

**Alberto de Andrade Reis Mota**

# **Métodos Cromatográficos**

**Separação e identificação de  
substâncias**

**Gama, DF, 2022.**

  /uniceplac  
uniceplac.edu.br



**UNICEPLAC**  
CENTRO UNIVERSITÁRIO

# CENTRO UNIVERSITÁRIO APPARECIDO DOS SANTOS - UNICEPLAC

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M917m

Mota, Alberto de Andrade.

Métodos cromatográficos: separação e identificação de substâncias. Gama, DF: UNICEPLAC, 2022.

30 p.

1. Cromatografia. 2. Métodos cromatográficos. 3. Nutrição. I. Título.

CDU: 615.4

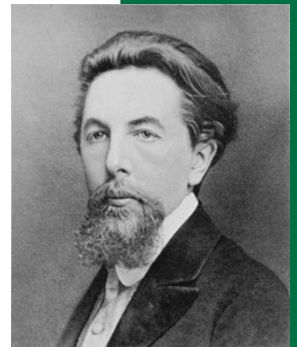
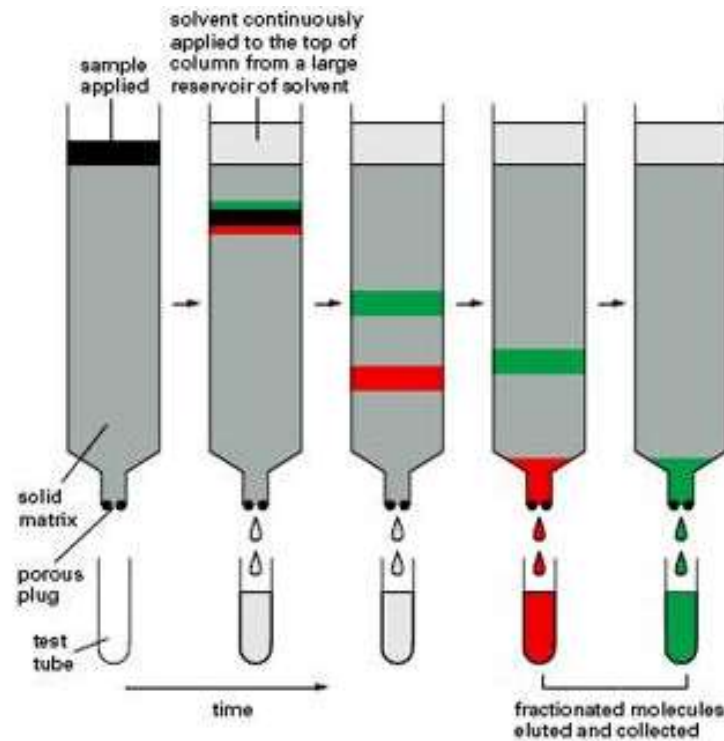
# QUANDO SURTIU A CROMATOGRAFIA

Em 1906 um russo chamado Tswett, usou uma coluna de vidro, preenchida com  $\text{CaCO}_3$  para separar os pigmentos do extrato de uma planta com hexano.

Ele foi o primeiro cientista a utilizar o termo “Cromatografia”, derivado do grego:

“*chroma*” = cores e

“*grafia*” = escrita



Mikhail Semenovich Tswett

# A DEFINIÇÃO ATUAL DE “CROMATOGRAFIA”

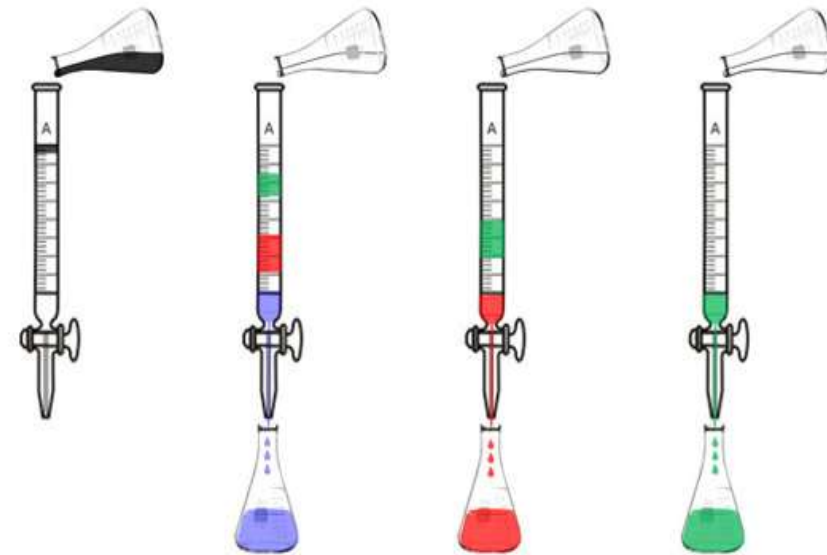
A cromatografia era até então conhecida como o método na qual os componentes de uma mistura são separados em uma coluna contendo um *adsorvente* com um sistema de fluxo.

## Segundo a IUPAC:

Cromatografia é um método físico de separação na qual os componentes que serão separados são distribuídos em duas fases, uma estacionária enquanto outra move em uma direção definida.

