

# Cromatografia

## um breve ensaio

Ana Luiza G. Degani  
Quezia B. Cass  
Paulo C. Vieira

**A seção "Atualidades em química" procura apresentar assuntos que mostrem como a química é uma ciência viva, seja com relação a novas descobertas, seja no que diz respeito à sempre necessária redefinição de conceitos.**

**Este artigo apresenta os conceitos básicos da cromatografia. Os diferentes tipos de cromatografia são descritos e classificados considerando-se a forma física do sistema cromatográfico empregado, a fase móvel/estacionária utilizada ou o modo de separação. Especial ênfase é dada à cromatografia em camada delgada, à cromatografia líquida clássica e de alta eficiência e à cromatografia gasosa de alta resolução.**

► cromatografia, sílica, fase móvel, fase estacionária ◀

**A** cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a *fase móvel* e a *fase estacionária*. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação.

O termo cromatografia foi primeiramente empregado em 1906 e sua utilização é atribuída a um botânico russo ao descrever suas experiências na separação dos componentes de extratos de folhas. Nesse estudo, a passagem de éter de petróleo (fase móvel) através de uma coluna de vidro preenchida com carbonato de cálcio (fase estacionária), à qual se adicionou o extrato, levou à separação dos componentes

em faixas coloridas. Este é provavelmente o motivo pelo qual a técnica é conhecida como cromatografia (*chrom* = cor e *graphie* = escrita), podendo levar à errônea idéia de que o processo seja dependente da cor.

Apesar deste estudo e de outros anteriores, que também poderiam ser considerados precursores do uso dessa técnica, a cromatografia foi praticamente ignorada até a década de 30, quando foi redescoberta. A partir daí, diversos trabalhos na área possibilitaram seu aperfeiçoamento e, em conjunto com os avanços tecnológicos, levaram-na a um elevado grau de sofisticação, o qual resultou no seu grande potencial de aplicação em muitas áreas.

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de

compostos, separando-se as substâncias indesejáveis e para a separação dos componentes de uma mistura.

As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se diversos critérios, sendo alguns deles listados abaixo:

### 1. Classificação pela forma física do sistema cromatográfico

Em relação à forma física do sistema, a cromatografia pode ser subdividida em *cromatografia em coluna* e *cromatografia planar*. Enquanto a cromatografia planar resume-se à cromatografia em papel (CP), à cromatografia por centrifugação (Chromatotron) e à cromatografia em camada delgada (CCD), são diversos os tipos de cromatografia em coluna, os quais serão mais bem compreendidos quando classificados por outro critério.

### 2. Classificação pela fase móvel empregada

Em se tratando da fase móvel, são três os tipos de cromatografia: a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida e a cromatografia supercrítica (CSC), usando-se na última um vapor pressurizado, acima de sua temperatura crítica. A cromatografia líquida apresenta uma importante subdivisão: a cromatografia líquida clássica (CLC), na qual a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual se utilizam fases estacionárias de partículas menores, sendo necessário o uso de uma bomba de alta pressão para a eluição da fase móvel. A CLAE foi inicialmente denominada cromatografia líquida de alta pressão, mas sua atual designação mostra-se mais

adequada. No caso de fases móveis gasosas, separações podem ser obtidas por cromatografia gasosa (CG) e por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR). A diferença entre os dois tipos está na coluna. Enquanto na CGAR são utilizadas colunas capilares, nas quais a fase estacionária é um filme depositado na mesma, a CG utiliza colunas de maior diâmetro empacotadas com a fase estacionária.

### 3. Classificação pela fase estacionária utilizada

Quanto à fase estacionária, distingue-se entre fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. No caso da fase estacionária ser constituída por um líquido, este pode estar simplesmente adsorvido sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre ele. Suportes modificados são considerados separadamente, como fases quimicamente ligadas, por normalmente diferirem dos outros dois em seus mecanismos de separação.

