



Isolamento e Purificação de Biomoléculas



CFBio 2015
Emanuel Carrilho



MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EM FASE LÍQUIDA

1. Definição
2. Histórico
3. Classificação
 - 3.a. Planar vs coluna
 - 3.b. Modos de desenvolvimento
 - 3.c. Mecanismos de separação
4. Coeficiente de partição
5. Fator de retenção, k
6. Fator de separação, α
7. Teoria cinética *versus* Teoria dos pratos
8. Seqüência de eventos (pratos)
9. Eficiência da coluna, N e H
 - 9.a. Gaussiana
10. Alargamento das bandas
 - 10.a. Equação de van Deemter
 - 10.b. Efeitos extra coluna
11. Resolução; R_s em função das condições

DEFINIÇÃO

A cromatografia é um método físico-químico que permite a separação de componentes de uma mistura, através da distribuição destes componentes em duas fases, que estão em contato íntimo.

Em todas as separações cromatográficas, a amostra é dissolvida numa **fase móvel** (líquido, gás ou fluido supercrítico). A fase móvel é então forçada através de uma fase imiscível, **fase estacionária**, a qual é fixa na coluna ou em uma superfície sólida.

Os componentes que são fortemente retidos pela fase estacionária movem devagar com o fluxo da fase móvel. Em contraste, os componentes que interagem fracamente com a fase estacionária movem mais rapidamente. Como consequência dessas migrações diferenciadas, os vários componentes da mistura se separam em bandas discretas e podem ser analisados qualitativamente ou quantitativamente.

HISTÓRICO - primórdios

Processos envolvendo migração diferencial já eram conhecidos.

Paralelo ao trabalho de Tswett, **REED**, na Inglaterra, e **DAY**, nos Estados Unidos, aplicaram **colunas contendo sólidos** para a separação de sais orgânicos e amostras de petróleo, respectivamente.

Antes disso, **RUNGE** descreveu os "desenhos" feitos por misturas de sais e por tintas que foram colocadas no centro de um **papel** de filtro e depois espalhadas pela passagem de um solvente, enquanto **SCHOENBEIN** fez experiências similares com tiras de papel mergulhadas em solventes.

O uso de sólidos de **camada delgada sobre vidro**, no lugar de papel, para o desenvolvimento circular de misturas de sais inorgânicos foi experimentado por **BEYERINCK**, em 1889.

-
-
-

HISTÓRICO - época moderna

A época moderna da cromatografia foi iniciada na **década de 30**.

KUHN e LEDERER redescobriam e aperfeiçoavam a **cromatografia de coluna**, repetindo as experiências de Tswett, separando e identificando as xantofilas da gema do ovo, usando uma coluna recheada com carbonato de cálcio pulverizado e éter de petróleo como fase móvel.

HISTÓRICO - década de 1940

1941: **MARTIN** e **SYNGE** (prêmio Nobel de 1952) descreveram a **cromatografia por partição** (cromatografia líquido/líquido), aplicaram o conceito de altura equivalente a um prato teórico à cromatografia, e anteciparam o surgimento de duas cromatografias: a gasosa, e a de alta eficiência.

MARTIN, **CONSDEN** e **GORDON**: reintroduziram a **cromatografia de papel**; **MARTIN** e **HOWARD**: desenvolveram a **cromatografia líquida de fase reversa**; **MARTIN** e **JAMES**: atualizaram a **cromatografia gás/líquido**.

Outros eventos importantes:

1938: **IZMAÏLOV** e **SCHRAÏBER** reintroduziram a **cromatografia de camada delgada** para a análise de produtos farmacêuticos, mas não foi usada até o desenvolvimento, por **KIRCHNER e col.**, do método de aderir o sólido ao suporte, e por **STAHL**, do método de preparar as placas com reprodutibilidade.

HISTÓRICO - década de 1940

1941: **HESSE** descreveu pela primeira vez a **cromatografia gás/sólido**, na separação de ácidos graxos, a 100°C, arrastando-os sobre sílica, com dióxido de carbono.

CREMER e PRIOR: primeiros a descrever um **cromatógrafo a gás completo**.

PRETORIUS e col., e McWILLIANS e DEWAR: **detector por ionização em chama**, ampliando a sensibilidade do método cromatográfico.

GOLAY: introdução das **colunas capilares**, tornando GC o método analítico mais usado no mundo (o **número de cromatógrafos** atualmente em uso no mundo é estimado em **200.000**).

HISTÓRICO - anos 50

1951: **LERMAN e col.** realizaram as primeiras experiências em **cromatografia por bioafinidade**, separando anticorpos em coluna recheada com celulose, contendo antígenos apropriados. **ANFINSEN e col.** aperfeiçoaram a técnica com o uso de gel de dextrano contendo grupos específicos quimicamente ligados.

ADAMS e HOLMES: síntese das primeiras **resinas de troca iônica**, baseadas em, fenil e formaldeído para cátions.

COHN utilizou **resinas de poliestireno-divinilbenzeno**, para a separação de aminoácidos, e **MOORE e STEIN** aperfeiçoaram o método utilizando **bombas peristálticas** para empurrar a fase móvel e um **fotômetro** para a detecção (**derivatização pós-coluna dos aa com ninidrina**).

1959: **HAMILTON e ANDREWS** modificaram o sistema para análises de aa, introduzindo a **bomba tipo pistão**, similar às usadas hoje na cromatografia líquida de alta eficiência.

HISTÓRICO - anos 60

KARR e col., JENTOFT e GOUW, HUBER e HULSMAN, SNYDER, KIRKLAND aperfeiçoaram os sistemas de bombeamento e detecção para cromatografia líquida, operando a fase móvel sob pressão, e com métodos de detecção sensíveis, possibilitaram análises de rapidez comparável às da cromatografia gasosa.

HALASZ e HORVATH: desenvolvimento dos enchimentos para cromatografia líquida, inicialmente com os peliculares (partículas superficialmente porosas), e posteriormente as partículas completamente porosas de pequeno diâmetro (10, 5 e 3 μm). NICKLESS e col. desenvolvem as fases estacionárias contendo grupos alquila quimicamente ligados ao suporte permitindo a aplicação da cromatografia por fase reversa, SCOTT e NOVOTNY, introduziram as colunas de pequeno diâmetro (as "microbores" e capilares recheadas).

HISTÓRICO - anos 60

1962: **KLESPER**, seguido por **GOUW** e **JENTOFT** utilizaram com sucesso um fluido supercrítico como fase móvel em um cromatógrafo a gás modificado. Somente em 1983, o primeiro instrumento para SCF foi comercializado.

PORATH e **FLODIN**: introduziram a cromatografia por exclusão como o desenvolvimento do gel de dextrano entrecruzado.

lista de 12 prêmios Nobel, de 1937 a 1972 com trabalhos envolvendo cromatografia

-
-
-

CLASSIFICAÇÃO

Vários critérios são usados para a classificação das diferentes modalidades de cromatografia; em geral são relacionados com a técnica empregada, o mecanismo de separação e o tipo de fases utilizado.

A **forma física** do sistema define a técnica: a fase estacionária pode ser colocada em um tubo cilíndrico (**cromatografia em coluna**), ou disposta sobre uma superfície planar (**cromatografia planar**).

CLASSIFICAÇÃO

CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO

FORMA FÍSICA

PLANAR

COLUNA

preparativa: 5-30 mm
analítica: 2-5 mm
microdiâmetro: < 2 mm

FASE MÓVEL

LÍQUIDO

GÁS

FLUIDO SUPERCRÍTICO

LÍQUIDO

FASE ESTACIONÁRIA

LÍQUIDO

SÓLIDO

FASE LIGADA

LÍQUIDO

SÓLIDO

FASE LIGADA

SÓLIDO

FASE LIGADA

LÍQUIDO

SÓLIDO

EXCLUSÃO

FASE LIGADA

TROCA IÔNICA

BIO AFINIDADE

TIPO DE CROMATOGRAFIA
(uso comum)

CP

CCD (TLC)

CCD (HPTLC)

CGL

CGS (GC)

CGFL

CSS (SFC)

CSFL

CLL

CLS (HPLC fase normal)

CE

CLFL (HPLC fase reversa)

CTI

CB

MECANISMO DE SEPARAÇÃO

F2 Absorção Partição

F1 F1/F2

F2 F1 Sorção Adsorção

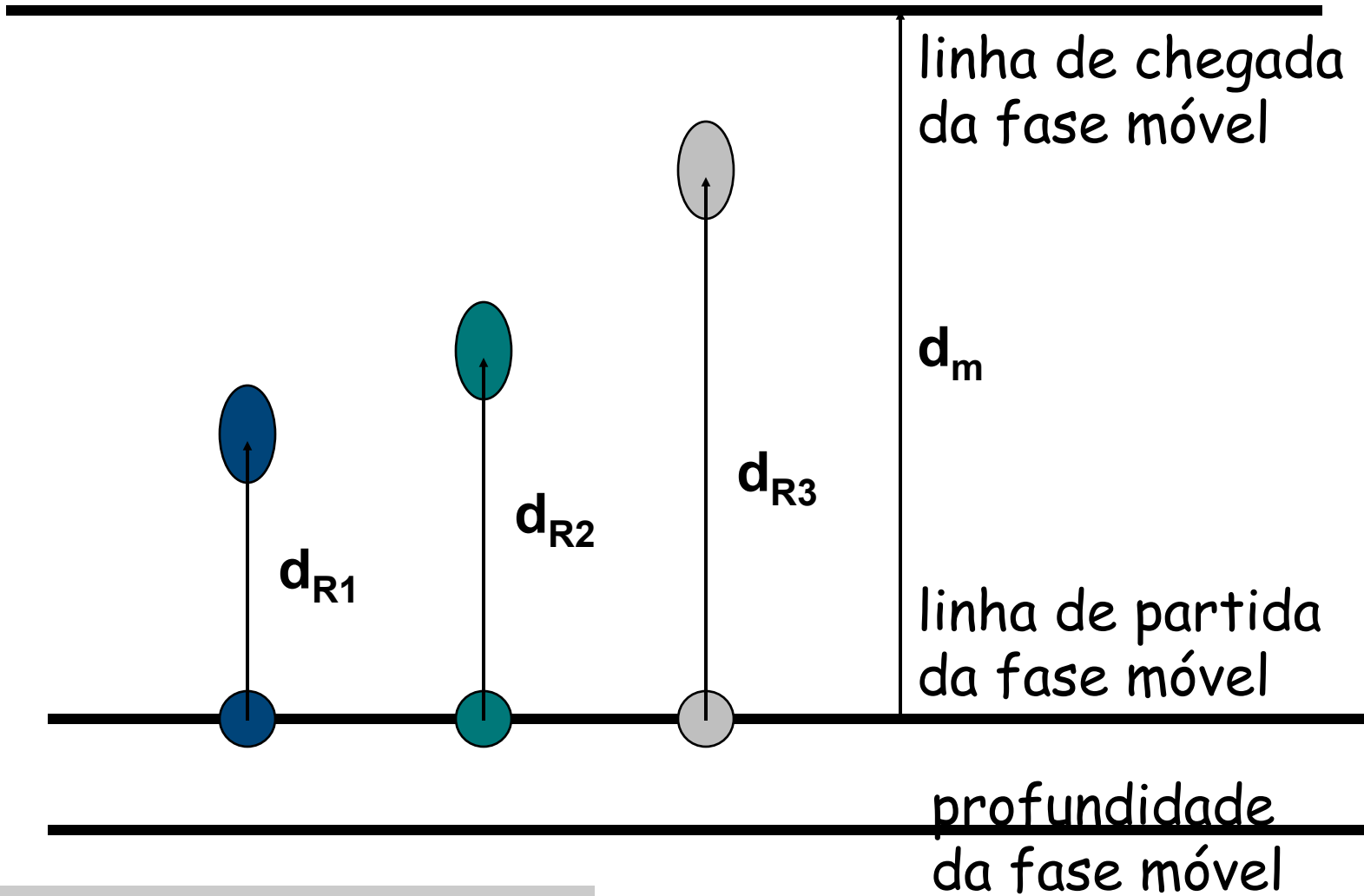
F1 F1/F2

F2

F1 M Mecânico

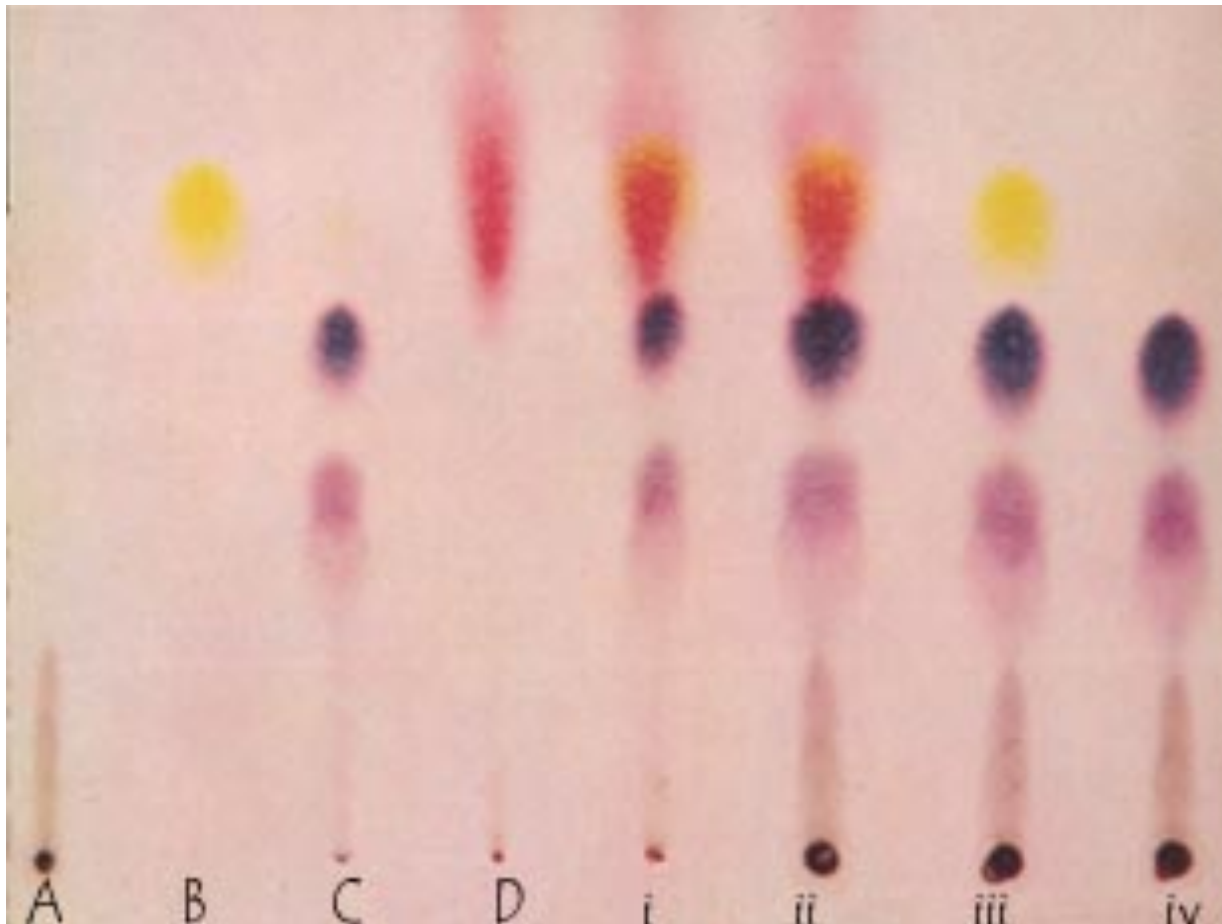
F1/F2 Q Q Químico


CROMATOGRAFIA PLANAR



-
-
-





Exemplos Cromatografia Planar



COVER STORIES: FINDING FAKES 

Remote Testing: Minilabs Offer An Affordable Chemistry-Based Approach

By Ann M. Thayer

0	0
	
Email 	Print 

Department: **Business**

News Channels: **Analytical SCENE**

Keywords: **instrumentation, analytical chemistry, counterfeit drugs, pharmaceuticals**

More On This Story

Instrumentation Firms Develop Portable Technology To Detect Counterfeit Drugs 

Remote Testing: Minilabs Offer An Affordable Chemistry-Based Approach

China Cracks Down On Fake Drugs 

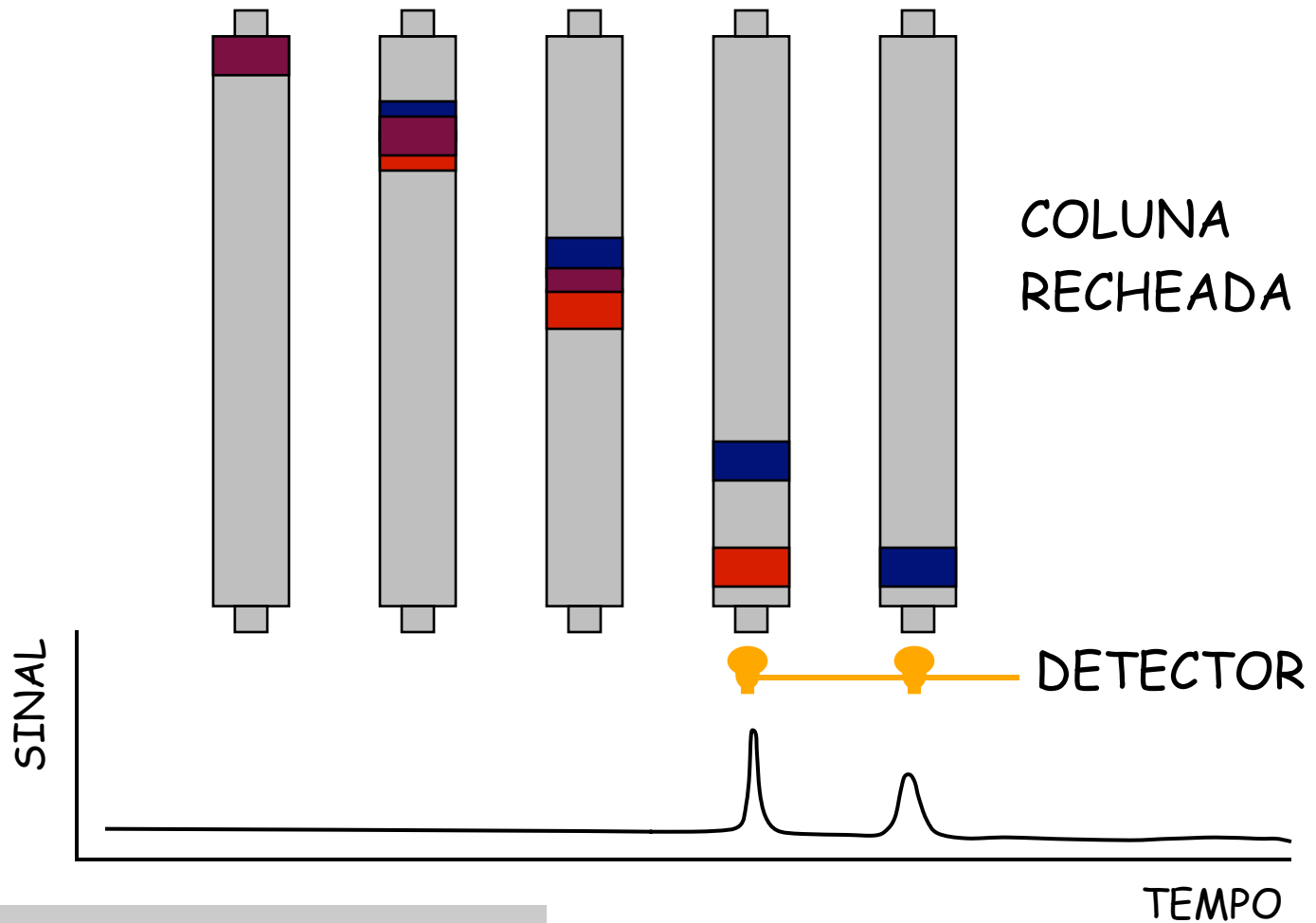
Portable and handheld analytical devices for counterfeit drug detection can cost anywhere from \$10,000 to \$50,000. To make testing accessible in developing countries where counterfeiting is widespread, the Global Pharma Health Fund has provided the wet-chemistry-based GPHF-Minilab since 1998. GPHF has been funded exclusively by Germany's Merck for the past five years. International organizations participate in programs to use and distribute the Minilabs.

Housed in two suitcases, the \$4,700 Minilab contains lab ware and reagents to run about 1,000 thin-layer chromatography (TLC) tests and at least 3,000 dye tests. Drug identity and quality can be verified, and counterfeits detected, through the kit's simple physical and chemical tests, along with available reference standards for comparison. Methods include visual inspection of dosage forms and packaging, disintegration testing to confirm formulations, color reactions to identify a drug's presence, and TLC to check drug content and potency.

The self-contained lab doesn't require special storage and can work outdoors in tropical climates. Reference standards have a shelf life of about two years, and reagents can last for at least five. Manuals provided in different languages "read more like a cooking recipe than an instruction booklet," GPHF states, and are "written in a nonscientific format and rich in illustrations." Training is also available.

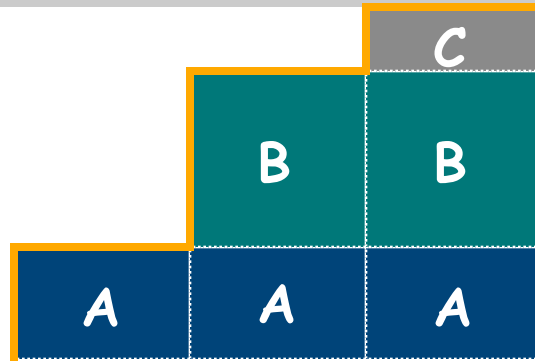
The \$3,200 TLC portion works for 58 drug compounds, and the \$1,500 dye test part covers 32. The compounds were selected "on the basis of prevailing prescription practices, public health interest, and existing counterfeit case reports," according to GPHF. Its list includes antimicrobials, anthelmintics, antiretrovirals, antimalarials, and antituberculosis drugs.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA



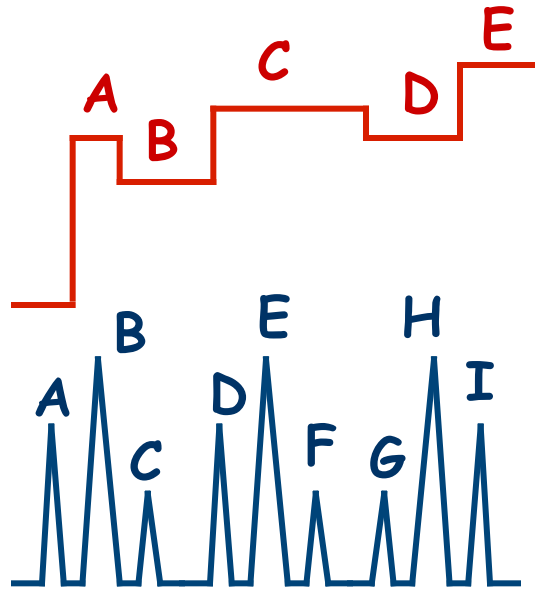
MODO DE DESENVOLVIMENTO

FRONTAL



amostra é continuamente aplicada à coluna; torna-se saturada em relação a um dado componente, que é então eluído, inicialmente na forma pura, depois em mistura

DESLOCAMENTO



preparativa; aplicação única fase móvel tem maior afinidade pela coluna e desloca componente da amostra de menor afinidade; cada componente funciona como deslocador do seguinte

ELUIÇÃO

analítica; aplicação única

TEMPO

OUTRAS CLASSIFICAÇÕES

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM COLUNA:

CLÁSSICA: colunas de vidro, sob pressão atmosférica, vazão da fase móvel por ação da gravidade

ALTA EFICIÊNCIA: colunas metálicas, ou capilares, sob pressões elevadas

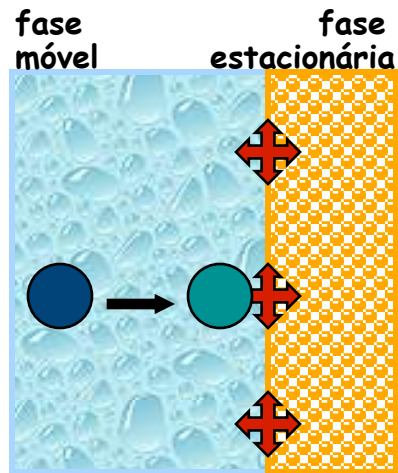
POLARIDADE RELATIVA DAS FASES:

FASE NORMAL: fase estacionária polar, fase móvel apolar

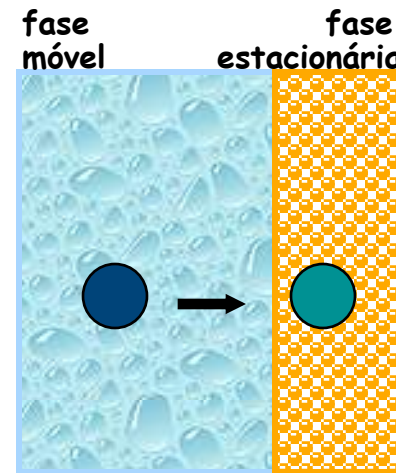
FASE REVERSA: (inverso) fase estacionária apolar, fase móvel polar

MECANISMOS DE SEPARAÇÃO físicos

ADSORÇÃO

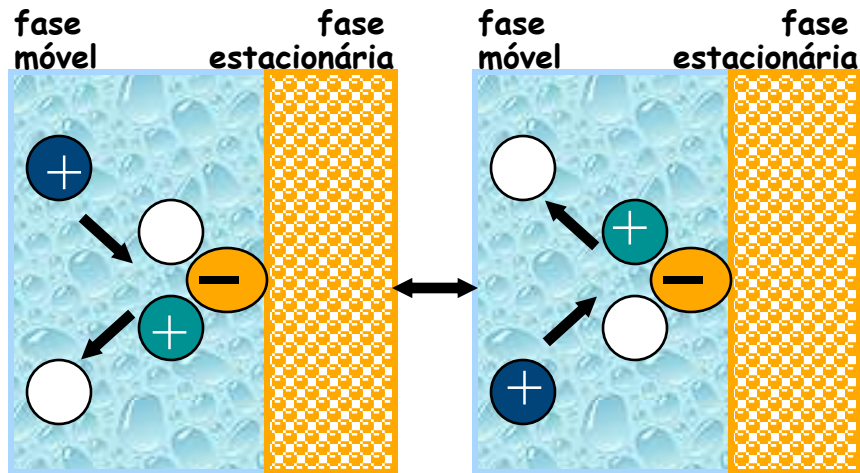


PARTIÇÃO/ABSORÇÃO

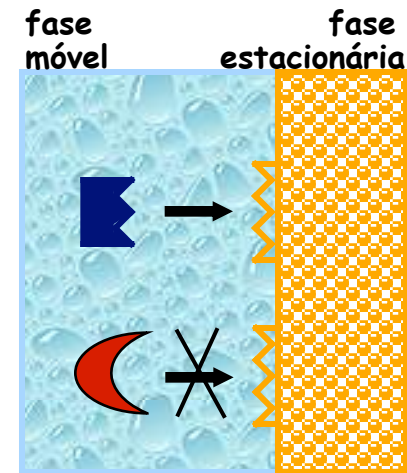


MECANISMOS DE SEPARAÇÃO químicos

TROCA IÔNICA



BIOAFINIDADE

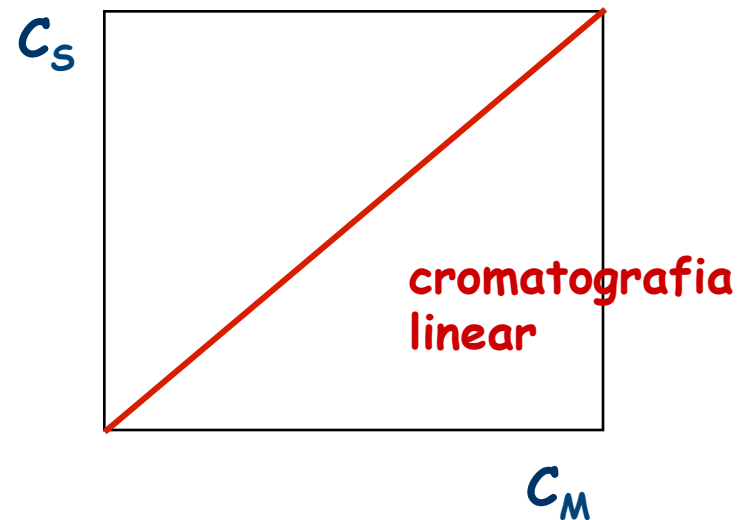


COEFICIENTE DE PARTIÇÃO, K

$A_{\text{móvel}}$ \longleftrightarrow $A_{\text{estacionária}}$

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

isoterma de distribuição



RELAÇÃO ENTRE TEMPO DE RETENÇÃO E COEFICIENTE DE PARTIÇÃO

velocidade linear média do soluto

$$v = \frac{L}{t_R}$$

velocidade linear média da fase móvel

$$\mu = \frac{L}{t_0}$$

$v = \mu \times$ fração de tempo do soluto na fase móvel

moles do soluto na fase móvel

$$v = \mu \times \frac{\text{moles do soluto na fase móvel}}{\text{número total de moles}}$$

$$v = u \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} = u \frac{1}{1 + C_S V_S / C_M V_M}$$

$$v = \mu \frac{1}{1 + K V_S / V_M}$$

FATOR DE RETENÇÃO, k

$$k_A = K_A \frac{V_S}{V_M}$$

$$v = \mu \frac{1}{1 + K \frac{V_S}{V_M}} = u \frac{1}{1 + k_A}$$

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_0} \frac{1}{1 + k_A}$$

$$k_A = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

FATOR DE SEPARAÇÃO, α

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad \text{onde B é o soluto mais retido}$$

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A}$$

$$\alpha = \frac{t_{RB} - t_0}{t_{RA} - t_0}$$

TEORIA DOS PRATOS vs TEORIA CINÉTICA

TEORIA DOS PRATOS

MARTIN e SYNGE: introduziram os termos número de pratos e altura equivalente a um prato

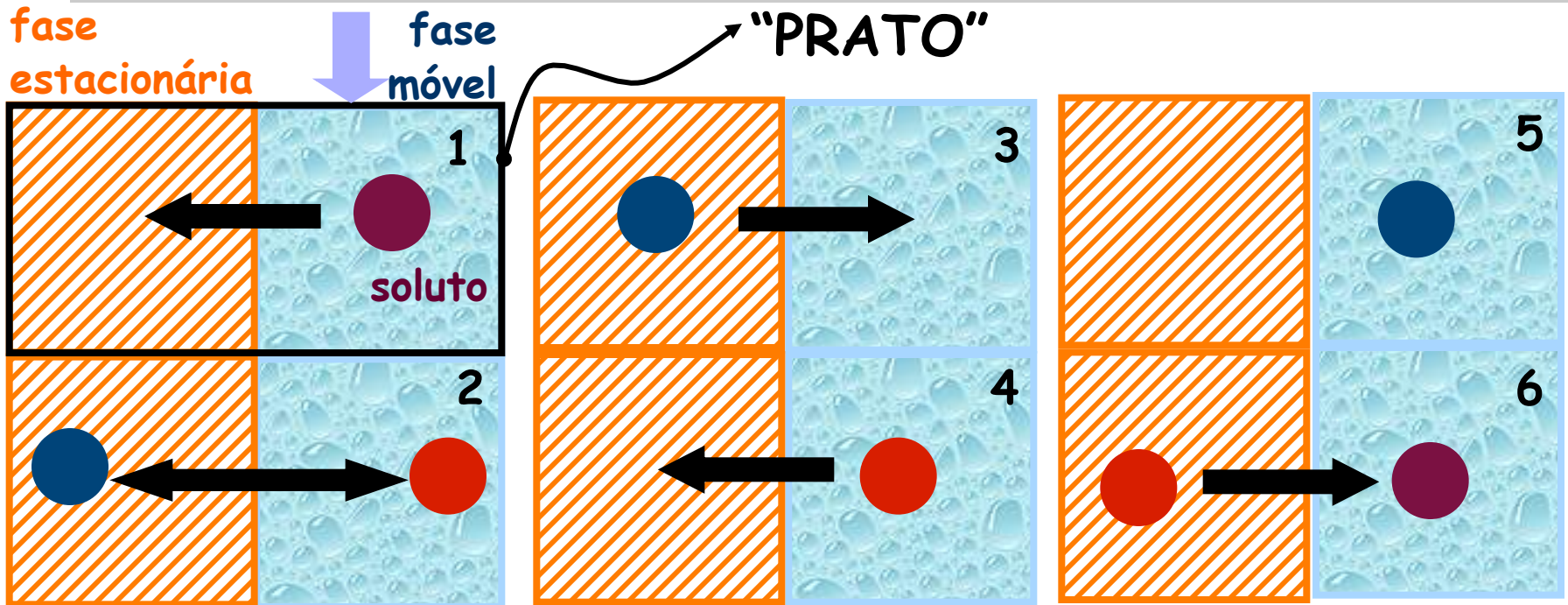
- coluna tratada em analogia a uma coluna de destilação
- explica forma Gaussiana dos picos, mas falha em explicar causas de alargamento de bandas
- abandonada em favor da teoria cinética; nomenclatura permanece

TEORIA CINÉTICA (random walk; drunk sailor)

- forma Gaussiana
- variância aditiva (processos individuais independentes):

$$\sigma_t^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \dots + \sigma_n^2$$

SEQUÊNCIA DE EVENTOS - Teoria dos Pratos



•o movimento do soluto ao longo da coluna era tratado como uma transferência de material entre uma porção da fase móvel equilibrada e a seguinte

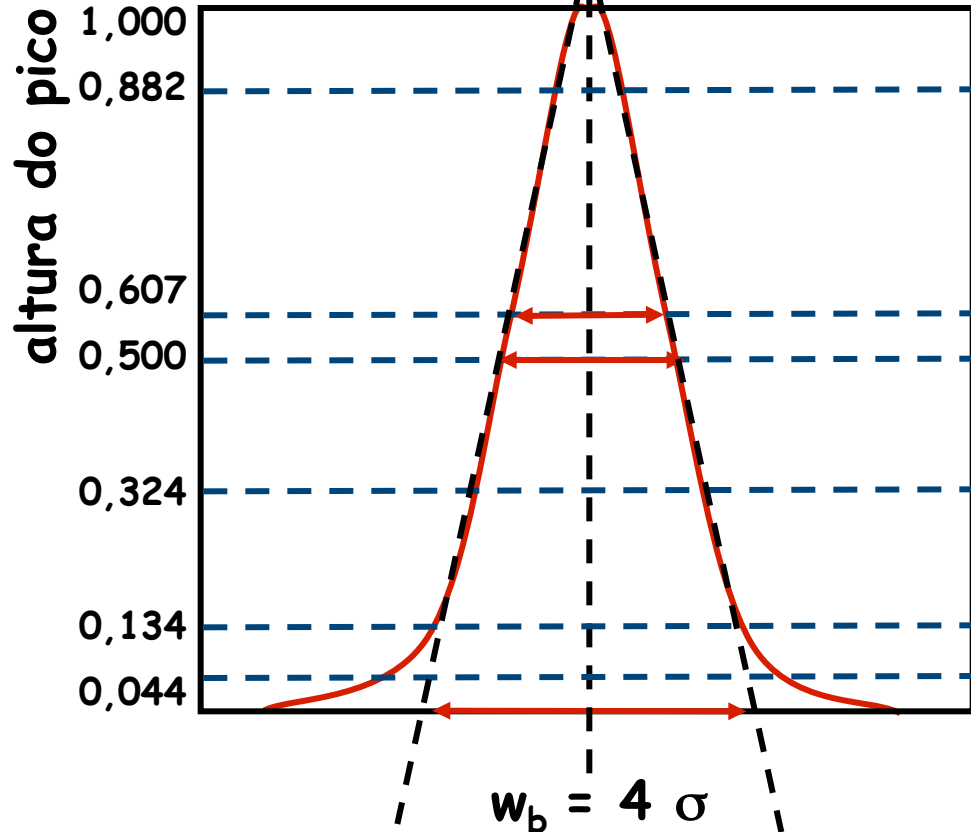
•de fato, a condição de equilíbrio nunca pode ser atingida com uma fase móvel em movimento constante

EFICIÊNCIA DA COLUNA

GAUSSIANA

tangentes ao ponto de inflexão

NÚMERO DE PRATOS



σ

$$N = 16 \left[\frac{t^2}{w_b^2} \right] = 5,54 \left[\frac{t^2}{w_h^2} \right]$$

$w_i = 2 \sigma$ (pontos de inflexão)

$w_h = 2,354 \sigma$ (meia altura)

3σ

4σ

5σ

ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO

$$H = L/N$$

-
-
-

Altura Equivalente a um Prato Teórico - HETP ou H

ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO

$$H = L/N \text{ ou } \sigma^2/L$$

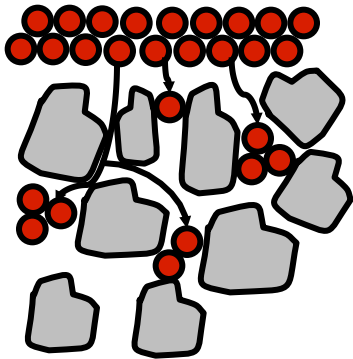
The HETP is the theoretical link between the “Plate Theory” and the “Rate Theory” as the HETP is numerically equal to the variance per unit length of the column as determined from the Rate Theory. The more efficient the column the more theoretical plates in the column the better the resolution and the smaller the HETP.