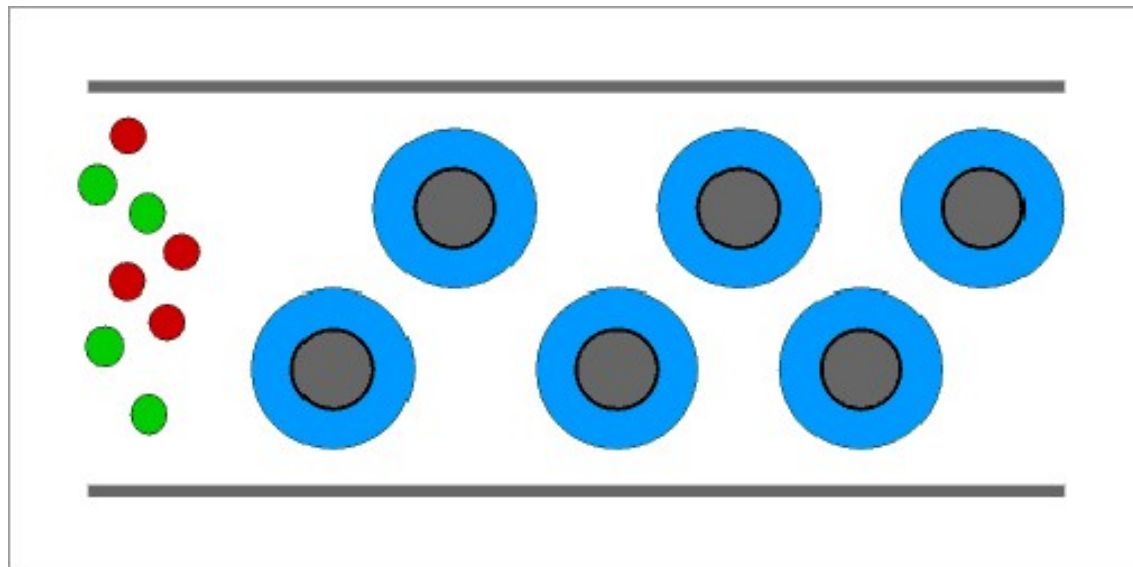
**Fase estacionária:** *Sólida ou Líquida suportada em um sólido*

**Fase móvel:** *Gás ou líquido.*



# UM EXEMPLO DE COMO FUNCIONARIA UMA COLUNA

Na animação abaixo, as moléculas **verdes** possuem uma maior interação pela fase móvel, observe que elas “correm” junto com a fase móvel, enquanto as moléculas **vermelhas** ficam mais presas a fase estacionária.



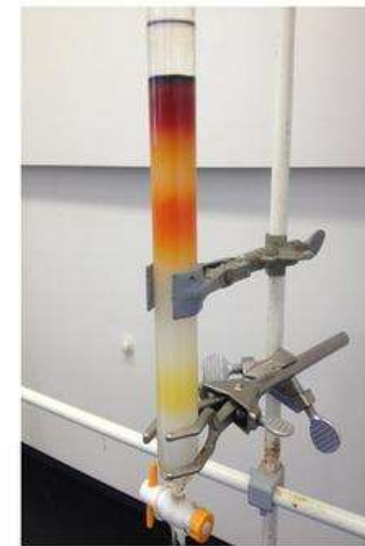
# OS PRINCÍPIOS DA CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um processo físico. Não existindo uma reação química entre a fase estacionária ou a fase móvel com os componentes da minha mistura.

Qualquer cromatografia é composta de três componentes:

- Fase estacionária
- Fase móvel
- Mistura a ser separada

Podemos controlar a fase móvel e a fase estacionária, sendo a mistura o problema a ser resolvido.



Cromatografia em camada delgada (esquerda) e em coluna (direita)

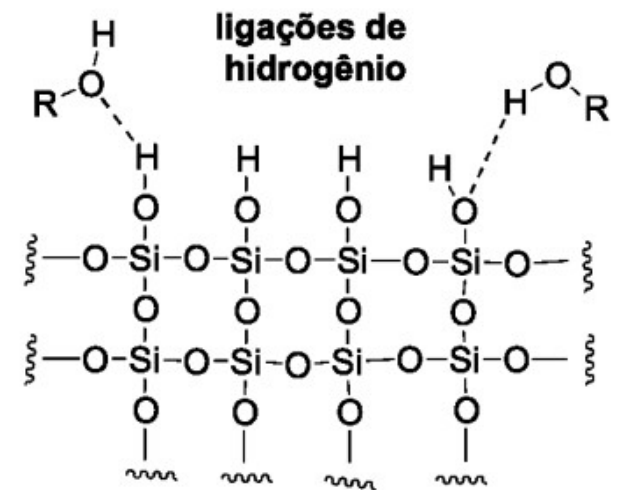
# CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Os métodos cromatográficos podem ser classificados de acordo com seus mecanismos de separação.

○ **mecanismo de separação** irá depender da natureza das fases:

Estacionária, podendo a cromatografia ser classificada como:

- **Adsorção** (a fase estacionária é um sólido com poder de adsorção) é a mais comum das cromatografias.



Interação da sílica (fase estacionária) com partes da molécula faz com que esta fique mais ou menos tempo retida na fase estacionária

# CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Os métodos cromatográficos podem ser classificados de acordo com seus mecanismos de separação.