### 4. Classificação pelo modo de separação

Por este critério, separações cromatográficas se devem à adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou misturas desses mecanismos.

Para se ter uma visão mais ampla dos diferentes tipos de cromatografia, os mesmos estão dispostos no diagrama da Figura 1.

Dentre os vários tipos de cromatografia, especial ênfase será dada à cromatografia em camada delgada (CCD), à cromatografia líquida clássica (CLAE) e à cromatografia gasosa de alta eficiência (CGAR) e à cromatografia

tografia gasosa de alta resolução (CGAR).

### Cromatografia planar

A cromatografia em papel (CP) é uma técnica de partição líquido-líquido, estando um deles fixado a um suporte sólido. Baseia-se na diferença de solubilidade das substâncias em questão entre duas fases imiscíveis, sendo geralmente a água um dos líquidos. O solvente 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, sendo largamente usado em bioquímica.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido-sólido. Nesse caso, a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária.

A Fig. 2 mostra um cromatograma obtido por CCD no qual se pode observar a diferença de afinidade das substâncias 1 e 2 pela fase estacionária, sendo a substância 1 mais retida que a 2. Por ser um método simples, rápido, visual e econômico, a CCD é a técnica predominantemente escolhida para o acompanhamento de reações orgânicas, sendo também muito utilizada para a purificação de substâncias e para a identificação de frações coletadas em cromatografia líquida clássica.

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.

A CCD pode ser usada tanto na escala analítica quanto na preparativa. Normalmente as placas utilizadas são de vidro, com es-

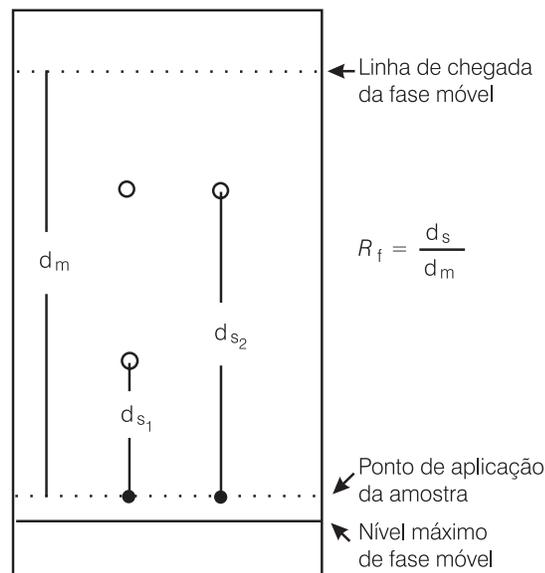


Figura 2: Esquemática de um cromatograma obtido por CCD.

pressão de 3 a 4 mm. Placas analíticas usualmente têm 10 cm x 2,5 cm e preparativas 20 cm x 20 cm.

A sílica gel é a fase estacionária mais utilizada, sendo seguida pela alumina, pela terra diatomácea e pela celulose. Para a preparação das placas, faz-se uma suspensão do adsorvente em água, sendo a mesma depositada sobre a placa manualmente ou com o auxílio de um espalhador. Após a deposição, deixa-se a placa secar ao ar. A etapa final da preparação da placa é sua ativação. A sílica, por exemplo, é ativada a 105-110 °C por 30 a 60 minutos. A espessura da camada de sílica a ser depositada é de 0,25 mm para placas analíticas e de 1,0 mm para placas preparativas. Na preparação de placas preparativas, costuma-se adicionar sulfato de cálcio para melhorar a adesão à placa de vidro. No mercado existem placas analíticas e preparativas pré-fabricadas, as quais apresentam a fase estacionária depositada sobre uma lâmina de material plástico ou de alumínio, sendo estas de maior eficiência.

As amostras a serem analisadas por CCD devem ser aplicadas a aproximadamente 1 cm da base inferior da placa, com a ajuda de um capilar.

