



FACULTAD DE
CIENCIAS FORESTALES
Ing. Néstor René Ledesma



UNSE

Universidad Nacional
de Santiago del Estero

CÁTEDRA DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIOLÓGICA

TÉCNICAS DE ANÁLISIS EN QUÍMICA ORGÁNICA CROMATOGRAFÍA



Autor Ing. Adriana Corzo

Mayo 2019

Corzo, Adriana

Técnicas de análisis en Química Orgánica : cromatografía : Cátedra de Química orgánica y Biológica / Adriana Corzo. - 1a ed . - Santiago del Estero : Universidad Nacional de Santiago del Estero - UNSE. Facultad de Ciencias Forestales, 2019.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-1676-86-6

1. Química Orgánica. 2. Análisis. 3. Técnicas de Análisis. I. Título.
CDD 543.8

LA CIENCIA EN LA FILATELIA

El **Royal Institute of Chemical** es una organización científica británica fundada en 1877. La Chemical Society, junto con el Royal Institute of Chemistry, Faraday Society y la Society of Analytical Chemistry se empiezan a fusionar en 1972, convirtiéndose en la **Royal Society of Chemistry** en 1980. En 1977 fueron emitidos los siguientes 4 sellos, en conmemoración del centenario de dicha organización (1877 – 1977).



La imagen de portada de la presente Serie Didáctica, corresponde al tercer sello emitido, el cual conmemora a Richard Laurence Millington Synge (Liberpool, 28 de octubre de 1914 – Norwich, 18 de Agosto de 1994) que fue un bioquímico británico galardonado con el premio Nobel de Química en 1952, compartido con Archer Martin, por la invención de la cromatografía de partición.

PRÓLOGO

El análisis químico experimental es el arte de reconocer compuestos diferentes y determinar sus elementos. El mismo adquiere una posición prominente entre las aplicaciones de la ciencia, por cuanto las preguntas que nos permite contestar originan por doquier procedimientos químicos que se emplean con fines científicos o técnicos. Su importancia suprema ha hecho que se lo cultive asiduamente desde un período muy antiguo en la historia de la química, y sus antecedentes comprenden una gran parte del trabajo cuantitativo que se extiende sobre todo el dominio de la ciencia – Wilhelm Ostwald (1894).

La incorporación de la moderna tecnología instrumental, los adelantos de la física, la química y la fisicoquímica han contribuido al gran desarrollo actual del análisis experimental químico, mejorando las técnicas y metodologías determinativas. La rama de la química que se ocupa de tales técnicas y metodologías es conocida en la actualidad como Química Analítica.

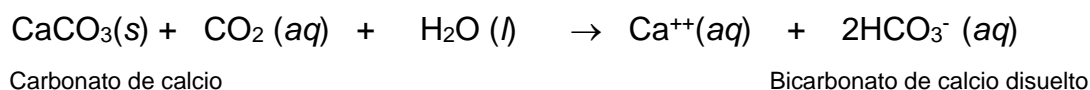
La Ingeniería Química, la Biología, la Edafología, la Ingeniería Sanitaria, la Medicina, la Agricultura, la Bioquímica, las Ciencias Ambientales etc. se sirven del análisis químico experimental como herramienta auxiliar de trabajo, y muchos de sus avances son posibles gracias a la información decisiva que les brinda. Un ejemplo de esto es lo sucedido con el río Potomac (E.E.U.U.).

El brazo norte del río Potomac corre cristalino por una hermosa región de los montes Apalaches pero en gran parte de su longitud el río está muerto, víctima de los escurrimientos ácidos provenientes de minas de carbón abandonadas. Cuando el río fluye junto a una fábrica de papel y una planta de tratamiento de aguas residuales en Westernport, Maryland; el pH de sus aguas asciende de un estéril 4,5 a un fértil 7,2, lo cual permite que ahí abunden peces y plantas. Algo en Westernport neutraliza la acidez del agua del río. A principios de la década de 1980 se construyó una gran presa en Bloomington, en la parte ácida del río. Surgió, entonces, el interrogante de cómo regular las descargas de agua de la presa de modo que no excediera la capacidad de neutralización de la acidez que se producía en Westernport.

Como en muchas discusiones sobre calidad ambiental, la química analítica participó de manera decisiva en la resolución del problema. Combinando muchas

de las técnicas que engloba este área de la ciencia (como la cromatografía y la espectroscopia) fue posible dilucidar y cuantificar los aspectos químicos del río Potomac* (D.P. Sheer y D. C. Harris, *J. Water Pollution Control Federation*, **54**,1441 – 1982).

La clave de la neutralización química resulto ser el carbonato de calcio sólido en suspensión, proveniente de sustancias químicas utilizadas para tratar la pulpa de madera en la fabricación del papel. Parte de este desecho sólido queda retenido en la planta de tratamiento y no llega a la corriente fluvial. Sin embargo, la respiración bacteriana en la planta de tratamiento de aguas residuales produce grandes cantidades de dióxido de carbono, que reacciona con el carbonato de calcio sólido y forma bicarbonato de calcio, soluble:



El bicarbonato generado en la planta de tratamiento neutraliza la acidez del río, permitiendo que la vida prolifere inmediatamente corriente abajo:



Una vez que se identificaron y cuantificaron los procesos químicos que ocurrían en Westernport, fueron creadas normas para la descarga desde la presa de manera que su agua ácida no excediera la capacidad neutralizante de la fábrica de papel.

Es así que, el importante desarrollo de la Química Analítica y su implicancia en casi cualquier rama de la ciencia exige realizar permanentes esfuerzos en su enseñanza. Esta preocupación por mejorar el proceso de enseñanza-aprendizaje requiere del apoyo de material didáctico apropiado, de manera de facilitar al estudiante su participación activa durante el mencionado proceso.

El objetivo del presente material de estudio no es desarrollar en profundidad ni en toda su amplitud el tema que se aborda en el mismo, si no proveer a los alumnos de las carreras de Ingeniería Forestal, Ingeniería en Industrias Forestales y Licenciatura en Ecología y Conservación del Ambiente de la Facultad de Ciencias Forestales una guía de estudio que les permita asomarse de una manera un poco

más amena y clara a los conceptos básicos y principios fundamentales de aplicación y funcionamiento de una de las técnicas más ampliamente usadas en la dilucidación de la identidad, estructura y cuantificación de sustancias químicas: la **CROMATOGRAFÍA**. Particularmente se desarrollará, con un poco más de detalle, la **CROMATOGRAFÍA PLANAR**.

LA AUTORA

Índice

LA CIENCIA EN LA FILATELIA	2
PRÓLOGO	3
CAPÍTULO I: Introducción a la Cromatografía	7
PRESENTACIÓN	8
DEFINICIÓN Y PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO	10
TÉRMINOS COMUNMENTE USADOS EN CROMATOGRAFÍA.....	12
CLASIFICACIÓN.....	17
Según el tipo de soporte físico sobre el cual se desarrolla	17
Según el estado físico de la fase móvil	17
Según el estado físico de ambas fases y el mecanismo que rige la separación ...	18
C-1) Cromatografía Líquido-Sólido.....	18
C-1-1. Cromatografía de adsorción	19
C-1-2. Cromatografía de intercambio iónico	20
C-1-3. Cromatografía de exclusión	20
C-2) Cromatografía Líquido- Líquido.	21
C-2-1. Cromatografía de reparto	21
C-2-2. Cromatografía de afinidad	22
C-3) Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.....	22
C-4) Cromatografía de gases.	25
CAPÍTULO II: Cromatografía planar en papel	30
INTRODUCCIÓN.....	31
Coeficiente R _f (Relación de Frentes)	31
ETAPAS DE LA TÉCNICA	33
Siembra	33
Desarrollo o Corrida	34
Revelado	40
Evaluación de los resultados.....	42
EFECTOS DE LA TEMPERATURA	44
CAPÍTULO III: Cromatografía planar en capa fina.....	45
INTRODUCCIÓN.....	46
ETAPAS DE LA TÉCNICA	48
Elección del Adsorbente	48
Elección de la Fase Móvil.....	49
Preparación de las Placas.....	49
Activación de las placas.....	50
Siembra de las muestras en las placas	51
Formas de desarrollo.....	51
Revelado de las placas	51
BIBLIOGRAFÍA	53



CAPÍTULO I
INTRODUCCIÓN A LA
CROMATOGRFÍA

PRESENTACIÓN

La cromatografía es una técnica o método físico de separación excepcionalmente versátil que, en una o varias de sus formas, es usada por casi todos los químicos en investigación. Entre los métodos de análisis modernos ocupa un lugar destacado debido a su facilidad para la separación, identificación y cuantificación de diversas especies químicas, ya sea por sí sola o asociada a otras técnicas instrumentales de análisis como, por ejemplo, la espectrofotometría o la espectrometría de masas.

El botánico ruso MIKHAEL SEMENOVICH TSWETT (1872 – 1919) estableció en 1906, las ventajas de la técnica, adoptó la terminología y definió los procesos experimentales básicos para esta técnica. Por lo tanto se lo considera como el padre de la cromatografía. TSWETT (Figura 1) publicó dos trabajos describiendo sus experiencias en la separación de los componentes de extractos de hojas y de yema de huevo, para lo cual usó columnas de vidrio rellenas con varios sólidos finamente divididos y arrastró los componentes con éter de petróleo. Como él separó compuestos coloreados (pigmentos) denominó a la técnica “cromatografía” ya que este término deriva de las palabras griegas “*chrom*” (color) y “*graphe*” (escribir): escribir en colores. Sin embargo, el proceso no depende de que los compuestos a separar posean color, pero sí de que puedan colorearse a través de una reacción química para poder visualizar su ubicación una vez separados.

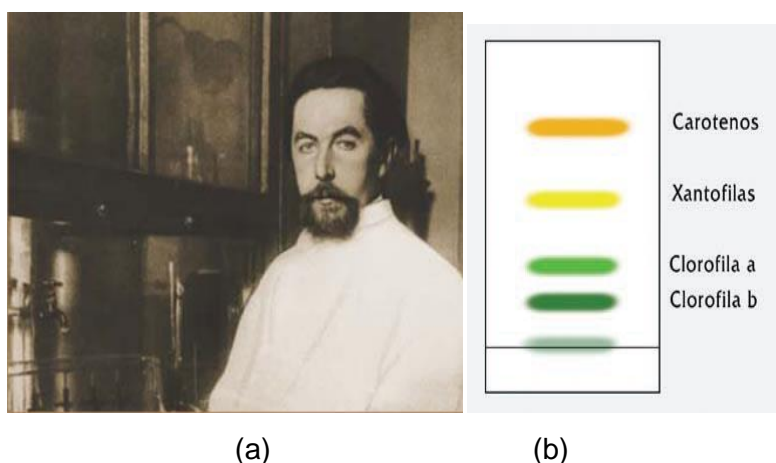


Figura 1: (a) Mikhael Tswett (1872 – 1919); (b) separación de pigmentos vegetales por cromatografía en papel.

Sin embargo en aquella época los procesos de separación basados en la migración diferencial ya eran bien conocidos. Paralelamente a los desarrollos de TSWETT, REED en Inglaterra y DAY en Estados Unidos, utilizaron columnas conteniendo sólidos en la separación de sales orgánicas y muestras de petróleo, respectivamente. Además, antes que ellos, RUNGE describió los “gráficos” hechos por muestras de sales y de tintas que fueron colocadas en el centro de un papel de filtro y después separadas por el paso de un solvente. Por otro lado SCHOENBEIN realizó experiencias similares con tiras de papel sumergidas en solventes. BEYERINK, en 1889, usó sólidos distribuidos en capas delgadas sobre vidrio, en lugar del papel, para el desarrollo circular de muestras de sales inorgánicas. A pesar de estas experiencias, se considera que la moderna cromatografía comienza en la década del 30, cuando KUHN y LEDERER “redescubrieron” y perfeccionaron la cromatografía en columna, repitiendo las experiencias de TSWETT para separar las xantofilas de la yema del huevo, usando una columna rellena con carbonato de calcio pulverizado y éter de petróleo como fase móvil.

DEFINICIÓN Y PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO

La cromatografía es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia. Es un conjunto de técnicas basadas en el **principio de retención selectiva**, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Puede cumplir dos funciones básicas que no se excluyen mutuamente:

- Separar los componentes de la mezcla, para obtenerlos más puros y que puedan ser usados posteriormente (etapa final de muchas síntesis).
- Medir la proporción de los componentes de la mezcla (finalidad analítica).
En este caso, las cantidades de material empleadas son pequeñas.

La separación se debe a la influencia de dos efectos contrapuestos:

a) Retención: Efecto producido sobre los componentes de la mezcla por una **fase estacionaria**, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.

b) Desplazamiento: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una **fase móvil**, que puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico.

El fenómeno de migración de los componentes de una muestra impulsados por la fase móvil, a lo largo de la fase estacionaria, se denomina **elución**. La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria, mientras que la móvil atraviesa el sistema arrastrando los componentes de la misma, los cuales se desplazan a distintas velocidades dependiendo de la magnitud de las interacciones relativas de dichos componentes con ambas fases.

La fase móvil y la estacionaria se eligen de manera que los componentes de la muestra se distribuyan de manera diferente entre ambas. Aquellos componentes que son retenidos fuertemente por la fase estacionaria, se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez junto con la fase móvil. Como consecuencia de esta **movilidad diferente** los componentes se separan en bandas o manchas que pueden analizarse cualitativamente y/o cuantitativamente. Los fenómenos físicos que influyen directamente sobre las constantes de equilibrio de distribución de los compuestos entre fase estacionaria y fase móvil

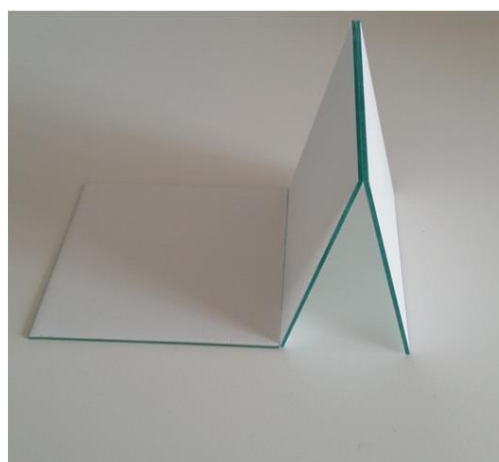
son, entre otros: absorción (o partición), adsorción, intercambio iónico, bioafinidad, y diferencias del tamaño molecular.