The rate theory provides an equation for the HETP in terms of the physical properties of the solute and phase system, the operating temperature and the mobile phase velocity.

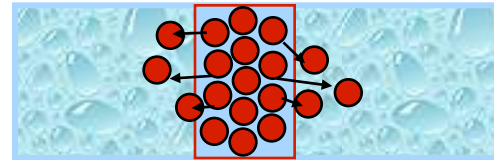
See more at: [http://www.ispe.org/glossary?term=HETP+\(Height+Equivalent+to+Theoretical+Plate\)+Testing#sthash.aTGzpJ2S.dpuf](http://www.ispe.org/glossary?term=HETP+(Height+Equivalent+to+Theoretical+Plate)+Testing#sthash.aTGzpJ2S.dpuf)

-
-
-
-
-
-
-
-

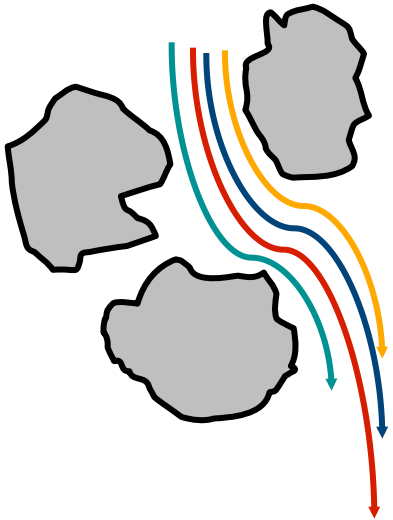
ALARGAMENTO DE BANDA



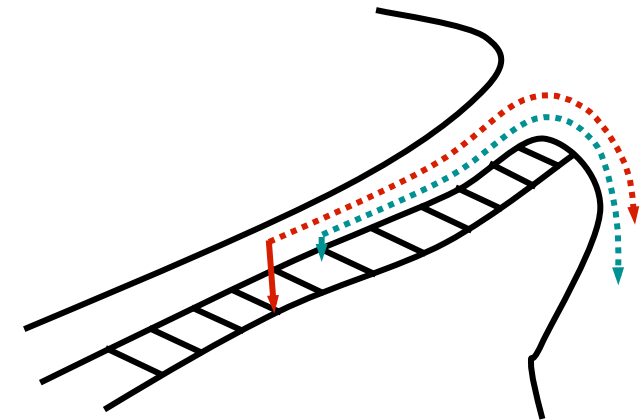
CAMINHOS
MÚLTIPLOS
termo A



DIFUSÃO
LONGITUDINAL
termo B



TRANSFERÊNCIA DE MASSA
NA FASE MÓVEL
termo C_m



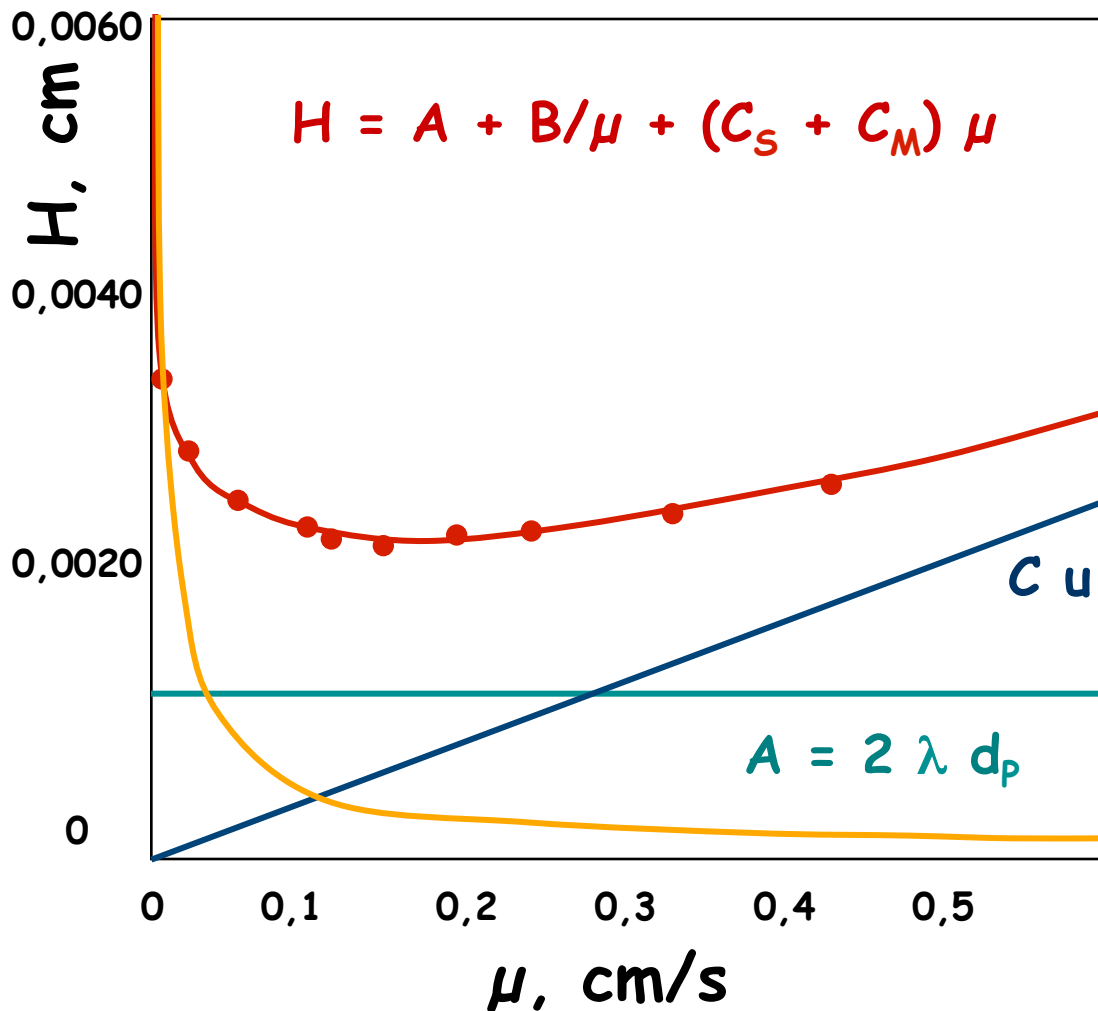
TRANSFERÊNCIA DE MASSA NA
FASE ESTACIONÁRIA
termo C_s

EQUAÇÃO DE van DEEMTER

λ, γ : constantes que dependem da qualidade do recheio

D_S, D_M : coeficientes de difusão do soluto na fase estacionária e móvel, respectivamente

d_p, d_f : diâmetro da partícula e espessura do filme que recobre o suporte da fase estacionária

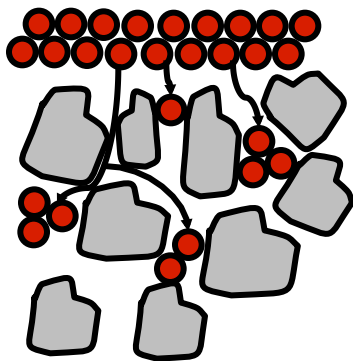


$$C u = \left[\frac{f_S(k) d_f^2}{D_S} + \frac{f_M(k) d_p^2}{D_M} \right] \mu$$

$$B/\mu = (2 \gamma D_M) / \mu$$

$$A = 2 \lambda d_p$$

EQUAÇÃO de van DEEMTER - o termo A (caminhos múltiplos)

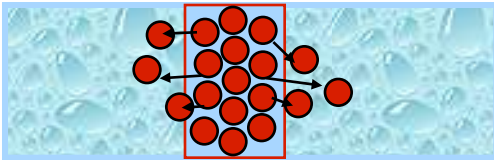


- múltiplos caminhos que a molécula encontra durante seu percurso na coluna
- comprimento dos percursos podem diferir consideravelmente; assim o tempo de residência de cada molécula na coluna também varia

- esse efeito, por vezes chamado de difusão por turbulência (eddy diffusion) é proporcional ao diâmetro da partícula
- parcialmente compensado por difusão radial: moléculas são transferidas de um percurso para o outro
- se vazão da fase móvel é baixa, ocorrerá um grande número de transferências: velocidade de cada molécula se aproxima de um valor médio (contribuição do termo é desprezível)
- se vazão é moderadamente alta, não há tempo para as transferências de percurso ocorrer, resultando no alargamento da banda

$$B/\mu = (2 \gamma D_M) / \mu$$

EQUAÇÃO de van DEEMTER - o termo B (difusão longitudinal)



• soluto difunde do centro concentrado da banda para regiões mais diluídas, na direção do fluxo

• o termo B/μ é proporcional ao coeficiente de difusão do soluto na fase móvel, D_M , e ao fator de obstrução, γ (difusão longitudinal é restringida pelo recheio: colunas recheadas, $\gamma = 0,6$; colunas capilares não-recheadas, $\gamma = 1$).

• contribuição da difusão longitudinal é inversamente proporcional à velocidade da fase móvel: com o aumento de μ , soluto permanece na coluna por períodos mais curtos (difusão tem menos tempo para ocorrer).

EQUAÇÃO de van DEEMTER - o termo C (coeficientes de transferência de massa)

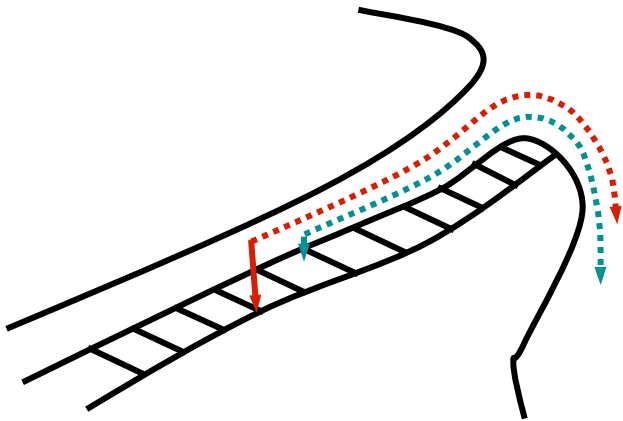
- equilíbrio de distribuição do soluto entre a fase móvel e estacionária é estabelecido tão lentamente que a coluna praticamente opera num regime de não-equilíbrio
- moléculas na frente da banda são empurradas pela fase móvel sem que haja tempo para o equilíbrio se estabelecer
- analogamente, o equilíbrio não é estabelecido na parte posterior da banda: moléculas são deixadas para trás, na fase estacionária com o movimento rápido da fase móvel
- alargamento devido a efeitos de transferência de massa ocorrem porque os vários caminhos que a fase móvel percorre dentro da coluna ou a camada de líquido imobilizada na fase estacionária, tem dimensões finitas; assim, é necessário um certo tempo para que o soluto possa difundir do interior dessas fases para a interface, onde a transferência ocorre; este tempo de atraso faz com que a situação de não-equilíbrio persista

EQUAÇÃO de van DEEMTER - o termo C (coeficientes de transferência de massa)

- a extensão do alargamento de banda devido à difusão longitudinal e resistência à transferência de massa depende da velocidade de difusão do soluto
- no entanto, a difusão longitudinal ocorre devido à tendência das moléculas em mover na direção paralela ao fluxo enquanto que na transferência de massa, o movimento é perpendicular ao fluxo
- assim, a contribuição da difusão longitudinal ao alargamento de banda é inversamente proporcional à velocidade da fase móvel
- por outro lado, nos processos de transferência de massa, quanto mais rápida for a velocidade da fase móvel, menos tempo existe para que o equilíbrio seja alcançado; portanto a contribuição dos processos de transferência de massa ao alargamento de banda é proporcional à velocidade da fase móvel

$$C_s \mu = (f_s(k) d_f^2 / D_s) \mu$$

EQUAÇÃO de van DEEMTER - o termo C_s (transferência de massa na fase estacionária)



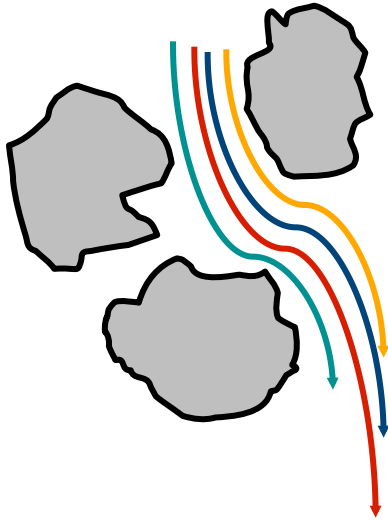
• quando a fase estacionária é um líquido, o coeficiente de transferência de massa depende da espessura do filme e é inversamente proporcional ao coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária

• em ambos os casos, a frequência com que as moléculas do soluto alcançam a interface é diminuída: em filmes espessos, as moléculas precisam percorrer longas distâncias para atingir a interface; se D_s é pequeno, as moléculas migram lentamente

• a consequência é a baixa velocidade de transferência de massa causando alargamento da banda

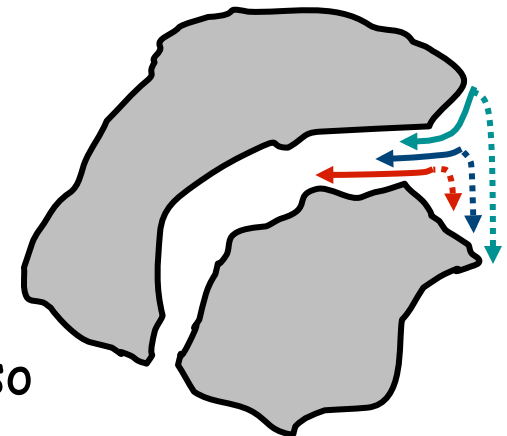
$$C_M \mu = (f_s(k) d_p^2 / D_M) \mu$$

EQUAÇÃO de van DEEMTER - o termo C_M (transferência de massa na fase móvel)



- coeficiente de transferência de massa na fase móvel depende do diâmetro da partícula e varia inversamente com o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel

- diferenças de percurso são minimizadas se partículas são de diâmetro pequeno
- se o soluto difunde rapidamente de um percurso para outro, alargamento é diminuído



poços estagnados

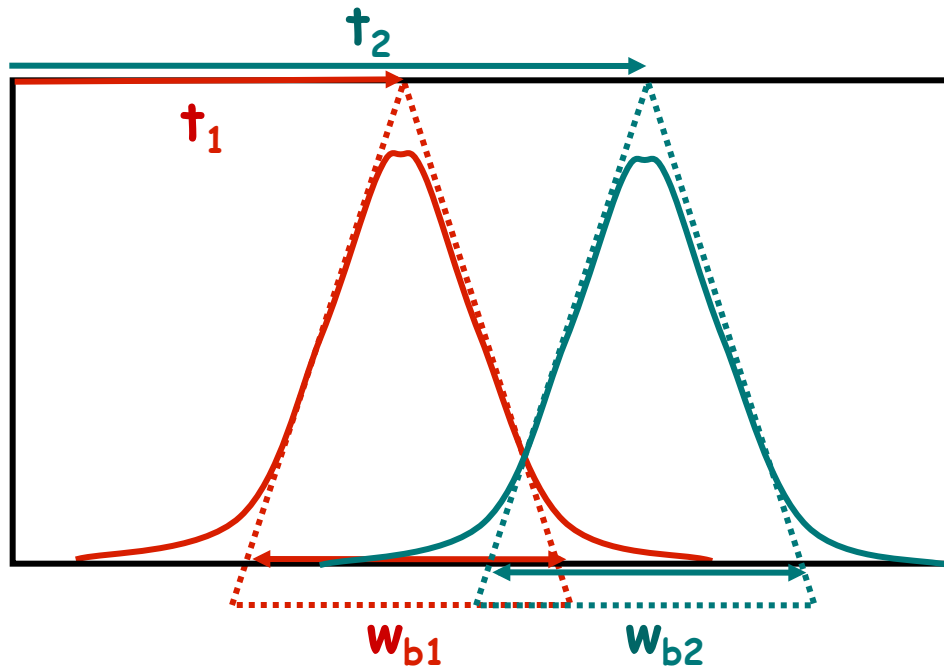
ALARGAMENTO DE BANDA EXTRA-COLUNA

- alargamento ocorre conforme soluto é carregado através de tubos abertos como os do sistema de injeção, da região do detector, da tubulação de conexão dos vários componentes do sistema cromatográfico
- decorre do perfil de velocidade radial parabólico (fluxo induzido por pressão): velocidade no centro da banda é maior que nas paredes do tubo

$$H_{ex} = \frac{\pi r^2 \mu}{24 D_M}$$

- alargamento pode-se tornar sério se colunas capilares são usadas

RESOLUÇÃO



definição:

$$R_s = 2 \frac{(t_2 - t_1)}{W_{b1} + W_{b2}}$$

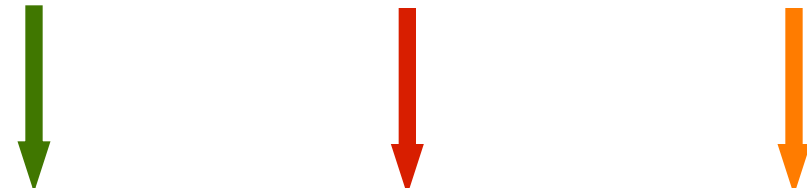
$$= 1,18 \frac{(t_2 - t_1)}{W_{h1} + W_{h2}}$$

Outras formas de estimar R_s quando abundância relativa dos solutos difere:

- Comparação com curvas de resolução
- Cálculo baseado na altura do vale entre os 2 picos

RESOLUÇÃO EM FUNÇÃO DAS CONDIÇÕES

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} (\alpha - 1) \frac{k}{1 + k}$$



eficiência separação retenção

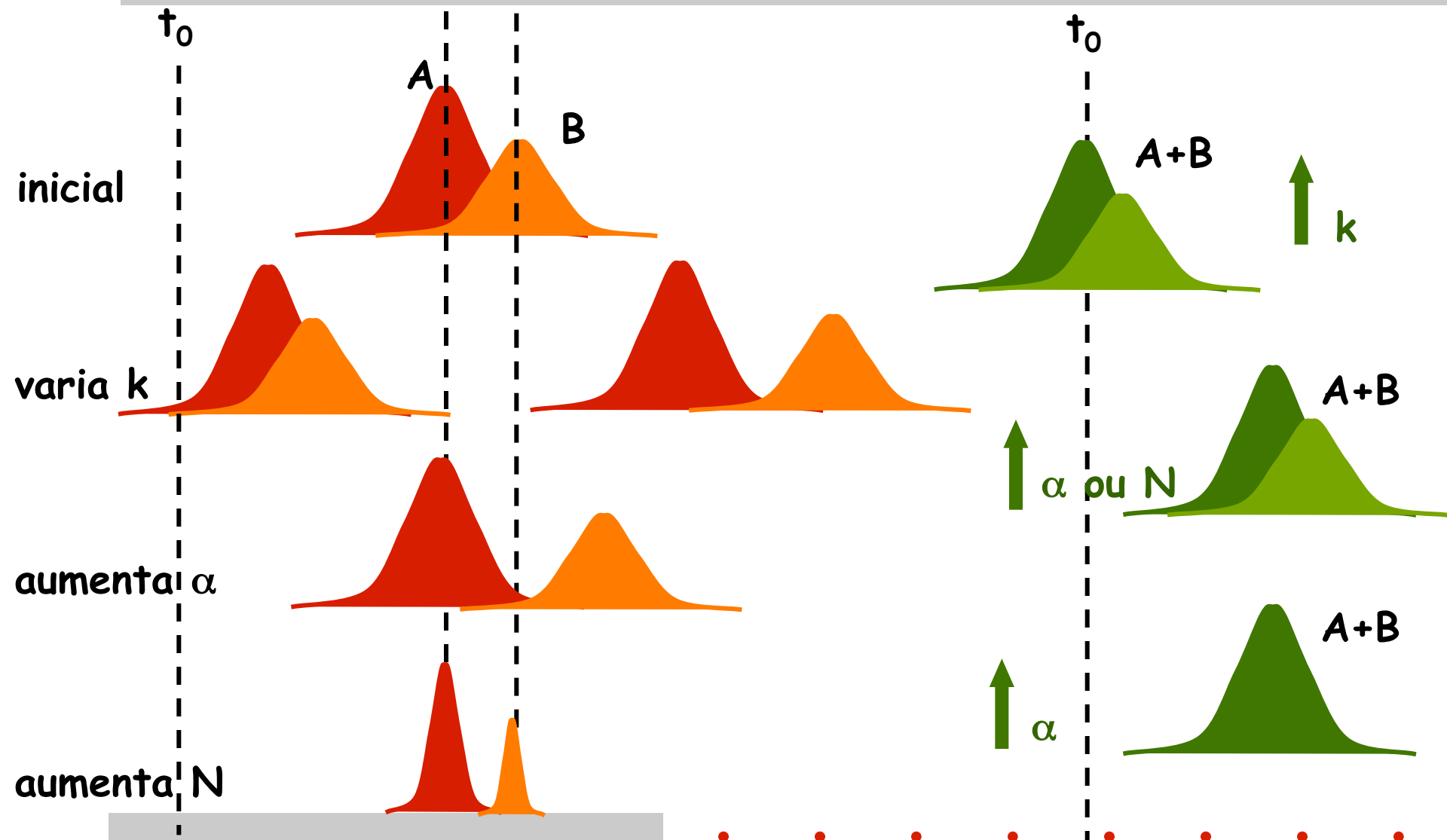
k e α : são determinados por condições que afetam retenção e equilíbrio de distribuição da amostra entre fase móvel e estacionária

composição da fase móvel; composição da fase estacionária; temperatura

N: depende da qualidade da coluna; varia com as condições instrumentais

vazão da fase móvel; comprimento da coluna; tamanho da partícula

EFEITO DE k , α e N NA SEPARAÇÃO



P2. INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EM FASE LÍQUIDA

12. Técnicas/Esopo

12.a. Cromatografia por adsorção

12.b. Cromatografia por partição

12.c. Cromatografia por pareamento iônico

12.d. Cromatografia quiral

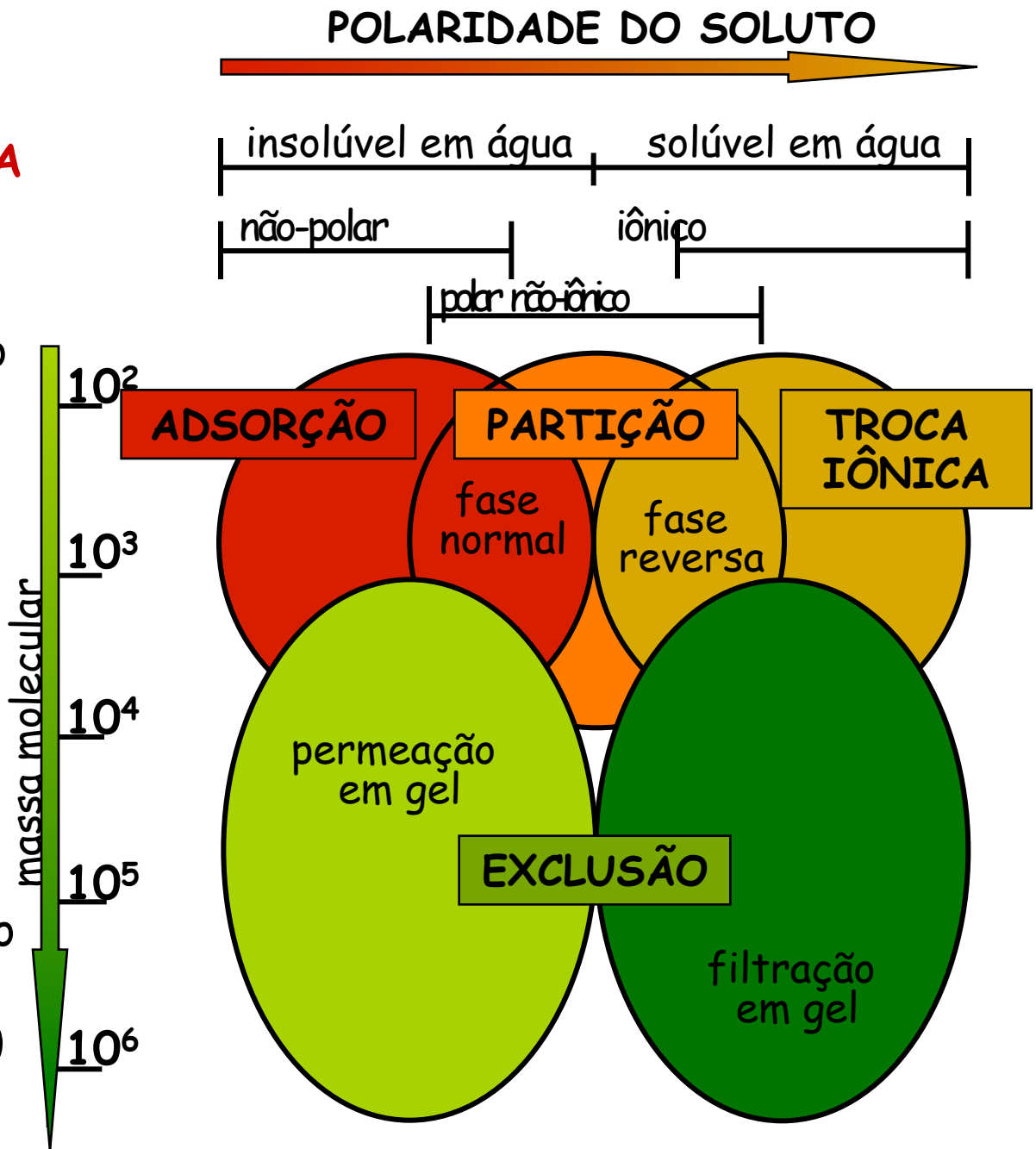
12.e. Cromatografia por bioafinidade

12.f. Cromatografia por troca iônica

12.g. Cromatografia por exclusão

ESCOPO DA CROMATOGRAFIA A LÍQUIDO

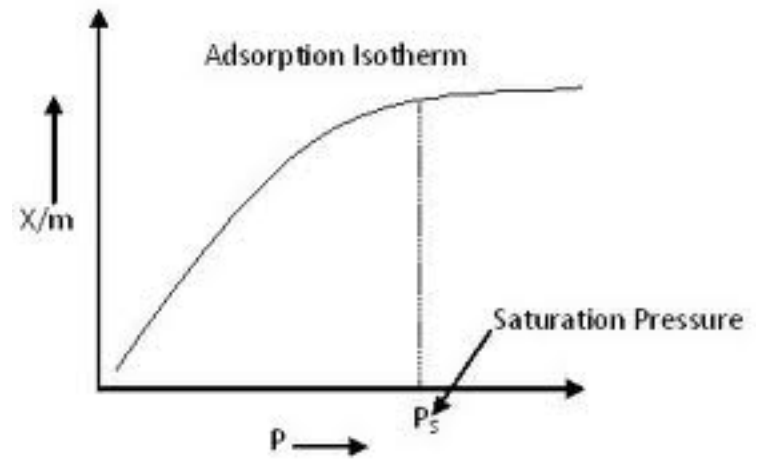
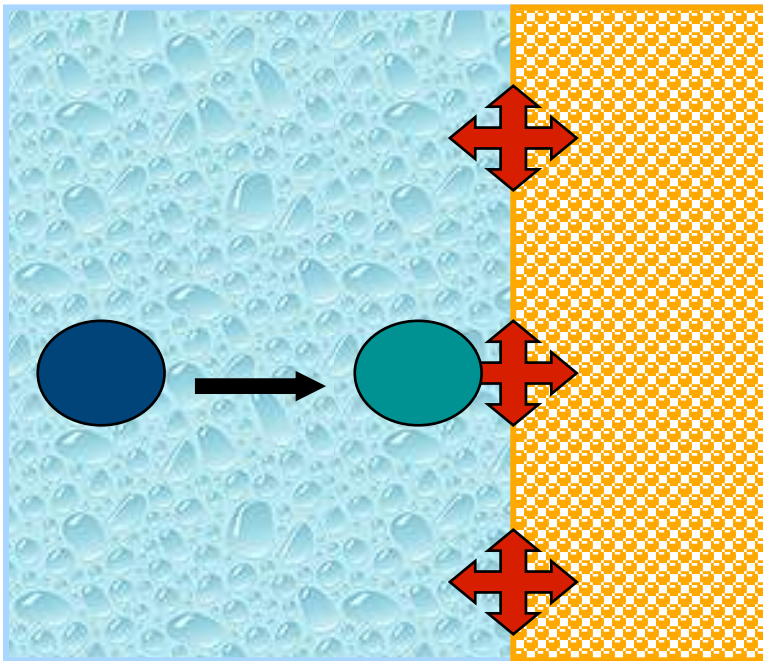
- espécies $MM > 10^4$: cromatografia por exclusão
- espécies iônicas de baixa MM : cromatografia por troca iônica
- espécies pequenas e polares, mas não-iônicas: métodos de partição (série homóloga)
- espécies não-polares: cromatografia por adsorção (isômeros estruturais, hidrocarbonetos alifáticos)



CROMATOGRAFIA POR ADSORÇÃO

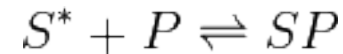
fase móvel

fase estacionária



Isoterma de Langmuir

A equação de Langmuir é derivada a partir do equilíbrio entre o no. sítios livres na superfície (S^*), o no. de partículas (P) e o no. de sítios ocupados (SP)



A constante de equilíbrio K é dada por:

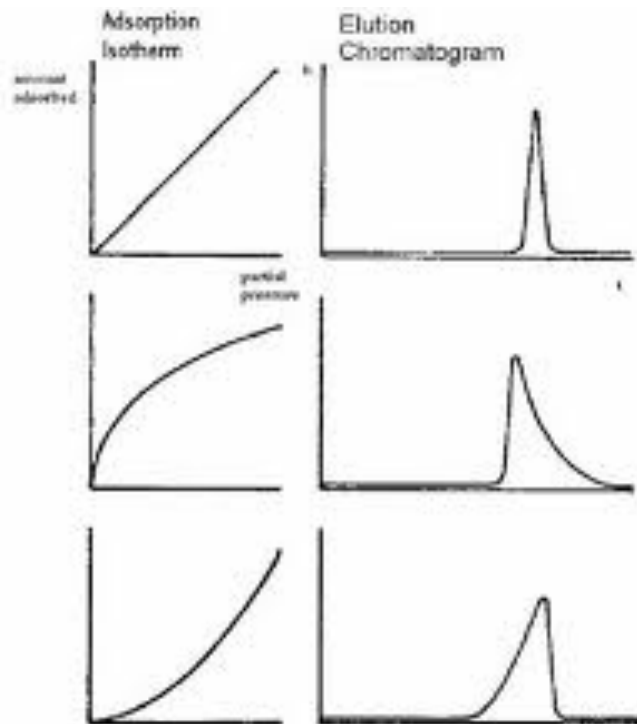
$$K = \frac{[SP]}{[S^*][P]}$$

Porque o no. sítios ocupados (SP) é proporcional a θ , o no. sítios livres (S^*) é proporcional a $1-\theta$, e o no. de partículas é proporcional a pressão do gás (p), a equação fica:

$$\alpha = \frac{\theta}{(1-\theta)p}$$

Rearranjando:

$$\theta = \frac{\alpha \cdot p}{1 + \alpha \cdot p}$$



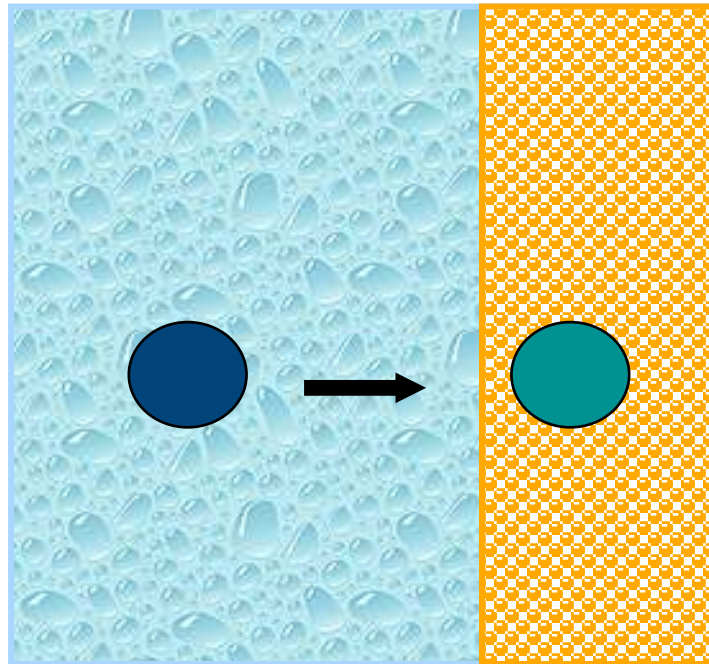
Cromatografia em coluna



CROMATOGRAFIA POR PARTIÇÃO

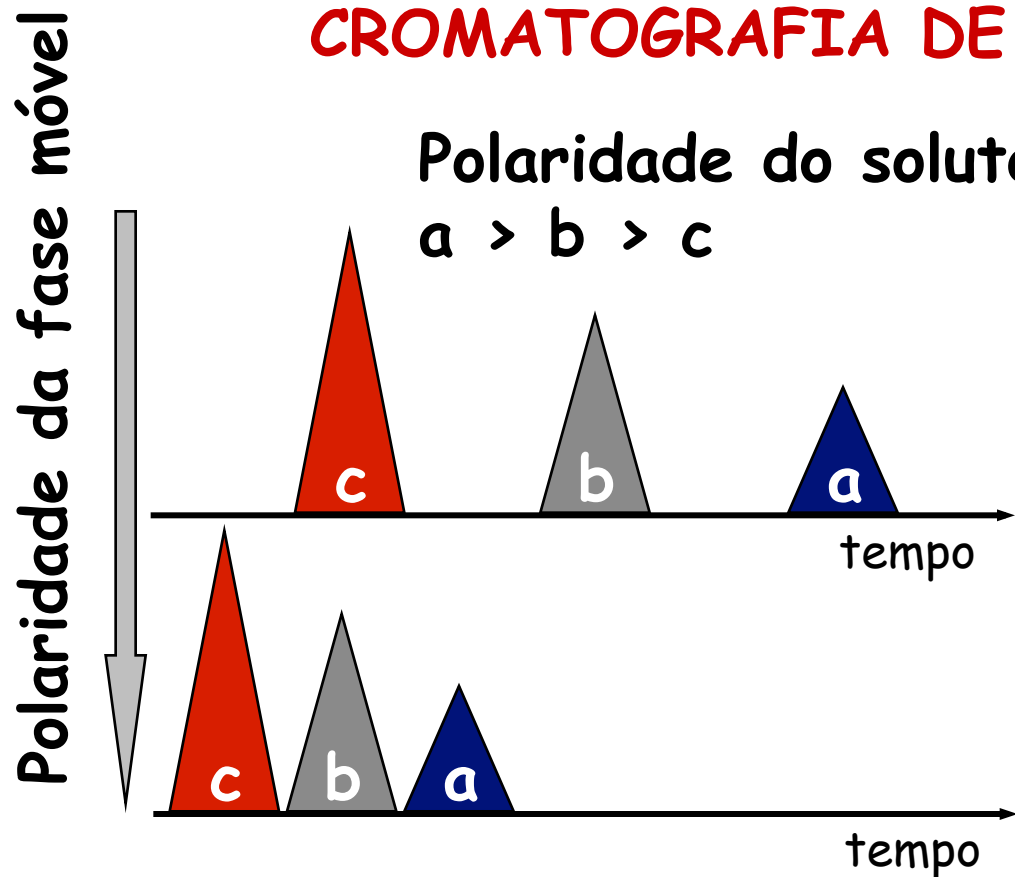
fase
móvel

fase
estacionária



CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL

Polaridade do soluto:
 $a > b > c$

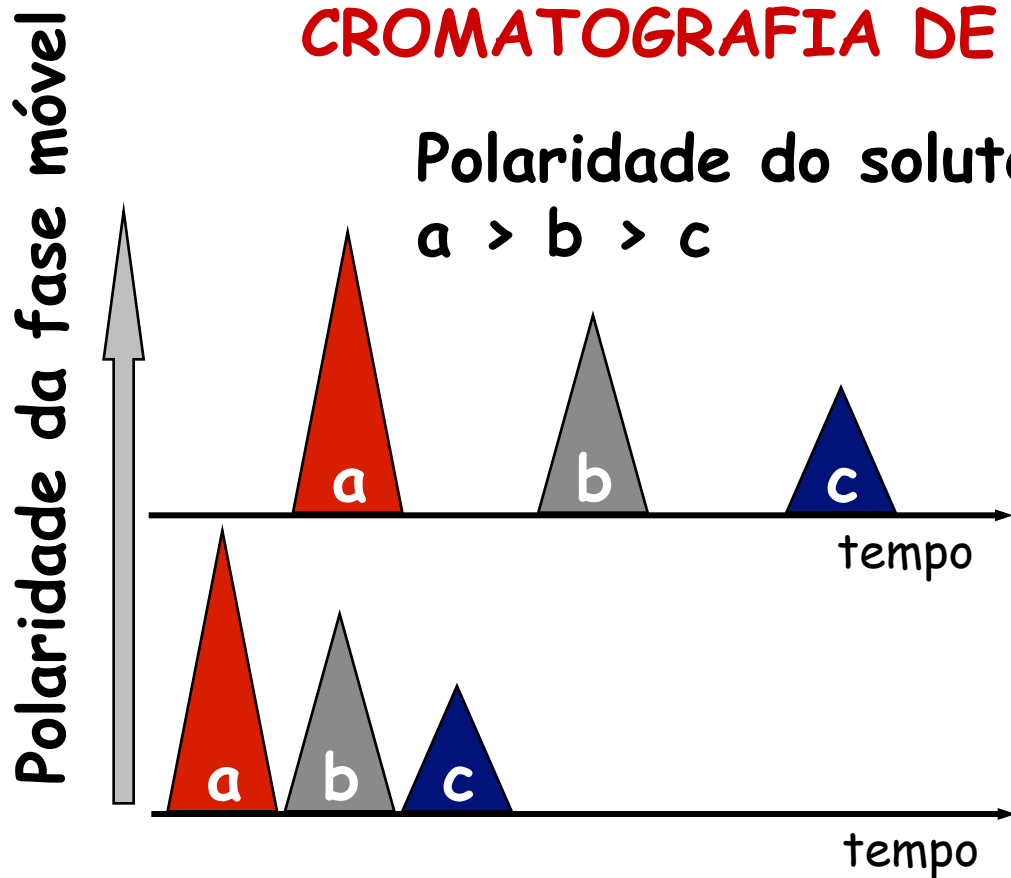


• Nos trabalhos pioneiros usou-se fases altamente polares, como água e trietilenoglicol adsorvidos sobre sílica ou alumina e solventes apolares, como hexano ou éter isopropílico, eram usados como fase móvel; por razões históricas, este tipo de cromatografia é chamado de **fase normal**

• Em fase normal, o **componente menos polar elui primeiro**, devido a sua maior solubilidade na fase móvel; aumentando a polaridade da fase móvel tem o efeito de diminuir o tempo de eluição

CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA

Polaridade do soluto:
 $a > b > c$



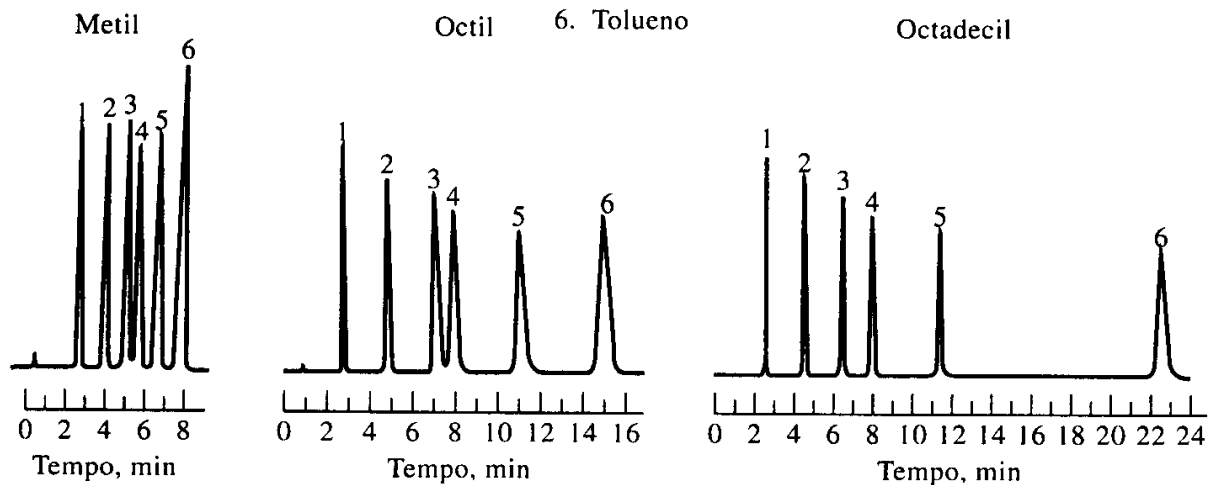
• Na cromatografia de **fase reversa**, a fase estacionária é apolar, um hidrocarboneto por exemplo (C18) e a fase móvel é relativamente polar (água, metanol, acetonitrila, etc)

• Em fase reversa, o **componente mais polar elui primeiro**, devido a sua maior solubilidade na fase móvel; aumentando-se a polaridade da fase móvel aumenta-se o tempo de eluição

EFEITO DO COMPRIMENTO DA CADEIA

Identificação do pico

1. Uracila
2. Fenol
3. Acetofenona
4. Nitrobenzeno
5. Benzoato de metila
6. Tolueno



• Cadeias mais longas produzem recheios mais retentivos.

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

- cromatografia por troca iônica (IC, ion exchange chromatography) ou cromatografia de íons: métodos de separação e determinação de íons com base em **resinas de troca iônica**
- desenvolvida durante o **projeto Manhattan** para a separação de cátions de terras raras com propriedades semelhantes, com resinas trocadoras de cátions; esse trabalho forneceu a base teórica das separações por troca iônica e, após a Segunda Guerra, foi estendido a outros tipos de materiais; detecção era feita por medidas de condutividade; hoje em dia outros detectores são possíveis
- falta de um detector sensível para as espécies iônicas eluídas retardou o desenvolvimento da técnica moderna; em 1975, Dow Chemical Company, introduziu o conceito de **supressão do eluente**, tornando possível a detecção condutométrica em linha

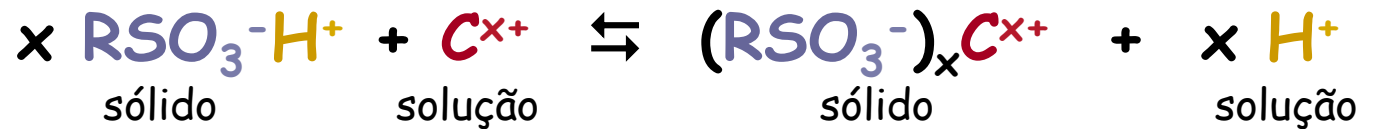
CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

PRINCÍPIO: equilíbrios de troca entre íons em solução e íons de mesmo sinal na superfície de um sólido (resina ou polímero de alta massa molecular e insolúvel)

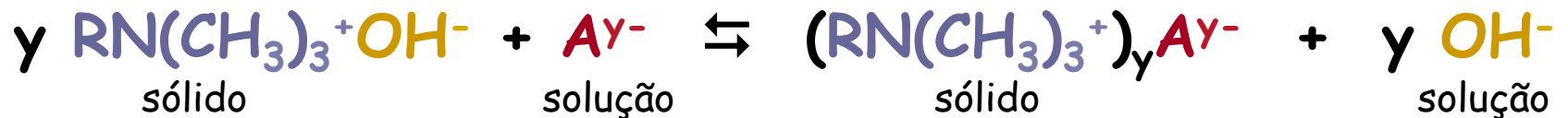
- **trocadores de íons naturais:** argila e zeólitas foram usados por décadas
- **trocadores sintéticos:** produzidos em 1930, para "amolecer a água", nos processos de desionização da água e purificação de soluções
- **sítios ativos mais comuns nos trocadores de cátions:**
grupo ácido sulfônico $-SO^3-H^+$ (ácido forte) e grupo ácido carboxílico $-COO-H^+$ (ácido fraco)
- **sítios ativos mais comuns nos trocadores de ânions:**
grupos amina terciária $-N(CH_3)_3^+OH^-$ (base forte) e grupos amina primária $-NH_3^+OH^-$ (base fraca)

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

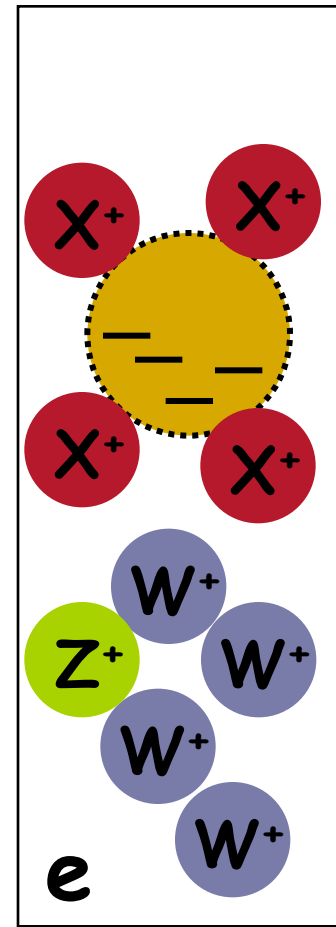
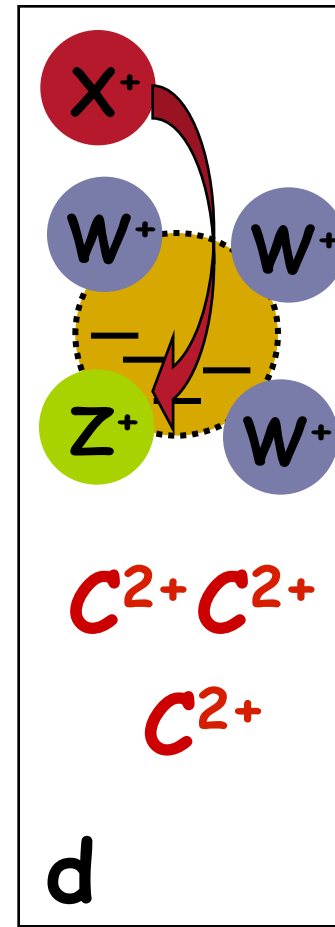
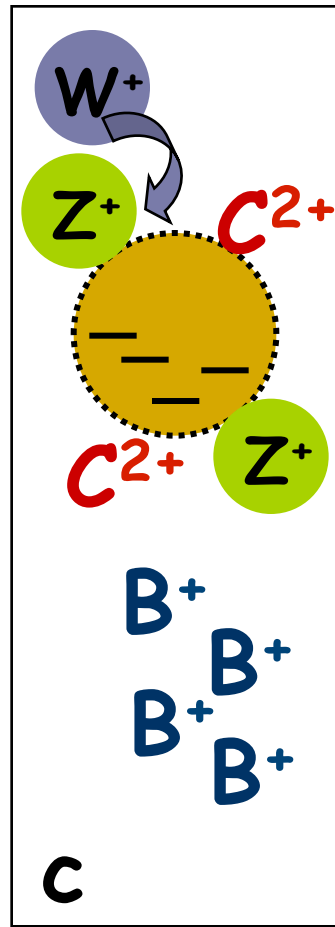
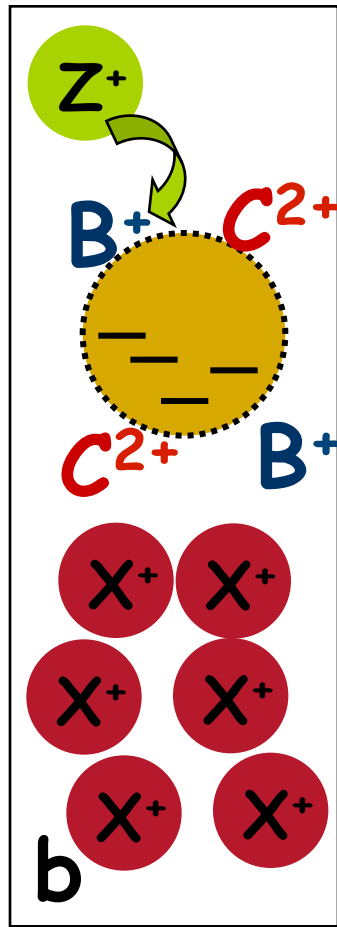
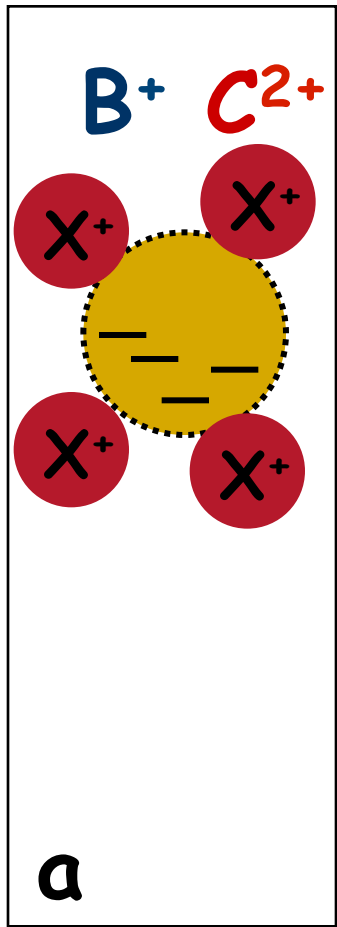
Quando um trocador iônico de ácido sulfônico é colocado em contato com uma solução aquosa contendo o cátion C , o equilíbrio de troca estabelecido é o seguinte:



analogamente, um trocador de ânions interage com o ânion A segundo a reação:



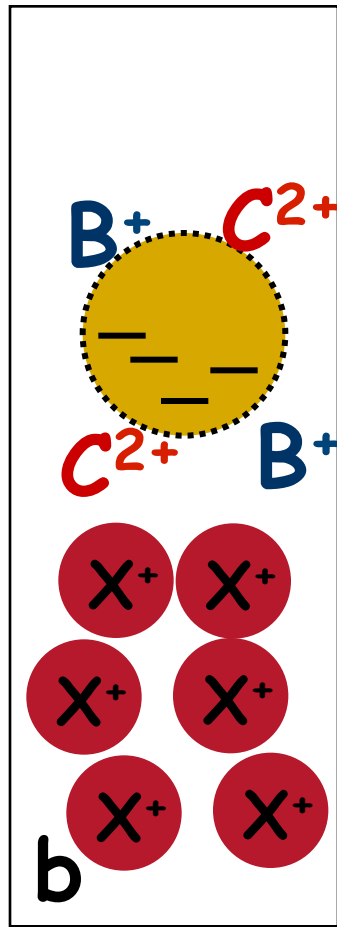
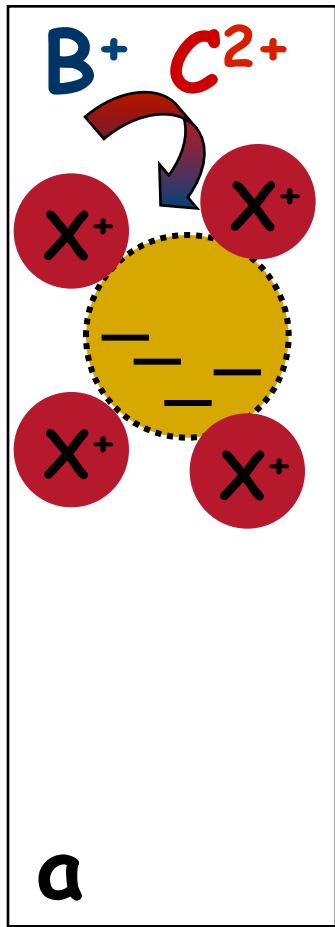
MECANISMO DE TROCA



B e C: analitos

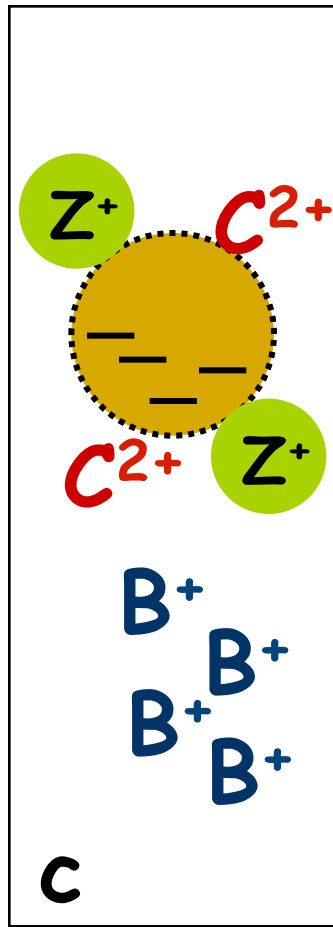
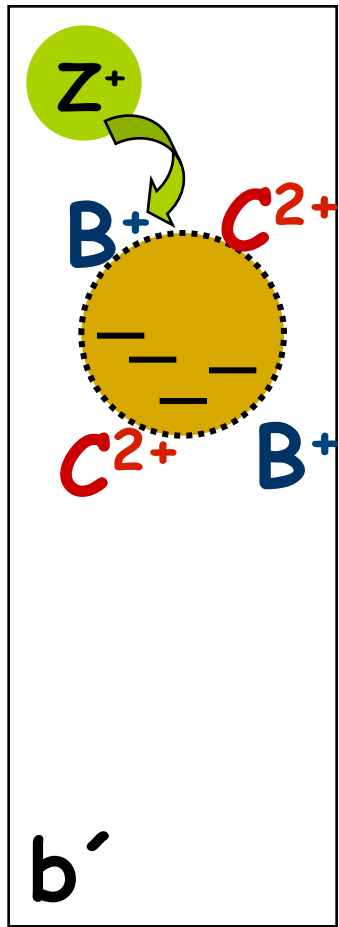
X, Z e W: são íons contidos nos eluentes

MECANISMO DE TROCA



- (a): trocador catiônico está em equilíbrio com o eluente inicial X^+ ; B^+ e C^{2+} são materiais a serem separados
- (b): quando determinada quantidade da amostra é introduzida na coluna, ocorre uma reação de troca liberando quantidade equivalente de X^+ , anteriormente ligado à matriz

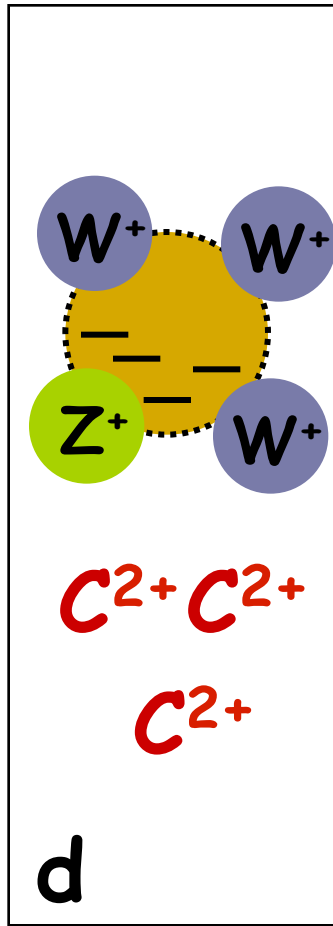
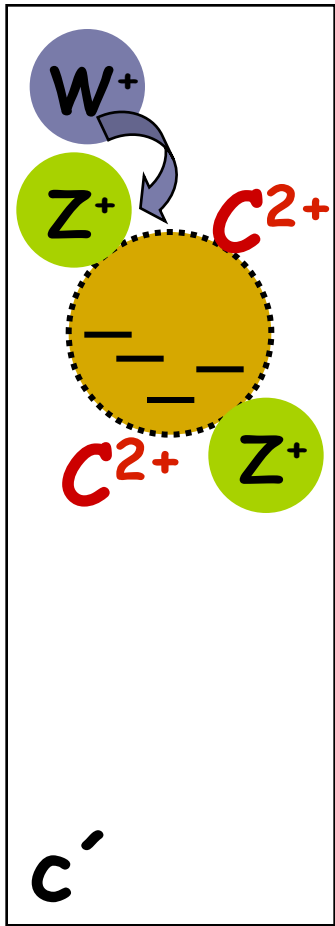
MECANISMO DE TROCA



•(b') : após a adsorção do analito na resina, é aplicado um eluente que contém íons Z^+ , com uma afinidade um pouco maior pelos grupos trocadores da resina

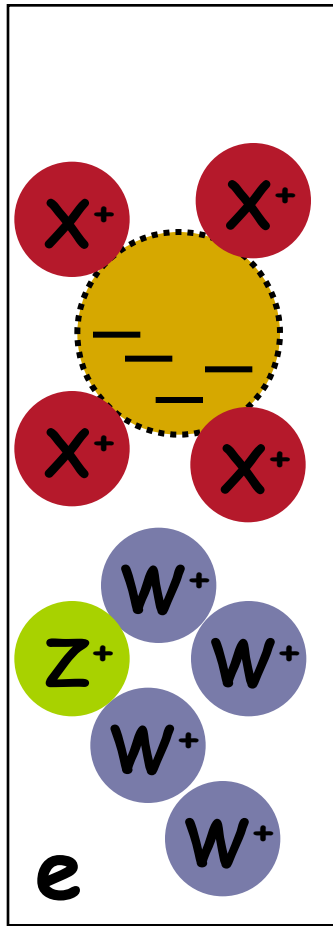
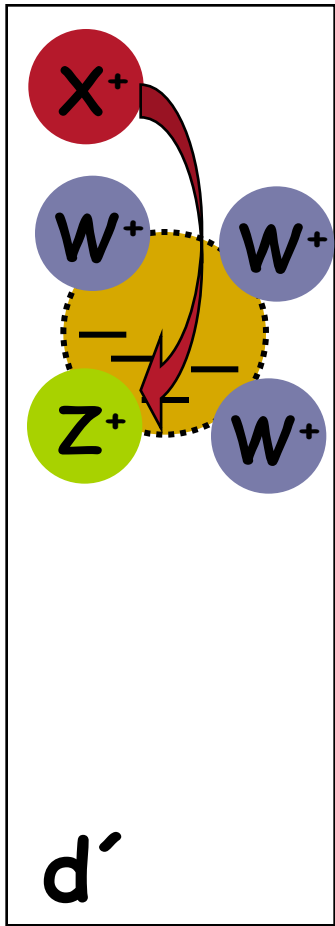
•(c) : os íons Z^+ irão provocar a liberação da substância B^+ , ligada mais fracamente à resina que a substância C^{2+}

MECANISMO DE TROCA



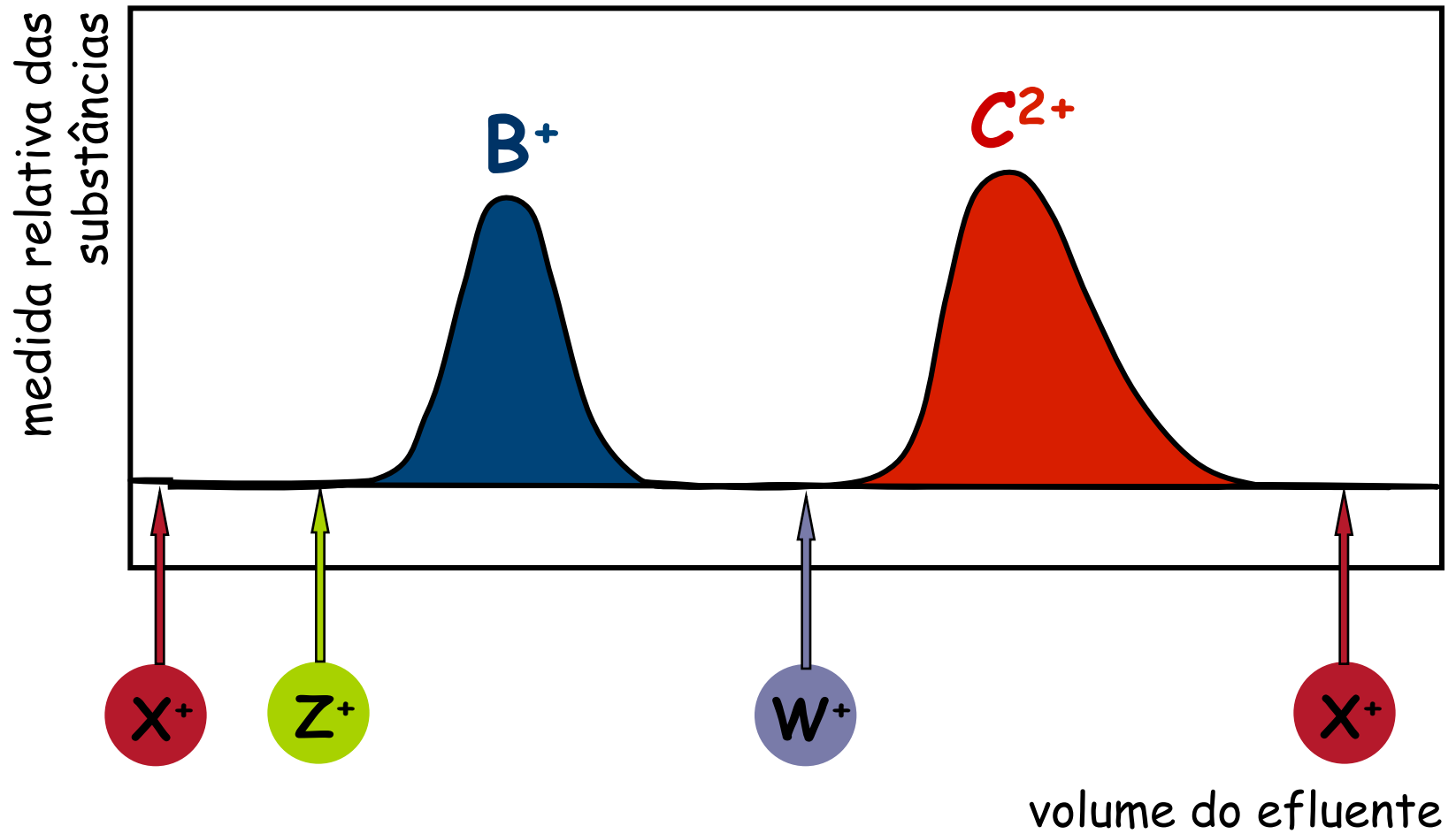
•(c') : passando a seguir o segundo eluente, contendo os íons W^+ , com maior afinidade pela matriz, haverá liberação do material C^{2+} (d) e, assim a separação de B^+ e C^{2+} foi obtida

MECANISMO DE TROCA



- (d') : a remoção dos íons de maior afinidade pela resina, que X^+ , ou seja W^+ e Z^+ , pode ser conseguida se concentrações crescentes de X^+ forem usadas (volumes de 5-10 vezes a capacidade da resina)
- (e): o equilíbrio entre a fase móvel e estacionária é alcançado, o menor grau de afinidade de X^+ pela resina é superado e a resina está regenerada para outra aplicação de amostra

PERFIL DE ELUIÇÃO



CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

FASES MÓVEIS MAIS COMUNS:

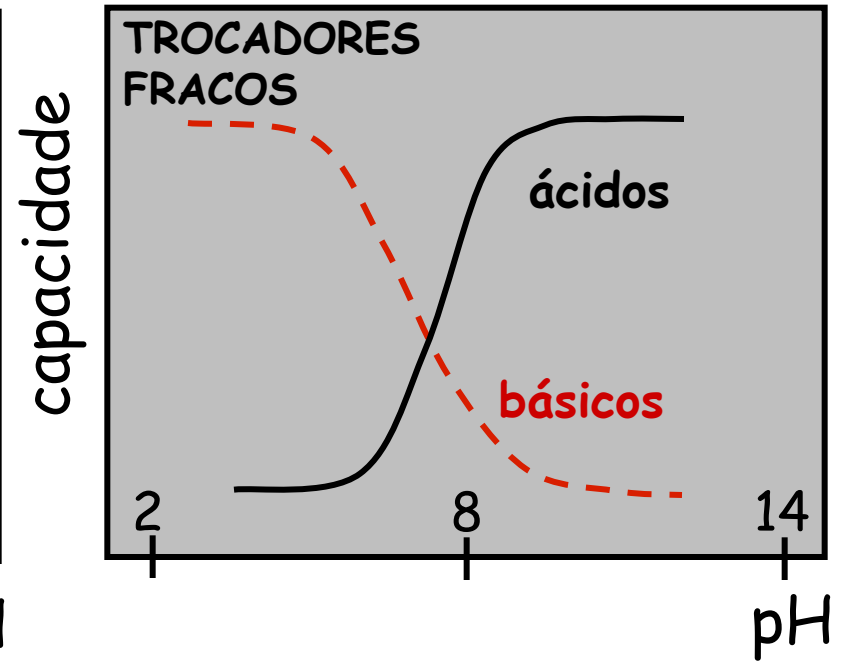
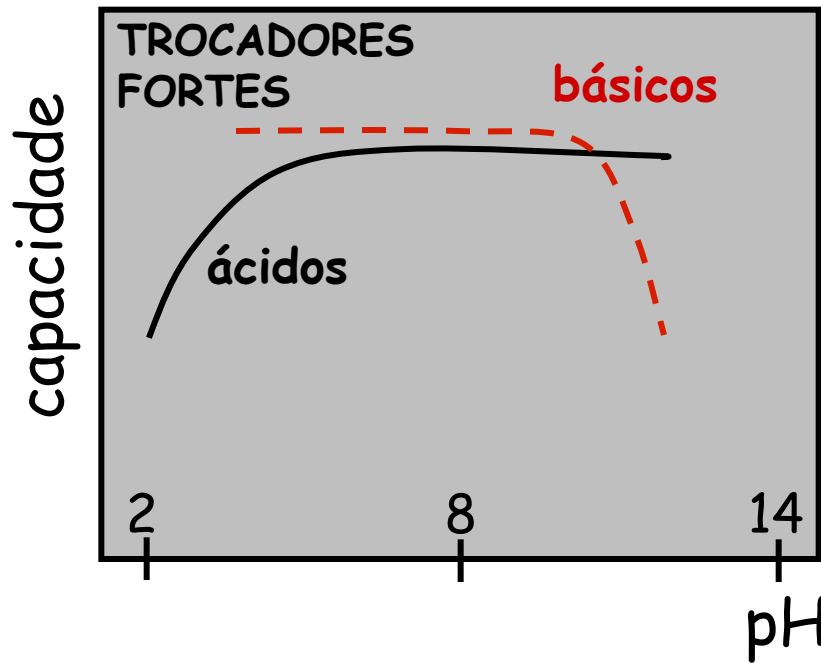
- soluções aquosas que podem estar tamponadas ou conter quantidades moderadas de um solvente miscível com água
- força e seletividade são moduladas pelo tipo e concentração dos aditivos (sal e solvente)

FASES ESTACIONÁRIAS MAIS COMUNS:

- resinas de poliestireno entrecruzada com divinilbenzeno, na qual são ligados grupos iônicos
- pelicular: leito polimérico ou vítreo esférico não poroso é recoberto com resina
- micropartículas porosas de sílica recobertas com filme do trocador

GRUPOS TROCADORES

- o tipo de grupos ligados à matriz classificam os trocadores iônicos de fortes, médios e fracos.
- grupos forte são aqueles ionizados em grande faixa de pH
- grupos médios e fracos: grau de ionização é influenciado pelo pH, e a capacidade de troca varia com o pH



CAPACIDADE DE TROCA

- medida da quantidade de troca de íons que pode ocorrer entre a matriz e os íons presentes na fase móvel
- **capacidade total** é a quantidade de grupos carregados, ou potencialmente carregados, que podem ser trocados por grama de peso seco do trocador; a capacidade total é expressa em meq/g ou meq/100 mL de suspensão de resina, sendo determinado por titulação
- **capacidade disponível** é a capacidade real do trocador sob determinadas condições; ela é dependente de vários fatores como a força iônica, pH, e temperatura do eluente
- amostra: a **quantidade de amostra** que pode ser aplicada em um trocador iônico depende de sua capacidade de troca; não deve exceder 1-5% da capacidade total do trocador

SELETIVIDADE

Considere a reação de troca do cation B^+ na resina sulfônica:



• a eluição da resina com solução ácida diluída desloca o equilíbrio para a esquerda, fazendo com que parte dos íons B^+ na fase estacionária seja transferida para a fase móvel; esses íons movem-se coluna abaixo numa série de transferências sucessivas entre fase estacionária e móvel

O equilíbrio é governado pela constante:

$$K_{tr} = \frac{[RSO_3^-B^+]_s \cdot [H^+]_{aq}}{[RSO_3^-H^+]_s \cdot [B^+]_{aq}}$$

SELETIVIDADE

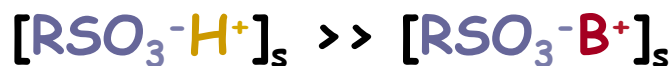
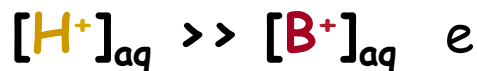
Rearranjando temos:

$$\frac{[\text{RSO}_3\text{-B}^+]_s}{[\text{B}^+]_{\text{aq}}} = K_{\text{tr}} \frac{[\text{RSO}_3\text{-H}^+]_s}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}}$$

• durante a eluição, a concentração de H^+ é muito maior que a concentração de B^+ na fase móvel

• além disso, o trocador tem um número apreciável de sítios disponíveis para troca de B^+

Assim, quando



$$\frac{[\text{RSO}_3\text{-B}^+]_s}{[\text{B}^+]_{\text{aq}}} = K = \frac{C_S}{C_M}$$

constante de distribuição

o lado direito da equação acima é constante

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA



$$K_{\text{tr}} = \frac{[\text{RSO}_3^- \text{B}^+]_{\text{s}} \cdot [\text{H}^+]_{\text{aq}}}{[\text{RSO}_3^- \text{H}^+]_{\text{s}} \cdot [\text{B}^+]_{\text{aq}}}$$

• K_{tr} representa a afinidade da resina pelo íon B^+ em relação ao íons H^+

• quando K_{tr} é grande significa que existe uma grande tendência da fase reter B^+

• para **H^+ como íon de referência** têm-se: íons polivalentes são mais fortemente retidos que espécies monocarregadas; para grupos de íons de mesma carga, diferenças de retenção aparecem devido ao grau de hidratação e outras propriedades

• o trocador iônico prefere: íons que têm alta carga, seguido de íons que têm pequeno tamanho (solvatado), íons altamente polarizáveis e por fim íons que têm interações fracas com a fase móvel

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

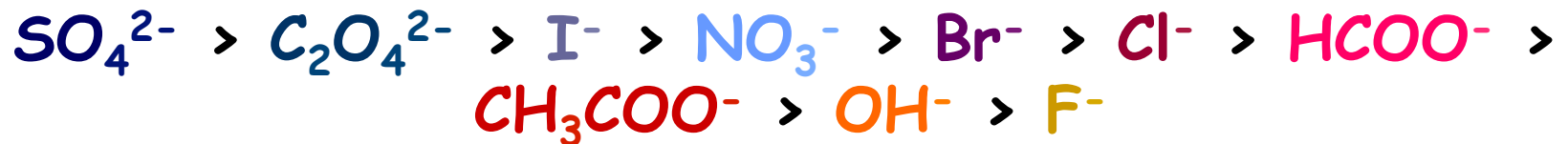
• Para uma resina de troca catiônica, os valores de K_{tr} decrescem na ordem para cátions monovalentes:



e cátions divalentes:



• Para uma resina de troca aniônica, os valores de K_{tr} decrescem na ordem:



CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA em colunas supressoras de eluente

- inicialmente, a cromatografia de troca iônica era praticada em materiais com **alta capacidade de troca**: aplicação restrita devido à eficiência moderada e a falta de um detector genérico que permitisse a determinação quantitativa dos íons eluídos da coluna
- escolha óbvia: **detectores por condutividade** que são altamente sensíveis, universais para espécies carregadas, respondem de forma previsível a mudanças de concentração; simples de construção e manutenção barata, fáceis de serem miniaturizados e comumente funcionam por longo tempo sem problemas
- **limitação séria**: era necessária uma **alta concentração do eletrólito** (fase móvel) para eluir a maioria dos analitos iônicos em um tempo razoável; como consequência, a condutividade dos componentes da fase móvel tendia a sobrepujar a dos analitos, reduzindo acentuadamente a sensibilidade do detector

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA em colunas supressoras de eluente

- o problema da alta condutância do eluente foi resolvido com a introdução da chamada **coluna supressora de eluente**, posicionada imediatamente após a coluna analítica de troca iônica
- a coluna supressora é recheada com uma segunda resina de troca iônica que efetivamente converte os íons da fase móvel a espécies moleculares de ionização limitada, sem afetar os íons do analito

REAÇÃO NA COLUNA SUPRESSORA

- quando **cátions** (analito) estão sendo separados, frequentemente é utilizado **HCl** como reagente eluente e a **coluna supressora** é uma **resina de troca aniônica** na forma de hidróxido
- o produto da reação no supressor é água

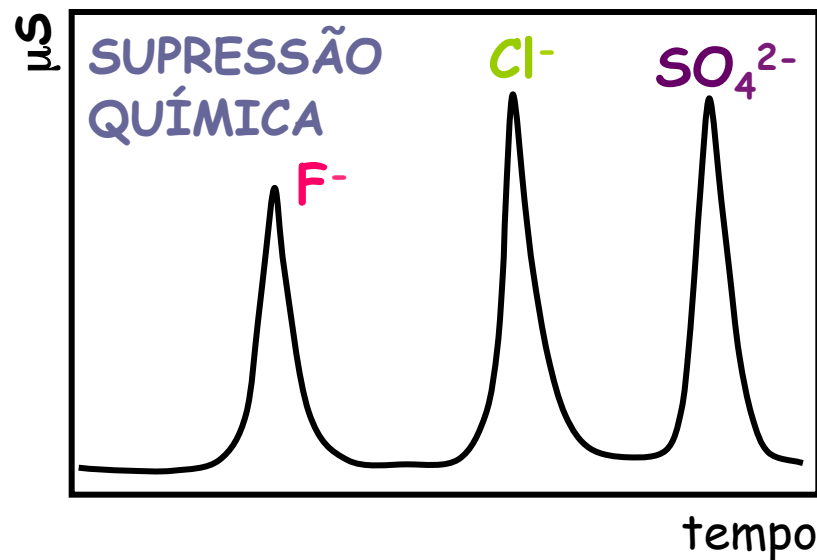
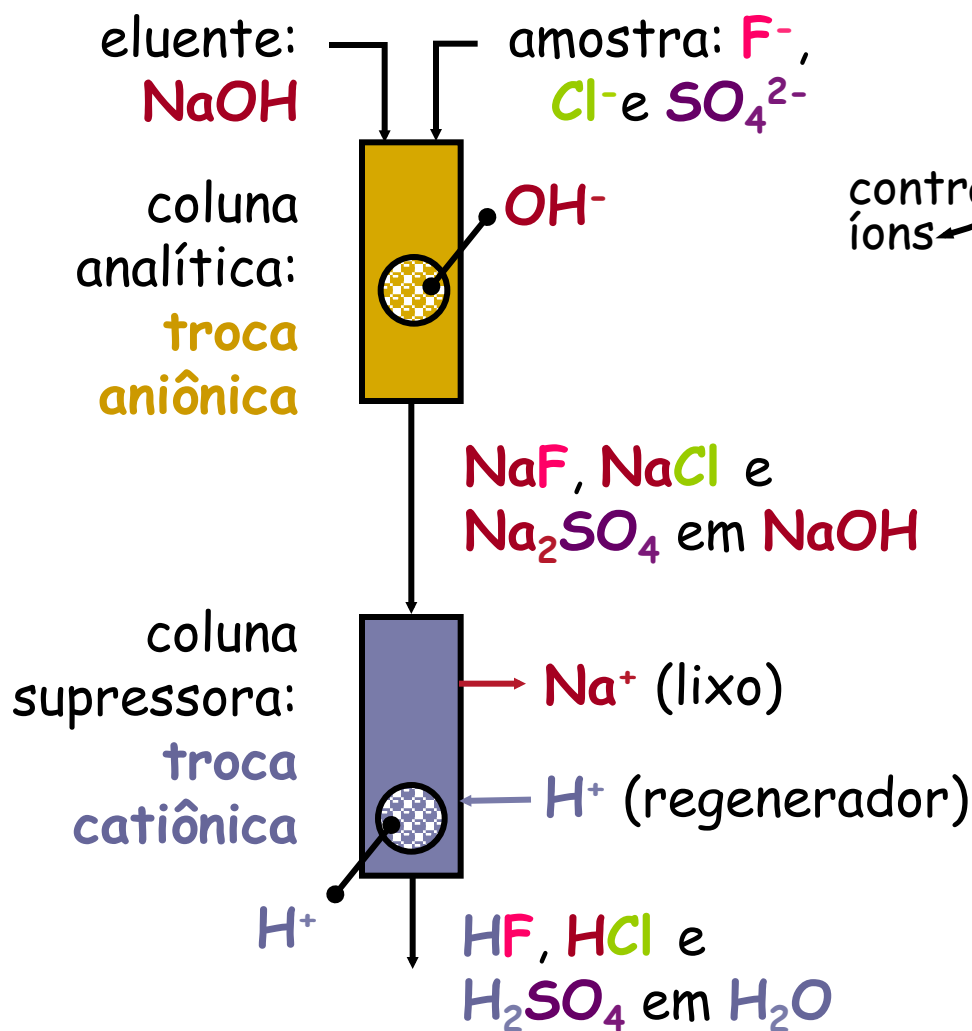


REAÇÃO NA COLUNA SUPRESSORA

• na separação de ânions (analito), eluentes comuns são carbonato ou bicarbonato de sódio e a coluna supressora é um trocador de cátions na forma ácida



O EFEITO DA SUPRESSÃO



O EFEITO DA SUPRESSÃO

exemplo

condutância
equivalente iônica
($S \cdot cm^2 / eq$)

concentração
(mol/L)

$(\lambda_+ + \lambda_-) C$

eluente: 5 mmol/L



$$G = \frac{(\lambda_+ + \lambda_-) C}{1000 \Theta}$$

condutância do
eletrólito
(microSiemens, μS)

constante da
cela (cm^{-1})

$$\lambda_{Na^+} = 50 \text{ S} \cdot cm^2 / eq$$

$$\lambda_{OH^-} = 198 \text{ S} \cdot cm^2 / eq$$

$$\Theta = 10 \text{ cm}^{-1}$$

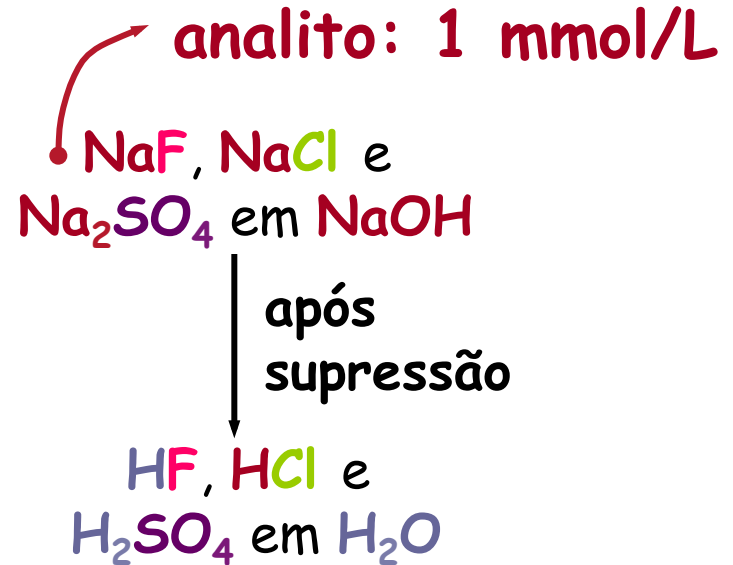
$$G = (50 + 198) \cdot 5 \times 10^{-3} / 10^4 = 124 \mu S$$

$$G_{H_2O} = 0,05 \mu S$$

condutância do
eluente decresce
 10^4 vezes após
supressão

O EFEITO DA SUPRESSÃO exemplo

$$G = \frac{(\lambda_+ + \lambda_-) C}{1000 \Theta}$$



$$\lambda_{\text{Na}^+} = 50 \text{ S.cm}^2/\text{eq}$$

$$\lambda_{\text{H}^+} = 380 \text{ S.cm}^2/\text{eq}$$

$$\lambda_{\text{F}^-} = 55 \text{ S.cm}^2/\text{eq}$$

$$\lambda_{\text{Cl}^-} = 76,3 \text{ S.cm}^2/\text{eq}$$

$$\lambda_{1/2\text{SO}_4^{2-}} = 79,8 \text{ S.cm}^2/\text{eq}$$

$$\Theta = 10 \text{ cm}^{-1}$$

$$G_{\text{NaCl}} = (50 + 76,3) \cdot 1 \times 10^{-3} / 10^4 = 12,6 \mu\text{S}$$

$$G_{\text{HCl}} = (380 + 76,3) \cdot 1 \times 10^{-3} / 10^4 = 45,6 \mu\text{S}$$

condutância da banda do cloreto aumenta 3,6 vezes após supressão

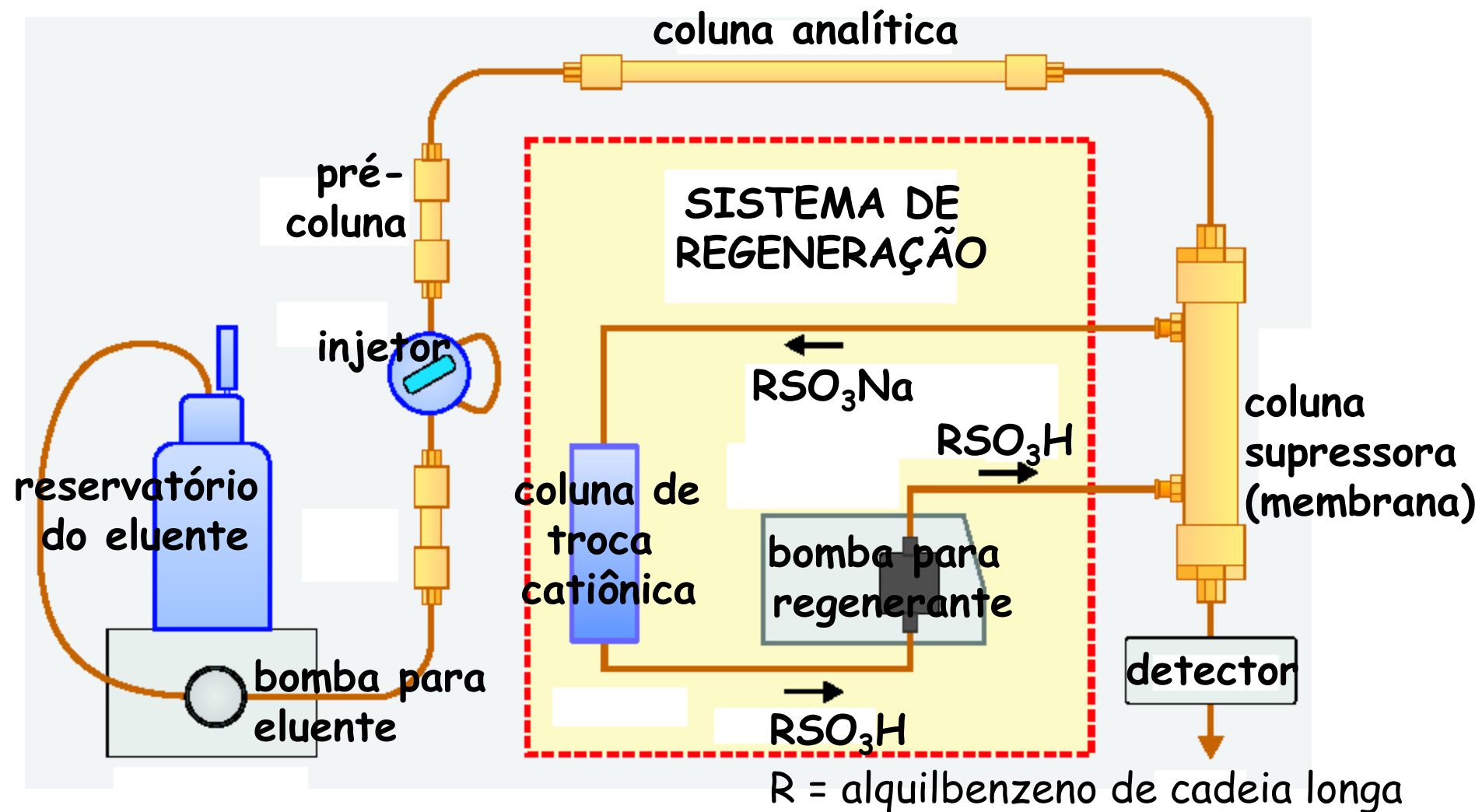
CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

regeneração das colunas supressoras

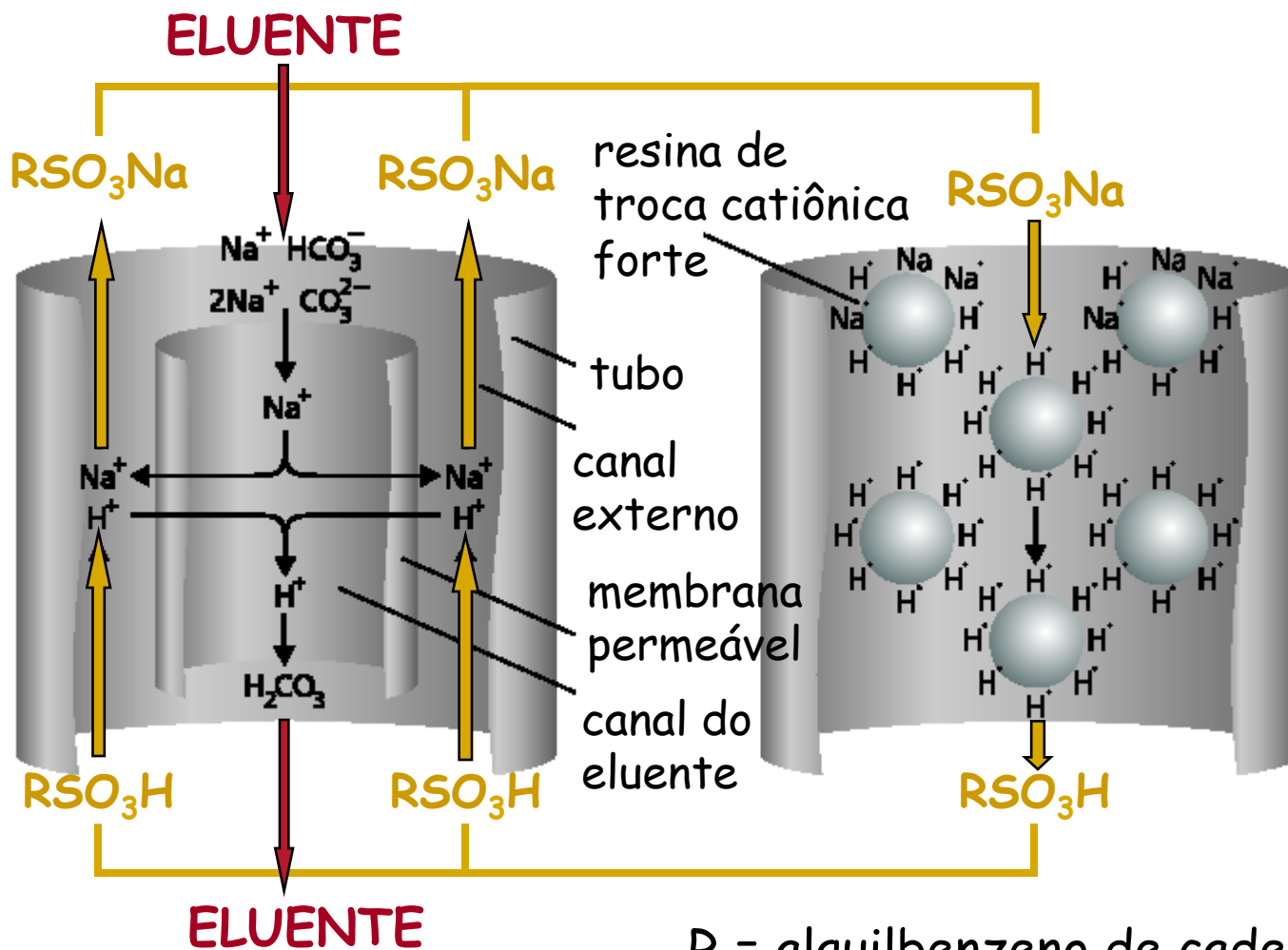
- **inconveniente do uso de colunas supressoras**: necessidade de regeneração periódica (8-10h) para converter a coluna a sua forma original ácida ou básica
- uso de **duas colunas** supressoras: enquanto uma das colunas é usada como supressora (retém Na^+ , supressor- Na^+), a outra é condicionada pela passagem do eluente (HX , supressor- H^+); quando a primeira coluna satura (7-12h), uma válvula dirige o fluxo para a segunda coluna e assim sucessivamente, e novamente o sistema pode ser usado por mais 7-12 h.
- **membrana supressora**
- **sistemas eletrolíticos**

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

membranas supressoras

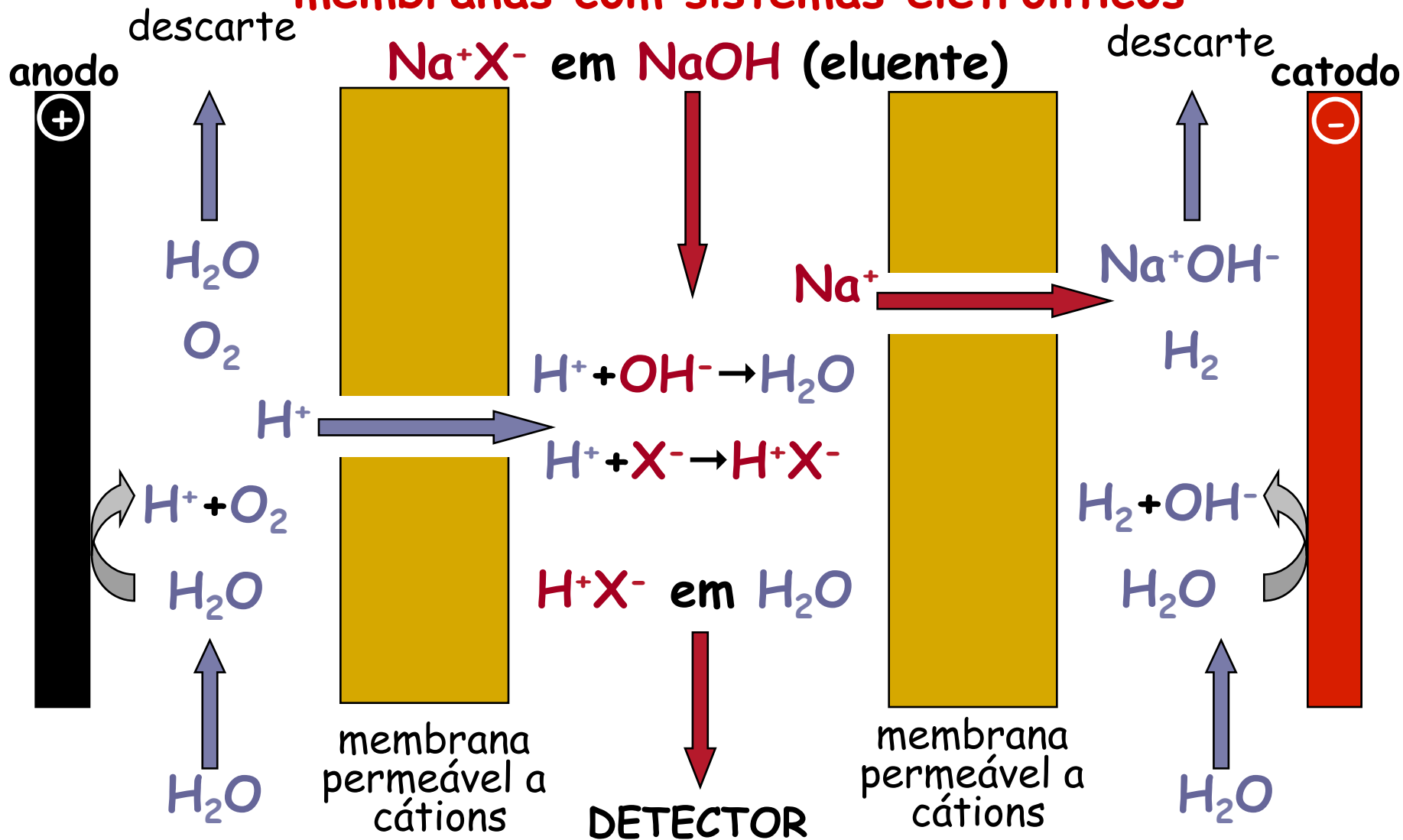


CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA membrana supressoras



CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

membranas com sistemas eletrolíticos

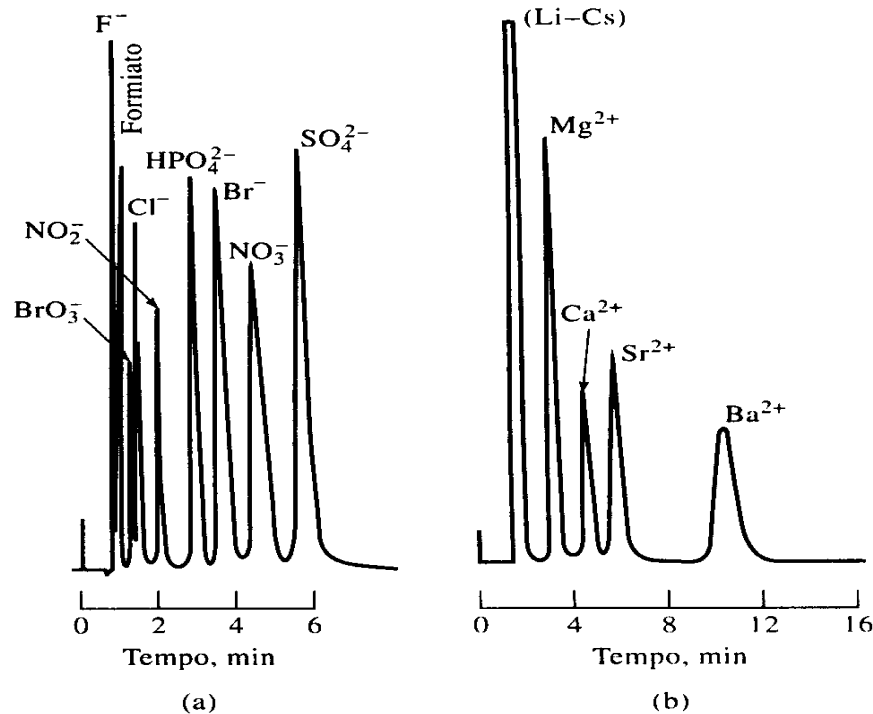


CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

aplicações típicas

Concentrações, ppm	
F ⁻	3
Formiato	8
BrO ₃ ⁻	10
Cl ⁻	4
NO ₂ ⁻	10
HPO ₄ ²⁻	30
Br ⁻	30
NO ₃ ⁻	30
SO ₄ ²⁻	25

Concentrações, ppm	
Ca ²⁺	3
Mg ²⁺	3
Sr ²⁺	10
Ba ²⁺	25



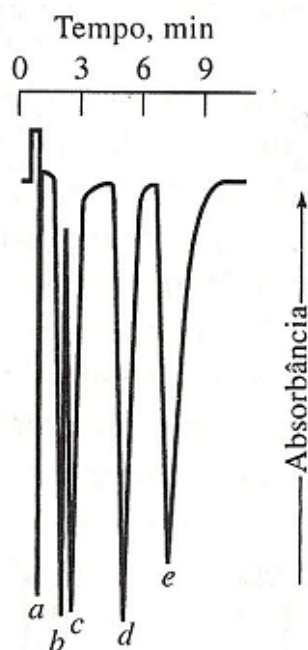
CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA em coluna única

- equipamentos onde nenhuma coluna supressora é usada
- abordagem depende de pequenas diferenças de condutividade entre íons eluídos e os íons do eluente
- para amplificar essas diferenças são usados trocadores de baixa capacidade, tornando possível a eluição de espécies de baixa condutância equivalente
- um pouco menos sensível e tem uma faixa mais limitada do que a cromatografia com coluna supressora