Após a aplicação da(s) amostra(s) sobre a placa, a mesma deve ser introduzida numa cuba contendo a fase móvel adequada. Cubas cromato-

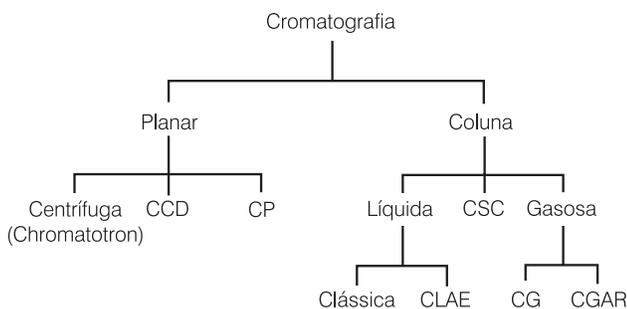


Figura 1: Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia.

gráficas geralmente são de vidro, com fundo chato, e devem ter suas paredes laterais internas recobertas com papel de filtro, para facilitar sua saturação com os vapores do solvente.

A escolha da fase móvel, que geralmente é constituída por um ou mais solventes, não é tarefa simples. No entanto, uma vez que as fases estacionárias mais usadas são extremamente polares, não devem ser utilizados solventes pouco polares, que não removeriam os compostos do ponto de aplicação, nem solventes muito polares, capazes de arrastar os componentes da amostra até o topo da placa. Em vista disso, melhores resultados são obtidos com misturas de solventes, de modo a se obter uma polaridade média em relação à polaridade dos componentes da amostra.

A placa é deixada na cuba, onde o solvente irá subir por capilaridade, até que ele esteja a aproximadamente 2 cm da extremidade superior. Ao ascender, o solvente irá arrastar mais os compostos menos adsorvidos na fase estacionária, separando-os dos mais adsorvidos.

A linha de chegada da fase móvel deve ser marcada e a placa deve estar seca. Como a maioria dos compostos orgânicos é incolor, faz-se necessária a utilização de um processo de revelação para que se possa analisar o resultado.

Para a revelação de placas de CCD, existem processos destrutivos e não destrutivos. Os métodos não destrutivos mais utilizados são a utilização de 1) placas onde a fase estacionária é fluorescente ou 2) iodo. O primeiro baseia-se na utilização de substâncias fluorescentes misturadas à sílica quando da preparação das placas, possibilitando a revelação dos compostos em câmaras de luz ultravioleta. O segundo vale-se do fato de que o iodo complexa-se com compostos insaturados, de modo que placas que os contenham, ao serem colocadas em uma câmara contendo cristais de iodo, apresentarão pontos amarronzados.

Os processos destrutivos consistem na oxidação dos compostos sobre a placa, pulverizando-os com solução aquosa de um oxidante orgânico e/ou

um ácido mineral, submetendo-se a placa a altas temperaturas ( $\sim 110^\circ\text{C}$ ) por alguns minutos. Os compostos orgânicos oxidados serão revelados na forma de pontos escuros.

## Cromatografia em coluna

### Cromatografia líquida clássica

Esta técnica é muito utilizada para isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas. As fases estacionárias mais utilizadas são sílica e alumina, entretanto estes adsorventes podem servir simplesmente 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.

Esses suportes são acondicionados em tubos cilíndricos geralmente de vidro, de diâmetros variados, os quais possuem uma torneira em sua extremidade inferior. A Fig. 3 é uma ilustração de uma coluna cromatográfica empacotada com sílica, sendo mostrados seus demais constituintes.

Os adsorventes possuem partículas na faixa de 60-230 mesh, de modo a possibilitar um fluxo razoável do solvente através da coluna.