Por otro lado las distintas técnicas cromatograficas se pueden llevar a cabo en los siguientes tipos de SOPORTES FÍSICOS: en papel, sobre placas de vidrio recubiertas con un sólido finamente dividido (generalmente gel de sílice) o en columnas de vidrio o de acero inoxidable, como los mostrados en la Figura 2.

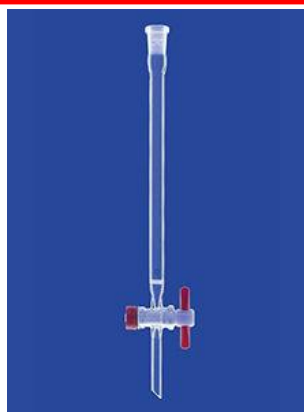


CROMATOGRAFÍA EN PAPEL

Separación, e identificación, de una mezcla de aminoácidos realizada por alumnos de la FCF - UNSE



Placas para cromatografía en capa delgada



Columnas de vidrio y de acero inoxidable, para cromatografía en columna

Figura 2: Soportes físicos usados en las distintas técnicas cromatograficas.

**TÉRMINOS COMUNMENTE
USADOS EN
CROMATOGRAFÍA**

♣ **SOPORTE:** papel u otro elemento físico sobre el cual queda retenida la fase estacionaria, con la cual debe ser totalmente inerte.

♣ **FASE ESTACIONARIA:** sustancia sólida, o líquida sostenida por un soporte inerte, con la cual interactúan de diversas maneras los componentes de la muestra a analizar.

♣ **FASE MÓVIL:** es un líquido (o mezcla de líquidos), un gas o un fluido supercrítico que fluyen a través del sistema cromatografico (papel, columna o placa) arrastrando los solutos.

♣ **SIEMBRA:** Procedimiento mediante el cual se deposita la muestra a analizar sobre una línea (línea de siembra), en el caso de la cromatografía que se desarrollará en papel o en capa fina. Para ello se utilizan micropipetas (pipetas Pasteur) de manera de asegurar que el volumen sembrado sea pequeño.

En los equipos automáticos más modernos la muestra se “inyecta” en el dispositivo destinado para recibirla mediante el uso de jeringas, provistas junto con el equipo para tal fin.

♣ **CORRIDA CROMATOGRÁFICA O DESARROLLO:** Término que se refiere a la acción por la cual los componentes de la muestra son arrastrados por la fase móvil.

♣ **TIEMPO DE CORRIDA:** Tiempo que dura una corrida. En la cromatografía planar, se da por concluida la corrida una vez que se observa que el “frente del solvente” ya no avanza más. En el caso de la cromatografía en columna, la cual procede con flujo continuo de fase móvil, normalmente consiste en el tiempo que toman todos los componentes de la muestra en salir de la columna, ser detectados por el detector y su presencia ser indicada gráficamente.

♣ **FRENTE DEL SOLVENTE:** Distancia máxima recorrida por la fase móvil.

♣ **REVELADO:** Si la técnica cromatográfica se realizó en papel o en capa fina, una vez concluida, interesa localizar la posición de las sustancias separadas. Si las sustancias no son coloreadas, como para poder localizarlas a simple vista, se recurre a diferentes métodos para poder hacerlo. Los métodos físicos como

fluorescencia y radiactividad, tienen aplicación muy limitada. Lo más frecuente es hacer reaccionar a las sustancias a revelar con algún reactivo químico con el cual forman un compuesto coloreado.

♣ **RESOLUCIÓN:** en una cromatografía en papel, es la distancia mínima a la que es posible distinguir individualmente las manchas producidas por los componentes de la muestra, luego de separados.

♣ **ELUCIÓN:** fenómeno de migración de los compuestos de una mezcla, a través de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil. También se denomina de esta manera a la acción por la cual se “recuperan” los compuestos retenidos por la fase estacionaria, ya sea en el papel, en la placa o en la columna, por medio del arrastre de los mismos con algún solvente adecuado para su posterior identificación y/o cuantificación.

♣ **TIEMPO DE RETENCIÓN (t_R):** en la cromatografía en columna se utiliza este parámetro en vez de la distancia recorrida, usada en la cromatografía planar. El tiempo de retención es el tiempo que demora cada componente de la muestra en abandonar el sistema cromatográfico, medido desde su inyección en el mismo hasta su salida y detección. Incluye todo el tiempo que el componente en cuestión *permanece* en el sistema cromatográfico.

♣ **CROMATOGRAMA:** Es un gráfico que muestra el resultado de la corrida cromatográfica. En el mismo se visualizan cada uno de los componentes de la muestra analizada en forma de manchas o picos, según sea el tipo de soporte en el cual se desarrolla la corrida (papel, placa o columna). Las manchas se observan en la cromatografía planar (papel o capa fina) y los picos en la cromatografía en columna. Los cromatogramas obtenidos por las técnicas cromatográficas en papel y en capa fina se presentarán en los capítulos correspondientes a las mismas.

En el caso de las técnicas que utilizan columnas para realizar la separación, los componentes eluidos (que salen de la columna) son transportados por la fase móvil a un detector, que mide una propiedad física o química de los mismos, y los registra en forma de curvas gaussianas (forma de campana). Tales señales se denominan *picos*. Cada componente de la mezcla presenta un pico, en el tiempo correspondiente a su t_R . Un *cromatograma* es el resultado de graficar en el eje X el tiempo de retención, y en el eje Y una señal correspondiente a la respuesta creada por los diferentes compuestos existentes en la muestra, luego de

atravesar el detector. Hasta aquí la cromatografía ha cumplido su primer cometido, la separación de los compuestos de la mezcla. Además los picos dan información cualitativa y cuantitativa de la mezcla en cuestión:

► Cualitativa: el *tiempo de retención* t_R , representado por un pico en el cromatograma, es siempre constante para determinado compuesto, bajo condiciones cromatograficas idénticas. Por lo tanto un compuesto puede ser identificado por comparación de su tiempo de retención con el de un patrón de identidad conocida (ubicación de su pico en el cromatograma).

La forma de proceder para efectuar el análisis cualitativo, en el caso de las técnicas que se desarrollan en papel o en capa fina, se explican en los capítulos correspondientes a las mismas.

► Cuantitativa: los métodos para obtener información cuantitativa, son específicos para cada tipo de cromatografía. Los correspondientes a las técnicas en papel o en capa fina, se explican en los capítulos siguientes.

En la cromatografía desarrollada en columna, el área debajo de un pico presentado por un componente particular de la muestra analizada, es proporcional a la concentración de dicho componente. Se debe elaborar una *curva de calibrado* a partir de varias disoluciones de patrones de identidad y concentración exactamente conocidas. Posteriormente, por comparación del área del pico presentado por el *compuesto desconocido* con el área del pico del patrón de *identidad y concentración conocidas*, podemos determinar la identidad y concentración del compuesto en cuestión. El siguiente gráfico (Figura 3) muestra un ejemplo general de un cromatograma obtenido por cromatografía en columna. En el mismo se pueden visualizar los análisis cualitativo y cuantitativo mencionados.

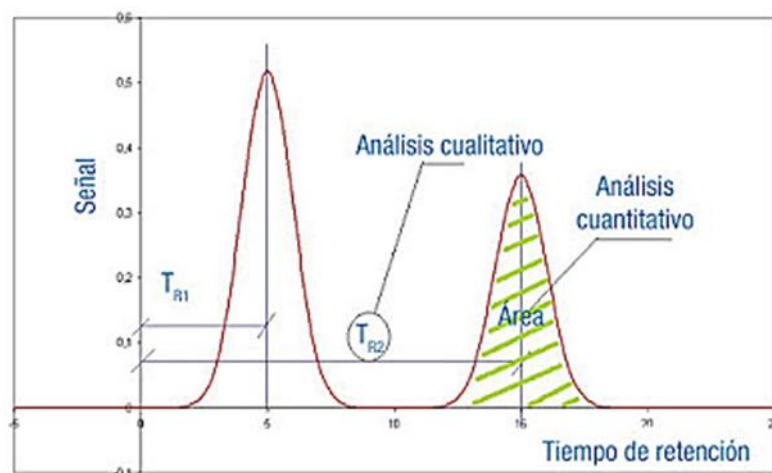


Figura 3: Cromatograma

En la Figura 4 se muestra un ejemplo práctico de todo lo expresado anteriormente. En la misma se presenta un cromatograma, resultado de una cromatografía en columna, en el cual se puede visualizar la presencia de cafeína en diversos productos (análisis cualitativo), y su concentración en los mismos (análisis cuantitativo). La cafeína es el compuesto que sale de la columna aproximadamente a los 4 minutos (t_R). Los valores de mg ml^{-1} corresponden a las concentraciones encontradas de cafeína, en los productos indicados debajo de cada cromatograma.

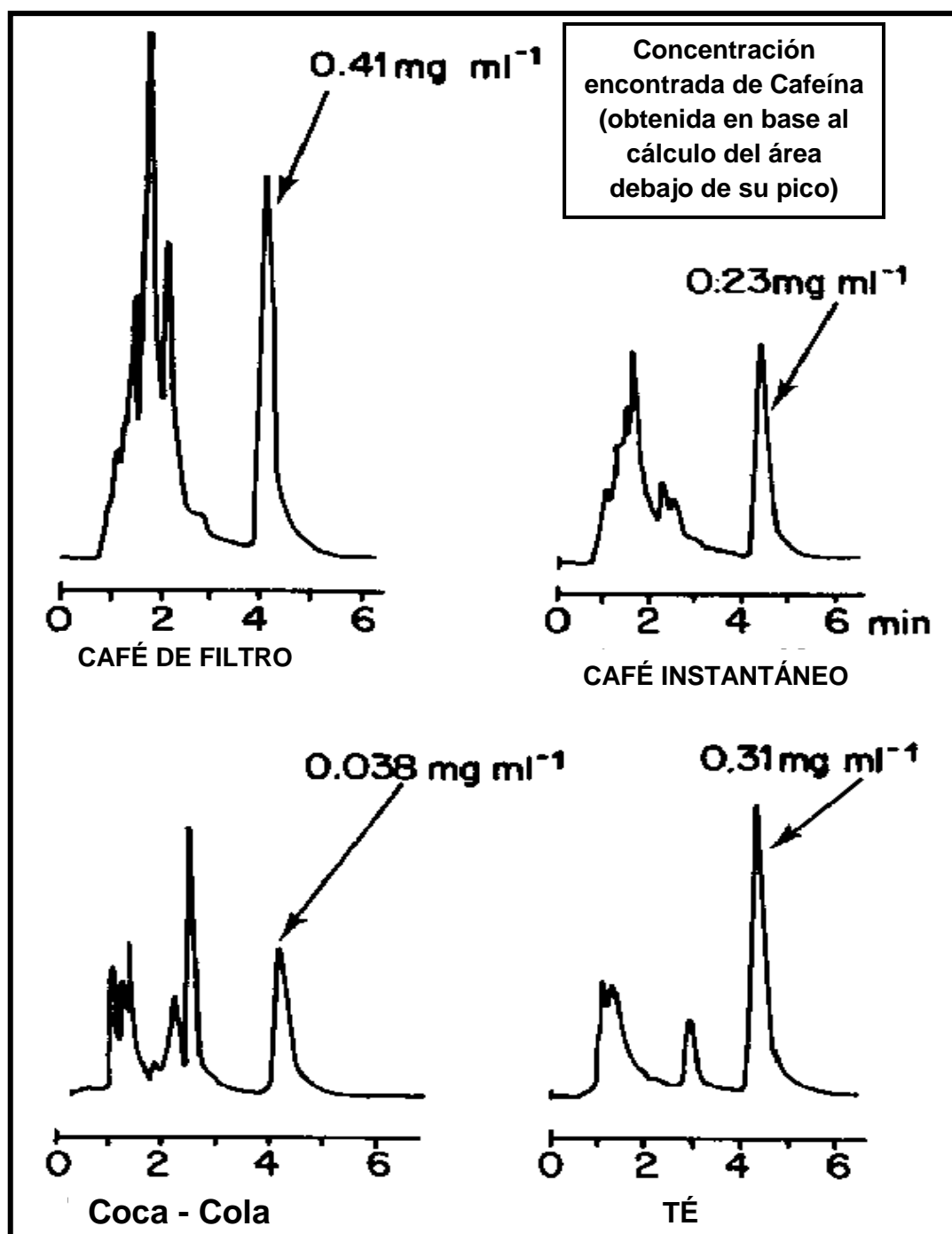


Figura 4: Análisis Cualitativo y Cuantitativo del contenido en cafeína presente en diversos productos.

CLASIFICACIÓN

Son diversos los criterios usados para la clasificación, siendo los más comunes los relacionados con:

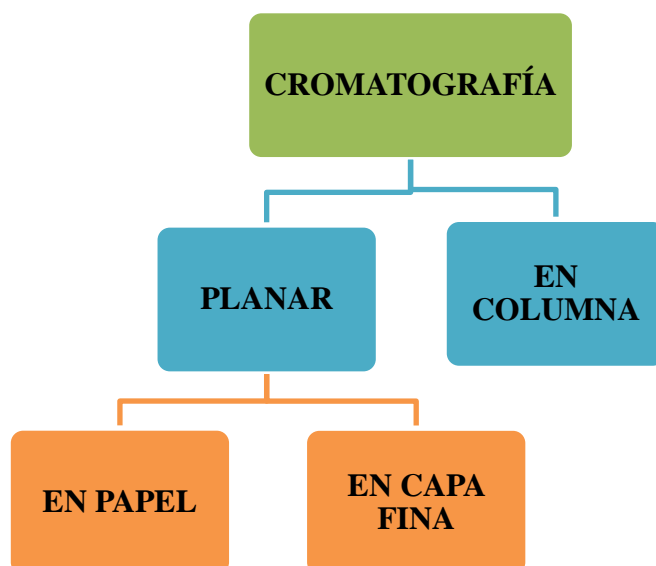
- **A)** El tipo de técnica empleada (o soporte físico sobre el cual se lleva a cabo).
- **B)** El tipo de fase móvil utilizada.
- **C)** Según el estado físico de ambas fases.
- **D)** El mecanismo que rige la separación.

A) SEGÚN EL TIPO DE SOPORTE FÍSICO SOBRE EL CUAL SE DESARROLLA

El tipo de soporte físico sobre el cual se desarrolla el análisis cromatográfico define a la técnica en general.

La fase estacionaria puede estar dispuesta sobre una superficie plana, o ser colocada en el interior de un tubo cilíndrico de vidrio o de acero inoxidable.