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA em coluna única

- **método fotométrico indireto** para uso em cromatografia por troca iônica sem coluna supressora: permite a detecção de ânions e cátions que não absorvem
- eluente é composto por ânions ou cátions que absorvem: estes são usados para deslocar os analitos da coluna
- quando o íon do analito é deslocado pelo trocador, seu lugar é ocupado por um número equivalente de íons do eluente
- assim, a absorbância do eluído diminui conforme os íons do analito saem da coluna
- a detecção indireta tem uma faixa mais restrita do que a detecção direta

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA método fotométrico indireto

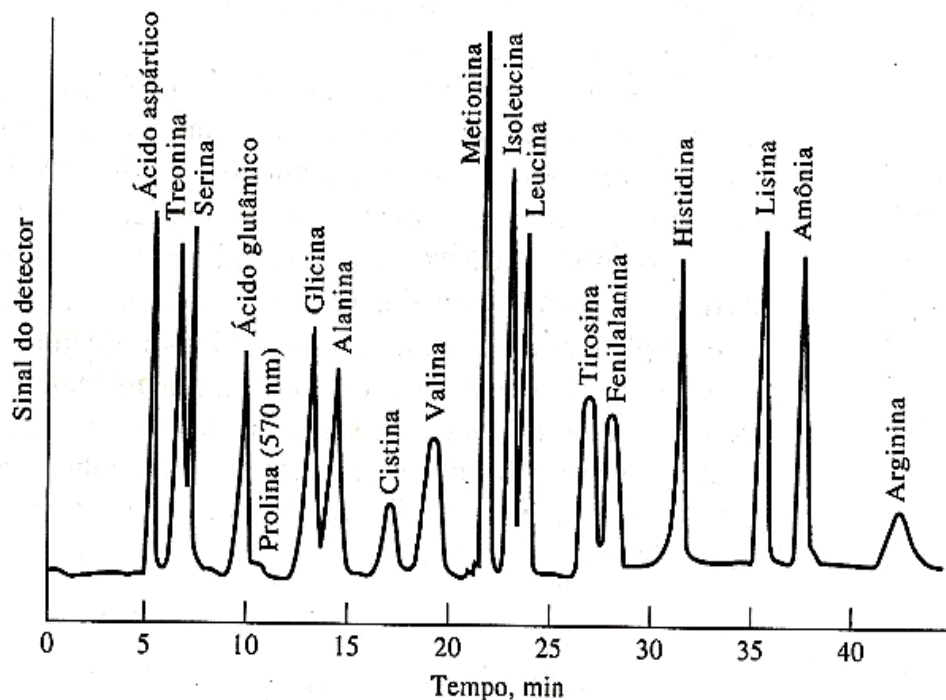


- eluente é constituído de ftalato de sódio
- ftalato é o íon deslocador que absorve no ultravioleta

Figura 28-24 Detecção fotométrica indireta de vários ânions por eluição. Eluente: ftalato dissódico 10^{-3} M, ácido bórico 10^{-3} M, pH 10. Vazão: 5 mL/min. Volume da amostra: 0,02 mL. Detector de UV. Íons da amostra: (a) 18 μ g de carbonato; (b) 1,4 μ g de cloreto; (c) 3,8 μ g de fosfato; (d) 5 μ g de azida; (e) 10 μ g de nitrato (*reproduzida com permissão de H. Small, Anal. Chem., 1985, 55, 240A. Copyright 1983 American Chemical Society*)

CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

derivação pós-coluna

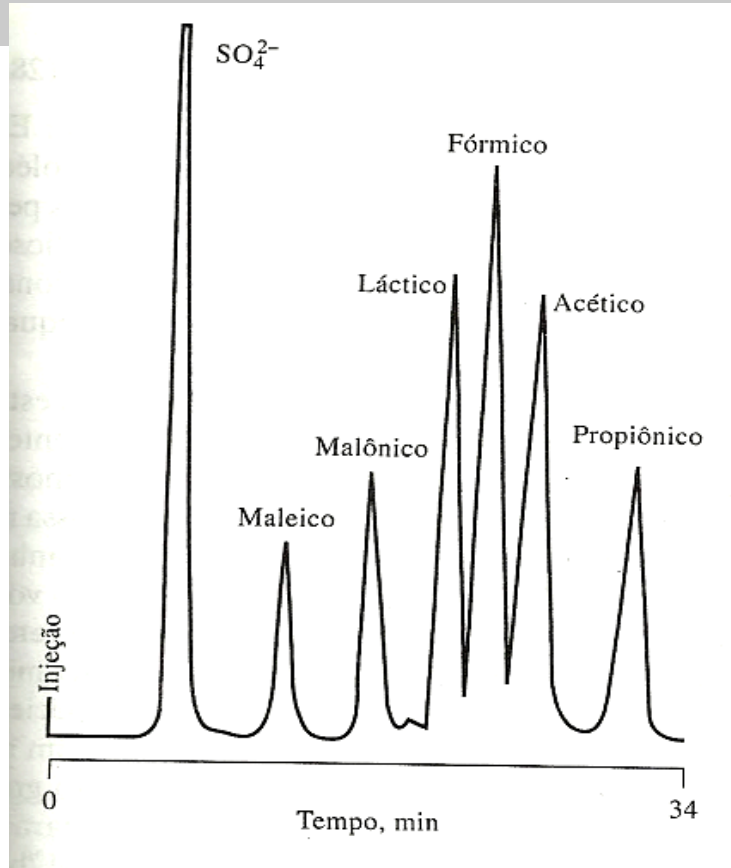


- separação de 17 amino ácidos em coluna trocadora de cátions

- derivação com ninidrina produzindo aduto que absorve em 570 nm

- não é uma forma de cromatografia iônica pois é a espécie neutra que é separada; no entanto, emprega colunas de troca iônica

CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO DE ÍONS



- fase estacionária: resina trocadora de cátion na forma ácida
- eluição é feita com solução diluída de HCl
- coluna analítica é conectada a uma coluna supressora na forma de Ag^+ ; os íons H^+ do eluente são intercambiados por íons Ag^+ , precipitados como $AgCl$, removendo assim a contribuição do íon do eluente

• a forma não dissociada dos ácidos é distribuída entre a fase móvel e o líquido imobilizado nos poros da fase estacionária;

• constantes de distribuição estão relacionadas com o inverso das constantes de dissociação

CROMATOGRAFIA POR PAREAMENTO IÔNICO

Tabela IX-8 – Aplicações dos reagentes par iônico

Reagente par iônico	Aplicações
Aminas quaternárias (por exemplo, tetrabutyl)	Ácidos fortes e fracos, corantes, ácidos carboxílicos
Aminas terciárias (por exemplo, trioctilamina)	Sulfonados
Alquil- e arilsulfonatos (por exemplo, heptanossulfonato)	Bases fortes e fracas, catecolaminas
Alquilsulfatos (por exemplo, laurilsulfato)	Semelhantes aos ácidos sulfônicos, porém com diferente seletividade

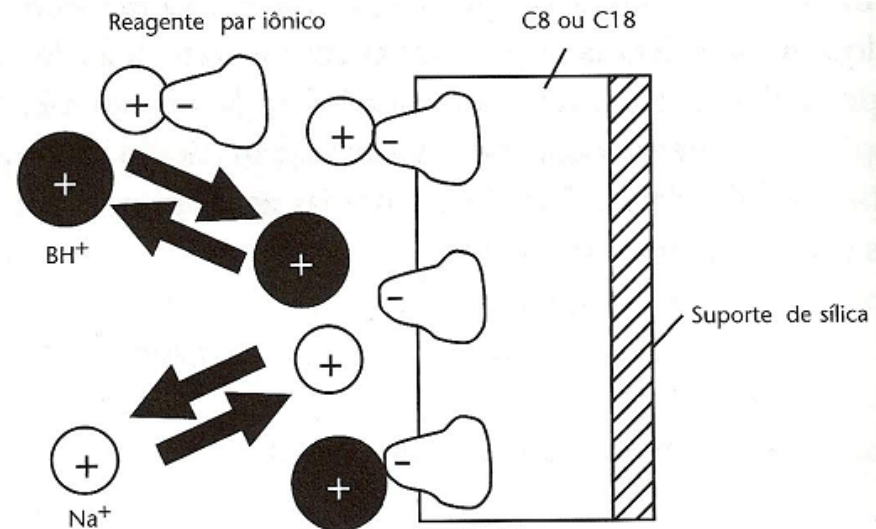
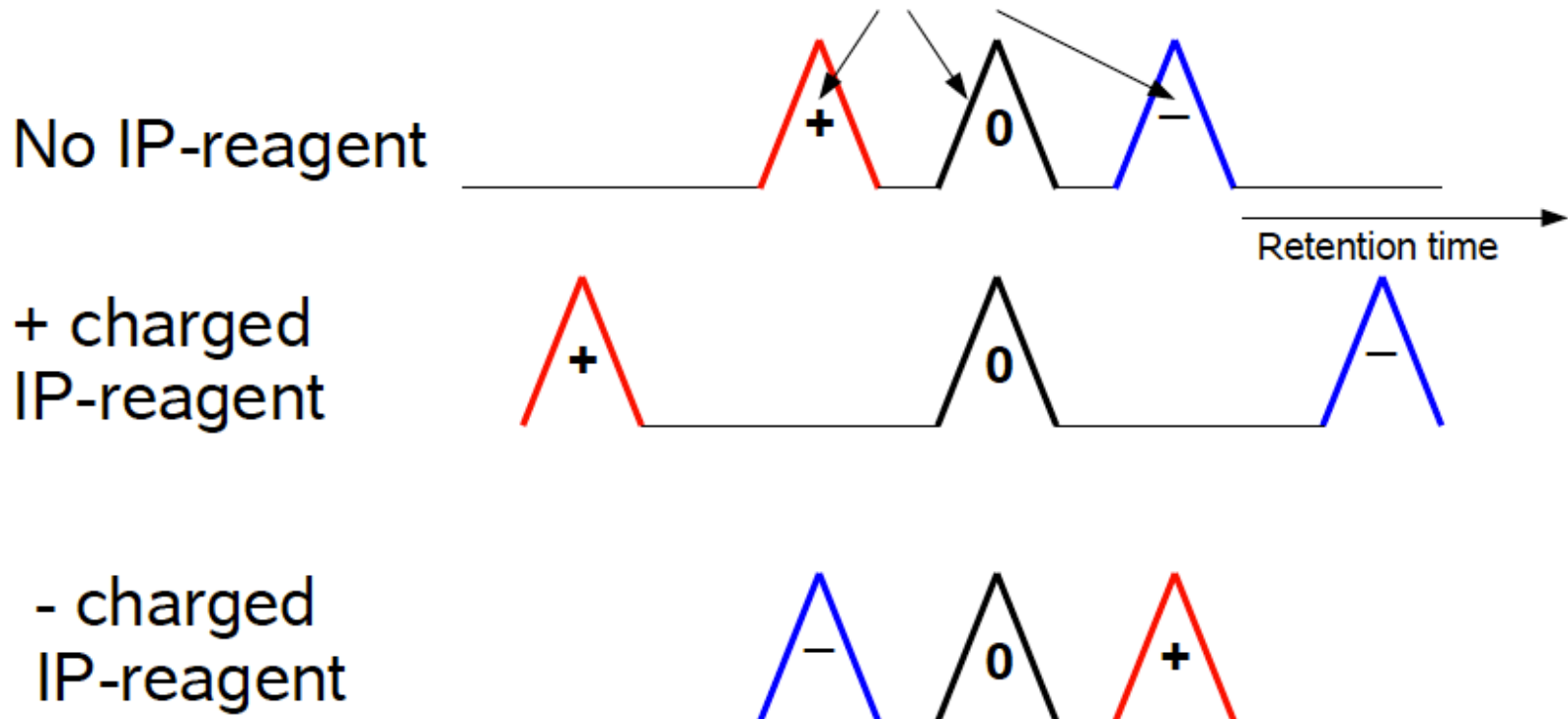


FIGURA IX-14: Representação da retenção em cromatografia por par iônico.

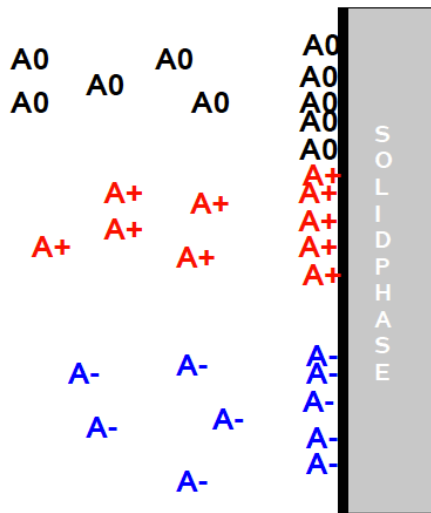
•
•

What is the effect of the IP-reagent on retention of analytes of different charge?



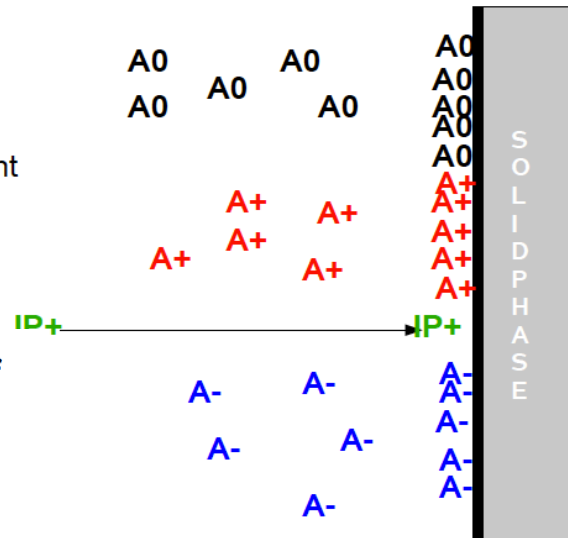
Schematic explanation of the effect of the IP-reagent on retention

When no IP reagent is added the distribution is 1:1 for all analytes



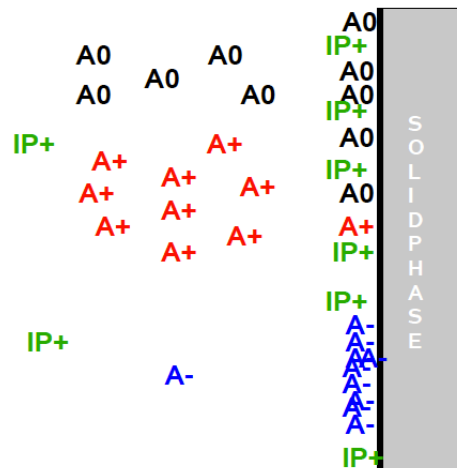
Schematic explanation of the effect of the IP-reagent on retention

The IP-reagent will adsorb to the stationary phase.



Schematic explanation of the effect of the IP-reagent on retention.

The charge of the adsorbed IP-reagent interacts electrostatically with the charge of the analytes



CROMATOGRAFIA POR PAREAMENTO IÔNICO

Á. Bartha, J. Ståhlberg / J. Chr

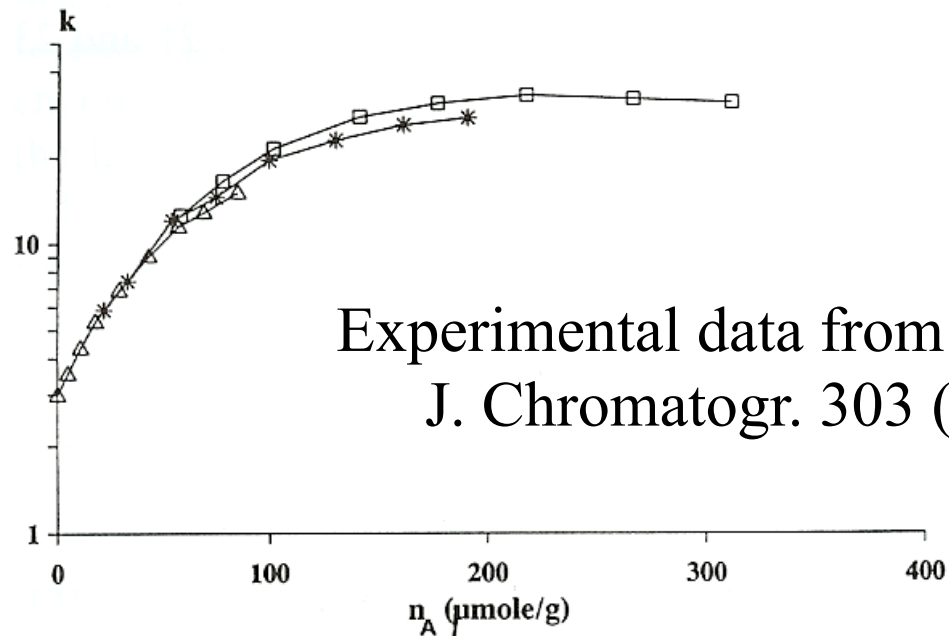


Fig. 4. Capacity factor (k) data for adrenaline vs. stationary phase concentration (n_A) of sodium (Δ) butyl-, ($*$) hexyl- and (\square) octylsulphonate pairing ions measured at constant ionic strength (175 mM Na^+) of the phosphate buffer (pH 2.1) mobile phase on an ODS-Hypersil column. See ref. 26 for experimental details.

CROMATOGRAFIA POR PAREAMENTO IÔNICO

- 1- Adrenaline
- 2- Dopamine
- 3- Tyramine
- 4- Tryptamine

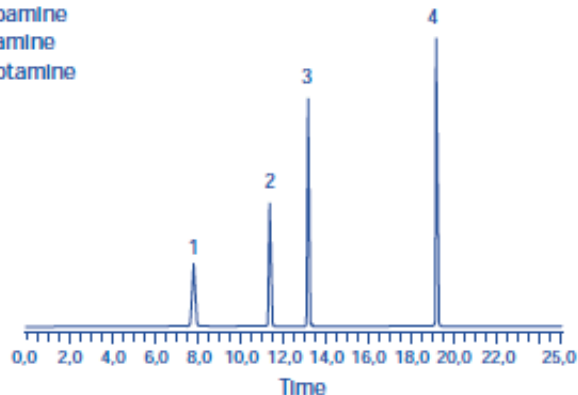


Figure 4. Mixture of biogenic amines resolved by IPC

Columns: Discovery™ C18 Column (250 x 4.0 mm) ID, 5 µm (Cat. No 04971-40)
Eluent: acetonitrile: heptanesulfonic acid buffer pH 2.4:
Buffer concentration: 0,005 M heptanesulfonic acid sodium salt (Cat. No 51832) + 0,01 M phosphoric acid (Cat. no 79606)
Weigh-in: - 2 mg in 10 ml acetonitrile/phosphoric acid (0.01 M) 1:9
Acetonitrile gradient: t=0 min : 6%, t=5 min : 6%, t=18 min : 25%
Flow: 1.5 ml/min
Detection: 220 nm
Injection volume: 20 µl
Temperature: ambient
Detector: UV 1000
Pump: P 4000

 SUPELCO

- 1- 5'-AMP
- 2- 3',5'-C-AMP
- 3- 3'-AMP
- 4- 2'-AMP
- 5- 5'-ADP
- 6- 5'-ATP

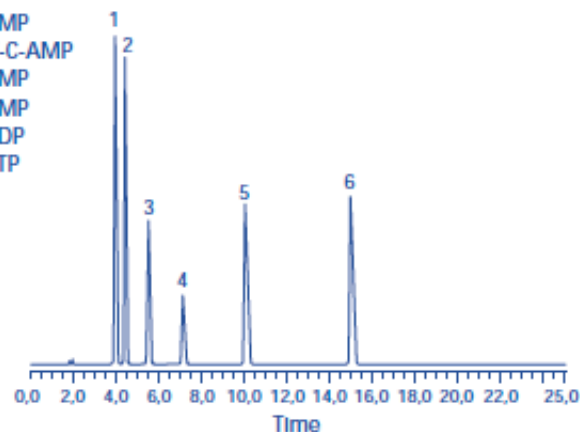
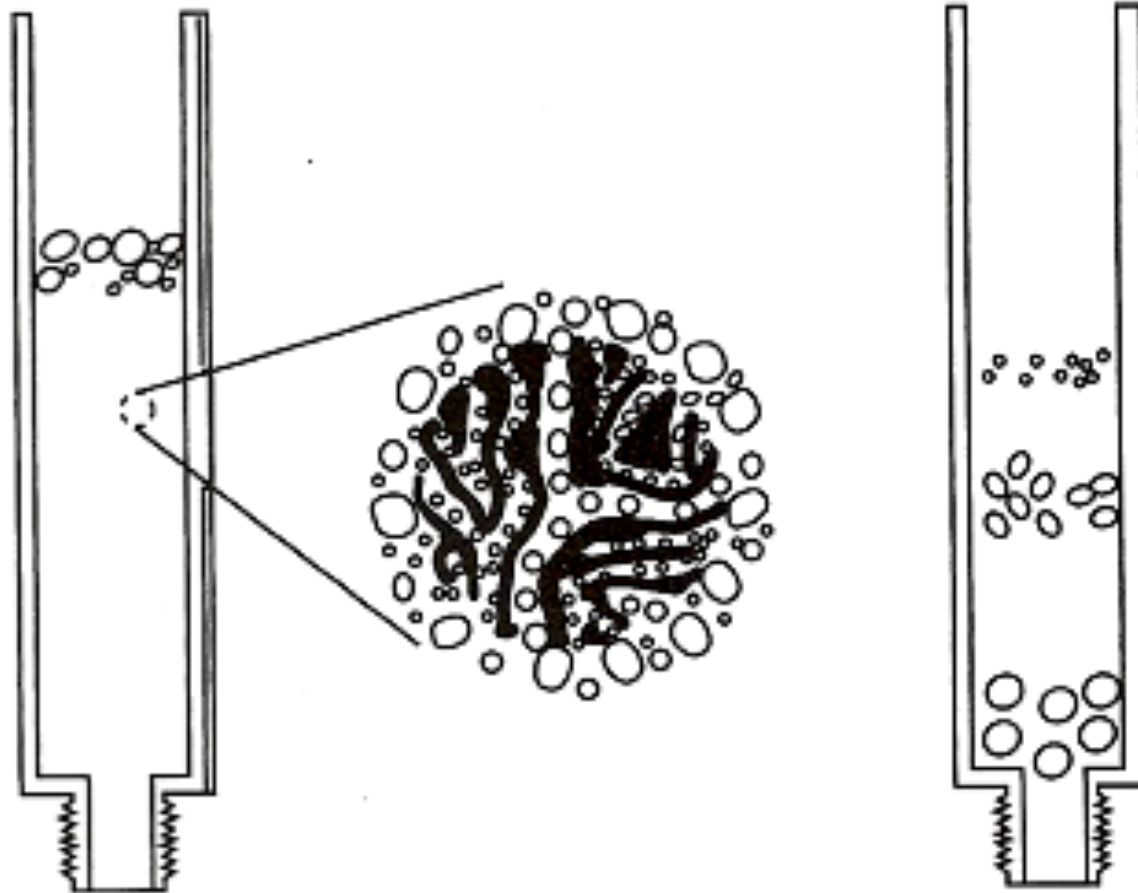


Figure 5. Mixture of nucleotides resolved by IPC

Column: Discovery™ C18 Column (250 x 4.0 mm) ID, 5 µm (Cat. No 504971-40)
Eluent: acetonitrile: tetrabutylammonium buffer pH 7.0
Gradient Buffer concentration: 0,005 M tetrabutyl-ammonium hydrogensulfate (Cat. No 86853) + 0,01 M Na₂HPO₄*12H₂O (Cat. No 71649).
Weigh-in: - 4 mg in 10 ml acetonitrile / water 1:9
Acetonitrile gradient: t=0: 10%; t=4 min 10%; t=14 min: 25%
Flow: 1.5 ml/min
Detection: 254 nm
Injection volume: 20 µl
Temperature: ambient
Detector: UV 1000
Pump: P 4000

 SUPELCO

CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO



CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

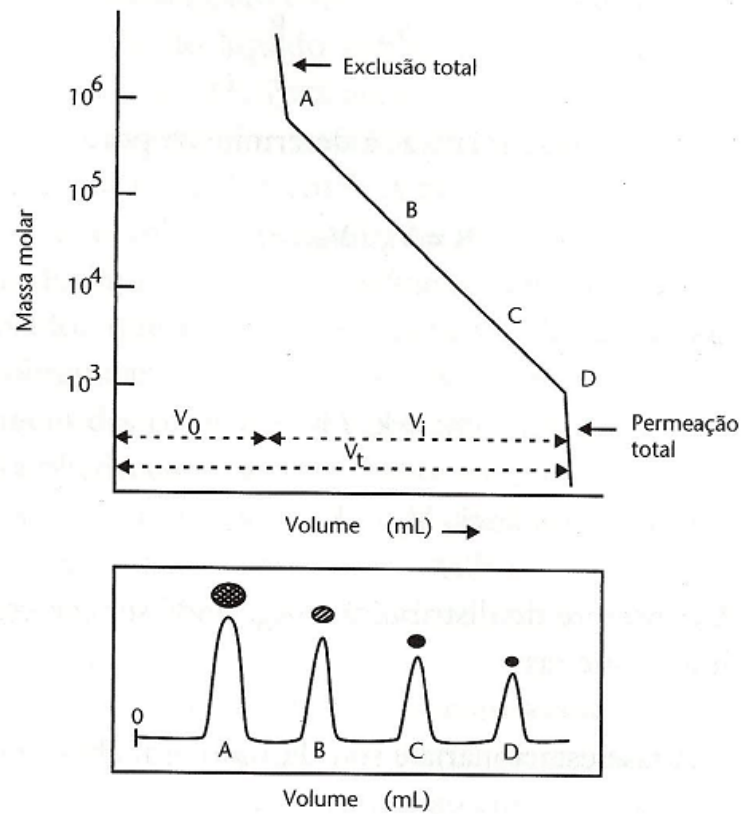
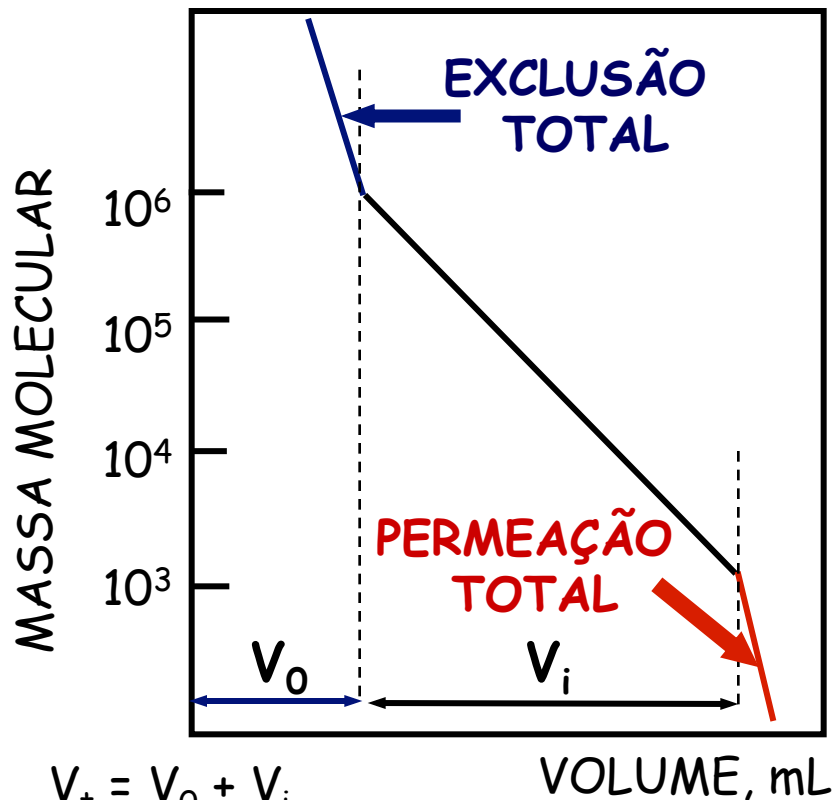


FIGURA VI-2: Relação entre massa molar e volumes de retenção em cromatografia por exclusão.

CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO



Resolução é baseada no tamanho efetivo dos componentes da amostra:

- **limite de permeação**: abaixo do qual todas as moléculas de menor tamanho são igualmente difundidas dentro dos poros do material
- **limite de exclusão**: acima do qual todas as moléculas são muito grandes para penetrar os poros
- somente podem ser separadas as moléculas que se encontram dentro dos dois limites

$$V_t = V_0 + V_i$$

V_t volume total da fase móvel

V_0 volume intersticial (entre as partículas, fora dos poros)

V_i volume intrasticial (dentro dos poros)

CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO

- Relação de retenção em CE

$$V_t = V_g + V_i + V_0$$

V_t : volume total da coluna

V_g : volume da matriz sólida

V_i : vol. intersticial

V_0 : vol. morto

- Eluição

$$V_e = V_0 + K V_i$$

$$0 < K < 1$$

Resolução/Eficiência em SEC

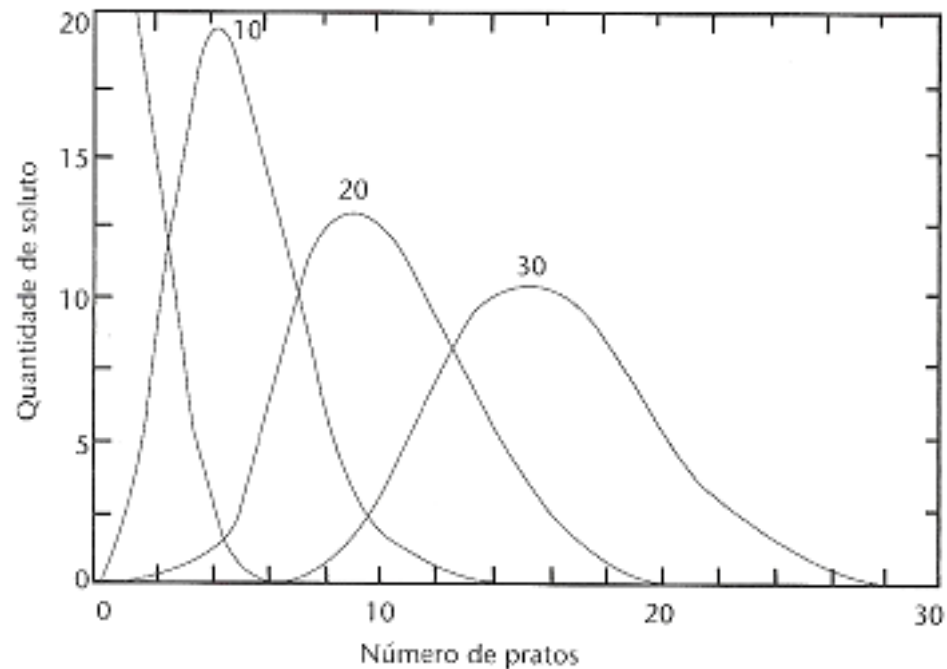


FIGURA VI-3: Espalhamento de zona, considerando-se que uma coluna cromatográfica seja um conjunto de estruturas (pratos) justapostas e que o processo de separação pressuponha uma série de equilíbrio e transferências. O algoritmo acima dos picos indica o número de transferências.

Tipos de gel

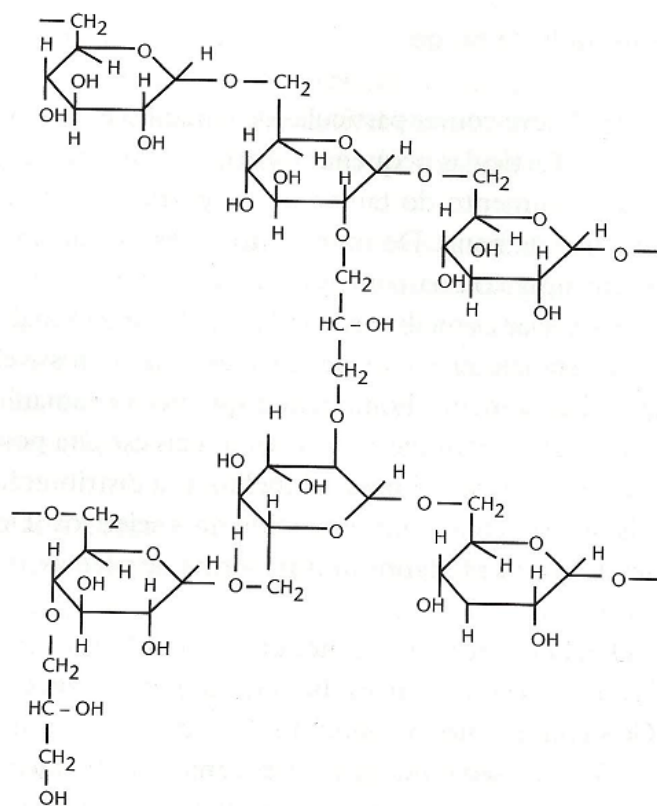


FIGURA VI-4: Estrutura parcial de Sephadex.

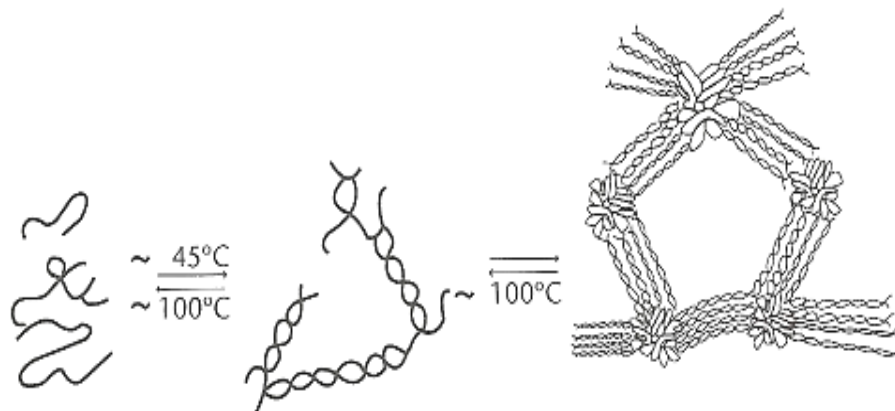
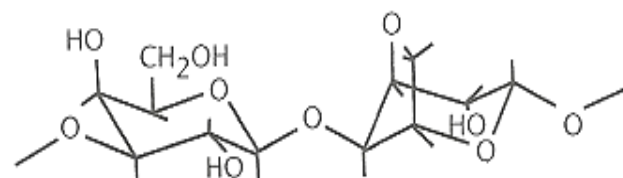


FIGURA VI-5: Estrutura parcial de agarose. Formação do gel de agarose.