O uso de sílica de partícula menor (230-400 mesh) como adsorvente para essas colunas requer a utilização de um sistema de bombeamento para o

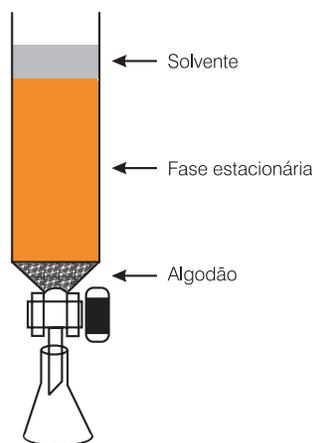


Figura 3: Ilustração de uma coluna cromatográfica.

empacotamento e eluição, sendo conhecido como Cromatografia Flash.

A principal etapa ao se utilizar essa técnica é o empacotamento, o qual, entre outros fatores, definirá a eficiência da separação. Enquanto a alumina é empacotada em sua forma original, a sílica deve sê-lo na forma de suspensão.

À coluna adiciona-se uma pequena quantidade de solvente e deposita-se na sua extremidade inferior um chumaço de algodão com espessura de aproximadamente 0,5 cm para impedir a passagem de partículas da fase estacionária. A adição de sílica deve ser feita com a torneira semi-aberta. O adsorvente é adicionado lentamente à coluna fixada na posição vertical, batendo-se continuamente ao longo da mesma para que todo o ar seja expulso, de modo a se obter uma compactação uniforme. A existência de ar entre as partículas leva à formação de canais na coluna, os quais alargam as bandas eluídas.

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.

Após o empacotamento, é conveniente que se passe uma certa quantidade do eluente (duas a três vezes o volume da coluna) a ser utilizado através da coluna antes da introdução da amostra. Esta é adicionada à coluna com o auxílio de uma pipeta no momento em que o nível do eluente esteja o mais próximo possível do adsorvente. Esse procedimento ameniza o alargamento das bandas a serem eluídas. Tendo a amostra penetrado no adsorvente, o eluente é então adicionado cuidadosa e continuamente.

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.

O volume das frações a serem recolhidas é função da quantidade de amostra e do grau de dificuldade da

separação. Para análise das mesmas, recorre-se a alguma técnica auxiliar, usualmente CCD.

Em vista de que geralmente algumas partículas da amostra permanecem irreversivelmente adsorvidas à fase estacionária, a cada separação é necessário um tratamento para a recuperação do adsorvente.

### Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O grande avanço na cromatografia em coluna foi o desenvolvimento e a utilização 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, devido a sua baixa permeabilidade. A Fig. 4 mostra um equipamento típico de CLAE.

As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e desgasificadas antes do uso.

A bomba deve proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado.

As válvulas de injeção usadas possuem uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, uma para o

preenchimento da alça e outra para sua liberação para a coluna. Existem alças de diversos volumes, sendo utilizadas geralmente alças na faixa de 5-50  $\mu$ L para injeções analíticas e 0,5-2 mL para preparativas.

As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno de 25-30 cm. Essas colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação.

O detector 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 à luz plano-polarizada.

O registro de dados pode ser feito através de um registrador, um integrador ou um microcomputador.

A Fig. 5 ilustra uma separação enantiomérica por CLAE.