Basándose en esto la cromatografía se puede clasificar de la siguiente manera:



B) SEGÚN EL ESTADO FÍSICO DE LA FASE MÓVIL

La fase móvil puede ser un gas, un líquido o un fluido “supercrítico”. Un fluido supercrítico es una sustancia sometida a presión, y calentada a una temperatura superior a su temperatura crítica. Posee algunas características propias de un gas y algunas correspondientes a un líquido. Por otro lado, presenta las ventajas de

tener una viscosidad menor a la de un líquido, manteniendo sus propiedades de interacción con los solutos, y ser amigable con el ambiente.

En base a este criterio se clasifica a las distintas técnicas cromatograficas en:

- CROMATOGRAFÍA DE GASES
- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA
- CROMATOGRAFÍA SUPERCRÍTICA.

C - D) SEGÚN EL ESTADO FÍSICO DE ÁMBAS FASES Y EL MECANISMO QUE RIGE LA SEPARACIÓN.

Se presenta el ítem D asociado con el ítem C, puesto que el mecanismo que rige la separación de los solutos depende del estado físico de ambas fases.

Como se dijo anteriormente la fase móvil, aparte de un fluido supercrítico, puede ser líquida o gaseosa y la fase estacionaria puede ser líquida o sólida. En base a esto las técnicas cromatograficas se pueden clasificar de la siguiente manera teniendo en cuenta, en primer lugar, el estado físico de la fase móvil:

c-1) Cromatografía Líquido-Sólido (LSC de Liquid - Solid Chromatography).

c-2) Cromatografía Líquido- Líquido (LLC de Liquid - Liquid Chromatography).

c-3) Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC de High Performance Liquid Chromatography)

c-4) Cromatografía de gases. Se subdivide en: cromatografía gas – líquido (GLC: Gas Liquid Chromatography) y cromatografía gas – sólido (GSC: Gas - Solid Chromatography)

Sin embargo, se considera que la clasificación más importante se basa en los mecanismos que rigen la separación de los solutos.

Las sustancias a separar pueden interactuar con las fases móvil y estacionaria según mecanismos de naturaleza física, química o mecánica, los cuales posibilitan tal separación. Dichos mecanismos pueden involucrar fenómenos de *intercambio iónico, reparto, adsorción, exclusión y afinidad*, cada uno de los cuales regirá la separación dando lugar a las siguientes “sub-clases” de técnicas cromatograficas (incluidas en las mencionadas con anterioridad):

c-1) Cromatografía Líquido - Sólido: (LSC de Liquid - Solid Chromatography);

en este tipo de técnica la fase móvil es líquida y la estacionaria consiste en sólidos finamente divididos (con gran superficie específica). Los mecanismos que pueden actuar en la separación, en este tipo de técnica cromatográfica, son los siguientes:

- **c-1-1. CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN:** la fase estacionaria sólida retiene a los solutos, principalmente por efecto de fuerzas físicas de superficie del tipo de fuerzas de Van der Waals. Se emplea en la separación de compuestos orgánicos diversos, tanto líquidos como sólidos. Recordemos, en primera instancia, la diferencia entre ADSORCIÓN y ABSORCIÓN, la cual se esquematiza en la Figura 5:

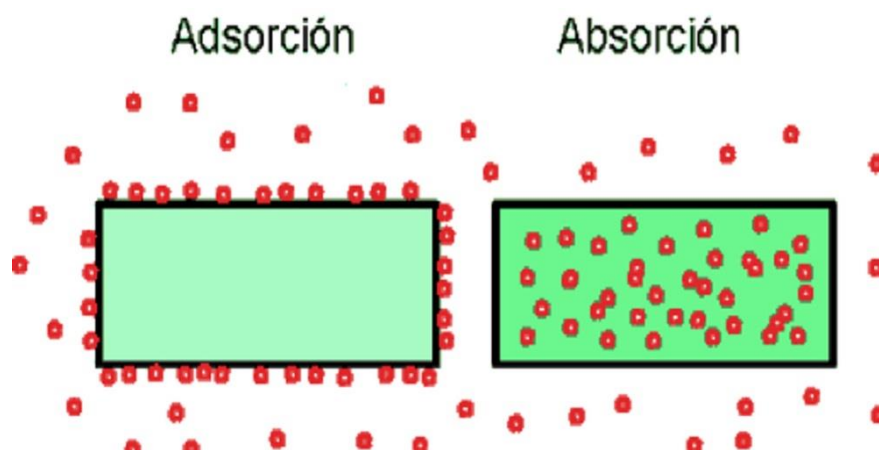


Figura 5: Diferencia entre adsorción y absorción

La Figura 6 esquematiza el principio que rige la cromatografía de adsorción, aplicada a la separación de una mezcla constituida por dos sustancias.

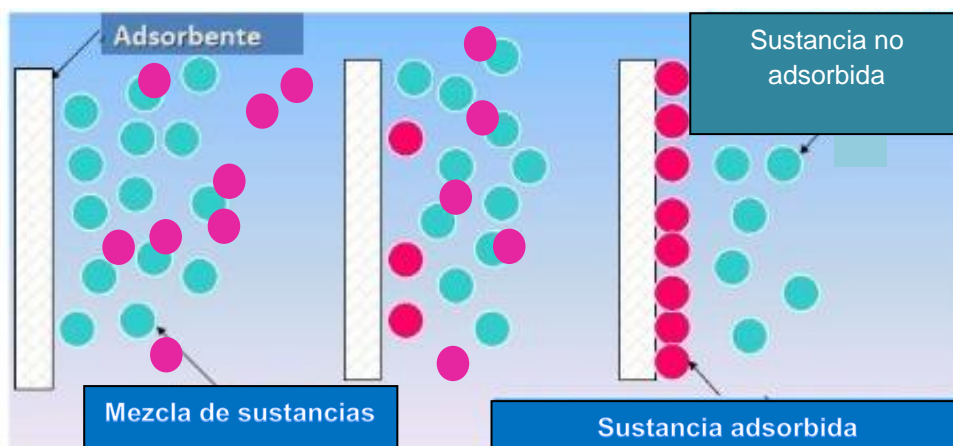


Figura 6: Principio de la Cromatografía de Adsorción

- **c-1-2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO** (IEC, de Ionic-Exchange Chromatography): el sólido retiene a los solutos gracias a atracciones electrostáticas. Por lo tanto, se usa con sustancias que se ionicen. La fase estacionaria sólida lleva en su superficie cargas electrostáticas fijas, que retienen contraiones móviles que pueden intercambiarse por iones de la fase móvil. La Figura 7 ilustra este principio de separación.

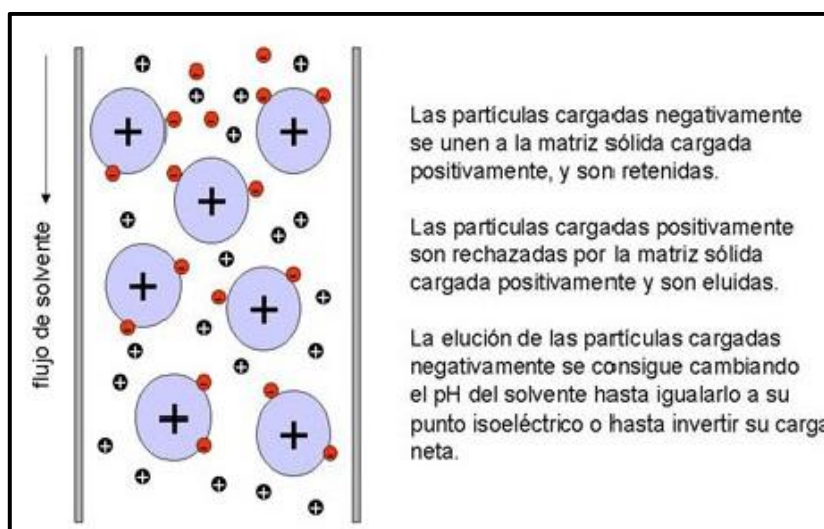


Figura 7: Principio que rige la separación en la Cromatografía de Intercambio Iónico

- **c-1-3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN** (EC, de Exclusión Chromatography): la fase estacionaria es un material poroso que retiene a los solutos selectivamente en función de la geometría y tamaño molecular. Este método también se llama cromatografía de permeación en gel, en la química de los polímeros, y de filtración en gel, en la bioquímica. Es muy útil en la separación de proteínas. La Figura 8 esquematiza este principio de separación.

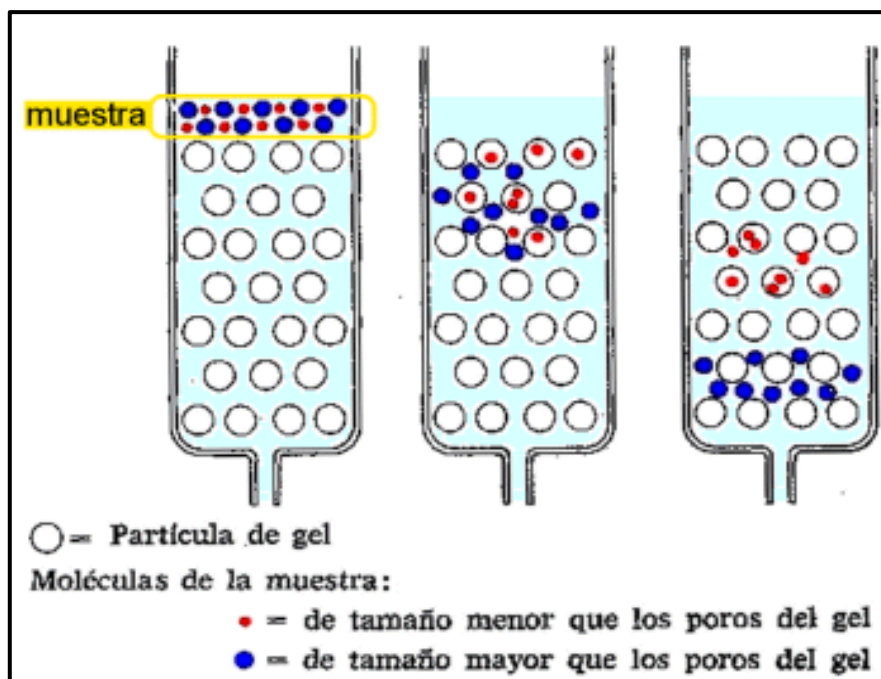


Figura 8: Mecanismo que rige la separación en la Cromatografía de Filtración en Gel

c-2) Cromatografía Líquido - Líquido (LLC de Liquid - Liquid Chromatography): en este caso la fase estacionaria es también un líquido, inmovilizado sobre un material sólido inerte que actúa solo de soporte. Los mecanismos que rigen la separación en este caso se deben a equilibrios de distribución de los solutos, controlados por la diferente solubilidad de los mismos entre fase móvil y estacionaria. Dichos mecanismos son los siguientes:

- **c-2-1. CROMATOGRAFÍA DE REPARTO:** los solutos se separan en base a las diferencias de las solubilidades de los mismos, entre la fase móvil y la fase estacionaria. Es la técnica más usada y, generalmente, se efectúa sobre tiras de papel de filtro, o en placas inertes recubiertas con un material adsorbente. En los capítulos siguientes se darán mayores detalles sobre estas técnicas. Es una cromatografía líquido-líquido porque la fase estacionaria es el agua contenida en la celulosa del papel. Cuando la fase móvil (solvente orgánico) pasa sobre la fase estacionaria, las sustancias se separan “repartiéndose” entre ambas. Este mecanismo de separación se ilustra en la Figura 9.

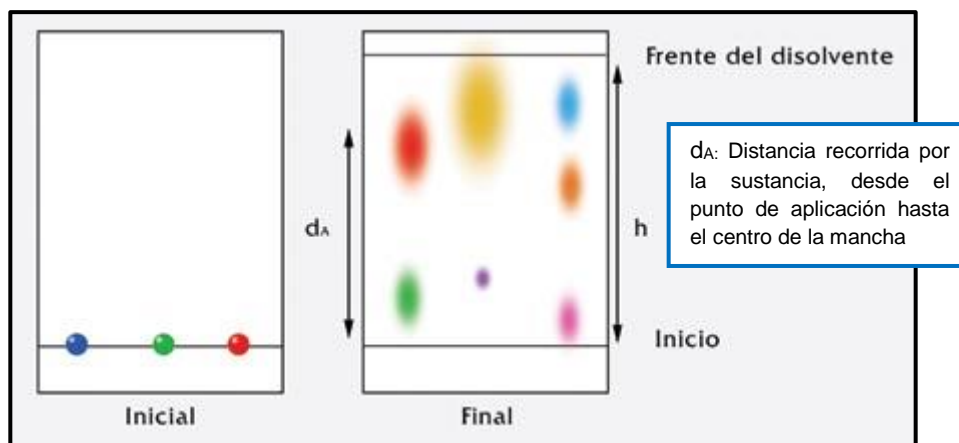


Figura 9: Cromatografía de Reparto sobre Papel

- **c-2-2. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD** la fase estacionaria es generalmente un polímero líquido inmovilizado sobre un sólido inerte, unido por enlaces covalentes. Se aplica mucho en la separación de sustancias con importante actividad bioquímica: anticuerpos, cofactores, inhibidores enzimáticos y proteínas. La Figura 10 ejemplifica este mecanismo de separación de los solutos.

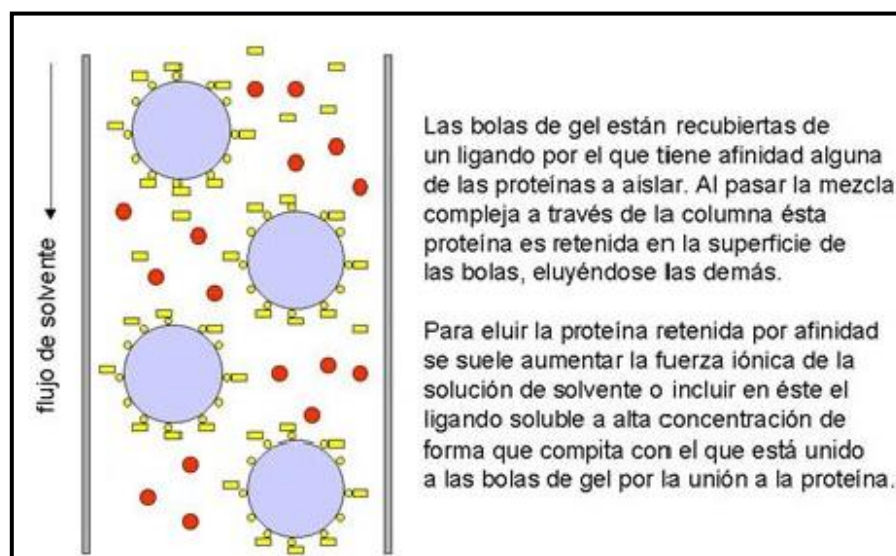


Figura 10: Principio de separación en la Cromatografía de Afinidad

c-3) Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC de High Performance Liquid Chromatography): Es un importante miembro dentro de las más modernas técnicas de separación. Su empleo, y el conocimiento de sus condiciones de

funcionamiento y operación son considerados actualmente indispensables para los profesionales de los laboratorios químicos, farmacéuticos y bioquímicos, entre otros. Este tipo de técnica utiliza instrumentos muy sofisticados y totalmente automatizados.