O **mecanismo de separação** irá depender da natureza das fases:

Estacionária, podendo a cromatografia ser classificada como:

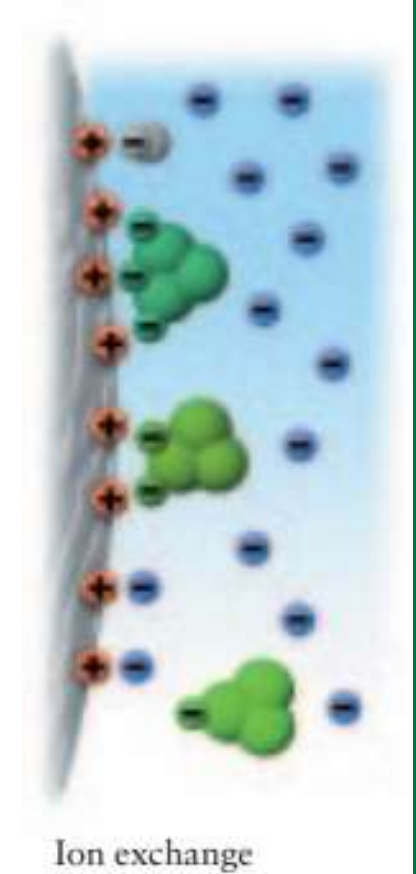
- **Afinidade** (utilizada para proteínas com ligantes específicos como enzimas).
- **Troca iônica** (para moléculas com carga)
- **Exclusão** molecular (pelo tamanho)
- **Eletroforese** (bastante incomum- separa as substâncias por uma corrente elétrica)



# CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

## Troca iônica

Biomoléculas possuem grupos carregados que podem variar com o pH  
Moléculas carregadas ligam-se a carga existente na fase estacionária  
Mais carregadas- se ligam mais fortemente à fase estacionária.  
Utilizada para amostras variadas e bastante efetiva para proteínas.



# CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

## Exclusão molecular

Se baseia na exclusão pelo tamanho.

Moléculas grandes não penetram nos poros do material, eluindo-se inicialmente.

Bastante utilizada para análise de polímeros.

Também chamada de cromatografia por “gel permeation”



Gel filtration

# CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

## Afinidade

Se baseiam na adsorção específica da molécula a um ligante ou a uma macromolécula

Quase todas as biomoléculas podem ser purificadas com base em interações específicas.

Pares moleculares: antígenos, anticorpos, enzimas e açúcares.

Ligantes específicos ligados com um espaçador a fase estacionária. A molécula específica é adsorvida e posteriormente eluída: Mudança conformacional da molécula pela mudança do pH ou força iônica.

Específica para separações problemáticas, com alta pureza de uma molécula.



Affinity

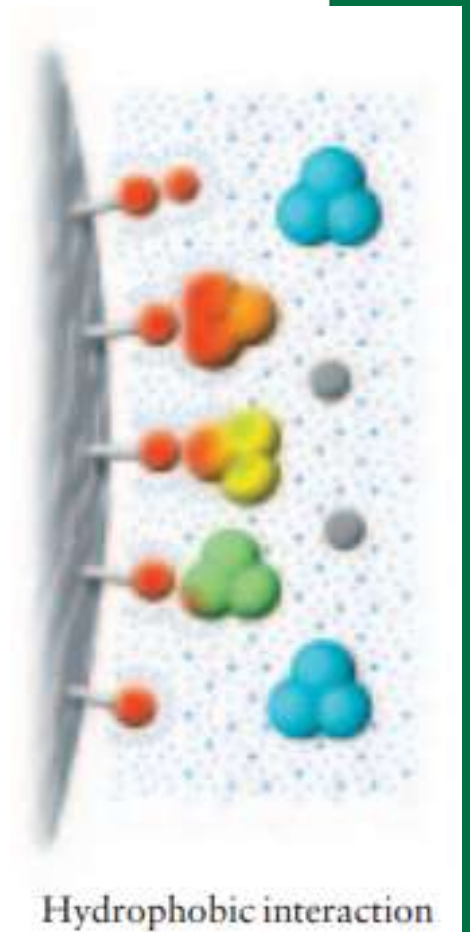
# CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

## Interação hidrofóbica

A interação da amostra com uma fase aquosa com alta concentração de sal e uma fase estacionária hidrofóbica (apolar)

É eluída da fase estacionária pela diminuição da concentração de sal na fase móvel.

Quase todas as moléculas biológicas contém partes hidrofóbicas, que sobre condições fisiológicas, são “escondidas” pelas partes hidrofílicas.



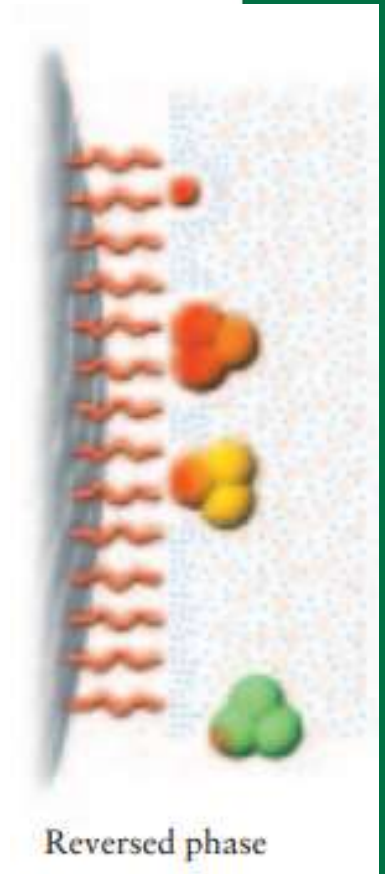
# CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

## Cromatografia de fase reversa

Usa interações hidrofóbicas entre a amostra e ligantes da fase estacionária, ao contrário da normal, onde a fase móvel é mais apolar que a fase estacionária.

Utilizada para separar pequenas moléculas e peptídeos.

Adsorção é muito forte entre a amostra e a fase estacionária, não recomendada para



# CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

## Cromatografia de fase reversa

Dentro da CLAE, estima-se que mais de 90% dos laboratórios de análise espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método que aplica a modalidade de CLAE em fase reversa (FR)<sup>1</sup>. Sistemas de CLAE-FR consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas. Estas fases apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas

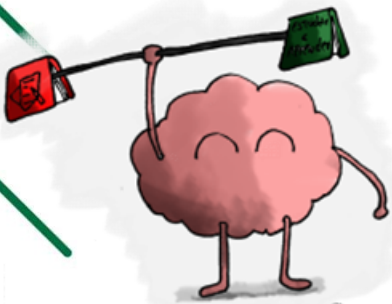
Quim. Nova, Vol. 25, No. 4, 616-623, 2002

# CLASSIFICAÇÃO DE ACORDO COM A FASE MÓVEL

Esta classificação é a que iremos dar uma maior prioridade.