Tipos de gel

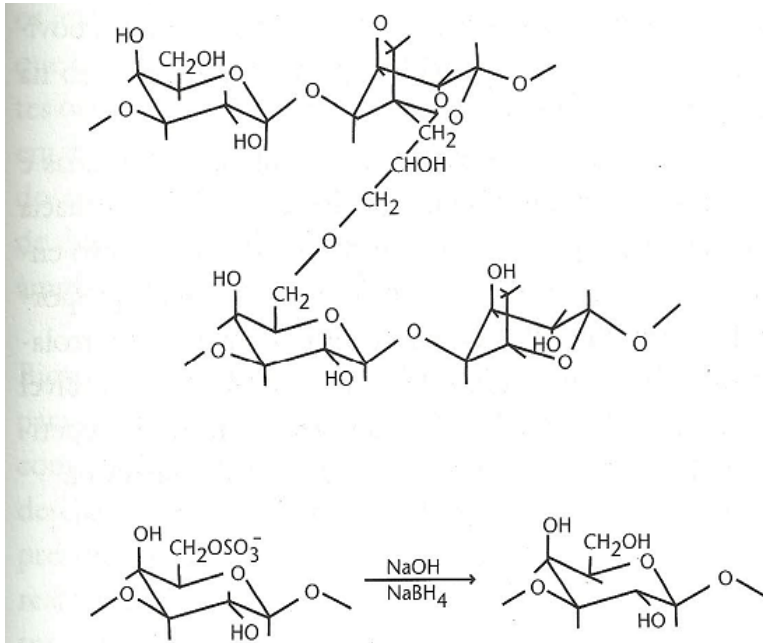


FIGURA VI-6: Estrutura parcial de Sepharose com as ligações entrecruzadas.

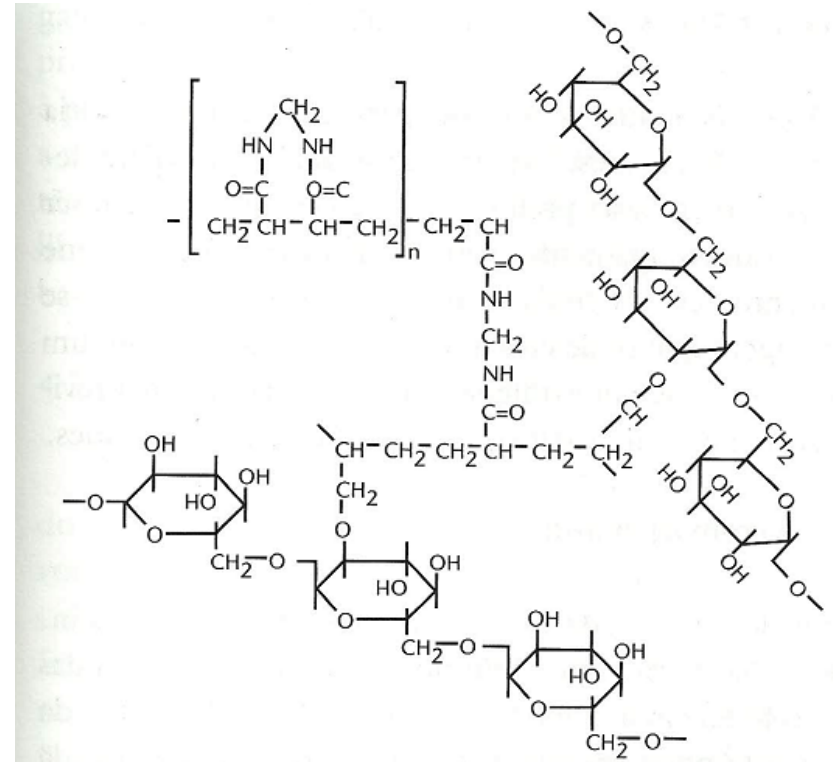


FIGURA VI-7: Estrutura parcial de Sephacryl.

Propriedades das Fases para SEC

Tabela VI-1 – Comparação das propriedades dos recheios: Sephadex^a e Bio-Gel^b

Sephadex	Diâmetro das partículas secas (µm)	Limite de exclusão (massa molar)	Bio-Gel	Diâmetro das partículas úmidas (µm)	Limite de exclusão (massa molar)
G10	40-120	700	---	---	---
G15	40-120	1.500	P-2	40-80	1.800
---	---	---	P-4	40-80	4.000
G25	50-150	5.000	P-6	40-80	6.000
---	---	---	P-10	40-80	20.000
G50	50-150	30.000	P-30	80-150	40.000
---	---	---	P-60	80-150	60.000
G75	40-120	80.000	P-100	80-150	100.000
G100	40-120	150.000	---	---	---
---	---	---	P-250	80-150	200.000
G150	40-120	300.000	---	---	---
---	---	---	p-300	150-300	400.000
G200	40-120	600.000	---	---	---

^a Amersham Biosciences, comercializado pela GE Healthcare.

^b Bio-Rad.

Propriedades das Fases para SEC

Tabela VI-2 – Propriedades do recheio Sephacryl^a

Tipo	Diâmetro das partículas úmidas (µm)	Intervalo de fracionamento (massa molar)	
		Proteínas	Polissacarídeos
S-200 Superfina	40-105	$50 \times 10^3 - 2,5 \times 10^5$	$1 \times 10^3 - 8 \times 10^4$
S-300 Superfina	40-105	$1 \times 10^4 - 1,5 \times 10^6$	$1 \times 10^3 - 7,5 \times 10^5$

^a Amersham Biosciences, comercializado pela GE Healthcare.

Propriedades das Fases para SEC

Tabela VI-3 – Propriedades do recheio Sepharose^a

Tipo	Concentração da agarose (aproximada) %	Diâmetro das partículas úmidas (µm)	Intervalo de fracionamento (massa molar)	
			Proteínas	Polissacarídeos
2B	2	60-200	$70 \times 10^4 - 40 \times 10^6$	$1 \times 10^5 - 20 \times 10^6$
4B	4	60-140	$60 \times 10^4 - 20 \times 10^6$	$3 \times 10^4 - 5 \times 10^6$
6B	6	45-165	$1 \times 10^4 - 4 \times 10^6$	$1 \times 10^4 - 1 \times 10^6$

a: Amersham Biosciences, comercializado pela GE Healthcare.

Propriedades das Fases para SEC

Tabela VI-4 – Propriedades do recheio Shodex^a

Fase móvel	Tipo	Intervalo de fracionamento (massa molar)
Orgânica	A801/S	50-1.000
	A802/S	50-5.000
	A803/S	400-70.000
	A804/S	1.000-500.000
	A805/S	10.000-5.000.000
	A806/S	100.000-50.000.000
Aquosa	S801/S	50-1.000
	S802/S	50-5.000
	S803/S	300-50.000
	S804/S	1.000-500.000
	S805/S	10.000-5.000.000

a: Showa Denka.

Propriedades das Fases para SEC

Tabela VI-5 – Pressões e vazões máximas para vários géis^a

	Tipo	Pressão máxima de operação (kPa)	Vazão (mL min ⁻¹)	Fluxo (mL cm ⁻² h ⁻¹)
Sephadex	G-10 a G-50	b		
	G-75	16	6,4	77,0
	G-75 SF	16	1,5	18,0
	G-100	10	4,2	50,0
	G-100 SF	10	1,0	12,0
	G-150	4	1,9	23,0
	G-150 SF	4	0,5	6,0
	G-200	2	1,0	12,0
	G-200 SF	2	0,25	3,0
Sepharose	6B	9	1,16	14,0
	4B	6	0,96	11,5
	2B	3	0,83	10,0
	CL-6B	>12	2,5	30,0
	CL-4B	12	2,17	26,0
	CL-2B	5	1,25	15,0
Sephacryl	S-200	30	2,5	30,0
	S-300	30	2,5	25,0

a: Dados obtidos com colunas de 30 x 2,5 cm.

b: Obedece à Lei de Darcy.

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

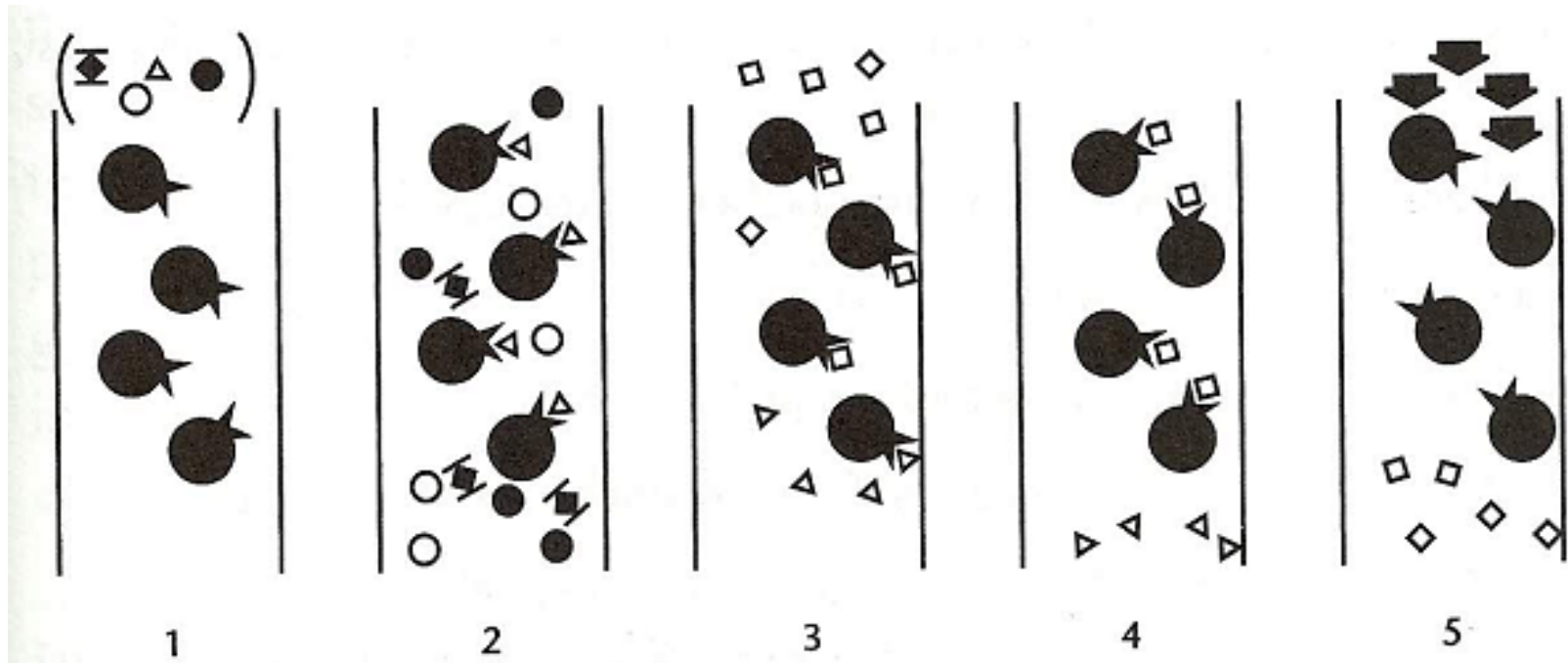


FIGURA VII-1: Esquema do princípio da cromatografia por bioafinidade.

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

Tabela VII-1 – Relação biológica entre substâncias com possibilidade de separação por cromatografia por bioafinidade

Substância a ser isolada	Substâncias imobilizadas na matriz
Enzimas	Substratos, co-fatores, inibidores competitivos
Ácidos nucleicos	Seqüência de bases complementares, histonas, enzimas específicas
Hormônios e vitaminas	Proteínas transportadoras, receptores
Anticorpos	Antígenos, células
Lectinas	Glicoproteínas, polissacarídeos
Células	Lectinas, proteínas específicas da superfície da célula
Proteínas (em geral)	Corantes (com afinidade por sítios protéicos específicos), íons metálicos (grupos elétron-doadores na superfície de proteínas)

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

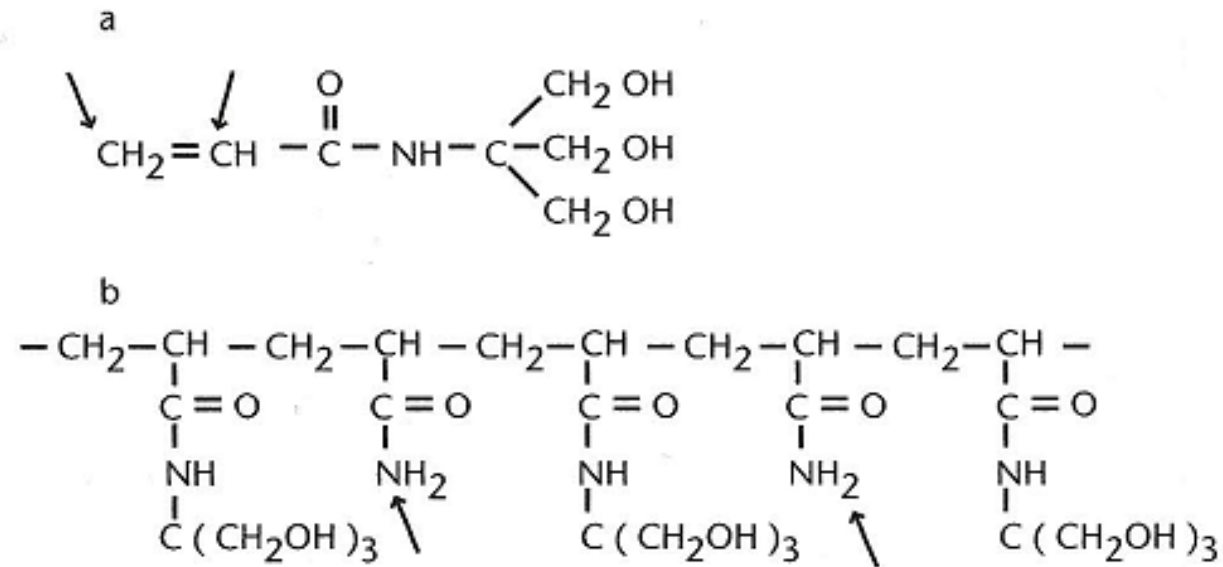


FIGURA VII-2: Estruturas químicas do (a) monômero e (b) polímero de trisacril. As setas indicam os pontos de reação para formação do polímero (a) e o local de união do ligante (b).

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

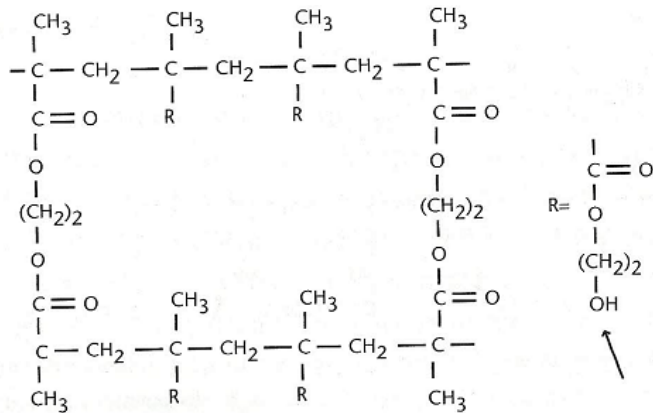


FIGURA VII-3: Estrutura do polímero de hidroxialquilmetacrilato. A seta indica os grupos hidroxilas que apresentam propriedades análogas às da agarose.

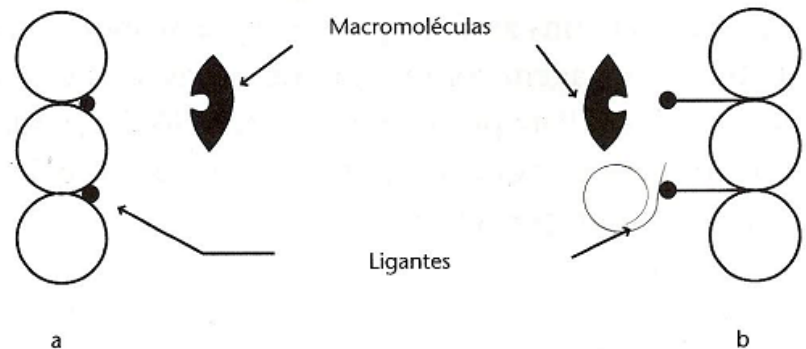


FIGURA VII-4: Aplicação do princípio de "braços" para facilitar a união entre o ligante e a substância a ser isolada; a: ligante unido diretamente à matriz; b: ligante unido à matriz por um braço.

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

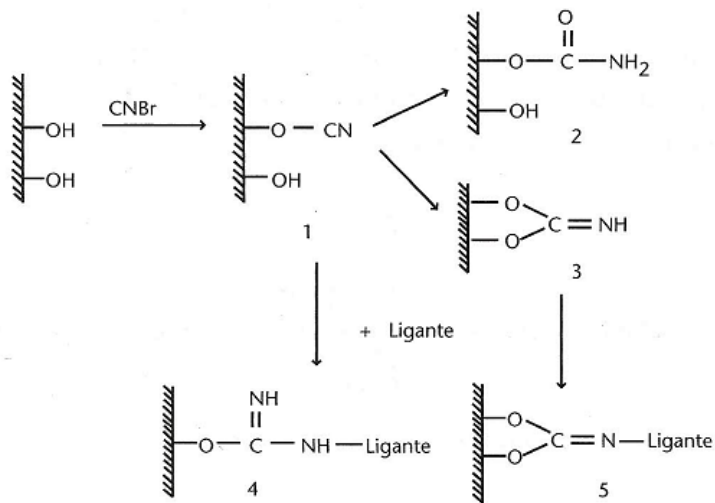


FIGURA VII-5: Mecanismo de ativação típico de uma matriz polissacarídea pelo brometo de cianogênio; 1: éster cianato; 2: derivado carbamato; 3: imidocarbonato cíclico; 4: derivado isouréia; 5: derivado imidocarbonato.

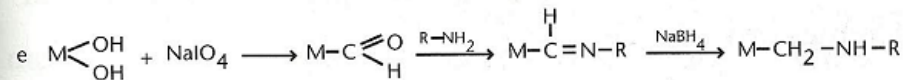
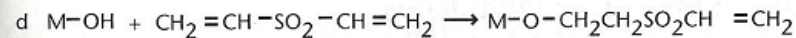
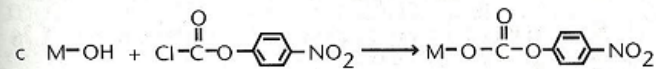
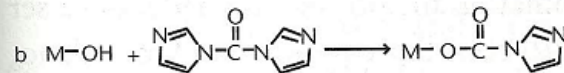
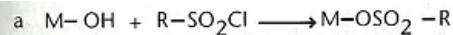


FIGURA VII-6: Métodos alternativos de ativação de matrizes polissacarídicas: a: ativação pelo cloreto de sulfonila; b: ativação com carbonildimida; c: ativação com p-nitroclorobenzoato (cloroformatos); d: ativação pela divinilsulfona; e: ativação pelo periodato de sódio (há necessidade de outras etapas para a ativação se completar).

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

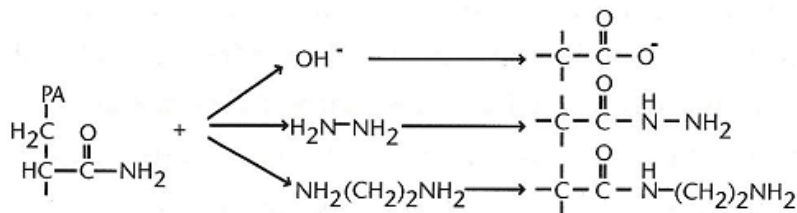


FIGURA VII-7: Métodos de ativação da matriz de poliacrilamida.

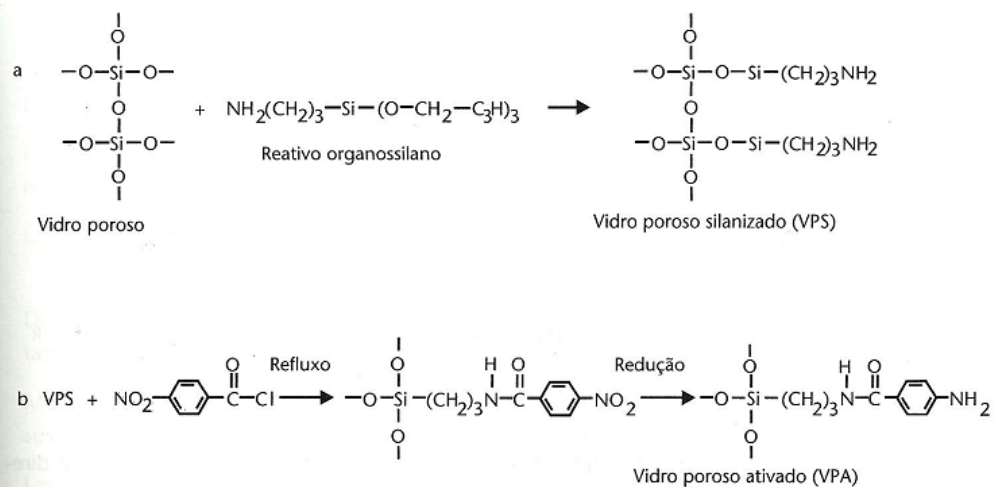


FIGURA VII-8: Silanização da superfície do vidro poroso (a) e subsequente ativação com derivado arilamina (b).

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

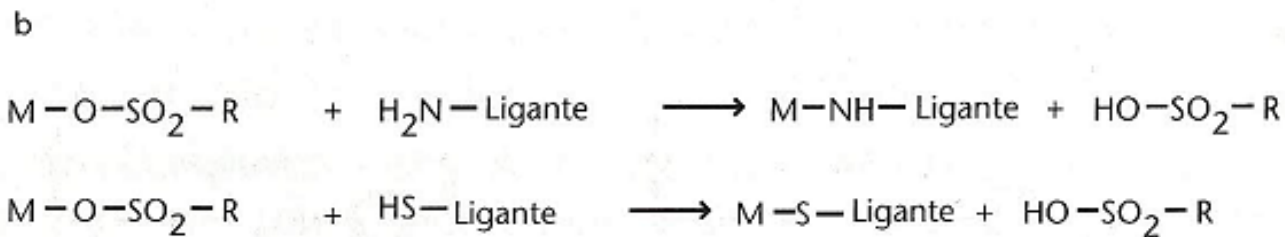
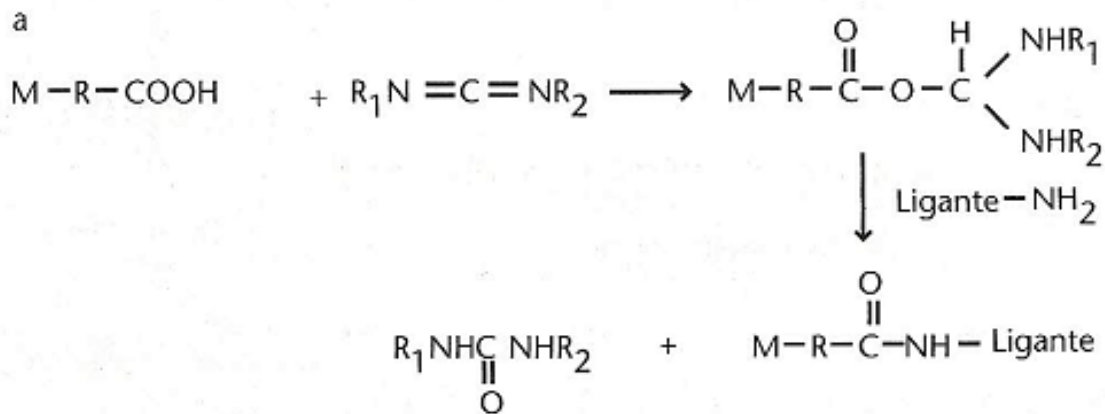


FIGURA VII-9: Exemplos de reações de acoplamento de ligantes específicos diretamente à matriz ativada.

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

Tabela VII-2 – Sequência de etapas da fase de acoplamento do ligante à matriz ativa

Etapa	Exemplos relativos a Sepharose 4 B ativada
Pesar a quantidade necessária da matriz.	1 g da matriz ativada que resulta em 3,5 mL de gel (base de cálculo).
Lavar em funil de placa sinterizada.	Usar HCl 1 mol L ⁻¹ para a lavagem na razão de 200 mL g ⁻¹ da matriz.
Dissolver o ligante usado no tampão escolhido.	Usar tampão bicarbonato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 8,0. 2-3 mg de ligante por g da matriz.
Misturar a solução do ligante com suspensão do gel.	1 h à temperatura ambiente ou 4 h a 4 °C. Usar agitador pendular ou similar.
Lavar para eliminar o excesso do ligante com vários tampões. Durante o processo de lavagem, deve-se, por meio de uma reação específica, observar se o ligante está sendo liberado. O processo deve continuar até não ser observada a liberação do ligante.	Tampão usado no acoplamento seguido de tampão pH alto (Tris 0,05 mol L ⁻¹ a pH 8,0, sendo 0,5 mol L ⁻¹ em NaCl) e após de pH baixo, por exemplo, formato 0,05 mol L ⁻¹ a pH 4,0, sendo 0,5 mol L ⁻¹ em NaCl
Transferir para a coluna cromatográfica ou armazenar entre 4-8 °C.	

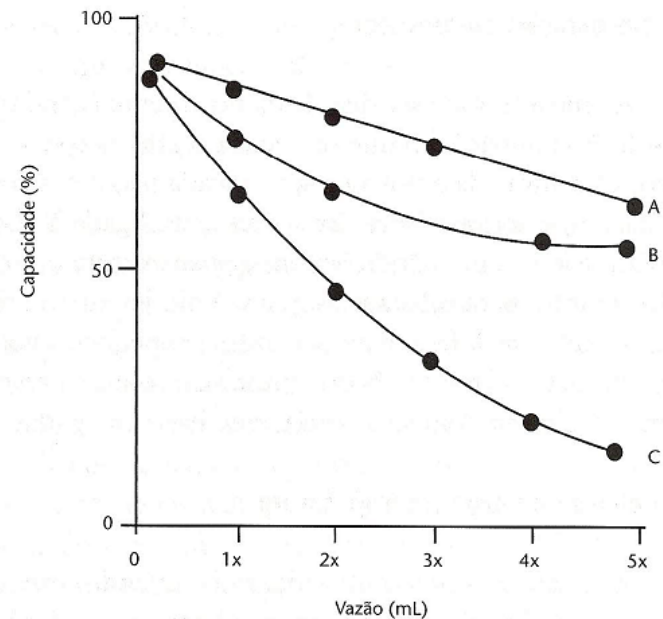


FIGURA VII-10: Dependência da capacidade de uma coluna por bioafinidade em função da vazão. A, B e C são substâncias que podem ser retidas na coluna e são afetadas diferentemente.

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

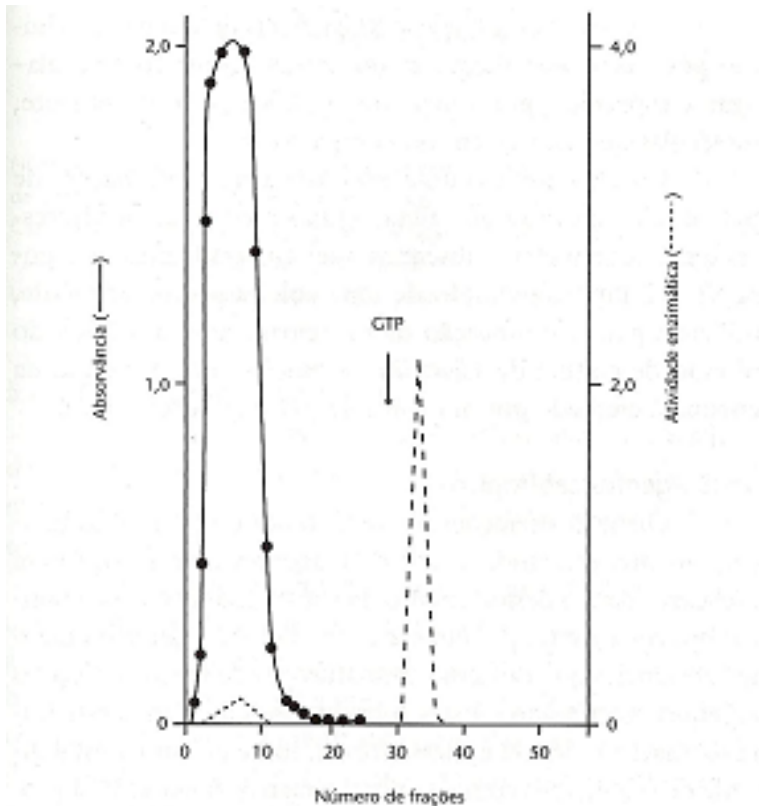


FIGURA VII-11: Isolamento da D-eritrodifoneoptiaina trifosfato sintetase por cromatografia por bioafinidade. Matriz: agarose; ligante: GTP; tampão inicial: fosfato 0,05 mol L⁻¹; pH: 6,8; coluna: 8,5 x 1,0 cm.

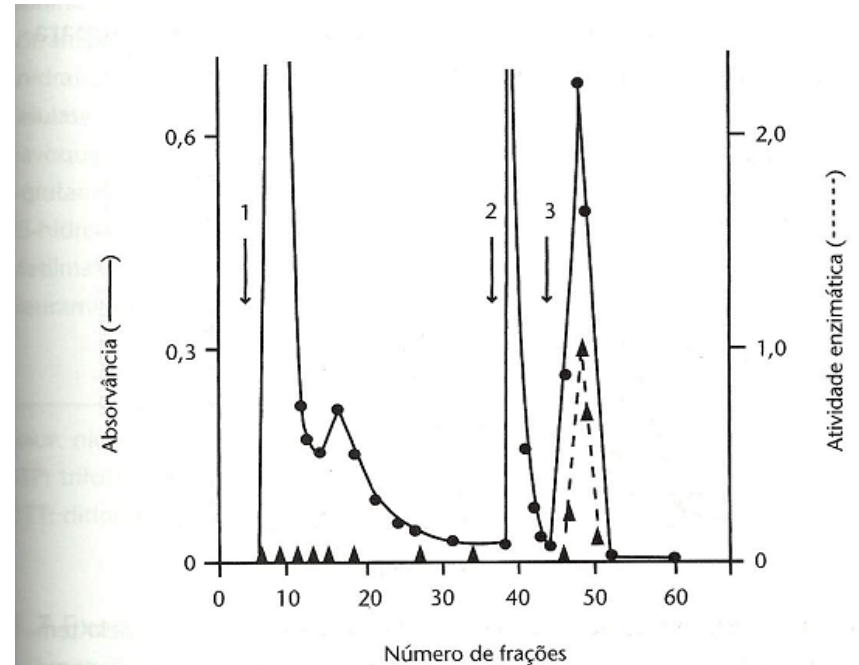


FIGURA VII-12: Eluição em uma coluna "Sepharose-Cap-Leu-Gly" na purificação de proteinase neutra usando diferentes tampões com forças iônicas variáveis. Cap: caproil; Leu: leucina; Gly: glicina. Tampão 1: Tris-Hepes 1 mmol L⁻¹ a pH 7,2 contendo 1 mmol L⁻¹ CaCl₂; tampão 2: tampão 1 + 0,1 mol L⁻¹ de NaCl; tampão 3: Tris 0,05 mol L⁻¹ a pH 10,0, contendo 1 mmol L⁻¹ CaCl₂.

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

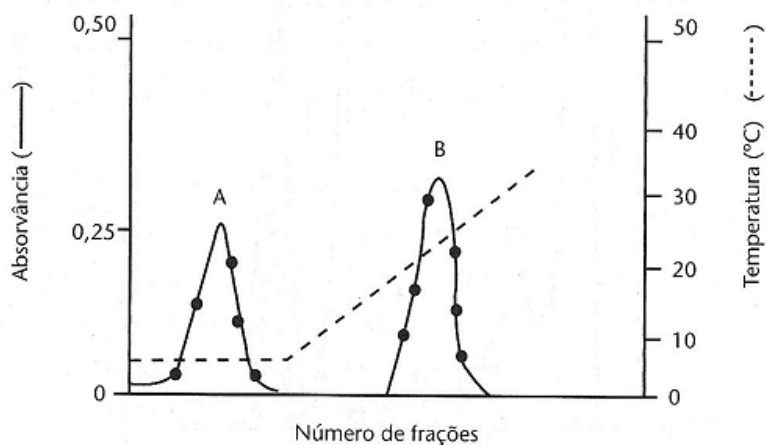


FIGURA VII-13: Eluição de duas substâncias afetadas diferentemente pela temperatura em uma coluna por bioafinidade. A separação é de enzimas (hexoquinase e gliceroquinase) por influência de um gradiente linear de temperatura utilizando 5'-AMP (monofosfato de adenosina) como ligante.

