluato; este gráfico é curva de eluição.

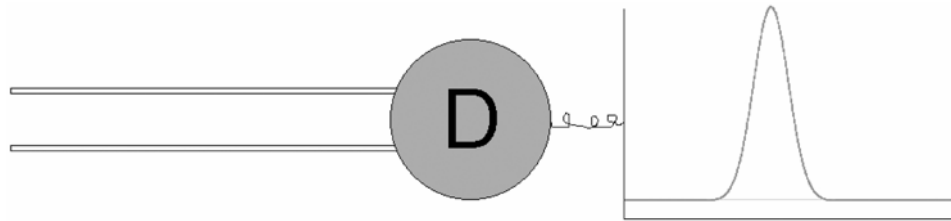


Figura 47 – Gráfico da curva de eluição

Se as curvas de eluição forem suficientemente afastadas entre si, conforme a fazer-se uma separação quantitativa, se as curvas se superpuserem, ocorrerá uma separação incompleta. Idealmente, as curvas deverão se aproximar de uma distribuição Gaussiana.

Em muitos casos, a separação eficiente de uma mistura através da cromatografia por troca iônica requer que a concentração seja mudada durante o curso da eluição.

## 2. Resinas de troca iônica

Resinas de troca iônica são materiais à base de polímeros de estireno e divinilbenzeno e poliacrilatos. A Tabela 2 mostra as características gerais de várias resinas trocadoras de íons.

Tabela 2

Características gerais de várias resinas trocadoras de íons.				
	Tipo	Grupo trocador	pH	Capacidade de troca
Troca catiônica	Ácido forte	-SO <sub>3</sub> H	1,0 - 14	4mmol H+ g <sup>-1</sup>
Troca catiônica	Ácido fraco	-CO <sub>2</sub> H	5,0 - 14	9-10 mmol H+ g <sup>-1</sup>
Troca aniônica	Base forte	-CH <sub>2</sub> +R <sub>3</sub>	1,0 -14	4 mmol -OH g <sup>-1</sup>
Troca aniônica	Base fraca	-CH <sub>2</sub> -NR <sub>2</sub>	1,0 - 9,0	4 mmol -OH g <sup>-1</sup>

### 3. Classificação das resinas

**Fortes:** Contêm grupos ácidos ou básicos fortes, que são completamente ionizáveis em uma grande faixa de pH.

**a) Catiônica forte:** Contêm grupos de ácido sulfônico e são completamente ionizáveis acima de pH 2,0.

**b) Aniônica forte:** Contêm quaternário de amônio e são completamente ionizáveis até pH 10.

**Fracas:** As resinas fracas têm uma maior capacidade de troca que as resinas fortes, mas não são ionizáveis em uma faixa restrita de pH.

**Catiônica e Aniônica fraca:** Contêm ácido carboxílico e amina, respectivamente.

### 4. Capacidade de troca dos trocadores iônicos

A capacidade de troca de íons de uma resina depende do número de grupos ativos unidade de peso do material, e quanto maior for o número de íons maior será a capacidade de troca. A capacidade de troca é expressa em miliequivalentes por grama de resina. A Tabela 3 fornece alguns exemplos de capacidade de trocadores iônicos<sup>17</sup>.

<sup>17</sup> A quantidade de amostra a ser aplicada em um trocador iônico depende de sua capacidade. Em geral, aplica-se de 1-5% da capacidade total do trocador. Excesso de material implica na perda da resolução.

Tabela 3

Resinas comerciais		
Nome	Tipo	Capacidade de troca por g-1 (resina seca)
Zeo-Karb 225	Ácido forte	4,5-5,0 mmol H+
Amberlite CG 120	Ácido forte	5,0 mmol H+
Zeo-Karb 226	Ácido fraco	9,0-10 mmol H+
Amberlite CG 50	Ácido fraco	10,0 mmol H+
Deacidite FFIP	Base forte	4,0 mmol -OH
Amberlite CG 400	Base forte	3,8 mmol -OH
Amberlite CG 45	Base fraca	5,0 mmol -OH

## 5. Seletividade

A **seletividade**<sup>18</sup> de um trocador aumenta com o incremento do grau das ligações cruzadas da matriz. Íons com carga elevada são trocadores mais fortes que íons de baixa carga nas mesmas concentrações. Íons com a mesma carga, porém com diferentes tamanhos em solução, têm diferentes graus de afinidade. Este efeito se relaciona melhor com o poder de polarização do íon e seu grau de hidratação, sendo que a afinidade diminui com o aumento do raio do íon hidratado.