De acordo com a fase móvel a cromatografia pode ser classificada em

- **Cromatografia Líquida**
- **Cromatografia Gasosa**



# ANTES DE FALARMOS SOBRE CL E CG.

As cromatografias também podem ser classificadas de acordo com a técnica, que é basicamente a maneira como a fase estacionária será suportada.

## 1. Cromatografia planar ou plana

Neste tipo de cromatografia, a fase estacionária é utilizada na forma de uma lâmina (bem fininha)

**1.1. CCD-** cromatografia de camada delgada.- A fase estacionária é colocada na forma de um pó em uma lâmina de plástico ou alumínio

**1.2. Cromatografia em papel** – tipos de papel específicos para esta técnica são utilizados como fase estacionária neste tipo de cromatografia.

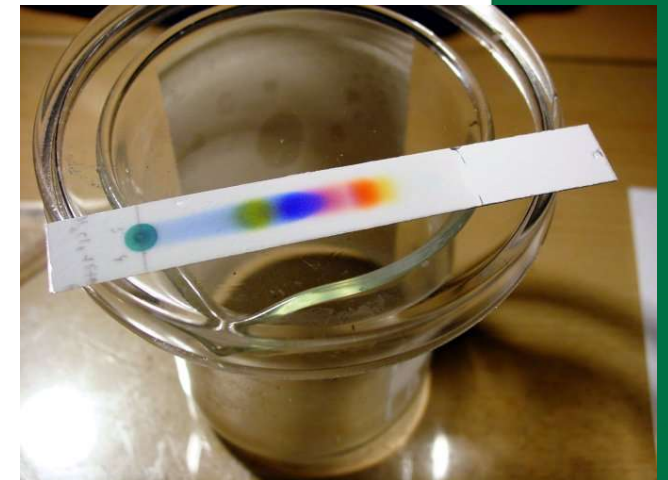
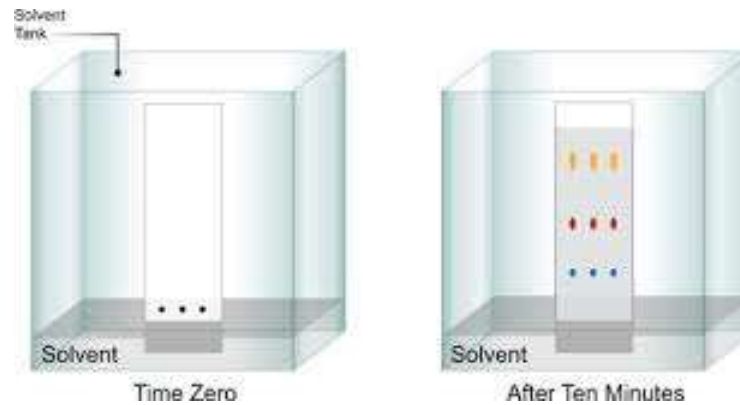
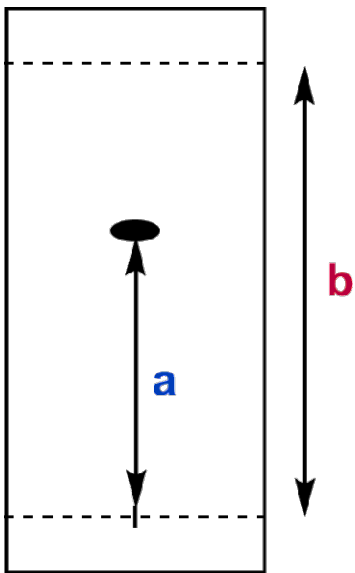
## 2. Cromatografia em coluna

A fase estacionária é colocada dentro de um tubo, feito de vidro ou metal.



# CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

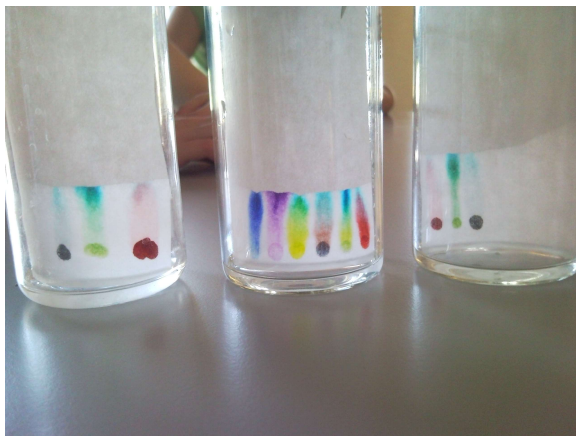
A fase estacionária é colocada na forma de um pó em uma lâmina de plástico ou alumínio. Prestem bastante atenção no  $R_f$ . (Fator de retenção) – entre 0,4 e 0,6.



$$R_f = \frac{\text{Distância recorreguda pel compost (a)}}{\text{Distância recorreguda pel dissolvent (b)}}$$

# CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Tipos de papel específicos para esta técnica são utilizados como fase estacionária neste tipo de cromatografia.