Tabela VII-3 – Exemplos de sistemas de bioafinidade, evidenciando os eluentes utilizados para desorver a substância-alvo

Substância-alvo	Ligante	Eluente
Alonina desidrogenase	NADP	NaCl
Antranilato sintetase	Antranilato	pH (tampão)
Anidrase carbônica	Sulfonamidas	ClO_4^- , I^- e Cl^-
Celulase	Celulose	Temperatura
Flavoquinase (riboflavina quinase)	Flavinas	Riboflavina
γ -glutamilcisteína sintetase	ATP, cestamina	ATP, DTT
3β -hidroxiesteróide oxidase	Colesterol	Triton X-100
Metilmalonil-CoA mutase	Vitamina B12	Vitamina B12
Neuraminidase	Ácido tirosil, ácido p-nitrofenil oxâmico, ácido colomínico	pH, acetato, NaCl

NADP: nicotinamida adenina dinucleotide fosfato.

ATP: trifosfato de adenosina.

DTT: ditioneitol.

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

Tabela VII-4 – Resinas para bioafinidade disponíveis comercialmente

Ligante	Matriz	Agente ativador	“Braço” (átomos)	Ligante imobilizado (<i>capacidade</i>)	Uso mais freqüente	Base de adsorção
Fenil ¹	Agarose	Epicloridrina	3	40 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ (20-30 mg de soro albumina humana mL^{-1})	Isolamento de proteínas plasmáticas	Interação hidrofóbica
ω -aminooctil ¹	Agarose	Brometo de cianogênio	1	2-5 $\mu\text{mol mL}^{-1}$ (5-6 mg de soro albumina bovina mL^{-1})	Isolamento de proteínas	Interação hidrofóbica
Avidina ¹	Agarose	Epicloridrina	15	2-4 mg de avidina mL^{-1} (25-50 mg de biotina mL^{-1})	Isolamento e purificação de biotina	Interação específica com biotina
N-acetil D-glicosamina ¹	Agarose	Divinil sulfonato	3	(25-50 mg de lectina mL^{-1})	Fracionamento de células, isolamento de lectinas, glicosidades	Interação específica de determinados carboidratos com parte de proteínas
Malto-heptaose ¹	Agarose	Epóxido	5	(20-40 mg de maltose ligada a proteína mL^{-1})	Isolamento de glicoproteínas, células	Interação específica de determinados carboidratos com parte de proteínas

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

Tabela VII-4, continuação

Ligante	Matriz	Agente ativador	"Braço" (átomos)	Ligante imobilizado (capacidade)	Uso mais freqüente	Base de adsorção
Heparina ^{1, 2, 3}	Acrilato	Oxirano	5	0,5-1,5 mg mL ⁻¹	Purificação de proteínas plasmáticas, lipases, substâncias em geral, com interação iônica	Interação específica de determinados carboidratos com parte de proteínas
Concanavalina A (Con A) ^{1, 2}	Agarose (Sephacrose 4 B)	Brometo de cianogênio	1	10-15 mg mL ⁻¹ (20-45 mg tiroglobulina mL ⁻¹)	Isolamento de glicoproteínas, glicolípidos, polissacarídeos, células	Interação específica de determinados carboidratos com parte de proteínas
DNA-celulose ¹	Celulose	-	-	3-8 mg de DNA g ⁻¹	Proteínas ribossomais, polimerase	Interação complementar de seqüências de bases nitrogenadas, enzima-substrato
Coenzima A (Co A) ¹	Agarose	Brometo de cianogênio	1	3-6 µmol mL ⁻¹ (1.000-1.500 U de fosfofructofosfatase mL ⁻¹)	Purificação de enzimas que requerem nucleotídeo como coenzima	Interação enzima-coenzima-substrato

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

Tabela VII-4, continuação

Ligante	Matriz	Agente ativador	“Braço” (átomos)	Ligante imobilizado (capacidade)	Uso mais freqüente	Base de adsorção
Affi Gel Blue Gel ³	Agarose (Bio-Gel A-5)	-	-	1,9 mg de corante mL ⁻¹ (0,2 mL de soro mL ⁻¹ e 11 mg de albumina mL ⁻¹)	Grande variedade de proteínas (em função de interações hidrofóbicas, iônicas)	Interação de corantes com proteínas
DEAE-Affi-Gel Blue Gel ³	Agarose	-	-	(0,2-1,0 mL de soro mL ⁻¹ de gel)	Purificação de IgG de soro. Etapa inicial de purificação de proteínas do soro	Bifuncional – troca iônica/interação corante-proteína
Poliuridílico (Poly U) ¹	Poliacril hidrazida e agarose	-	-	0,1-1,0 mg mL ⁻¹ (0,2 mg de ácido poliadenílico (poli A) mL ⁻¹)	Separação de oligonucleotídeos, m-RNA, DNA e RNA	Interação enzima-substrato-co-fator
Ni-CAM™ RC Resin ¹	Agarose	-	6	8-16 μmol de Ni mL ⁻¹ (-5 mg de proteína mL ⁻¹)	Purificação de proteínas em geral	Quelação de metais

Fornecedores: 1: Sigma-Aldrich; 2: Amersham Biosciences; 3: Bio-Rad.

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

Tabela VII-5 – Condições para a cromatografia por bioafinidade para algumas enzimas

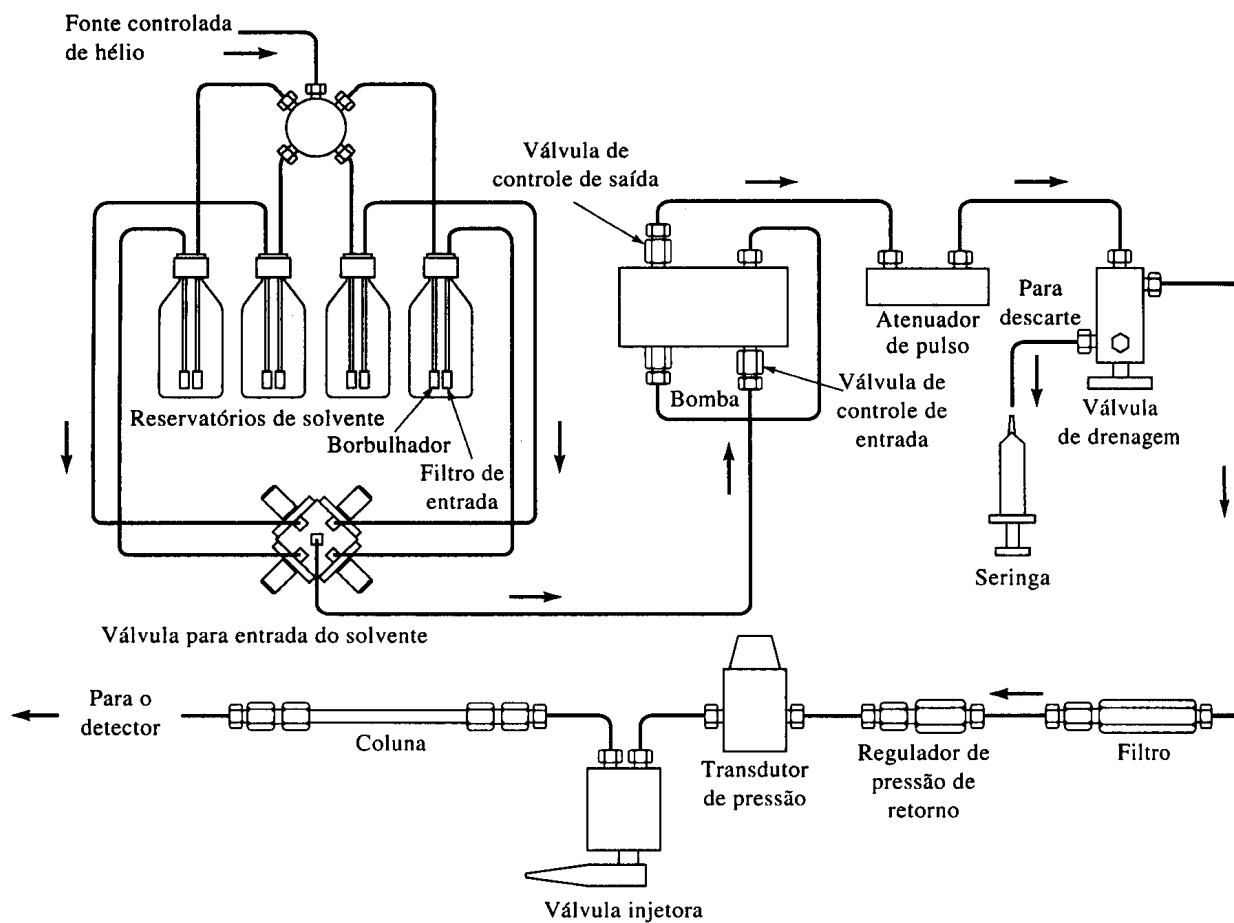
Enzima	Ligante	Eluição
Categoria 1: Específicos		
Colina disidrogenase	Colina	Ditiotreitol
Cathepséina	Pepstatina	NaCl
Celulase	Celulose	Temperatura
Glicose-6-fosfatase	Glicose-6-fosfato	KCl
Glutamato decarboxilase	Etilglutamato	NaCl
1-histidina-2ox-glutaratoamina-transferase (histidina aminotransferase)	Histidina	NaCl
Categoria 2: Gerais		
Ω -hidroxiácido graxo – NADP oxidorreductase	NADP	KCl, NADP
Malonil CoA decarboxilase	NADP	NaCl
Endonuclease de restrição	DNA	Fosfato, KCl
RNA polimerase	DNA	Sais
Fenilalanina t-RNA sintetase	RNA	KCl-glicerol
Polinucleotideofosforilase	RNA	NaCl

CROMATOGRAFIA POR BIOAFINIDADE

Tabela VII-6 – Algumas enzimas purificadas por cromatografia por imunoafinidade em coluna com anticorpos ligados à matriz

Enzima	Eluente
Catalase	Glicerol
Kalilcreína	Guanidina
Celulase	pH 2,2
Aminopectidase	Tris/HCl
Enzima conversora de angiotensina I	MgCl ₂
Uroquinase	Glicina-HCl
Somastotatina	Ácido acético

INSTRUMENTAÇÃO



INSTRUMENTAÇÃO - reservatório da fase móvel e sistemas de tratamento de solvente

- reservatório de 200 - 1000 mL, vidro ou aço inox
- equipados com dispositivo para remoção de gases dissolvidos (evitar formação de bolhas: causam alargamento ou interferem na eficiência do detector)
- desgaseificadores: bomba de vácuo
 - sistema de destilação
 - dispositivos para aquecimento e agitação do solvente
 - borbulhamento de gases inertes de baixa solubilidade
- filtro de entrada: remoção partículas de poeira (fase pode ser filtrada previamente)
- câmara de mistura: eluições em gradiente

INSTRUMENTAÇÃO - sistemas de bombeamento

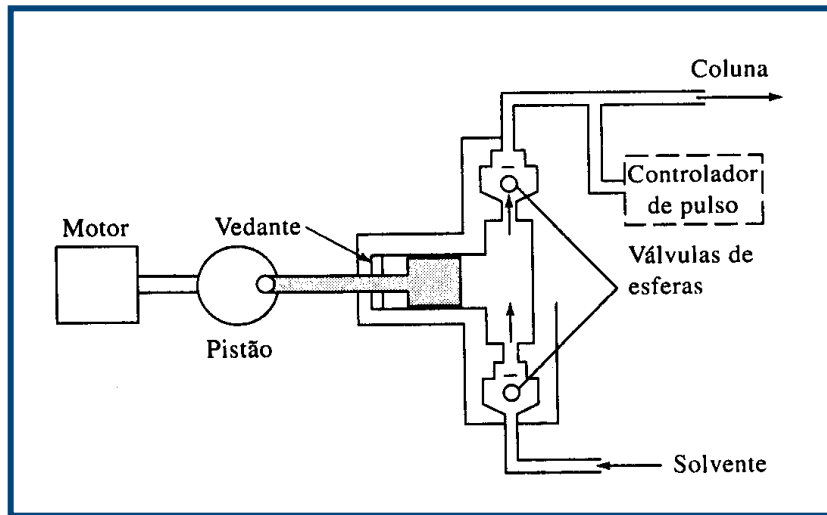
REQUISITOS:

- pressões de até 6000 psi (600 bars)
- vazão contínua, sem pulsos (ou, se pulsando, com amortecedor de pulsos)
- vazões de 0,01 a 10 mL/min (aplicações analíticas) e até 100 mL/min (aplicações preparativas)
- controle de vazão e reprodutibilidade melhor que 1 %
- inércia química: componentes resistente à corrosão

2 TIPOS:

- bombas pneumáticas
- bombas mecânicas: recíprocas (pistão ou diafragma)
deslocamento (tipo seringa)

INSTRUMENTAÇÃO - bombas recíprocas



- 2 válvulas (esferas de safira) são abertas e fechadas alternadamente para controlar a vazão de solvente dentro e fora do cilindro; solvente está em contato direto com o pistão

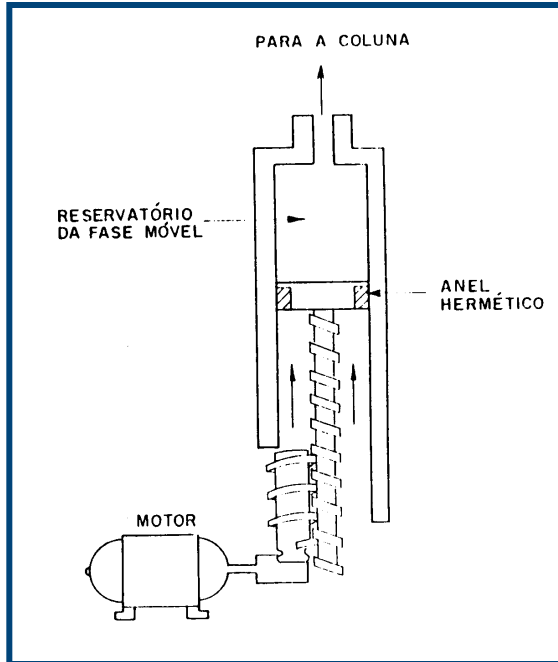
VANTAGENS:

- pequeno volume interno (35 a 400 μL)
- pressões elevadas de saída (até 10000 psi)
- fácil adaptação a eluição em gradiente
- vazão constante
- fluxo independente da pressão de retorno da coluna e da viscosidade do solvente

DESVANTAGENS:

- fluxo pulsado que deve ser amortecido (ruído de fundo na linha de base)

INSTRUMENTAÇÃO - bombas tipo seringa



- câmara em forma de seringa, equipada com êmbolo acionado por um parafuso controlado por um motor

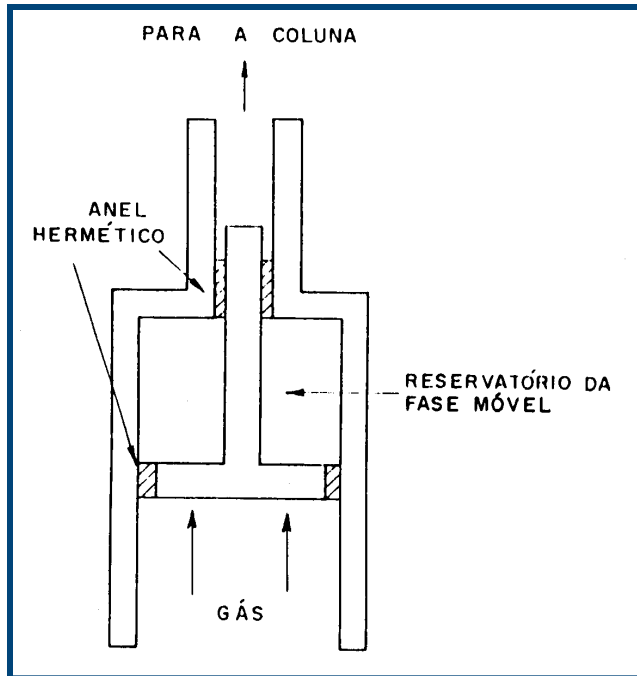
VANTAGENS:

- saída livre de pulsos
- fluxo independente da pressão de retorno da coluna e da viscosidade do solvente

DESVANTAGENS:

- capacidade limitada de solvente (≈ 250 mL)
- inconveniência quando solvente precisa ser trocado

INSTRUMENTAÇÃO - bombas pneumáticas



- fase móvel é contida em reservatório compressível, inserido dentro de um vaso que pode ser preesurizado com gás comprimido

VANTAGENS:

- baratas e livres de pulsação

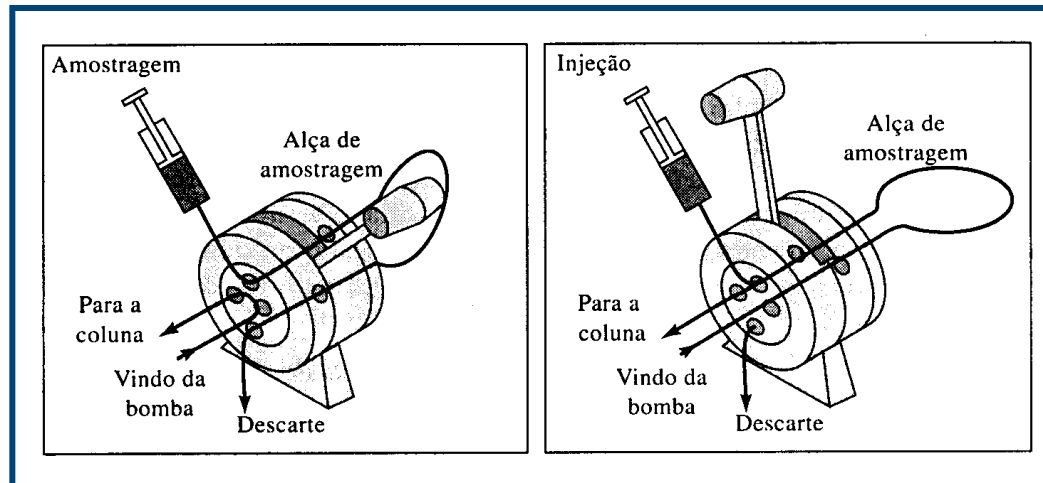
DESVANTAGENS:

- limitação de capacidade e pressão de saída
- fluxo depende da pressão de retorno da coluna e da viscosidade do solvente

INSTRUMENTAÇÃO - controle de vazão e sistemas de programação

- dispositivo controlado por computador para medida de vazão: determinação da queda de pressão por um restritor localizado na saída da bomba
- diferenças detectadas em relação a um valor pré-estabelecido fazem com que a velocidade do motor da bomba seja alterada.
- muitos equipamentos possuem dispositivos para controle da composição do solvente: válvula proporcional

INSTRUMENTAÇÃO - sistema de injeção de amostras



- fator limitante da precisão: repetibilidade da injeção
- volumes devem ser pequenos (evitar alargamento de banda e sobrecarga da coluna, "overload"): $< 500 \mu\text{L}$
- conveniente injetar amostra sem despressurizar o sistema
- sistema mais comum: alça de injeção (loop) mediante seringa; escolha de $0,5$ a $500 \mu\text{L}$; permite injeção a pressões de até 7000 psi ; precisão melhor que 1%

INSTRUMENTAÇÃO - colunas

- em geral, tubos de aço inoxidável, mas tubos de vidro com paredes resistentes também são encontrados (restritos a pressões mais baixas, 600 psi)
- diversidade de colunas recheadas são disponíveis comercialmente, com preços variando entre US\$ 200 a 500

INSTRUMENTAÇÃO - colunas

- **Colunas analíticas:** em geral de 10 a 30 cm; 4 a 10 mm diâmetro com partículas de 3, 5 e 10 μm (60000 pratos/m)
- **Pré-coluna:** introduzida antes da coluna de separação para aumentar a vida útil desta
 - remove material particulado e contaminantes provenientes do solvente
 - serve para saturar a fase móvel com fase estacionária minimizando a sangria da coluna
 - composição deve ser similar a da coluna analítica, com tamanho de partícula em geral maior (minimizar queda de pressão)
- **Termostatização:** em geral coluna é operada a temperatura ambiente; no entanto, cromatogramas de melhor qualidade são obtidos quando a temperatura da coluna é controlada; fornos aquecidos até 100-150 $^{\circ}\text{C}$ estão disponíveis

CARACTERÍSTICAS DAS FASES MÓVEIS

- alto grau de pureza ou de fácil purificação (permitir alta sensibilidade nos detectores de absorvância ou fluorescência)
- dissolver a amostra sem decompor os seus componentes (se possível, solvente da amostra é a própria fase móvel)
- não decompor ou dissolver a fase estacionária (uso da pré-coluna para saturação da fase móvel com fase estacionária; fase ligada ou sólida dispensam esse procedimento)
- ter baixa viscosidade (favorecer transferência de massa)
- ser compatível com o tipo de detector utilizado (particularmente importante na eluição por gradiente)
- ter polaridade adequada para permitir separação conveniente dos componentes da amostra

PROPRIEDADES DAS FASES MÓVEIS DE USO COMUM EM CROMATOGRAFIA

SOLVENTE	ÍNDICE DE REFRAÇÃO	VISCOSIDADE cP	PONTO DE EBULIÇÃO °C	ÍNDICE DE POLARIDADE	FORÇA DO ELUENTE*
n-Hexano	1,372	0,30	81	0,04	-0,2
CCl ₄	1,457				
Éter dietílico	1,350				
THF	1,405	0,46	66	4,0	0,57
Clorofórmio	1,433				
Etanol	1,359				
Acetato de etila	1,370				
MeOH	1,326	0,54	65	5,1	0,95
ACN	1,341	0,34	82	5,8	0,65
Etileno glicol	1,431				
Água	1,333	0,89	100	10,2	grande

*sobre Al₂O₃

CARACTERÍSTICAS DAS FASES MÓVEIS

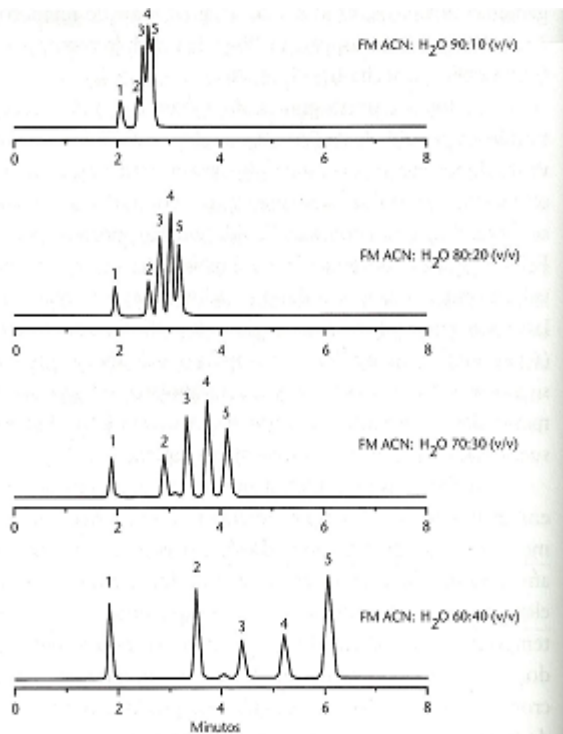


FIGURA IX-2: Método empírico para determinação da força cromatográfica. Compostos: 1: uracil; 2: acetofenona; 3: benzeno; 4: tolueno; 5: naltaleno. Coluna: Spherisorb C8, tamanho de partícula 10 µm. Condições cromatográficas: vazão: 0,8 mL min⁻¹; volume de injeção: 10 µL; detecção: UV, 254 nm.

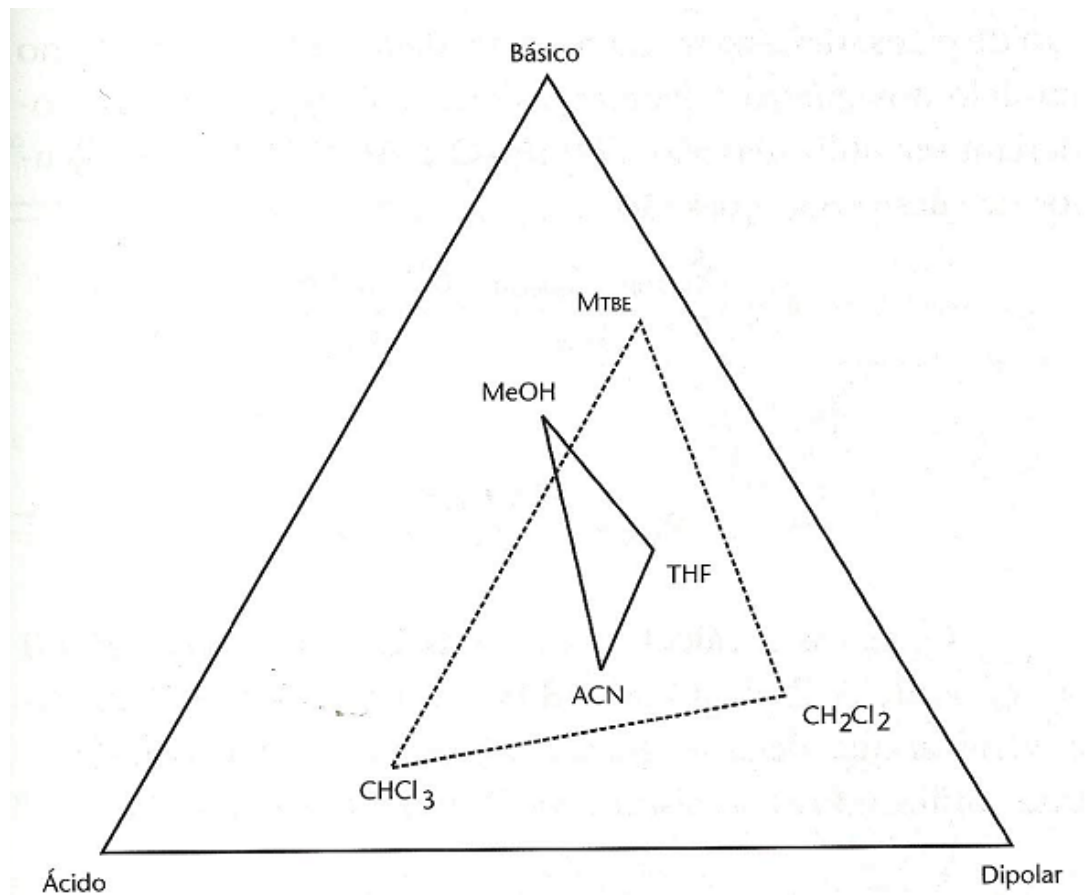
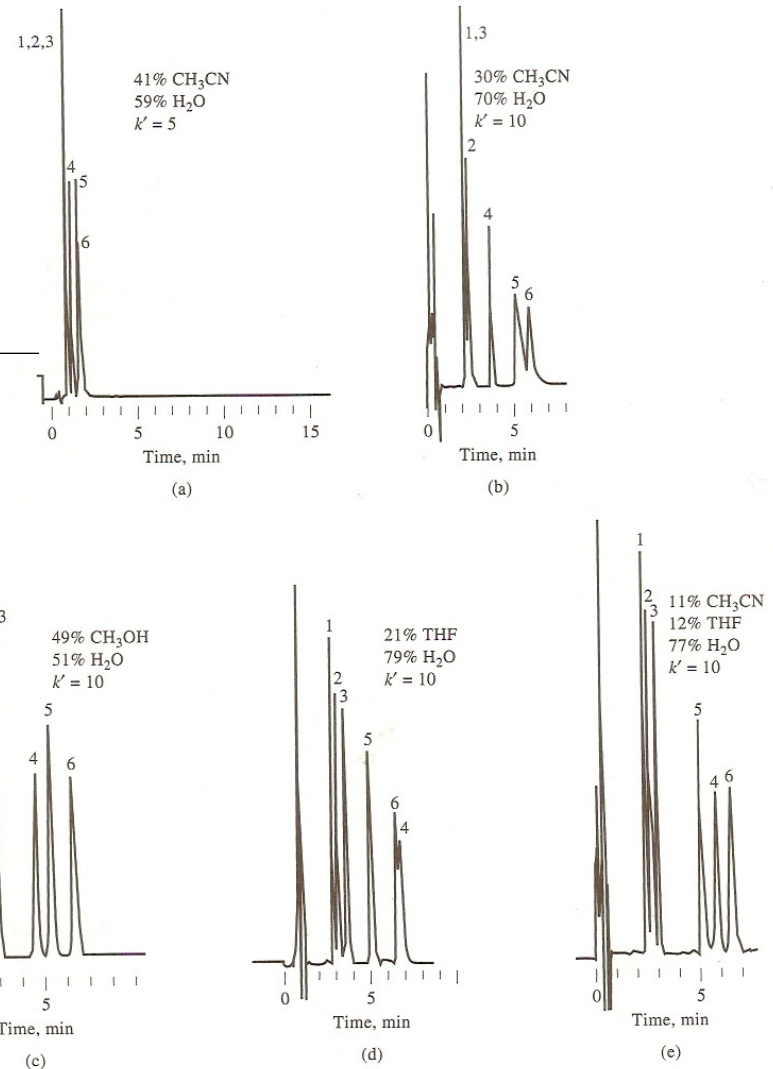


FIGURA IX-3: Triângulo de seletividade para os solventes preferidos em: — fase reversa, ---- fase normal.

OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO

Figure 28-16 Systematic approach to the separation of six steroids. The use of water to adjust k' is shown in (a) and (b). The effects of varying α at constant k' are shown in (b), (c), (d), and (e). Column: 0.4×150 mm packed with $5 \mu\text{m}$ C_8 bonded, reversed-phase particles. Temperature: 50°C . Flow rate: $3.0 \text{ cm}^3/\text{min}$. Detector: UV 254 nm. THF = tetrahydrofuran. CH_3CN = acetonitrile. Compounds: (1) prednisone, (2) cortisone, (3) hydrocortisone, (4) dexamethasone, (5) corticosterone; (6) corticoxolone. (Courtesy of DuPont Instrument Systems, Wilmington, DE.)



OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO

736

25 High-Performance Liquid Chromatography

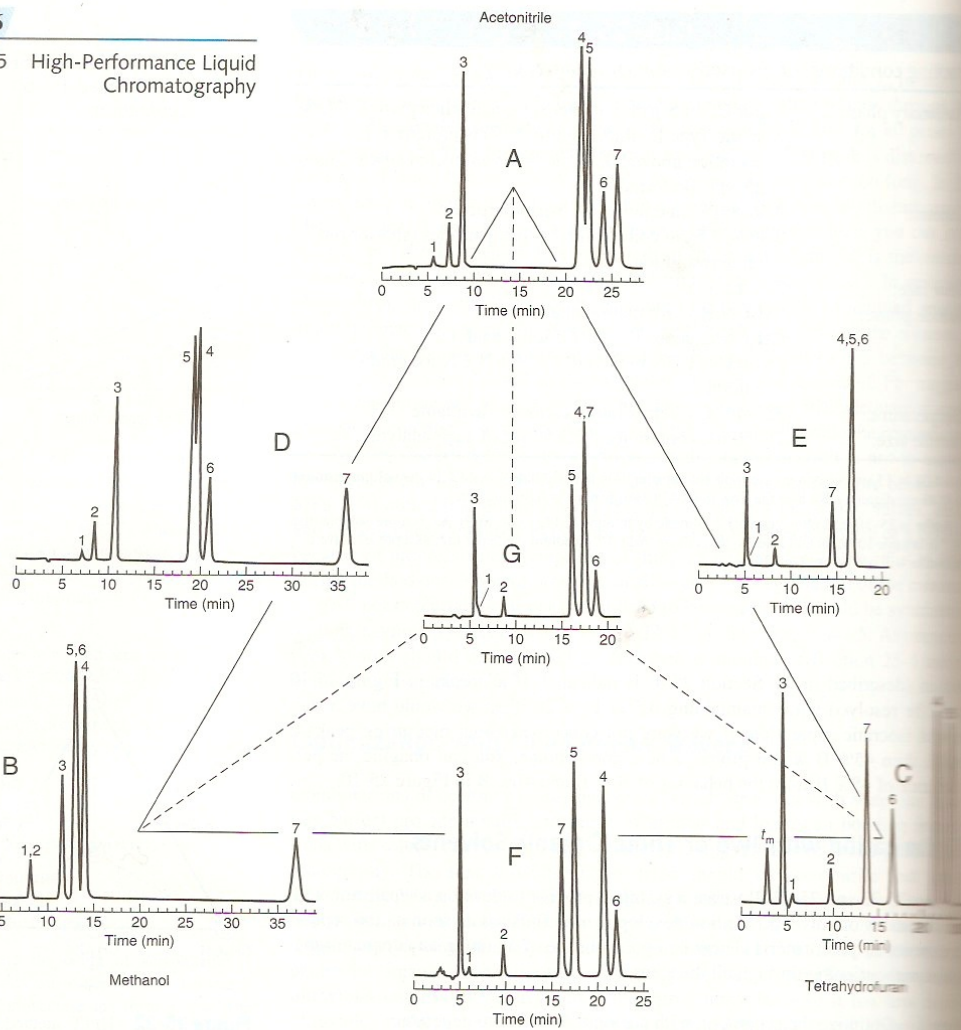
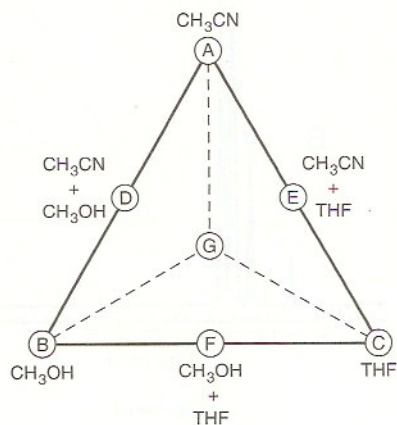


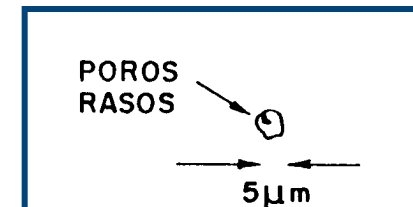
Figure 25-23 Application of the method development triangle to the separation of seven aromatic compounds by HPLC. Column: 0.46 × 25 cm Hypersil ODS (C₁₈, silica) at ambient temperature (~22° C). Elution rate was 1.0 mL/min with the following solvents: (A) 30 vol % acetonitrile/70 vol % buffer; (B) 40% methanol/60% buffer; (C) 32% tetrahydrofuran/68% buffer. The aqueous buffer contained 25 mM KH₂PO₄, 0.1 g/L NaN₃ adjusted to pH 3.5 with HCl. Points D, E, and F are midway between the vertices: (D) 15% acetonitrile/20% methanol/65% buffer; (E) 15% acetonitrile/16% tetrahydrofuran/69% buffer; (F) 20% methanol/16% tetrahydrofuran/64% buffer. Point G at the center of the triangle is an equal blend of A, B, and C with the composition 30% acetonitrile/13% methanol/11% tetrahydrofuran/66% buffer. The negative dip in Chromatogram B is associated with the solvent front. Peak identities were tracked with a photodiode array ultraviolet spectrophotometer: (1) benzyl alcohol; (2) phenol; (3) 3',4'-dimethoxyacetophenone; (4) *m*-dinitrobenzene; (5) *p*-dinitrobenzene; (6) *o*-dinitrobenzene; (7) benzoin.