Es un tipo de cromatografía líquida que utiliza una pequeña cantidad de muestra (del orden de los μl), la cual es eluida por la fase móvil a través de pequeñas columnas, rellenas con materiales especialmente preparados, por el efecto de altas presiones.

Si bien tiene algunas limitaciones, como ser el alto costo del equipamiento utilizado, alto costo de operación, necesidad de personal capacitado especialmente en su manejo, difícil análisis cualitativo y falta de un detector universal sensible, las mismas no impiden el aprovechamiento adecuado de sus ventajas, a saber: necesita cantidades de muestra muy pequeñas, alta resolución, resultados cuantitativos, buena sensibilidad, menor tiempo de análisis, versatilidad y automatización (existen en el mercado equipos que realizan el análisis de manera totalmente automática, desde la inyección de la muestra hasta la impresión de los resultados).

Los mecanismos involucrados en la separación de los solutos en la HPLC son los mismos que los presentados hasta el momento: adsorción, partición, exclusión e intercambio iónico. En el mercado existen columnas con rellenos (fase estacionaria) diversos, de acuerdo al tipo de mecanismo de separación que sea necesario aplicar para lograr la separación deseada el cual, a su vez, queda determinado por el tipo de compuestos a separar. En la Figura 11 se muestra un esquema general del funcionamiento de un HPLC, las columnas empleadas en la misma y uno de los modelos existentes en el mercado para llevarla a cabo.

El desarrollo con más detalle de esta tipo de técnica cromatográfica escapa al alcance de la presente Serie Didáctica. En caso de desear o necesitar profundizar en la misma, se remite al alumno a la bibliografía especializada en el tema.

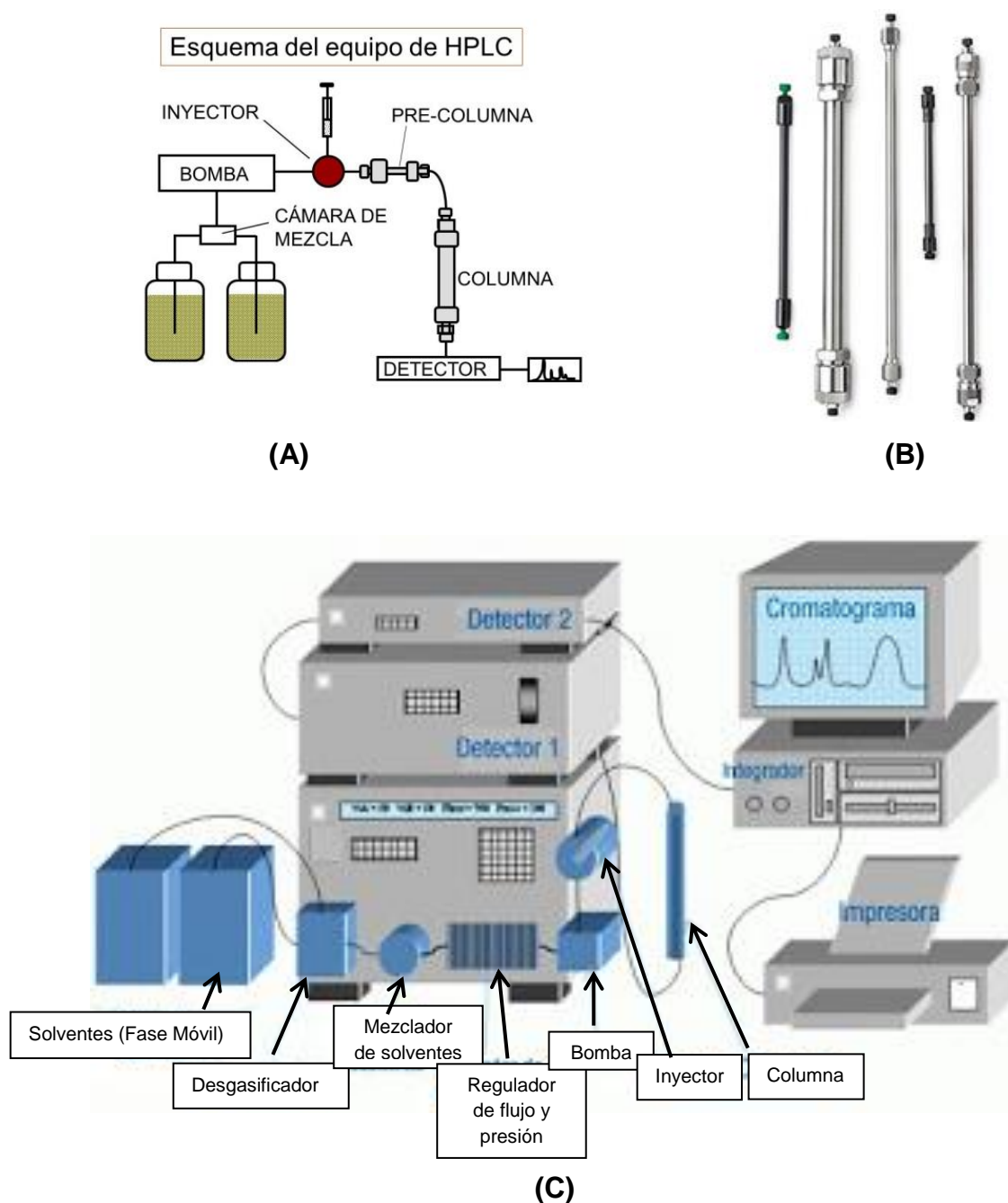


Figura 11: (A): Esquema general básico de un equipo para HPLC; (B): Columnas para HPLC; (C): Modelo de equipo para HPLC.

Las siguientes figuras muestran cromatogramas obtenidos por HPLC. En la Figura 12 se puede observar la separación de algunos de los componentes de un perfume de marca conocida. La Figura 13 evidencia la presencia de cafeína en el café.

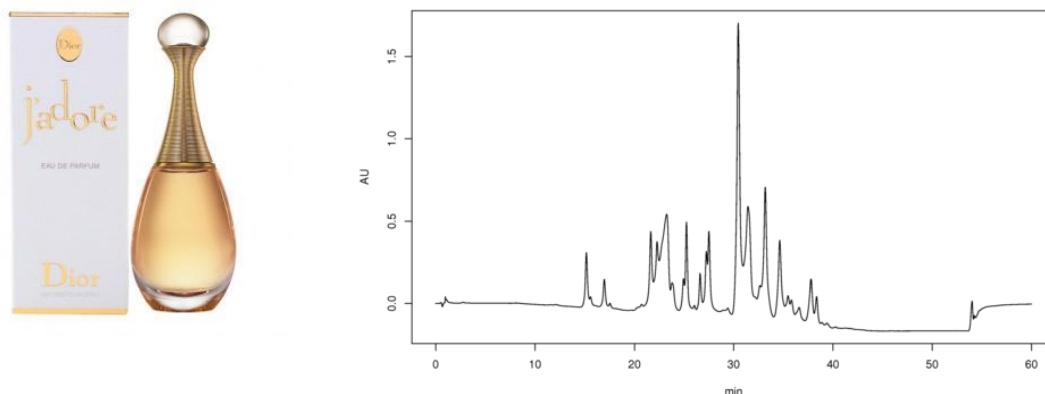


Figura 12: Cromatograma obtenido por HPLC del agua de perfume J' Adore, como ejemplo de análisis de una muestra **compleja**

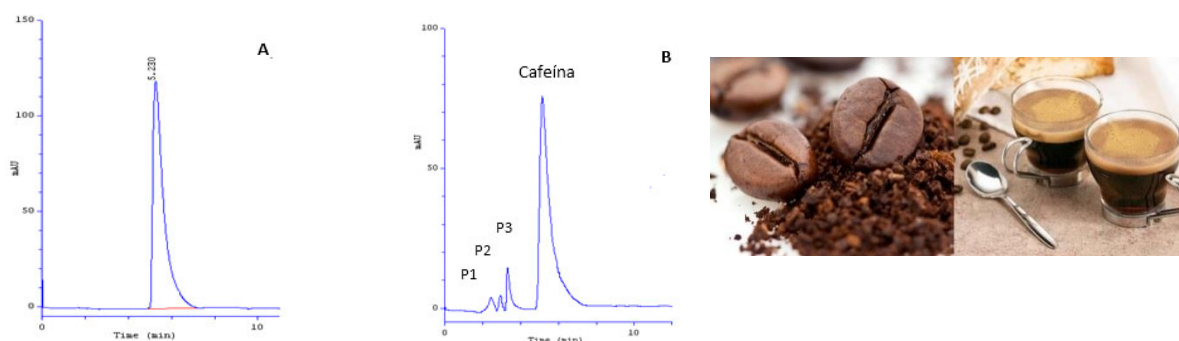


Figura 13: Cromatograma HPLC de café. (A) Cafeína; (B) cafeína y sus productos después de 4 minutos de ozonización a pH 7

c-4) Cromatografía de gases: Los gases, o mezclas de sustancias volátiles, pueden ser separados por esta técnica en la cual la fase móvil es un gas. De acuerdo al estado físico de la fase estacionaria encontraremos: cromatografía gas-líquido (GLC: Gas Liquid Chromatography), y cromatografía gas-sólido (GSC: Gas - Solid Chromatography). La separación se basa, como siempre, en la diferente interacción de los componentes de la muestra con las fases móvil y estacionaria, debido a alguno de los siguientes fenómenos físicos:

- **Adsorción (en la Cromatografía Gas – Sólido):** la fase estacionaria es un sólido finamente dividido que retiene a los solutos por adsorción sobre su superficie.
- **Partición (en la Cromatografía Gas – Líquido):** la fase estacionaria es un líquido, retenido por impregnación o por enlaces covalentes sobre un sólido inerte. La separación queda determinada por los

diferentes comportamientos de solubilidad de los solutos con la fase estacionaria líquida.

La muestra es introducida, a través de un sistema de inyección, en la columna que contiene la fase estacionaria. El uso de temperaturas convenientes en la válvula de inyección y en las columnas posibilita la evaporación de los componentes de la muestra, los cuales son eluidos (transportados) a través de la columna por la fase móvil gaseosa. Dichos componentes serán retenidos durante tiempos diferentes en el interior de la columna, de la cual saldrán en tiempos, también diferentes, de acuerdo a sus distintos grados de interacción con la fase estacionaria. El uso de un detector adecuado, a la salida de la columna, hace posible la identificación y cuantificación de las sustancias separadas.

Las columnas que se emplean en cromatografía de gases contienen la fase estacionaria y pueden ser de cobre, acero inoxidable, aluminio, vidrio, sílica fundida, teflón, etc. Idealmente, el material con el cual está confeccionada la columna no debe interactuar con el relleno ni con las sustancias presentes en la muestra analizada. Pueden ser de son de dos tipos: columnas capilares (o tubulares abiertas) y columnas empacadas como las mostradas en la Figura 14 la cual presenta, además, un esquema de un cromatografo de gases.



Figura 14: (a) Columnas para cromatografía de gases. (b) Esquema de Funcionamiento de un cromatografo de gases.

La Figura 15 muestra un modelo de los equipos usados para llevar a cabo una cromatografía de gases.



Figura 15: Modelo de Equipo para Cromatografía de Gases

Esta técnica puede aplicarse al análisis de sustancias volátiles y térmicamente estables. En caso contrario es necesario formar un derivado con estas características, lo cual no siempre es posible.

La cromatografía gaseosa permite la separación de las sustancias presentes en una muestra, pudiendo ser usada también para su identificación. La identificación se puede efectuar comparando el tiempo de retención (como en las demás técnicas cromatograficas que se desarrollan en columna) o el volumen de retención de los componentes de la muestra con los de patrones convenientes.

Una vez obtenido el cromatograma se puede efectuar la cuantificación de los compuestos separados, a través del cálculo de la altura o del área del pico presentado por cada uno de ellos.

El análisis ambiental se puede citar como un ejemplo del uso de la cromatografía gaseosa, en el control de la polución del aire, agua, suelos, etc. Controlar la contaminación atmosférica ya sea en grandes ciudades, centros industriales o el mismo ambiente de trabajo, merece atención especial debido al incremento de dolencias crónicas como cáncer de pulmón, bronquitis, asma y alergias observados actualmente. La cromatografía gaseosa puede usarse para determinar la presencia de diversos contaminantes en el aire tales como hidrocarburos, aldehídos, cetonas, compuestos policíclicos aromáticos, etc. Un

análisis de esta naturaleza se muestra en la Figura 16, la cual presenta un cromatograma obtenido luego de una separación cromatográfica, en fase gaseosa, de trazas de solventes en el aire.