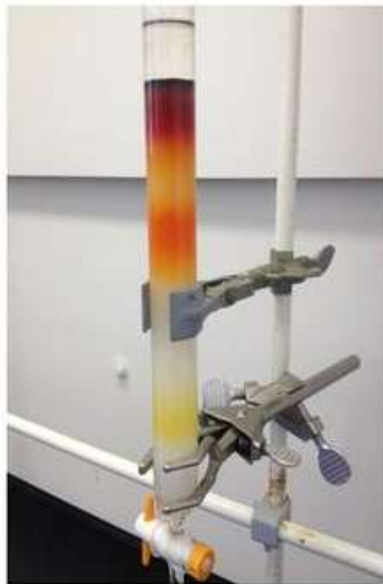


# CROMATOGRAFIA EM COLUNA

A fase estacionária é colocada dentro de um tubo, feito de vidro ou metal



Colunas de vidro



Colunas de HPLC



Colunas de CG

# AGORA SIM - A CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA

A fase móvel é líquida. No caso da fase estacionária ser sólida, esta também pode ser chamada cromatografia líquido sólida. Se a fase estacionária também é líquida (cromatografia por partição) a cromatografia também pode ser chamada líquida líquida.

A cromatografia em coluna de vidro mostrada anteriormente é um exemplo de cromatografia líquida.

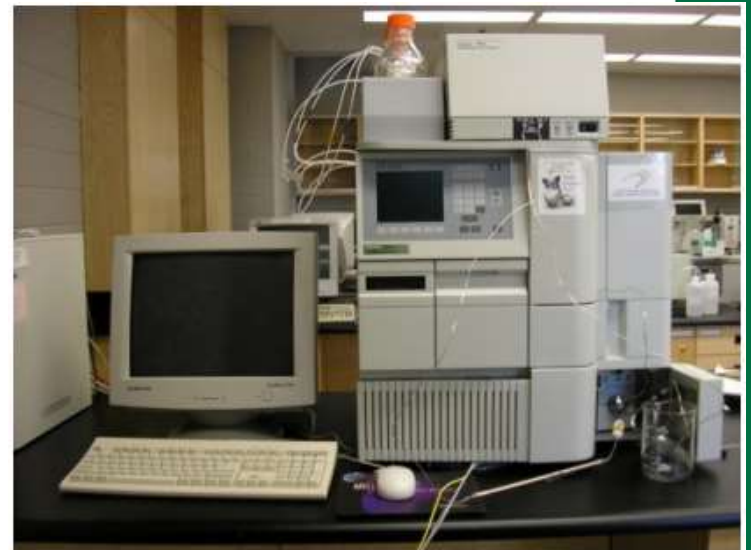
A cromatografia líquida mais famosa, nas indústrias e também bastante utilizadas em laboratórios de análise quantitativa e qualitativa é a:

**Cromatografia líquida de alta resolução (CLAE ou HPLC)**

# CROMATOGRAFIA LÍQUIDA- HPLC

A HPLC é uma forma de cromatografia líquida. Utiliza-se para esta cromatografia um instrumento, que possui basicamente em:

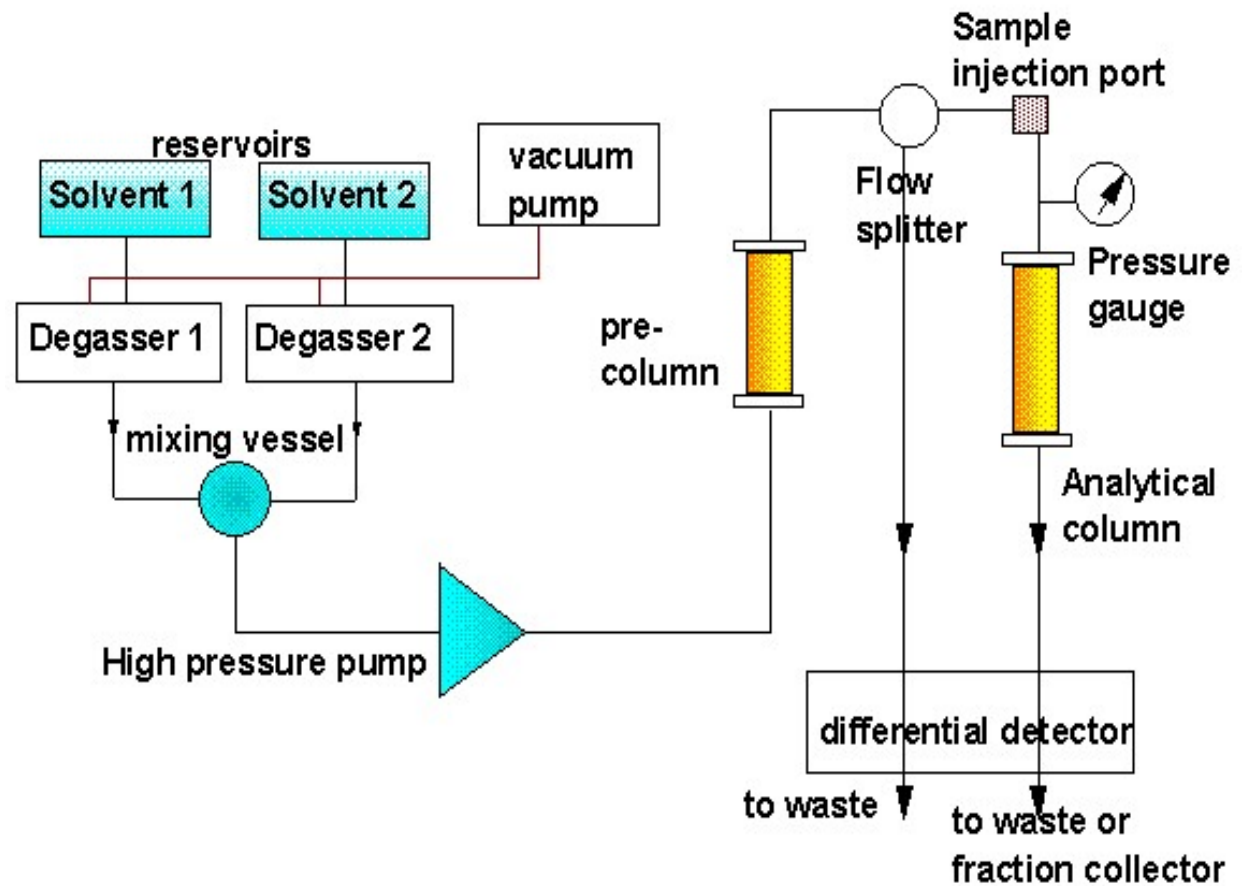
- Um reservatório para a fase líquida
- Uma bomba
- Um injetor
- Uma colina de separação
- Um detector.