A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacio-

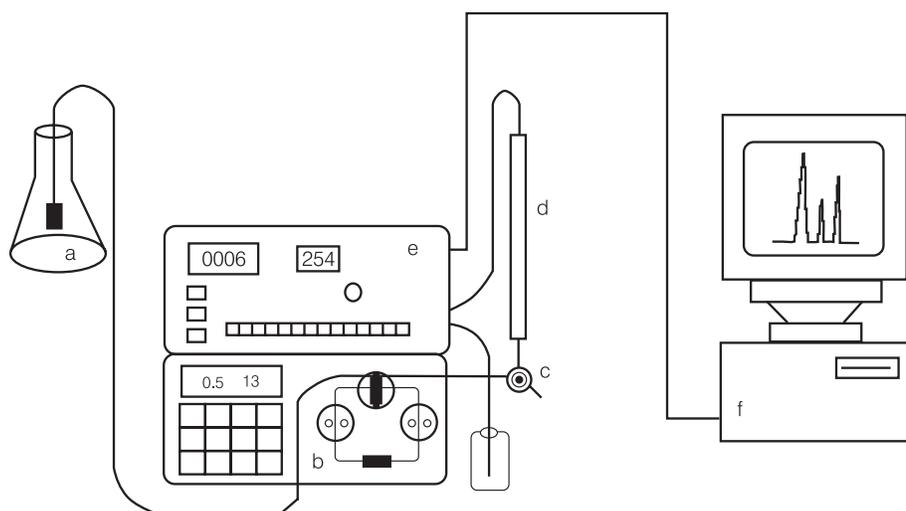


Figura 4: Equipamento básico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador.

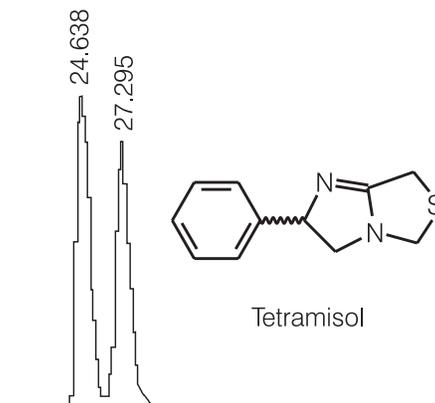


Figura 5: Cromatograma mostrando a separação dos enantiômeros do tetramisol, princípio ativo de vários medicamentos usados para ascariíase.

nárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Tem sido utilizada em várias áreas da ciência, no acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, feromônios, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos, dentre tantas outras aplicações.

As separações em CLAE podem se dar por adsorção, partição ou ambos. O suporte mais comumente utilizado é a sílica. O uso de fases estacionárias líquidas adsorvidas a um suporte não tem grande aplicação devido à perda de fase estacionária, mas o uso de suportes modificados, os quais foram desenvolvidos como consequência do problema acima, possibilita a produção de uma imensa variedade de colunas com diferentes propriedades e tipos de seletividade. As fases assim obtidas são chamadas de quimicamente ligadas.

Essas fases, dependendo da modificação feita ao suporte, podem atuar no modo normal, reverso ou ambos. Na cromatografia em fase normal, a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e em fase reversa, a fase móvel é mais polar.

Separções analíticas são predominantemente realizadas em fase reversa, sendo a fase C18 (octadecil-sílica) a mais usada, ao passo que são preferidas fases que atuam no modo

normal para fins preparativos, em vista de que separações no modo reverso utilizam fases móveis aquosas.

Entre as fases quimicamente ligadas, merecido destaque deve ser dado às fases estacionárias quirais, as quais possibilitam a separação direta de enantiômeros. Para tanto, é necessária a presença de um seletor quiral como parte integrante da fase estacionária.

### Cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR)

Em contraste à CLAE, o principal mecanismo de separação da cromatografia gasosa está baseado na partição dos componentes de uma amostra entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida. A utilização de fases estacionárias sólidas, as quais levariam à separação por adsorção, apresenta poucas aplicações.

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 ( $10^{-9}$ - $10^{-12}$  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 derivadas quimicamente. Pode ser utilizada para separações preparativas apenas na faixa de microgramas a miligramas, não sendo muito empregada para esse fim. A Fig.