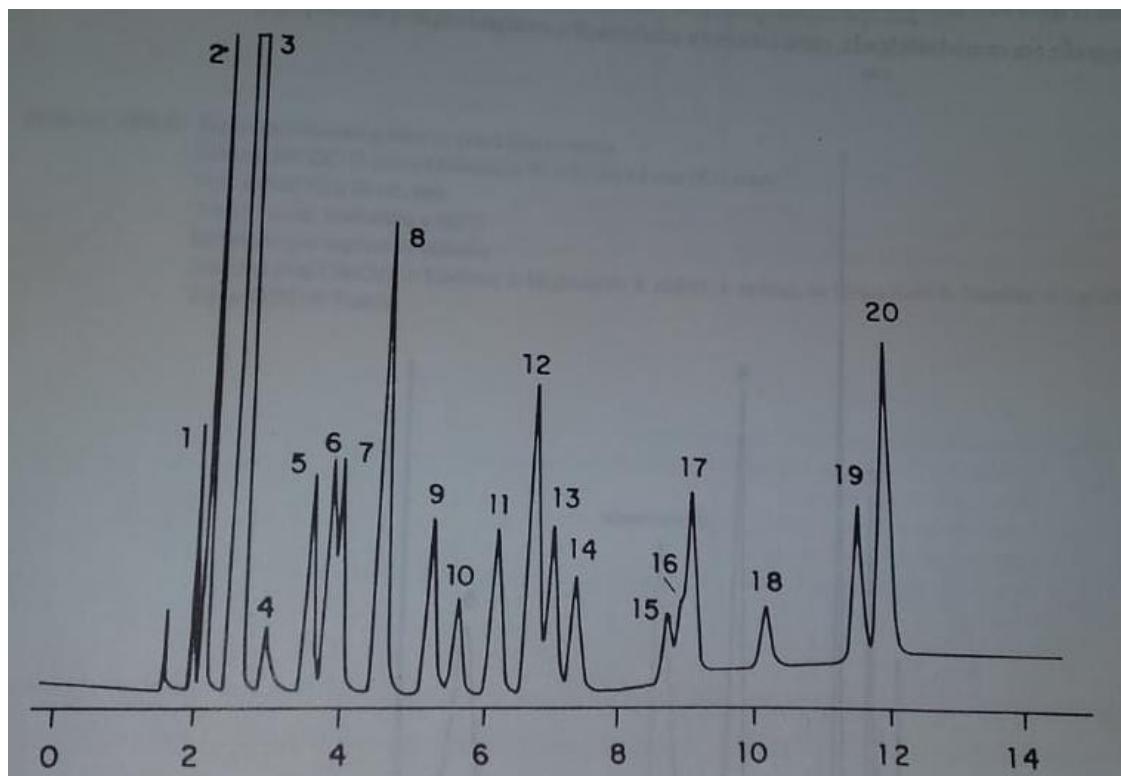


Figura 16: Separación cromatográfica de trazas de solventes en el aire. Columna:10%SP-1000 sobre Supelcoport 80-100 mallas, 6m x3mm (o.d.), acero inoxidable. Fase Móvil: N₂ a 30 mL/min. Temperatura: isotérmica a 100°C por 6 min, después programada a 20°C/ min hasta llegar a 140°C. Detector: por ionización de llama.

Muestra (en CS₂): (1) éter etílico; (2) isooctano; (3) disulfuro de carbono; (4) acetona; (5) tetraclorometano y 1,1,1-tricloroetano; (6) butan-2-ona; (7) diclorometano; (8) benceno; (9) tricloroetileno; (10) cloroformo; (11) tetracloroetileno; (12) tolueno; (13) 1,2-dicloroetano; (14) dioxano; (15) etilbenceno; (16) *p*-xileno; (17) *m*-xileno; (18) *o*-xileno; (19) 1,1,2-tricloroetano; (20) estireno.

La industria alimenticia también usa la cromatografía gaseosa para el análisis de algunos constituyentes de alimentos tales como lípidos y carbohidratos. En algunos casos, como el mostrado en la Figura 17, con técnicas adecuadas de concentración de la muestra se pueden detectar componentes alimenticios que se encuentran a nivel de trazas, como esteroides y vitaminas.

Además, la cromatografía gaseosa es usada frecuentemente, en conjunto con la cromatografía en capa delgada, para estudiar adulteración, contaminación y descomposición de alimentos.

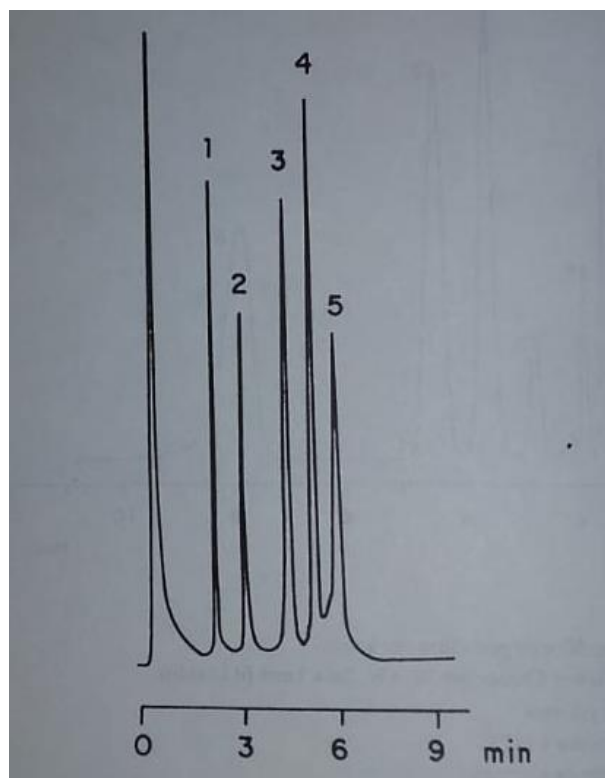


Figura 17: Separación cromatográfica de algunos esteroides. Columna: 3% OV-17 sobre Chromsorb W-HP, 100-120 mallas, 2m x4mm, de vidrio. Fase Móvil: N₂ a 34 mL/min. Temperatura: isotérmica a 280°C. Detección: por ionización de llama.

Muestra: (1) androsterona; (2) estradiol; (3) progesterona; (4) colesterol; (5) hidrocortisona.

Esta técnica cromatográfica, en sí misma, es rápida. Su desarrollo puede efectuarse en minutos. Sin embargo, la mayoría de las veces necesita de etapas previas de preparación de las muestras para que no haya interferencias durante el análisis ni contaminación de la columna cromatográfica, etapas que generalmente son largas y complejas, incrementando considerablemente el tiempo y costo del análisis. Por otro lado, la cromatografía gaseosa no es una técnica cualitativa eficiente y, muchas veces, necesita de técnicas auxiliares para la identificación segura de las sustancias presentes en la muestra.



CAPÍTULO II

CROMATOGRAFÍA PLANAR EN PAPEL

INTRODUCCIÓN

La cromatografía en papel es una técnica simple que tiene buena capacidad de resolución y se aplica en la separación e identificación de compuestos muy polares o polifuncionales como ácidos orgánicos, antibióticos hidrosolubles, hidratos de carbono, aminoácidos y pigmentos vegetales, entre otros. Según BROWNING *et al.* se clasifica como cromatografía líquido-líquido por partición y, en la clasificación presentada por COLLINS *et al.*, como cromatografía planar líquido-líquido.

La separación de los componentes de una muestra, en la cromatografía líquido-líquido en papel, se relaciona con las diferentes solubilidades relativas de estos (partición), entre las fases móvil y estacionaria. Los componentes menos solubles en la fase estacionaria tienen una migración más rápida a lo largo del papel, mientras que los más solubles en la fase estacionaria serán selectivamente retenidos, teniendo una migración más lenta.

Este mecanismo de separación puede ser explicado de la siguiente manera: la celulosa está formada por más de 2000 unidades de glucosa anhidra ligadas por átomos de oxígeno. Un líquido polar como el agua tiene gran afinidad por los hidroxilos de cada glucosa, con los cuales forma puentes de hidrógeno y queda retenida por los mismos, actuando como fase estacionaria líquida; los líquidos menos polares, como los solventes orgánicos, son repelidos por esta estructura y funcionan como fase móvil.

Si la muestra problema está formada por más de un soluto, éstos se separan e identifican en función de sus diferentes coeficientes de partición.

COEFICIENTE R_f (Relación de Frentes)

Este coeficiente, también conocido como “Relación de Frentes”, es una constante para cada sustancia siempre que la determinación se realice en las mismas condiciones operativas en cuanto a tipo de papel, temperatura, tiempo de corrida, solventes usados, volumen y concentración de las sustancias aplicadas. Este coeficiente se define por la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la sustancia}}{\text{distancia recorrida por el frente del solvente}}$$

La Figura 18 muestra un ejemplo del cálculo de R_f :

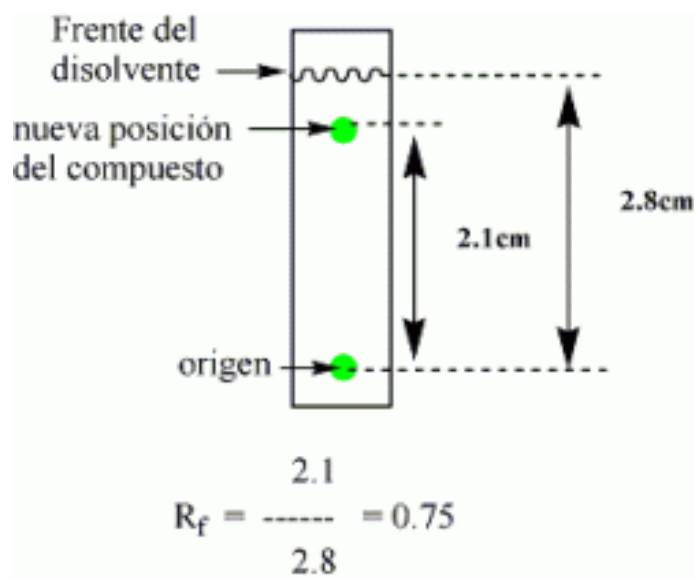


Figura 18: Cálculo del R_f

En la práctica la distancia recorrida por una sustancia, en un tiempo determinado, se mide desde el punto de aplicación de la misma hasta el centro de la mancha producida por ella, luego de su revelado; la distancia recorrida por el frente del solvente se mide desde la línea de siembra (línea de partida), hasta la mayor distancia hasta la cual se observe húmedo el papel.

Los R_f de las diversas sustancias toman valores entre 0 y 1; se encuentran tabulados en la bibliografía específica y pueden ser usados, como se mencionó anteriormente, para la identificación de los componentes de una muestra, en tanto se trate de sistemas cromatográficos idénticos.



ETAPAS DE LA TÉCNICA

SIEMBRA

Recordemos que, por “siembra”, se entiende el procedimiento mediante el cual se deposita la muestra a analizar sobre una línea (línea de siembra), en el caso de la cromatografía que se desarrollará en papel.

Para ello se utilizan micropipetas Pasteur (o, en su defecto, pequeños tubos capilares) de manera de asegurar que el volumen sembrado sea pequeño. Una buena resolución en la separación de los componentes de la muestra depende de la concentración y del diámetro de la mancha aplicada.

La muestra a analizarse aplica en el papel a no menos de 1,5 cm del borde inferior de una tira rectangular de papel, y a no menos de 1,5 cm de los bordes laterales. Se toca el papel con la punta de la pipeta cargada con muestra, evaporando el solvente entre cada toque, a fin de concentrar el punto de siembra y tratando de que la mancha producida no supere un diámetro de 3 mm. La siembra es puntual para fines analíticos, y en banda para fines preparativos. La Figura 19 muestra lo expuesto.

Cuando el objetivo de la cromatografía en papel, además de separar los componentes de la muestra en estudio, es IDENTIFICARLOS se requiere de patrones puros de identidad conocida los cuales se siembran junto con la muestra manteniendo, entre cada punto de siembra, una distancia no menor de 1 cm. Al finalizar la corrida cromatográfica, la identidad de los componentes de la muestra problema se determina por comparación de la distancia recorrida por cada uno de ellos con la distancia recorrida por cada uno de los patrones.

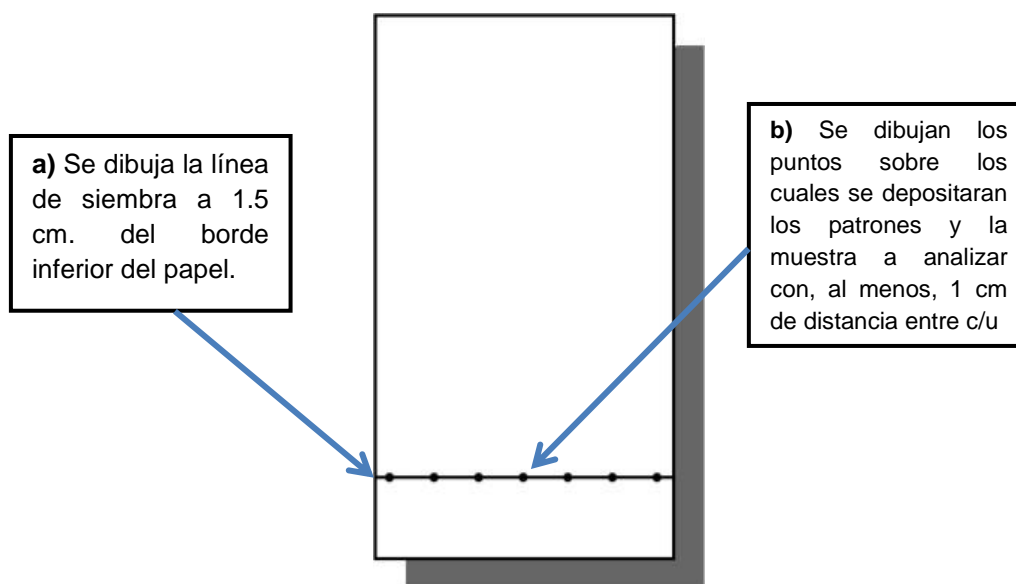


Figura 19: Siembra en la cromatografía en papel

La muestra, debe estar disuelta de preferencia en un solvente volátil, siendo recomendados el éter etílico, cloroformo, acetato de etilo acetona, etanol, etc.

El soporte es una tira rectangular o una hoja circular de papel que funciona como una capa fina de celulosa. El papel cromatografico es una variable muy importante en los resultados obtenidos y, por lo general, se usan papeles de las marcas Watman, S&S y Macherey – Nagel. La elección de uno u otro dependerá de la muestra a ser analizada. En algunos casos especiales es necesario utilizar papeles modificados, a saber: papel acetilado; papel impregnado con silicona, parafina dimetilformamida o aminas de alto peso molecular; papel de fibra de vidrio, etc.

DESARROLLO O CORRIDA

Es el movimiento diferencial de los componentes de una muestra, al ser arrastrados por la fase móvil. El desarrollo de esta técnica se lleva a cabo en *cubas* o cámaras cromatográficas, como las mostradas en la Figura 20. Las mismas consisten en recipientes rectangulares de vidrio con tapa hermética, con lo cual se evita el escape de la fase móvil.

Antes de colocar el papel sembrado con la muestra y los patrones se debe *saturar* la cuba con el objeto de asegurar una distribución uniforme de la fase vapor de la fase móvil en el interior de la misma, hasta alcanzar un equilibrio. Para ello se

colocan papeles de filtro embebidos en la fase móvil, adheridos a las paredes laterales internas de la cuba.