# CROMATOGRAFIA LÍQUIDA- HPLC

A HPLC é uma forma de cromatografia líquida. Utiliza-se para esta cromatografia um instrumento, que possui basicamente em:

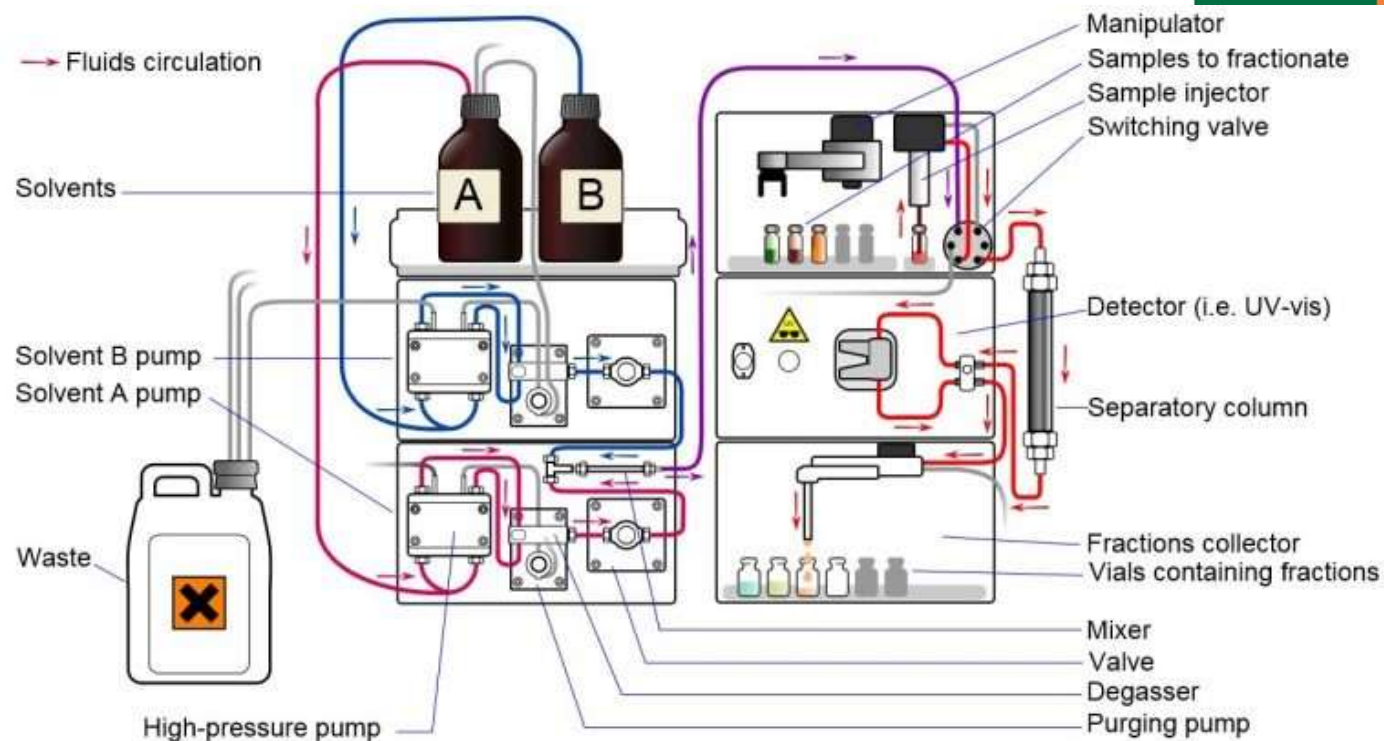
- Um reservatório para a fase líquida
- Uma bomba
- Um injetor
- Uma colina de separação
- Um detector.



# CROMATOGRAFIA LÍQUIDA- HPLC

A HPLC é uma forma de cromatografia líquida. Utiliza-se para esta cromatografia um instrumento, que possui basicamente em:

- Um reservatório para a fase líquida
- Uma bomba
- Um injetor
- Uma coluna de separação
- Um detector.

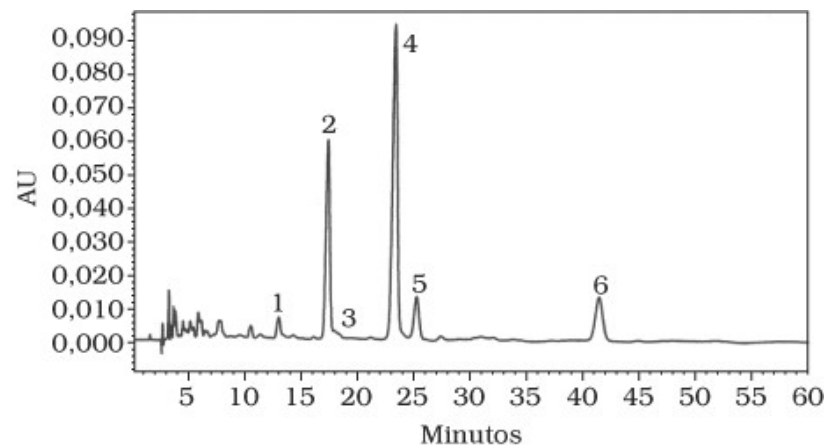


**Cromatografia Líquida de Alta Performance (CLAE)**

# CROMATOGRAFIA LÍQUIDA- HPLC

A HPLC é usada para analisar misturas complexas, realizar purificações, desenvolver métodos de síntese, isolar produtos naturais...