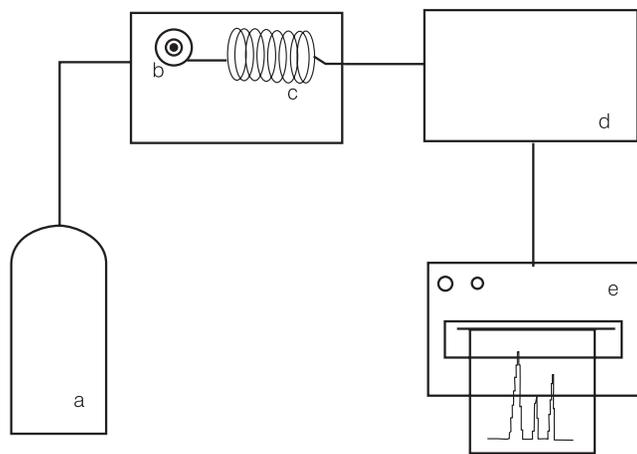


Figura 6: Componentes básicos de um cromatógrafo gasoso. a) cilindro do gás de arraste mantido sob alta pressão; b) injetor; c) coluna; d) detector e e) registrador.

6 mostra os componentes básicos de um cromatógrafo gasoso.

Como dito anteriormente, a diferença entre CG e CGAR está na coluna. Colunas de CGAR são maiores em comprimento, menores em diâmetro, possuem a fase líquida como um filme aplicado diretamente às paredes do tubo da coluna e são mais eficientes.

Essas colunas são tubos longos de metais como aço ou cobre, vidro ou teflon. Colunas de CG têm diâmetro de cerca de 3 mm e comprimento em torno de 3 m, ao passo que colunas de CGAR têm diâmetro na faixa de 0,15-0,75 mm e comprimentos variados, usualmente entre 10 m e 100 m.

Os gases utilizados como fase móvel devem ter alta pureza e ser inertes em relação à fase estacionária. Hidrogênio, nitrogênio e hélio são os mais usados.

A injeção da amostra é feita através de microseringas ou válvulas semelhantes às utilizadas em CLAE.

Os detectores de maior aplicação são o detector por ionização em chama e o detector de condutividade térmica. Os dados podem ser obtidos através de um registrador potenciométrico, um integrador ou um microcomputador, sendo as amostras identificadas por seus tempos de retenção.

Nesses equipamentos é necessário o controle da temperatura do injetor, da coluna e do detector, as quais são mantidas por termostatos. Como a temperatura é um fator extremamente importante, grande parte das análises por cromatografia gasosa é feita com programação de temperatura, obten-

do-se melhor separação com picos mais simétricos em menor tempo.

Para o empacotamento de colunas de CG, geralmente empregam-se terras diatomáceas como suporte. A escolha da fase estacionária é de fundamental importância, sendo ela o

componente crítico da coluna. As fases estacionárias podem ser polares, apolares ou quirais. Fases polares são baseadas em polietileno glicol puro ou modificado e apolares em metilsiloxano puro ou modificado. As fases quirais mais comuns são compostas

de ciclodextrinas.

Atualmente, espectrômetros de massa têm sido acoplados a equipamentos de cromatografia gasosa, possibilitando a identificação imediata das substâncias presentes na amostra.

**Ana Luiza G. Degani**, mestre em química orgânica, é doutoranda na UFSCar. **Quezila B. Cass**, bacharel em farmácia pela UFPE e Ph.D. em química pela City University, Londres, é docente do Departamento de Química da UFSCar, em São Carlos – SP. **Paulo C. Vieira**, licenciado pelo DQ-FFCL-USP, em Ribeirão Preto, doutor em ciências (química orgânica) pela USP, é docente do Departamento de Química da UFSCar, em São Carlos – SP.

### Para saber mais

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 5ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1993.

LOUGH, W.J. e WAINER, I.W. *High Performance liquid chromatography: fundamental principles and practice*. Blackie Academic and Professional, 1995.

CHAVES, M.H.; Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "Química Orgânica". *Química Nova*, v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.

ANDRADE, J.B.; PINHEIRO, H.L.C.; LOPES, W.A.; MARTINS, S.; AMORIM, A.M.M. e BRANDÃO, A.M. Determinação de cafeína em bebidas através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). *Química Nova*, v. 18, n. 4, p. 379-381, 1995.

NETO, F.R.A.; CGAR em análise de resíduos. *Química Nova*, v. 18, n. 1, p. 65-67, 1995.