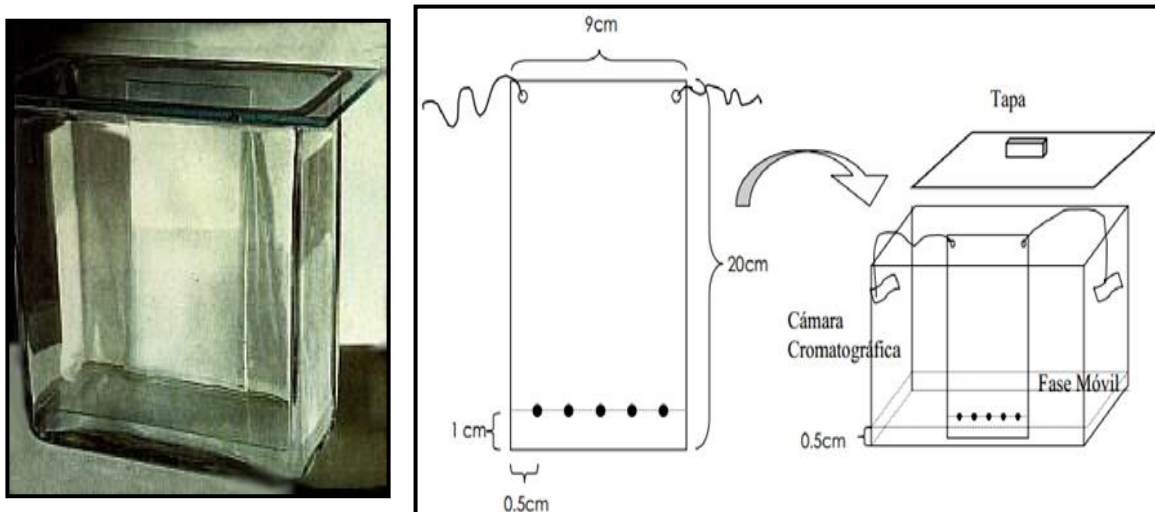


Figura 20: Cuba o cámara cromatográfica

El desarrollo, o corrida, puede realizarse en varias direcciones dependiendo del sentido en que se haga fluir la fase móvil. Según esto se presentan los siguientes tipos:

- **Ascendente** (de abajo hacia arriba): El solvente se coloca en el fondo de la cuba. El papel se suspende por su parte superior dentro de la misma de tal manera que su borde inferior toque el solvente, pero cuidando que la línea de siembra no quede sumergida en el mismo. El solvente subirá por capilaridad a lo largo del papel y avanzará hasta que este efecto sea contrarrestado por la fuerza de la gravedad. Es la técnica usada con más frecuencia.

En la práctica las cubas pueden ser reemplazadas por algún otro recipiente de vidrio con cierre hermético, en caso de que no se disponga de las mismas. La Figura 21 muestra esta técnica.

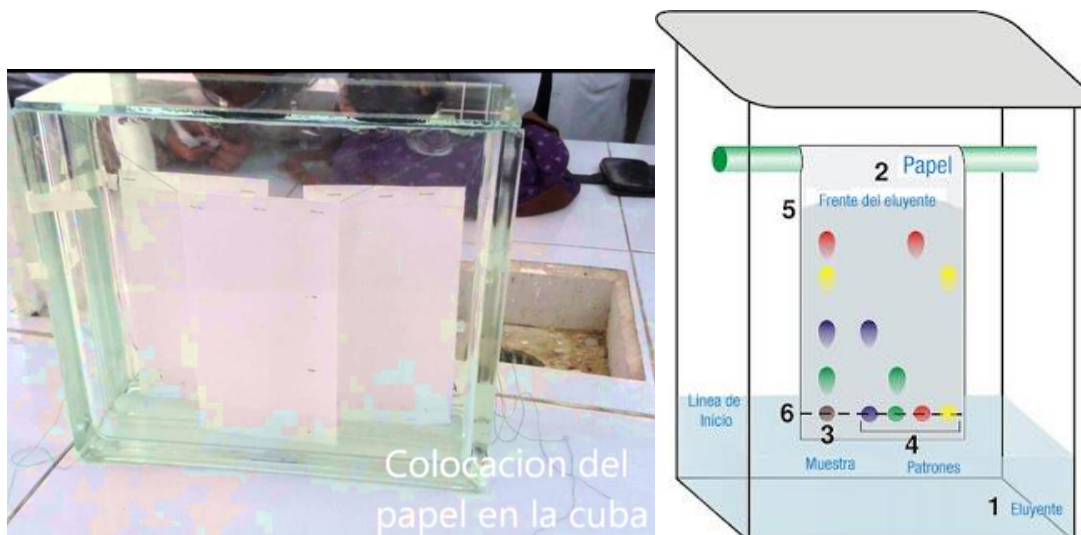


Figura 21: Cromatografía en papel ascendente

- **Descendente** (de arriba hacia abajo): el solvente se coloca en un depósito inerte, ubicado en la parte superior de la cuba cromatográfica, y fluye hacia abajo por una combinación de capilaridad y gravedad, llevando consigo los componentes de la muestra sembrada.

En el fondo de la cuba se coloca también un poco de solvente para asegurar la saturación con el vapor. La parte superior del papel se sumerge en el disolvente y se tapa herméticamente la cuba (al igual que en la técnica ascendente). La siembra quedará en la parte superior del papel. La Figura 22 ilustra esta forma de desarrollar la cromatografía en papel.

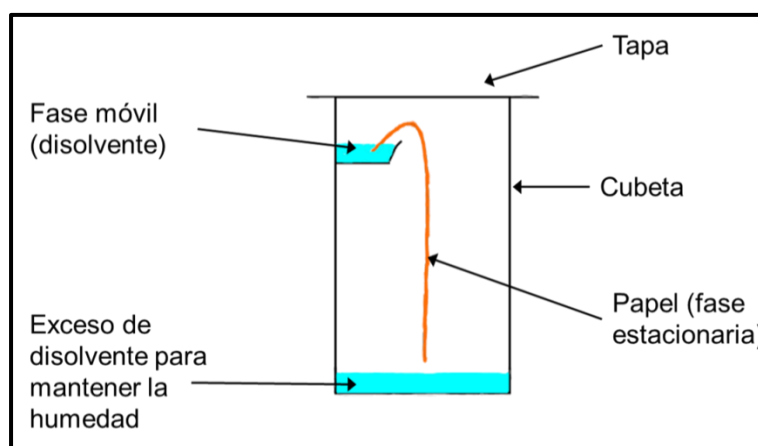


Figura 22: Cromatografía en papel descendente

Con la técnica ascendente la fase móvil solo puede llegar hasta el extremo superior del papel, cesando en este momento su movimiento a través del mismo. Esto, considerando que la atmósfera en la cubeta está saturada

con los vapores de la fase móvil. Así, todos los compuestos separados permanecen en el papel, y la distancia recorrida por la fase móvil es fija. El método ascendente da también mejores resultados con disolventes muy volátiles. Una desventaja de esta técnica es que los compuestos con R_F muy bajos muy a menudo se separan de manera incompleta.

En la técnica descendente se le permite a la fase móvil correr en el papel debido a la fuerza de la gravedad, con lo cual es posible aumentar considerablemente la longitud del recorrido y, de esta manera, conseguir mejores separaciones.

- **Bidimensional:** se usa para separar mezclas complejas. La muestra se siembra en un ángulo del papel y se realiza una primera corrida en dirección ascendente, paralela a uno de los bordes del papel, con un solvente. Finalizada esta primera corrida, y luego de secar este cromatograma para eliminar el primer disolvente, se gira el papel 90° y se efectúa una segunda corrida con otro sistema de solventes. Dado que cada compuesto migra a una velocidad característica en un sistema de disolventes determinado, la segunda cromatografía debería incrementar sustancialmente la separación de la muestra en sus componentes.

Esta modalidad es empleada con mayor frecuencia en la cromatografía en capa fina, técnica que se desarrolla con más detalle en el capítulo siguiente. La Figura 23 muestra un cromatograma obtenido por este tipo de técnica de desarrollo.

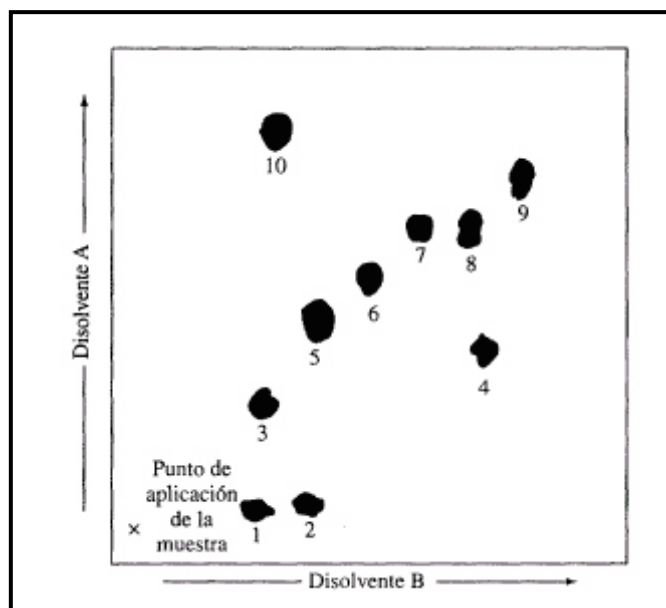


Figura 23: Cromatograma en capa fina bidimensional (gel de sílice) de algunos aminoácidos. Disolvente A: tolueno/2-cloroetanol/piridina. Disolvente B: cloroformo/alcohol bencílico/ácido acético. Aminoácidos: (1) ácido aspártico, (2) ácido glutámico, (3) serina, (4) β -alanina, (5) glicina, (6) alanina, (7) metionina, (8) valina, (9) isoleucina, (10) cisteína.

- **Circular:** se emplea para separar los componentes de extractos vegetales. Con el extracto a analizar se efectúa una mancha circular de muestra de pequeñas dimensiones en el centro de un papel cuadrado (o circular) de unos 8x8 cm. Repitiendo la operación unas tres veces y evaporando el disolvente luego de cada siembra. De esta forma se obtiene una mancha suficientemente concentrada de pequeñas dimensiones.
- A continuación se coloca el papel de filtro sobre un vidrio de reloj o vaso de precipitados (contenedor), haciendo coincidir verticalmente la mancha sembrada con el centro del mismo. Se atraviesa el centro de la mancha con un hilo de coser o un rollito de papel absorbente, el cual proporciona un contacto entre la misma y el fondo del contenedor elegido. A continuación se vierte una pequeña cantidad de disolvente en el contenedor y se lo deja fluir por capilaridad hacia el centro de la mancha, El disolvente se dispersa circularmente por el papel de filtro, obteniéndose el correspondiente cromatograma circular, como los mostrados en las Figuras 24 y 25.

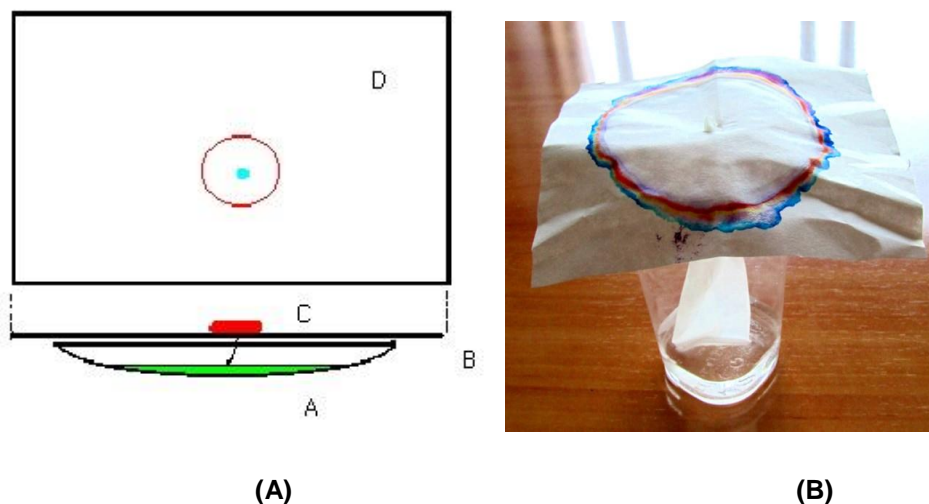


Figura 24: (A). Esquema del dispositivo para obtener un cromatograma circular usando vidrio de reloj como contenedor del disolvente: A) líquido eluyente; B) papel de filtro; C) mancha; D) cromatograma obtenido. (B) Cromatograma circular de una mancha de tinta, usando un vaso como contenedor del disolvente.

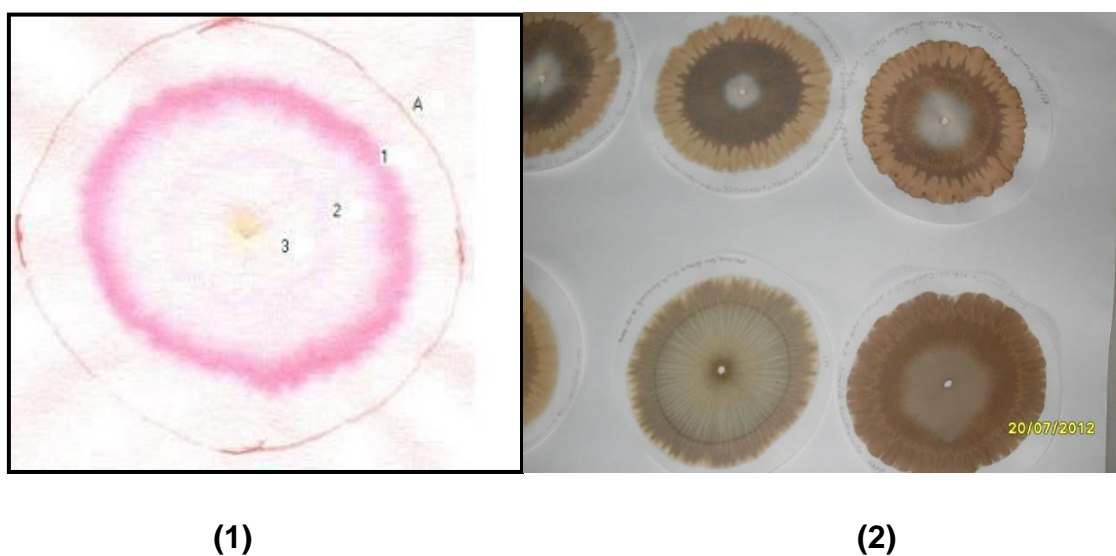


Figura 25: Cromatogramas circulares: (1). A) frente del solvente; 1,2 y3 especies separadas. (2). Cromatogramas circulares de suelos

Este tipo de cromatografía tiene una serie de ventajas:

1. Rapidez. La corrida se lleva a cabo en no más de dos horas.
2. Mayor poder resolutivo. Se obtienen separaciones más nítidas ya que los componentes se distribuyen en anillos, cuyo espesor disminuye a medida que aumenta el radio.
3. Revelados simultáneos. Se puede cortar el papel en sectores y, luego, revelar cada uno con un revelador diferente.