Esta técnica é muito mais refinada que a cromatografia em coluna de vidro, executada na maioria das vezes manualmente.



Exemplo de um cromatograma onde são separados os carotenoides do mamão.



# CROMATOGRAFIA GASOSA - CG



Esta cromatografia se baseia na separação de substâncias volatilizáveis.

A amostra é vaporizada no local de injeção e introduzida na coluna contendo a fase estacionária.

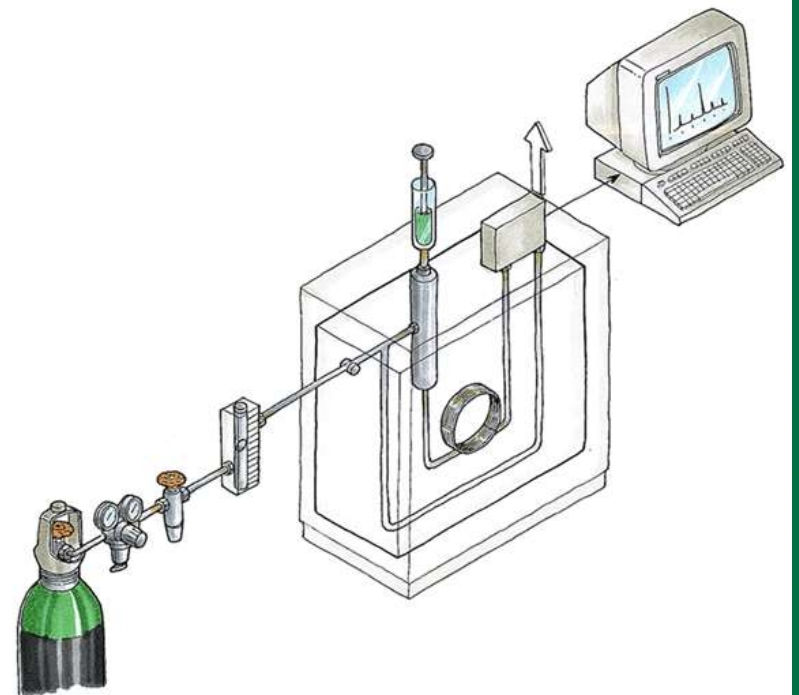
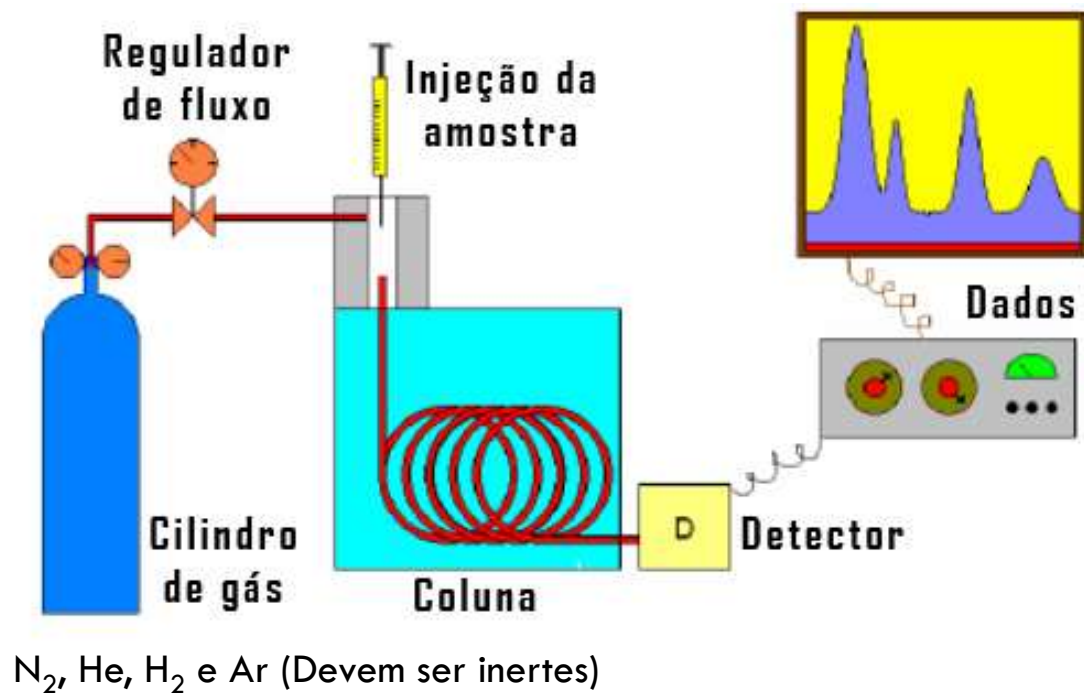
## Vantagens

- Alto poder de resolução
- Sensibilidade ( $10^{-12}$ g)
- Pequenas quantidades de amostra
- Análises quantitativas (pg a  $\mu$ g)

## Desvantagens

- Substâncias voláteis ou estáveis termicamente
- Requer preparo da amostra
- Tempo e custo elevado
- Eficiência qualitativa limitada