## 6. Fase móvel

A fase móvel pode ser constituída por soluções ácidas, básicas ou ainda por soluções tampões. Quando a fase móvel é uma solução tampão, sua escolha é em função do valor em que se pretende manter o pH. Na literatura, encontram-se vários tampões utilizados, como o fosfato, o citrato, o acetato, dentre outros.

## 7. Aplicações

A desionização da água e de muitos licores açucarados de frutos bem como a despigmentação destes são as aplicações mais rotineiras.

Em Química Analítica, é usada na separação de elementos geralmente complexados, como também na eliminação de íons que interferem na análise de uma determinada substância e na separação de misturas de compostos carregados.

Na Bioquímica, tem sido aplicada frequentemente, tanto com fins preparativos como analíticos. Na preparação e purificação de enzimas como de outras macromoléculas, usada também na separação de drogas e seus metabólitos, utilizadas em autoanalisadores de aminoácidos.

<sup>18</sup> Seletividade é a capacidade que tem um trocador de reter íons

## Referências



BARCIA, M. T.; JACQUES, A. C.; PERTUZATTI, P. B.; ZAMBIAZI, R. C., **Determinação de ácido ascórbico e tocoferóis em frutas por CLAE**, Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 2, p. 381-390, abr./jun. 2010.

CIOLA, R., **Fundamentos da Cromatografia Líquida de Alto Desempenho**, São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., 1998.

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L., Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: COLLINS, C. H. & BRAGA, G. L.; **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, 1988, p 179 - 243.

MARZOCCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 3° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

Vogel: **Análise Inorgânica Quantitativa**, Rio de Janeiro, Editora Livros Técnicos e Científicos, 2002.

**Análise Instrumental Cromatografia Líquida de Alta Resolução**, CEFET-Química Unidade Rio de Janeiro.

**Análise de drogas vegetais por cromatografia em camada delgada (CCD)**, MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Departamento de Farmácia, Laboratório de Farmacognosia.

SCHULER, A., **Cromatografia a Gás e a Líquido**. 10° ed., UFPE, Recife, 2007.

## Sobre a autora

**Antônia Fádía Valentim de Amorim:** possui graduação em Química pela Universidade de Fortaleza (1988), Mestrado em Química - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (1997) e Doutorado em Química pela Universidade Federal do Ceará (2002). Professora Adjunto da Universidade Estadual do Ceará (UECE) desde 1995, Pesquisadora do Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), atualmente é Coordenadora do Núcleo de Ensino Lato Sensu da Pro-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UECE. Tem experiência na área de Química, com ênfase em Síntese Orgânica, atuando principalmente nos seguintes temas: quitosana, cosméticos, fitocosméticos, microesferas de quitosana, microencapsulamento de drogas e produção de hidrogéis.



Química

Fiel a sua missão de interiorizar o ensino superior no estado Ceará, a UECE, como uma instituição que participa do Sistema Universidade Aberta do Brasil, vem ampliando a oferta de cursos de graduação e pós-graduação na modalidade de educação a distância, e gerando experiências e possibilidades inovadoras com uso das novas plataformas tecnológicas decorrentes da popularização da internet, funcionamento do cinturão digital e massificação dos computadores pessoais.

Comprometida com a formação de professores em todos os níveis e a qualificação dos servidores públicos para bem servir ao Estado, os cursos da UAB/UECE atendem aos padrões de qualidade estabelecidos pelos normativos legais do Governo Federal e se articulam com as demandas de desenvolvimento das regiões do Ceará.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