REVELADO

Cuando la fase móvil llega al final de su recorrido, se retira el papel de la cuba cromatográfica y se lo seca con frío o con el calor de un secador de cabellos. Si los compuestos de la muestra analizada son coloreados, las manchas producidas por los componentes individuales de la misma son visibles directamente. Sin embargo lo más frecuente es que sean incoloros o invisibles a la luz ordinaria y se necesitan artificios externos para hacerlos visibles. Es decir, es necesario “revelarlos” para poder detectarlos y localizarlos a simple vista en el papel. Para ello se recurre a métodos químicos, físicos, biológicos y enzimáticos. Estos dos últimos escapan al alcance planteado para la presente serie didáctica y se remite a la bibliografía especializada en el tema, a quien esté interesado en los mismos.

- **Métodos químicos.** El cromatograma obtenido se rocía con una solución reveladora, cuya composición depende del tipo de sustancias a ser reveladas (aminoácidos, carbohidratos, insecticidas, iones inorgánicos, etc.). Existe en la bibliografía información acerca de cuál debe ser el agente cromogénico empleado, técnica de preparación y de conservación, sensibilidad y tipo de sustancias detectadas por una determinada solución reveladora. A modo de ejemplo citaremos la solución de ninhidrina en acetona, la cual reacciona con los aminoácidos produciendo complejos de color violáceo o amarillo, haciéndolos visibles a simple vista, como se observa en la Figura 26.

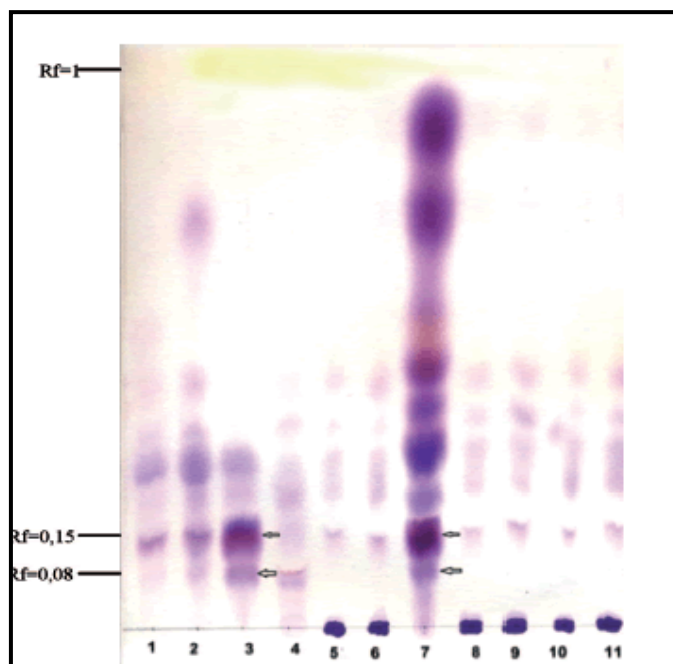


Figura 26: Cromatografía en papel de muestras de orina y sangre. Carriles 1, 4, 8, 10, 11. Controles normales de orina. Carril 2. Muestra de orina con aumento de metionina. Carril 3. Muestra de orina de paciente en seguimiento por sospecha de cistinuria, banda de cistina característica $R_f = 0,08$ (primera flecha negra de abajo hacia arriba). La separación de aminoácidos muestra un patrón de excreción anormal donde comigran arginina, lisina y ornitina (segunda flecha negra de abajo hacia arriba) característica de estos pacientes, comparado con controles normales. Carriles 5, 6 y 9. Control normal de plasma. Carril 7. Patrón o estándar total de aminoácidos ubicado en la parte central del cromatograma, el cual muestra patrón característico de cistina $R_f = 0,08$

- **Métodos físicos.** Muchas sustancias orgánicas absorben radiaciones de luz ultravioleta tornándose fluorescentes. Cuando el papel es tratado con solución de fluoresceína, frecuentemente destaca las manchas tornándolas amarillo-verdosas, blancas o azuladas, mientras que las sustancias que absorben luz UV aparecen como manchas oscuras sobre un fondo fluorescente azulado que, normalmente, corresponde al papel. Se pueden usar lámpara UV de onda corta (240-260 nm) o de onda larga (360 nm). La Figura 27 muestra una aplicación de estos métodos.

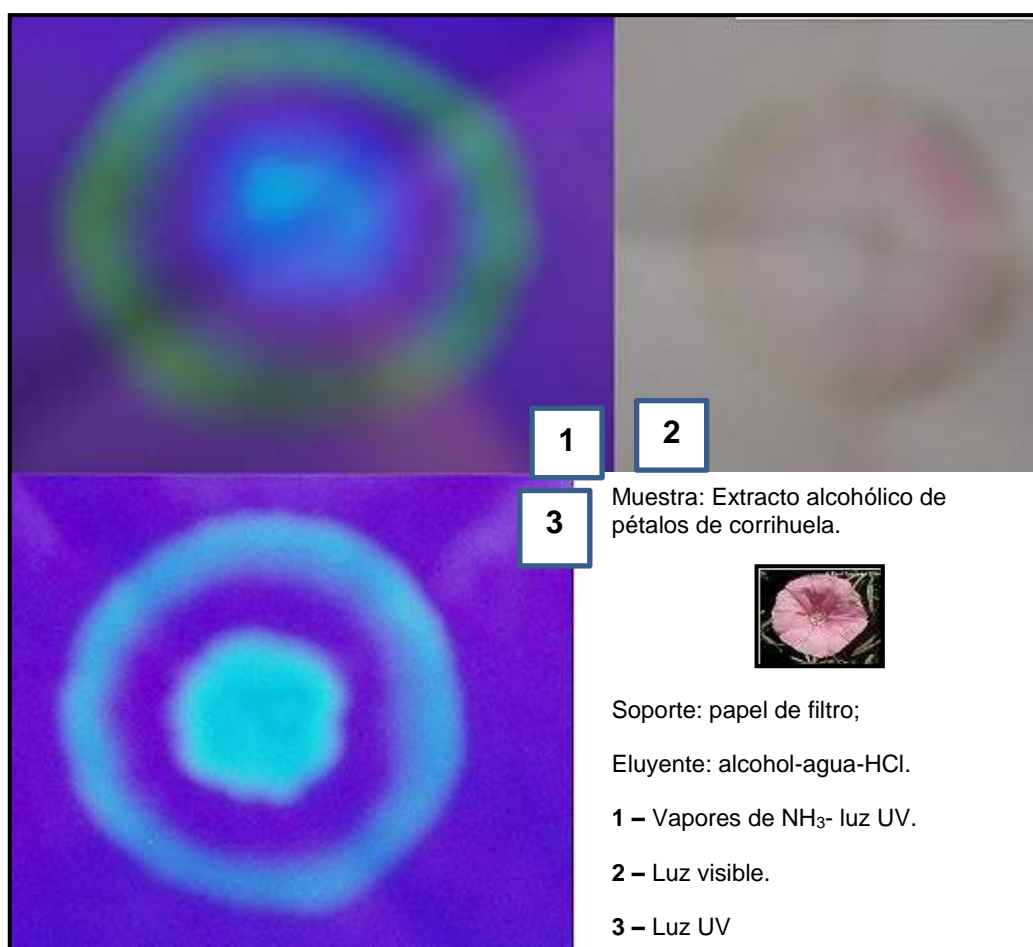


Figura 27: Cromatograma circular del extracto alcohólico de pétalos de corihuela, en distintas condiciones de revelado con luz UV y visible

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Puede ser de dos naturalezas, no excluyentes entre sí:

- **Cualitativa:** consiste en determinar la identidad de las sustancias separadas de la muestra analizada. Normalmente este objetivo se logra por la comparación del color y los R_f presentados por las sustancias separadas, con los correspondientes a los patrones usados, siempre que se haya realizado la corrida en las mismas condiciones bajo las cuales se determinaron los R_f de los patrones. A modo de ejemplo, en la Figura 28 se presentan los cromatogramas obtenidos haciendo correr una muestra problema con dos solventes diferentes: hexano y diclorometano, respectivamente. Para tratar de identificar los compuestos presentes en dicha muestra se usaron los siguientes patrones: (1) naftaleno; (2) veratrol y (3) acetanilida, El punto 4 corresponde a la muestra problema.

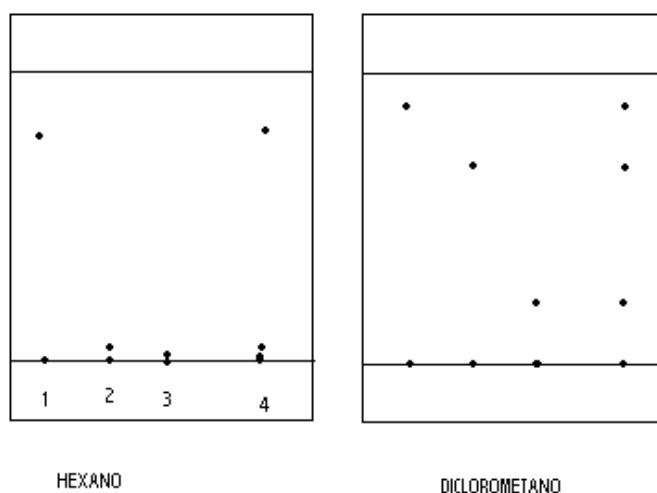


Figura 28: Ejemplo de evaluación cualitativa de resultados

En el primer cromatograma, usando hexano como fase móvil, no se llega a precisar la composición exacta de la muestra, pero se puede asegurar que contiene naftaleno. Después de repetir la corrida con diclorometano se pueden apreciar claramente tres puntos, cada uno a la misma altura de alguno de los patrones. Conclusión: la muestra problema está compuesta por naftaleno, veratrol y acetanilida.

- **Cuantitativa:** se emplea para determinar la concentración de cada una de las sustancias que integran la muestra. Para ello se debe seleccionar una fase móvil capaz de separar perfectamente los componentes de la misma. Se puede realizar el análisis cuantitativo de cada sustancia directamente sobre el papel (usando patrones de concentraciones conocidas, midiendo el área de las manchas, midiendo la intensidad del color de las manchas con un densitómetro) o luego de ser extraída del mismo con un disolvente adecuado midiendo, luego, su densidad óptica en un espectrofotómetro.

EFECTOS DE LA TEMPERATURA

En la cromatografía en papel se debe controlar la temperatura ya que, en función de esta variable, se puede aumentar o disminuir la capacidad de resolución de esta técnica.

Teóricamente hay un tiempo ideal de contacto entre los solutos y las fases móvil y estacionaria, para que ocurra una partición lo más completa posible. En esto también influye la velocidad del avance de la fase móvil, a través del papel, la cual está influenciada por la temperatura a la que se efectúa la corrida cromatográfica.

La temperatura ideal depende de la muestra a ser analizada, así como del papel y la fase móvil usados. Una temperatura por encima de la ambiente mejora el tiempo de análisis, pero puede perjudicar la resolución de la misma. Una temperatura por debajo de la ambiente puede mejorar la resolución, pero perjudica el tiempo de análisis.

Se puede trabajar a temperatura ambiente controlada, logrando así una resolución y un tiempo de análisis ideales empleando, por ejemplo, estufas de cultivos a 37°C.

Es muy importante que la temperatura se mantenga constante durante toda la técnica para lograr valores de R_f reproducibles, ya que este parámetro varía con la temperatura. Existen laboratorios donde se realizan las cromatografías en papel en locales con temperatura controlada constante, o con variaciones de fracciones de grado.



CAPÍTULO III
CROMATOGRAFÍA PLANAR EN CAPA FINA

INTRODUCCIÓN

La cromatografía en capa fina, o delgada (CCD), en inglés thin layer chromatography o (TLC) es una técnica analítica rápida y sencilla, muy utilizada en un laboratorio de Química Orgánica.

Consiste en la separación de los componentes de una muestra, debido a la migración diferencial de los mismos a través de una capa delgada de adsorbente, sostenido por una superficie plana inerte. Entre otras cosas permite:

- Determinar el grado de pureza de un compuesto. Si la sustancia en cuestión proviene de una mezcla que se separó por medio de una columna cromatográfica, se puede determinar la pureza de cada fracción por CCD. Se puede determinar así, por ejemplo, la efectividad de una etapa de purificación. Si, luego de un proceso cromatográfico previo de separación el compuesto presenta varias manchas, en una CCD, entonces dicho compuesto no está puro y no se logró separarlo de sus impurezas.
- Comparar muestras. Si dos muestras corren igual en la placa podrían ser idénticas. Si, por el contrario, corren distinto entonces no son la misma sustancia.
- Realizar el seguimiento de una reacción. Es posible estudiar cómo desaparecen los reactivos y cómo aparecen los productos finales o, lo que es lo mismo, saber cuándo la reacción ha acabado.

Al igual que otras técnicas cromatográficas, consiste de una fase estacionaria y una fase móvil y el principio de la separación es el mismo: la sustancia de interés será retenida por la fase estacionaria, o se moverá con la fase móvil, recorriendo una distancia que es inversamente proporcional a su afinidad por la fase estacionaria.

El gran auge de esta técnica se debe a las múltiples ventajas que ofrece, tales como:

- Fácil comprensión y ejecución.
- Separaciones en corto tiempo.
- Versatilidad.
- Gran reproductibilidad y bajo costo.

El proceso de separación está fundamentado principalmente en el fenómeno de la *adsorción*. Sin embargo, usando fases estacionarias tratadas, puede ocurrir una partición o intercambio iónico, lo que permite su empleo en la separación de sustancias hidrofóbicas así como de sustancias hidrofílicas.

La fase estacionaria (el adsorbente) puede ser variada. Se dispone en el mercado de una gran variedad de adsorbentes, entre los cuales los más utilizados son: sílica, alúmina, celulosa y poliamida. El tipo de fase estacionaria que se utilice en un experimento dependerá del tipo de moléculas que se quieran separar. La fase móvil es un solvente que puede ser agua, un solvente orgánico o una mezcla de ambos.

La superficie de soporte de la fase estacionaria, puede ser una placa de vidrio, aluminio, plástico o papel. Esta superficie sólida puede ser rígida o flexible.

La muestra a analizar se siembra cerca de un extremo de la placa cromatográfica. A continuación, la placa se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil), como se muestra en la Figura 29. A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra, entre el disolvente y el adsorbente.