# ESQUEMA DA CROMATOGRAFIA GASOSA



# O GÁS UTILIZADO NA CROMATOGRAFIA

**Gás de arraste (alta pureza,  $\geq 99,995\%$ )**  
*não interage com a amostra*

- argônio, hélio, hidrogênio e nitrogênio
  - gases inertes
  - compatíveis com os detectores
- hélio e nitrogênio são os mais usados

**FILTRO**  
sílica gel ou  
peneira molecular

→ Garantir a pureza

**CONTROLADOR DE  
VAZÃO**

→ Manutenção de vazão  
constante

# CROMATOGRAFIA GASOSA - CG

Separa os constituintes da amostra → Aquecimento

(enrolada: posicionada dentro do forno)



**Empacotada**

Aço inox ou Cobre  
 $\Phi = 3 - 6$  mm  
 $L = 0,5 - 5,0$  m  
FE: sólido ou  
líq. sobre sól.

(de alto PE)

Material metálico  
 $\Phi = 0,1 - 0,5$  mm  
 $L = 5 - 100$  m  
FE:  
líq. sobre sól.



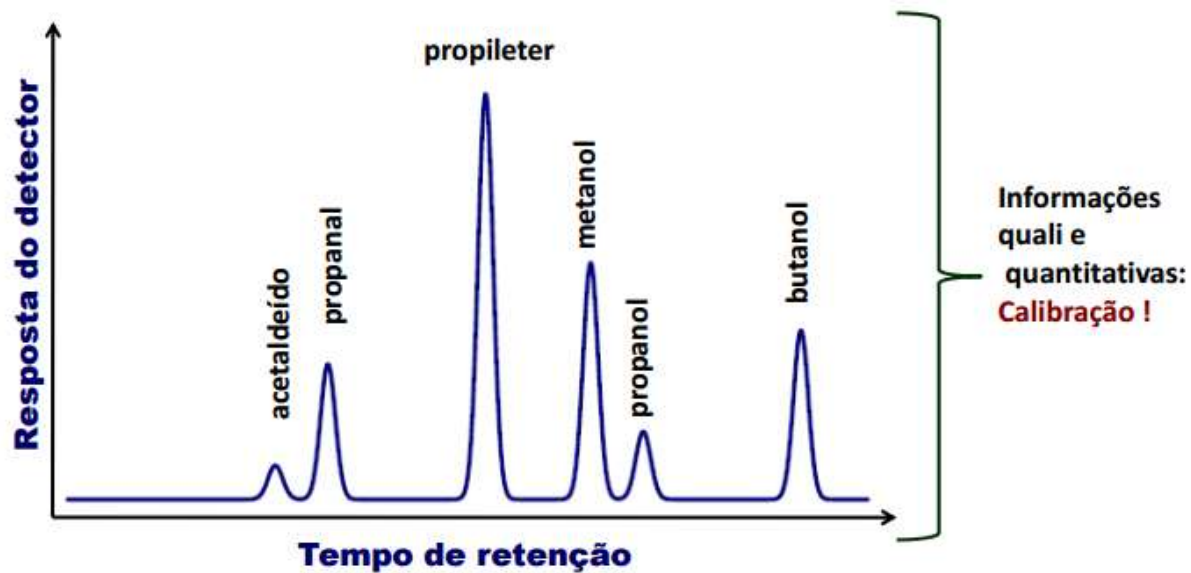
**Capilar**

**MAIS USADA**  
- menor capacidade de amostra  
- melhor resolução



# O CROMATOGRAMA NA CG

Medida em função do tempo → CROMATOGRAMA



Diferentes espécies → SAEM DA COLUNA em tempos diferentes:  $t_r$   
( $t_r$  = tempo de retenção)

# EXERCÍCIOS

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação que desde os anos 70 vem sendo cada vez mais utilizada na área de toxicologia forense. Entretanto, como toda técnica, ela tem suas limitações quanto ao seu emprego na fase da triagem. A princípio, para ser passível de análise por cromatografia gasosa, uma substância precisa.

- A) Se degradar nas temperaturas do injetor
- B) Se volatilizar nas temperaturas operacionais
- C) Não conter nitrogênio na sua estrutura química
- D) Não interagir com a fase estacionária
- E) Ser volátil e estável a temperatura ambiente.

# EXERCÍCIOS

Na cromatografia a fase fixa de uma coluna ou placa é chamada de fase estacionária e o solvente, que irá se mover através desta fase é o chamado eluente ou fase móvel.

A diferentes interações entre as substâncias e as fases fixas e móveis, irão fazer com que estas apresentem diferentes valores de fator de retenção ( $R_f$ ). De acordo com esta informação e com base na representação de uma placa cromatográfica a seguir, mostre qual substância (S1, S2 e S3) possui uma maior afinidade pela fase móvel e qual apresenta uma maior afinidade pela fase estacionária.



# EXERCÍCIOS

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é uma das técnicas empregadas nas análises toxicológicas. Indique a alternativa que **NÃO** se apresenta como vantagem na aquisição deste equipamento.

- A) a versatilidade
- B) a alta resolução
- C) a boa sensibilidade
- D) os resultados qualitativos
- E) o baixo custo de aquisição do equipamento



# EXERCÍCIOS

Na obtenção de álcool benzílico e ácido benzoico através da reação de Cannizzaro, condensação de benzaldeído em meio básico, o benzaldeído deve estar isento de ácido benzoico (impureza gerada pela oxidação do benzaldeído). A CCD de sílica gel do benzaldeído impuro apresenta duas manchas distintas quando o eluente é tetracloreto de carbono. Qual substância tem maior  $R_f$ , benzaldeído ou ácido benzoico? Justifique.