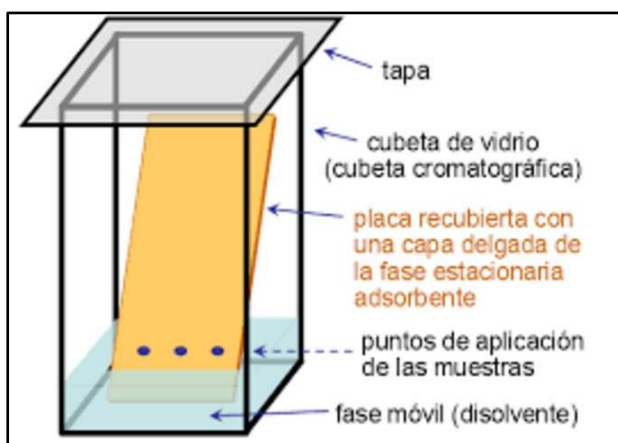


Figura 29: Cromatografía en capa fina ascendente

ETAPAS DE LA TÉCNICA

1 - ELECCIÓN DEL ADSORBENTE

Los adsorbentes (fase estacionaria) más ampliamente utilizados son el gel de sílice (SiO_2) y la alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar.

El gel de sílice es altamente poroso y uno de los adsorbentes más utilizados en cromatografía en capa delgada. Presenta carácter francamente ácido. En general se utiliza para separar compuestos lipofílicos como aldehídos, cetonas, ácidos grasos, fenoles, aminoácidos, alcaloides, terpenoides y esteroides.

La alúmina es otro de los adsorbentes muy usados, después de la sílica. Presenta carácter alcalino. Sin embargo se puede preparar de manera que muestre también comportamientos neutro o ácido. También es usada frecuentemente en la separación de compuestos lipofílicos (relativamente apolares) y, por el hecho de poder ser preparada con carácter ácido, neutro o alcalino, es bastante útil en la separación de compuestos que presentan variaciones de estas características. La alúmina separa bien hidrocarburos policíclicos, alcaloides, aminas y vitaminas liposolubles.

El proceso de adsorción se debe a interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno entre el soluto y el adsorbente, como las mostradas en la Figura 30. El adsorbente debe ser inerte con respecto a las sustancias a analizar y no actuar como catalizador en reacciones de descomposición.

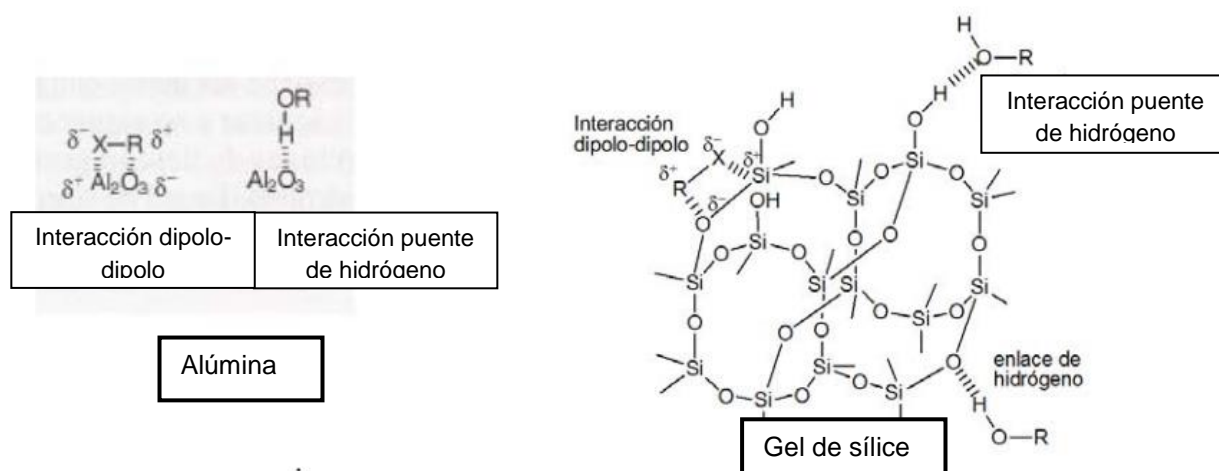


Figura 30. Interacciones intermoleculares entre soluto y adsorbente.

2 - ELECCIÓN DE LA FASE MÓVIL

La elección de la fase móvil (denominada también eluyente o disolvente) depende del tipo de sustancias que se desean separar y, cuando una fase móvil pura no separa bien los componentes de una mezcla, se utilizan mezclas de solventes de diferentes polaridades. Dado que, existe una competencia entre las moléculas de la fase móvil y las de la muestra por la superficie del adsorbente, se deben tener en cuenta la naturaleza química de las sustancias a separar y la polaridad de la fase móvil, al momento de escoger esta última. Para esta selección se toma como base la *serie eluotrópica* de los solventes, en la que estos están ordenados según sus polaridades las cuales, a su vez, están directamente relacionadas con su poder de elución.

En cuanto al orden de elución, depende del tipo de molécula a separar y se incrementa al aumentar la polaridad de la fase móvil o eluyente. Este puede ser un disolvente único o dos miscibles de distinta polaridad. En el siguiente recuadro se recoge por orden creciente de fuerza eluyente los disolventes más comúnmente empleados.

Hexano < tetraclorometano < cloroformo < diclorometano < acetato de etilo < acetona < 2-propanol
< metanol < agua

En general, estos disolventes se caracterizan por tener bajos puntos de ebullición y viscosidad, lo que les permite moverse con rapidez. Raramente se emplea un disolvente más polar que el metanol. Usualmente se emplea una mezcla de dos disolventes en proporción variable; la polaridad de la mezcla será el valor promediado en función de la cantidad de cada disolvente empleada.

En casi todos los textos que tratan sobre cromatografía de adsorción en capa delgada se indican diferentes mezclas de solventes, para lograr la separación óptima de distintos tipos de sustancias. En caso de disponer de los mismos, el eluyente idóneo para cada caso ha de encontrarse por "el método del ensayo y del error".

3 - PREPARACIÓN DE LAS PLACAS

Existen diversas formas de preparar una placa cromatográfica. Esto se puede hacer en forma manual o con el empleo de esparcidores o distribuidores.

Independientemente del método escogido, siempre se debe iniciar con la limpieza de la placa a fin de eliminar residuos grasos de su superficie. Para ello es aconsejable lavar la placa con detergente, solución sulfocrómica o agua corriente evitando el enjuague posterior con solventes orgánicos, ya que los mismos pueden contener sustancias grasas que dificulten la adherencia del adsorbente. Finalmente la placa debe secarse en estufa.

En la técnica manual se usan placas de vidrio de 20 cm de longitud y de ancho variable. Se prepara una suspensión del adsorbente en un solvente adecuado y se la distribuye sobre la superficie de la placa, ayudándose con una varilla de vidrio o con suaves movimientos para que la distribución de la suspensión sea uniforme. A continuación, se la deja reposar sobre una superficie plana horizontal para que se seque al aire. Esta técnica presenta dificultades para obtener superficies de adsorbente uniformes.

Por otro lado, se encuentran disponibles en el mercado placas prefabricadas con los adsorbentes más utilizados. A pesar de tener un costo más elevado, ahorran la etapa de la preparación y tienen capas de adsorbente más uniformes y homogéneas, lo cual mejora la separación y proveen valores de R_f más reproducibles. En este caso el adsorbente está depositado sobre una lámina de material plástico (por ejemplo ácido politerftálico) o de aluminio. La Figura 31 muestra algunas de las placas descriptas.

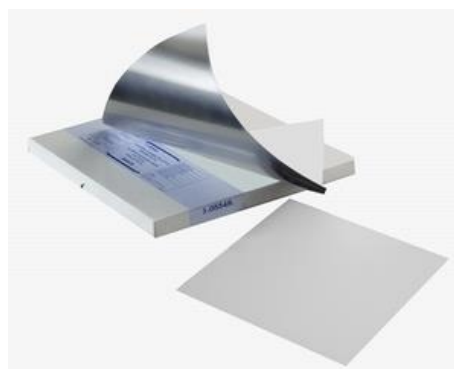


Figura 31: Placas de vidrio y de aluminio, con gel de sílice como adsorbente, para cromatografía en capa fina

4 - ACTIVACIÓN DE LAS PLACAS

Para muchas separaciones las placas, ya sean preparadas o prefabricadas, son usadas directamente luego de secarse al aire libre. Sin embargo algunas separaciones exigen la activación de las mismas. Para ello se someten las placas

a determinadas temperaturas, durante un cierto tiempo, dependiendo del adsorbente utilizado y la actividad deseada. La mayoría de los adsorbentes se tornan más activos al ser expuestos a temperaturas elevadas, durante un tiempo prolongado. El gel de sílice y la alúmina se activan calentándolos a 105-110°C durante 30 a 60 minutos. La celulosa no debe ser calentada por más de 10 minutos a 105°C. Luego de su activación las placas se deben almacenar en ambientes secos, como desecadores, hasta el momento de su empleo.

5 - SIEMBRA DE LAS MUESTRAS EN LAS PLACAS

Las muestras se aplican en forma de soluciones, en solventes que sean lo suficientemente volátiles para su fácil eliminación luego de la siembra. Tales soluciones no deben ser muy diluidas, de manera que no exijan la siembra de un volumen grande de muestra, lo cual aumenta mucho el diámetro de la mancha. Esto, a su vez, obstaculiza una buena separación de los componentes de la muestra.

Para la aplicación de la muestra se pueden utilizar micropipetas o microjeringas, las cuales permiten determinar la cantidad de sustancia sembrada en la placa. Se pueden usar tubos capilares de vidrio, en caso de no requerirse precisión en la cantidad de muestra sembrada.

El procedimiento empleado para realizar esta etapa de la técnica es el mismo que el seguido para la siembra en la cromatografía en papel (remitirse a la figura 19 de página 34).

6 - FORMAS DE DESARROLLO

Son esencialmente las mismas que las descritas para la cromatografía en papel. Se colocan las placas en cubas de vidrio y se procede a su desarrollo (o corrida). El desarrollo ascendente es el más utilizado y puede ser considerada como la técnica básica. En caso de no obtenerse una buena separación por esta técnica, se recurre a un desarrollo bidimensional, como el explicado para la cromatografía en papel.

7 - REVELADO DE LAS PLACAS

Luego del desarrollo del cromatograma, las placas se secan y se disponen para su revelado. Esta última etapa consiste en tornar visibles a las sustancias

presentes en la cromatoplaque, en caso de ser incoloras. Para lograrlo se pueden usar los mismos métodos presentados para el revelado en la cromatografía en papel, a saber: métodos físicos, químicos y biológicos (en caso de emplear reacciones enzimáticas o bacterianas). Para algunos compuestos orgánicos se suele utilizar la exposición de la cromatoplaque a vapores de iodo, en recipientes cerrados. Este método tiene la ventaja de que el iodo puede ser eliminado por el calentamiento posterior de la cromatoplaque.

En la literatura química existen referencias sobre diversos reactivos de coloración para cromatografía en capa delgada los cuales varían, desde los de aplicación muy específica hasta los más generales, como el caso de los vapores de iodo.

BIBLIOGRAFÍA

- ▶ Abbott, D y Andrews, R. S. 1970. "Introducción a la Cromatografía". Ed. Alhambra, S. A. Madrid.
- ▶ Albertis, B; Bray, D. 1992. "Biología Molecular de la Célula". 2ª Ed. Ediciones Omega S.A. Barcelona.
- ▶ Blanco, A. 1986. "Química Biológica". Tercera Edición. Editorial González Truccone.
- ▶ Bohinsky, R. 1991. "Bioquímica". Addison Wesley. Iberoamericana S.A. Quinta Edición.
- ▶ Browning, D. R. 1971. "Cromatografía", Toray-Masson, S.A. Barcelona.
- ▶ Campbell; Farrell. 2010. "Bioquímica". 6ª Ed. Cengage Learning Editores S. A.
- ▶ Collins; Braga; Bonato. 1997. "Introdução a Métodos Cromatográficos". Facultad de Ingeniería de Alimentos. Universidad Estadual de Campinas.
- ▶ D.P.Sheer y D. C. Harris, J. 1982. "Water Pollution Control Federation", 54,1441.
- ▶ Hais, I; Lederer, M. M.; Macek, K.1970. "Identification of substances by Paper and Thin-Layer Chromatography". Elsevier, New York.
- ▶ Galagovsky, L. 2002. "Fundamentos Teóricos-Prácticos para el Laboratorio". Editorial Universidad de Buenos Aires.
- ▶ Horton, H. R.; Moran, L. A.; Ochs, R.; Rawn, J. D.; Scrimgeour, K. 2008. "Bioquímica". Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana. 4ª Edición.
- ▶ Kuhn, R.; Lederer, E. 1931. "Naturwissenschaften". 19, 306; "Ver. Deutch. Chem. Gessell". 64. 1349.
- ▶ Lehninger, A; Nelson D. L; Cox, M. M. 2014. "Principios de Bioquímica". 6ª Ed. Omega Ediciones S.A., Barcelona.
- ▶ Randerath, K. 1968. "Thin – Layer Chromatography". 2ª Ed. Academic Press. New York.
- ▶ Sthal, E. 1969. "Thin-Layer Chromatography" – A Laboratory Handbook. Springer-Verlag, Heidelberg.
- ▶ Stryer, L. 1990. "Bioquímica". Tercera Edición. Tomo 1. Editorial Reverté.

- ▶ Torres, H. N.; Carminatti, H; Cardini, C. E. "Bioquímica General". Librería El Ateneo. Editorial Buenos Aires.
- ▶ Touchstone, J. C.; Dobbins, M. F. 1978. "Practice of Thin-Layer Chromatography". John Wiley - Sons, New York.
- ▶ Tswett, M. 1906. "Ber. Deutch. Botan. Gesell. 24, 316 a 384.
- ▶ Villaverde Gutierrez, C.; Blanco Gaitan, M.; Mendoza Oltras, C.; Ramirez Rodrigo, 2005. "Fundamentos de bioquímica metabólica". Editorial alfaomega. (*)
- ▶ Weisz, P. B.; Keogh, R, N. 1987. "La Ciencia de la Biología". Ediciones Omega S.A. Barcelona.
- ▶ Wilcox, Jr.; Charles F. 1995. "Experimental Organic Chemistry". Second Edition. Editorial Prentice-Hall, Inc.
- ▶ Zubay, G. 1983. "Biochemistry". Addison – Wesley Publishing Company.

Páginas web

https://www.google.com.ar/?gfe_rd=cr&ei=htl6U7PSC4aF8QfRrYGQBQ#

www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/.../Tema6.pdf

www4.ujaen.es/~mjayora/docencia_archivos/.../Tema6.pdf

rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf

www.uprm.edu/biology/profs/velez/fina.htm