CARACTERÍSTICAS DAS FASES ESTACIONÁRIAS

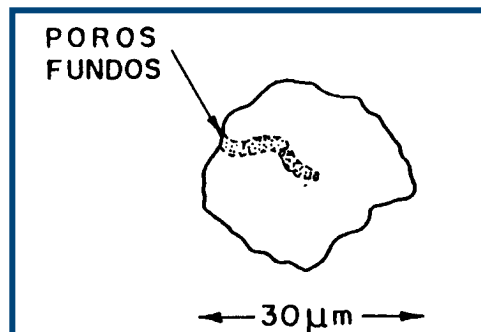
alumina, celulose, sílica gel e zeolita: cromatografia líquida clássica

TIPOS DE RECHEIO

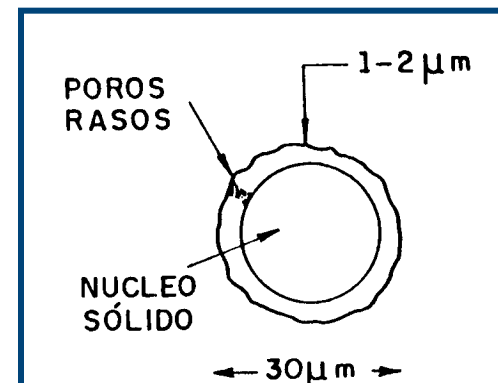
- sólidos rígidos (sílica), semi-rígidos (partículas porosas de poliestireno entrecruzado) ou não rígidos (agarose ou dextrose)
- partículas porosas ou peliculares
- partículas esféricas ou irregulares
- partículas com diferentes diâmetros



PARTÍCULAS MICROPOROSAS



PARTÍCULAS POROSAS



PARTÍCULAS PELICULARES

SÓLIDOS E SUPORTES

para cromatografia líquido-sólido (CLS), cromatografia líquido-líquido (CLL) e com fase ligada (CLFL)

SÓLIDOS PARA CLS

- partículas totalmente porosas de 5-10 μm ou materiais maiores (30-40 μm) com película porosa
- quase todas as separações são limitadas a alguns tipos de adsorventes: **sílica ou alumina**
- componentes mais polares da amostra são retidos preferencialmente:
- ordem usual de eluição: **hidrocarbonetos saturados** < **olefinas** < **hidrocarbonetos aromáticos** \approx **haletos orgânicos** < **sulfetos** < **éteres** < **ésteres** \approx **aldeídos** \approx **cetonas** < **álcoois** \approx **aminas** < **amidas** < **ácidos carboxílicos**

SUPORTES PARA CLL

- preferência para materiais inertes; no entanto como não existem materiais inertes com rigidez e uniformidade necessárias, usa-se sílica, por vezes desativada, porosa ou superficialmente porosa

SÓLIDOS E SUPORTES

para cromatografia líquido-sólido (CLS), cromatografia líquido-líquido (CLL) e com fase ligada (CLFL)

EXEMPLOS sólidos microporosos:

- **sílica esférica:** série LICHROSPHERE-Si (E-Merck); diâmetro de partícula (3, 5 e 10 μm); tamanho de poro (6, 10 e 30 nm); volume de poro (1,1-1,4 mL/g); área da superfície (60-400 m^2/g)
- sílica irregular
- alumina esférica
- **alumina irregular:** ALOX 60D (Macherey-Nagel); diâmetro de partícula (5 e 10 μm); tamanho de poro (6 nm); área da superfície (60 m^2/g)
- carbono grafitizado
- polímeros de estireno divinilbenzeno; polímeros de vinilpiridina e polímeros de propilamida-6

SÓLIDOS E SUPORTES

para cromatografia líquido-sólido (CLS), cromatografia líquido-líquido (CLL) e com fase ligada (CLFL)

EXEMPLOS sólidos peliculares:

- **sílica ativa:** CORASIL I (Waters); diâmetro de partícula (37-50 μm); área da superfície (7 m^2/g)
- **sílica inativa** (somente usado como suporte): ZIPAK (DuPont); diâmetro de partícula (26-37 μm); área da superfície (1 m^2/g)
- **alumina:** PELLUMINA HS (Whatman); diâmetro de partícula (37-44 μm); área de superfície (8 m^2/g)

FASES ESTACIONÁRIAS cromatografia a líquido com fase ligada (CLFL)

A superfície da sílica é o suporte mais popular, que pode ser modificado por uma dessas reações:

• formação do éster silicato (Si-O-R) por reação do grupo silanol com um álcool:



• formação da ligação siloxano (Si-O-SiR) por reação do grupo silanol com um organoclorosilano:



• formação da ligação silício-carbono pelo tratamento do grupo silanol com cloreto de tionila e, em seguida, com um composto organometálico:



FASES ESTACIONÁRIAS

cromatografia a líquido com fase ligada (CLFL)

EXEMPLOS fases microporosas:

- **apolar:** PARTISIL ODS-1 (Whatman); grupo ligado (**octadecil**-polímero); %Carbono, em peso (5,0); NUCLEOSIL-100-C8 (Macherey-Nagel); grupo ligado (**octil**); %C (7,0)
- **polaridade média:** μ -BONDAPAK CN (Waters); grupo ligado (**cianopropil**); %C (6,0); HYPERSIL PHENYL (Shandon); grupo ligado (**fenil**); %C (5,0)
- **polaridade alta:** ZORBAX-NH₂ (DuPont); grupo ligado (**alquilamina**); ACCUSPHERE-DIOL (J&W Scientific); grupo ligado (**propildiol**); %C (2,5)
- todas as fases são ligadas a um núcleo sólido (citado anteriormente) e, em geral mantém o mesmo nome
- a maioria contém o grupo Si-O SiRR'₂ onde R é o grupo ligado (octadecil, octil, fenil, amino e nitrilo são os mais comuns) e R' é em geral o grupo metil
- fases apolares: grupos silanóis residuais são desativados por reações de capeamento ("**end-capping**") com trimetilmtoxissilano ou similar



FASES ESTACIONÁRIAS

cromatografia a líquido com fase ligada (CLFL)

EXEMPLOS fases peliculares:

- **apolar:** PERISORB RP18 (E. Merck); grupo ligado (octadecil)
- **polaridade média:** BONDAPAK PHENYL (Waters); grupo ligado (fenil)
- **polaridade alta:** ZIPAC PAM (DuPont); grupo ligado (poliamida)

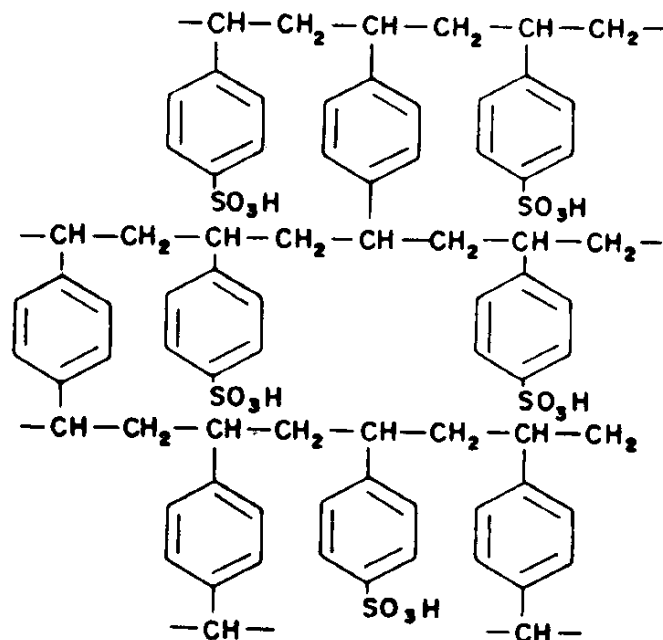


FASES ESTACIONÁRIAS cromatografia por troca iônica

- Os materiais usados como recheio para cromatografia por troca iônica têm grupos (cátions ou ânions) quimicamente ligados a partículas porosas de resinas poliméricas, a sílica com camada pelicular, a micropartículas porosas de sílica e a micropartículas porosas de resinas poliméricas.
- Os grupo quimicamente ligados, presentes em todo tipo de material para troca iônica são:
 - SO_3^- : trocadores fortes de cátions
 - COO^- : trocadores fracos de cátions
 - NR_3^+ : trocadores fortes de ânions
 - NH_2R^+ : trocadores fracos de ânions

FASES ESTACIONÁRIAS

cromatografia por troca iônica



ESTRUTURA DE POLIESTIRENO/DIVINILBENZENO SULFONADO

FASES ESTACIONÁRIAS

cromatografia por troca iônica

EXEMPLOS:

• **aniônica:** PARTISIL SAX (Whatman); suporte (sílica); grupo funcional ($-NR_3^+$); capacidade (<1 meq/g); IONPAC-AS (Dionex); suporte (polímero); grupo funcional ($-NR_3^+$)

• **catiônica:** AQUAPORE CX-300 (Brownlee); suporte (sílica); grupo funcional ($-SO_3^-$); capacidade (5,0 meq/g); PRP-200 (Hamilton); suporte (estireno-divinilbenzeno); grupo funcional ($-SO_3^-$); capacidade (0,35 meq/g)

FASES ESTACIONÁRIAS cromatografia por exclusão

Materiais para cromatografia por exclusão variam de acordo com a rigidez e intervalo de tamanho das moléculas a ser separadas:

- materiais fracos (não rígido): géis de polidextrano (Sephadex), poliacrilamidas (Bio-Gel P) e poliagaroses (Sepharose e Bio-Gel A); usados com fase móvel aquosa; cromatografia de coluna clássica
- materiais semi-rígidos (resistem a pressões de 100 a 150 bar): microesferas de copolímero como poliestireno-divinilbenzeno; usados com fases aquosas e orgânicas; também para cromatografia clássica
- materiais rígidos: partículas de sílica porosa ou de vidro poroso (desativados)

-
-
-

FASES ESTACIONÁRIAS cromatografia por exclusão

Estrutura parcial da Sephadex

Figura VI-4 Collins p106

Estrutura parcial da agarose


Figura VI-5 Collins p107

Estrutura parcial da Sepharose com ligações entrecruzadas

Figura VI-6 Collins p108

Estrutura parcial de Sephacryl

Figura VI-7 Collins p109



FASES ESTACIONÁRIAS

cromatografia por exclusão

EXEMPLOS fases microporosas:

- BIOGEL SEC (BioRad); material (estireno-divinilbenzeno); diâmetro da partícula (10 μm); faixa de massa molecular ($10^3 - 8 \times 10^6$)
- μ -BONDAGEL (Waters); material (sílica); diâmetro da partícula (10 μm); faixa de massa molecular ($2 \times 10^3 - 7 \times 10^6$)
- OHPAK-Q (Showa Denko); material (polivinil álcool); faixa de massa molecular (500 - 5000)

DETECTORES ÓPTICOS DE USO COMUM EM CROMATOGRAFIA

13.f. Detectores

13.f.1. Detectores de absorvância no UV-vis

13.f.2. Detectores de absorbância no Infravermelho

13.f.3. Detectores de fluorescência

13.f.4. Detectores Refratométricos

13.f.5. Outros: eletroquímicos, espalhamento, radioatividade

13.f.6. Detectores por Espectrometria de Massas

DETECTORES

- monitoramento do efluente que sai da coluna

ESTRATÉGIAS:

- medidas diferenciadas de propriedades gerais de ambas, amostras e fase móvel
- medidas de uma propriedade da amostra que não é apresentada pela fase móvel
- detecção após eliminação da fase móvel

DETECTOR IDEAL

- alta sensibilidade e baixo limite de detecção
- resposta rápida a todos os solutos
- insensibilidade a mudanças de temperatura e na vazão da fase móvel
- resposta independente da fase móvel
- pequena contribuição ao alargamento do pico pelo volume extra da cela do detector
- resposta que aumente linearmente com a quantidade do soluto
- não destruição do soluto
- segurança e conveniência para uso
- informação qualitativa do pico desejado

DETECTORES

2 TIPOS: SELETIVO versus UNIVERSAL

UNIVERSAL: responde às propriedades da fase móvel (índice de refração, constante dielétrica ou densidades, moduladas pela presença do soluto)

SELETIVO: responde às propriedades do soluto (absorvância no UV-vis, fluorescência, corrente de difusão) que a fase móvel não possui

- UV-vis: detector por espectrofotometria no UV-vis
- FLU: detector por fluorescência

IRef: detector por índice de refração
 ELETR Hg: detector eletroquímico (Hg gotejante)

COND E: detector por condutividade elétrica

CARACTERÍSTICAS DE ALGUNS DETECTORES

detector	UV-vis	FLU	IRef	ELETR Hg	COND E
princípio de operação					
tipo					
quantidade mínima de detecção (g/mL)					
faixa de linearidade					
volume da cela (mL)					
sensibilidade à temperatura					
sensível à vazão da fase móvel					
útil com gradientes					
aplicações					



PARÂMETROS (da tabela anterior)

- **sensibilidade:** relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera este sinal (termo relativo, depende da amostra)
- **linearidade:** faixa linear do sistema onde o sinal do detector é diretamente proporcional à concentração do soluto; se concentração da amostra é muito alta (diluições apropriadas)
- **limite mínimo de detecção:** menor quantidade da substância que pode ser detectada, produzindo um sinal igual ao dobro do nível de ruído do instrumento; ruído é a variação do sinal do instrumento que não é atribuída à amostra e pode ser produzida por falhas eletrônicas, aparelhos mal aterrados, variações de vazão ou temperatura, flutuações na tensão, bolhas de ar no detector, etc.
- variações na composição da fase móvel podem produzir grandes flutuações na linha de base, principalmente nos casos de eluição por gradiente

NÚMERO DE TRABALHOS PUBLICADOS EM LC

até 1982:

365 trabalhos publicados

- 71%: UV-vis
- 15%: fluorescência
- 5,4%: índice de refração
- 4,3%: eletroquímico
- 4,3%: outros

UV-vis:

39%: baseados em linhas de emissão do Hg)

13%: radiação filtrada de uma fonte de deutério

48%: radiação emitida de um monocromador de rede

DETECTORES DE ABSORVÂNCIA

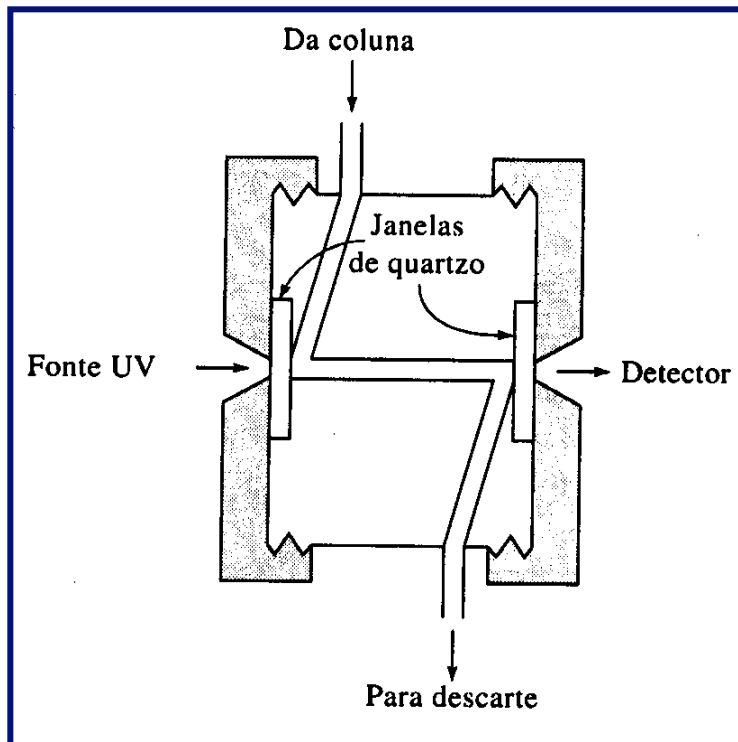
PRINCÍPIO: absorvência da luz por parte da amostra ao passar através desta qualquer radiação eletromagnética (normalmente do ultravioleta até o infravermelho)

• **resposta seletiva:** só detecta os componentes da amostra que absorvem a radiação no comprimento de onda selecionado; grande maioria das substâncias absorvem radiação UV (substâncias com elétrons π ou elétrons desemparelhados), por exemplo

olefinas, compostos aromáticos e

compostos contendo **$>C=O$, $>C=S$, $-N=O$ e $-N=N-$**

DETECTORES DE ABSORVÂNCIA - CELA EM Z



- volume é mantido pequeno para minimizar alargamento de banda: 1-10 μL
- comprimento: 2-10 mm
- $P < 600$ psi (reductor de pressão é requerido)

DETECTORES DE ABSORVÂNCIA

2 TIPOS:

- comprimento de onda fixo (fotométrico): sensível e econômico
- comprimento de onda variável (espectrofotométrico): versátil

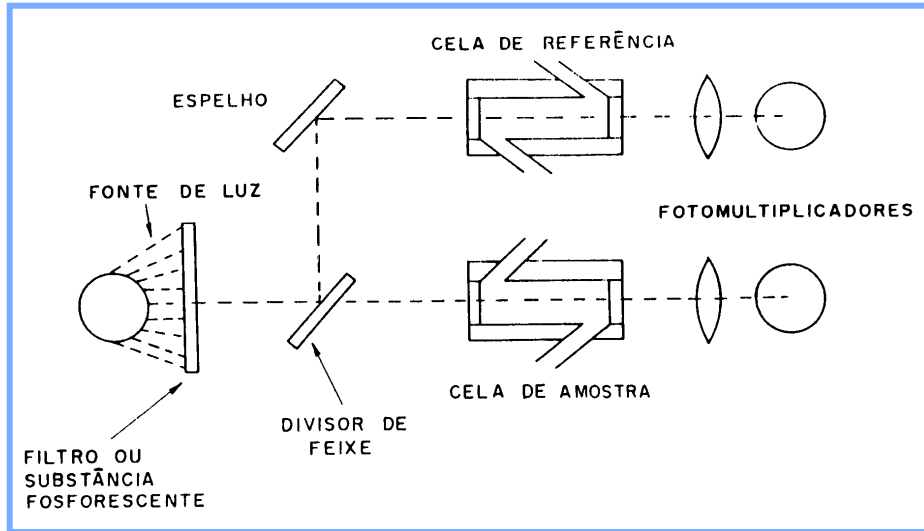
ambos, relativamente insensíveis a variações de vazão ou temperatura; sensibilidades de até 0,001 unidades de absorvância; possível a detecção de décimos de nanograma ($10^{-10}g$)

- muitos instrumentos são de **duplo feixe**: um feixe passa pela cela da amostra/eluente, e outro passa por um filtro que reduz sua intensidade; detectores piezoelétricos geminados são usados para comparar a intensidade dos dois feixes; alternativamente, um sistema de recorte de feixe é usado em conjunção com um único fototubo; cromatogramas: gráficos do log da razão dos sinais dos transdutores em função do tempo

- instrumentos de **feixe simples** também são encontrados: medidas da intensidade do solvente são armazenadas em memória e depois recuperadas para o cálculo da absorvância.

DETECTORES DE ABSORVÂNCIA

comprimento de onda fixo



• a maioria dos detectores de comprimento de onda fixo opera em 254 nm (filtro) e 280 nm

- radiação de uma fonte de mercúrio de baixa pressão é transmitida através da amostra
- quantidade de radiação não absorvida (transmitida) atinge a célula fotoelétrica da amostra (fotomultiplicador)
- a radiação da fonte é dirigida através de um divisor de feixe para a cela de referência, e atinge a célula fotoelétrica de referência
- a diferença de corrente das duas células fotoelétricas alimenta um amplificador, que gera um sinal de saída para o registrador

DETECTORES DE ABSORVÂNCIA faixa do visível

- alguns compostos absorvem na região visível do espectro eletromagnético e podem ser analisados com detectores que funcionam nessa região do espectro
- reagentes podem ser adicionados ao efluente de maneira contínua, ou periódica, para formar compostos coloridos que podem então ser monitorados (**derivação pós-coluna**); exemplo: aa com ninidrina (cor púrpura) detectado a 570 nm
- detectores de absorvância (lâmpadas de tungstênio) podem ter comprimento de onda fixo ou variável com monocromador

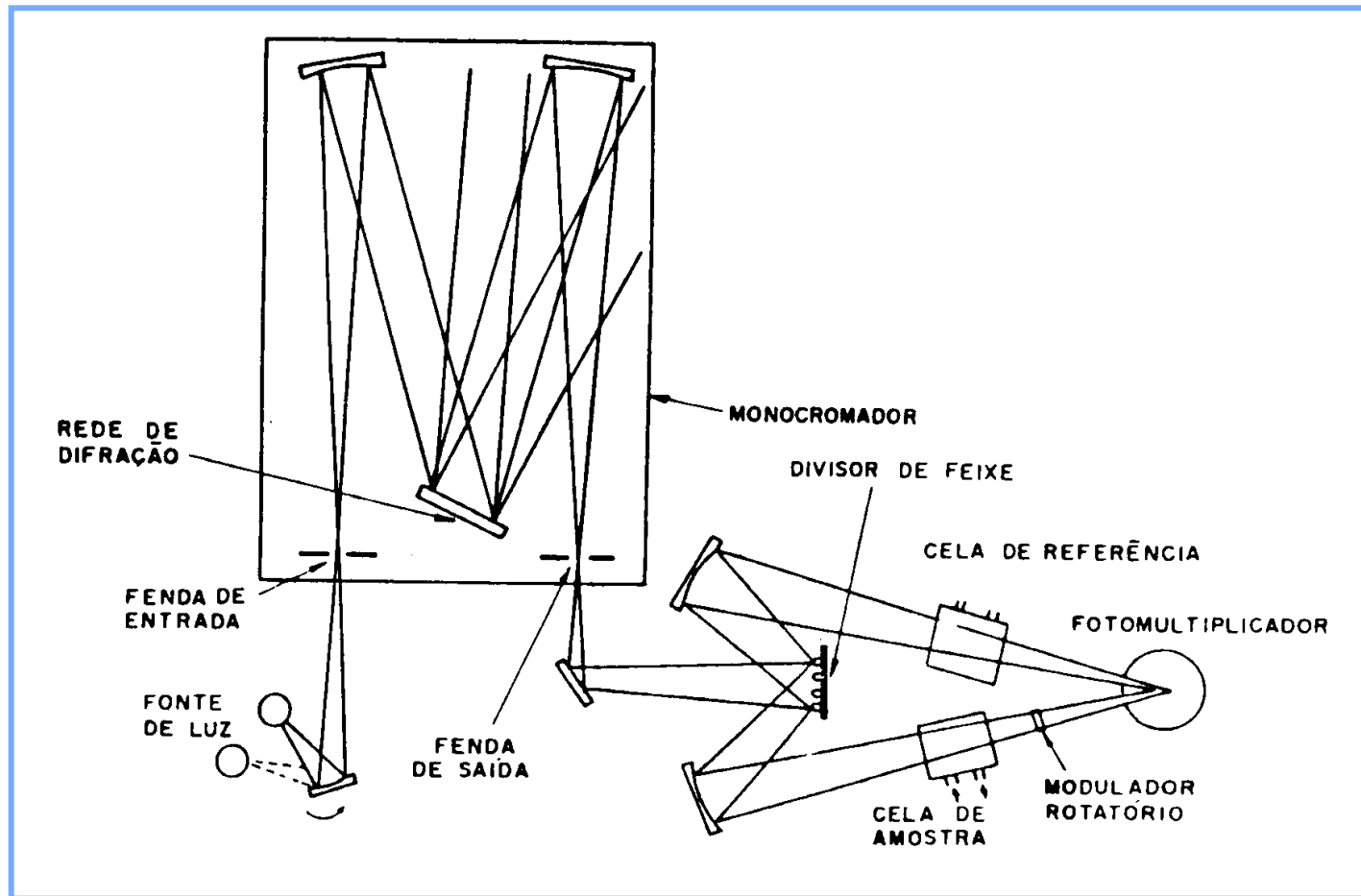
DETECTORES DE ABSORVÂNCIA comprimento de onda variável

- cobrindo a faixa de 190 a 800 nm; através de monocromador que seleciona o λ desejado do feixe de luz emitido por lâmpadas de deutério (UV) ou tungstênio (vis)

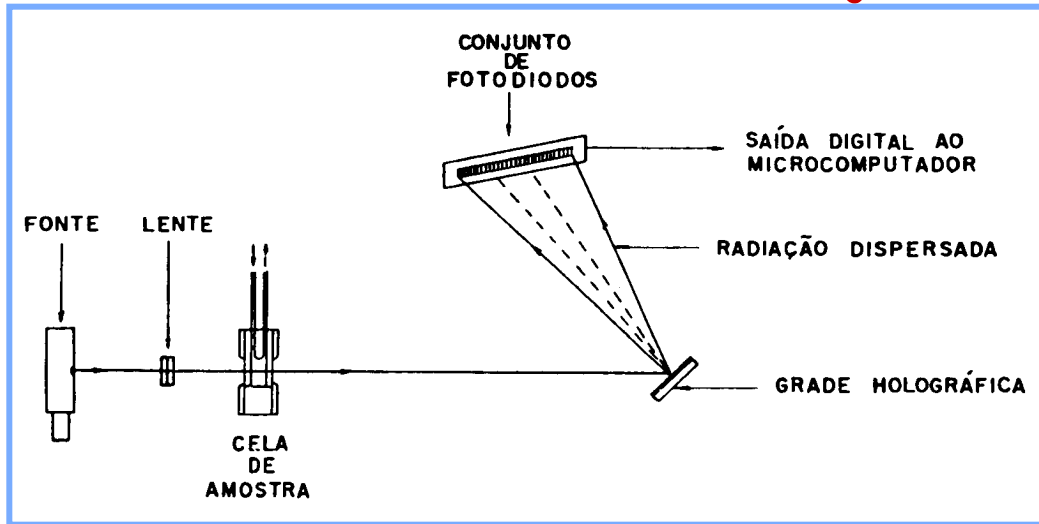
VANTAGENS sobre os instrumentos de onda fixo:

- maior versatilidade: através da escolha apropriada do λ é possível trabalhar nas regiões de alta absorvância dos componentes da amostra (alta sensibilidade)
- maior seletividade: é possível escolher λ onde um determinado componente da amostra absorve e outros não
- otimizar eluições por gradiente: selecionar λ onde a fase móvel não apresenta variação de absorvância com a concentração
- obtenção do espectro de absorvância de cada componente da amostra durante sua eluição (**arranjo de diodos**) ou interrompendo a vazão da fase móvel no momento de detecção

ESQUEMA DE UM DETECTOR DE ABSORVÂNCIA NO UV-VIS COM COMPRIMENTO DE ONDA VARIÁVEL



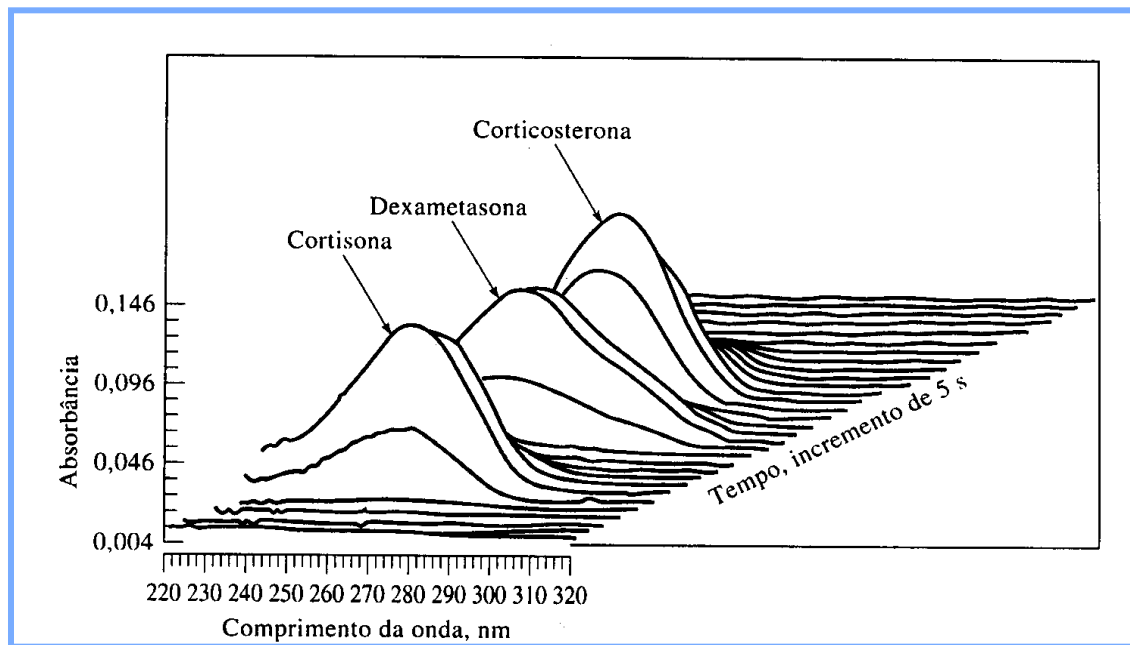
DETECTORES DE ABSORVÂNCIA arranjo de diodos



- alto custo
- relativamente complexo

- toda a luz da fonte passa pela cela da amostra
- a luz emergente é dispersada por uma grade holográfica (rede de difração)
- a radiação dispersada resultante (comprimentos de onda distintos) é focalizada sobre uma fila de fotodiodos (256-512nm)
- todo o espectro da substância passando pelo detector é armazenado no microcomputador

DETECTORES DE ABSORVÂNCIA arranjo de diodos



- é possível exibir um cromatograma para cada comprimento de onda selecionado
- é possível exibir o espectro em cada tempo determinado, ou seja, o espectro do pico cromatográfico

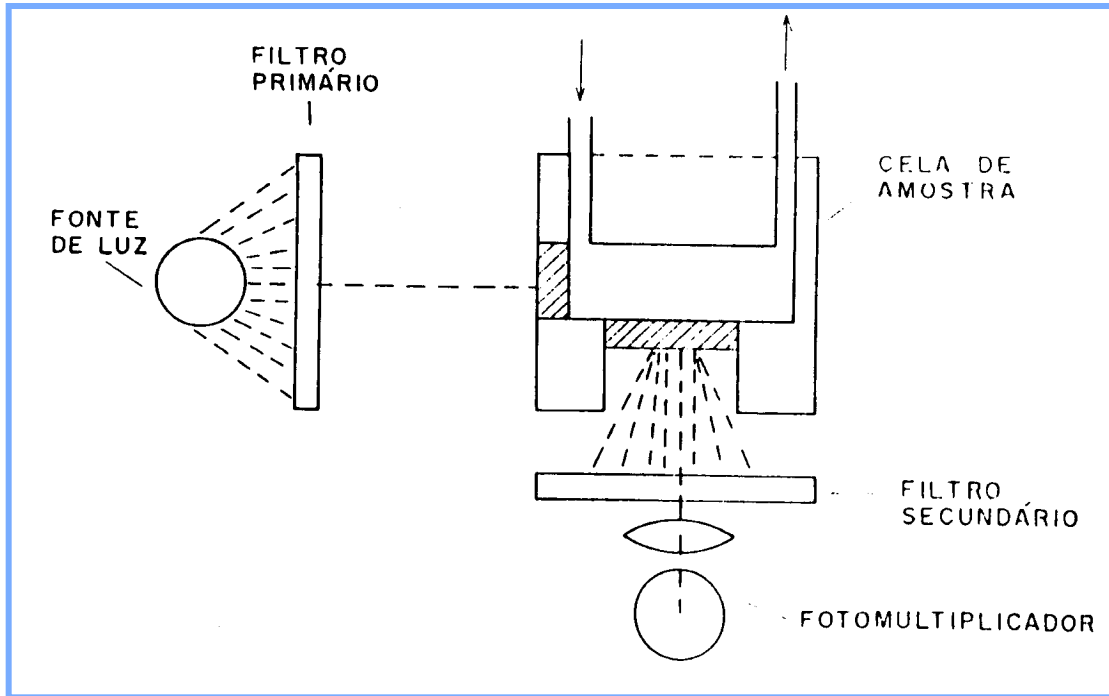
DETECTORES DE ABSORVÂNCIA no infra-vermelho

- a absorvância na região do infra-vermelho pode ser usada como detector universal ou específico
- sensibilidade é em geral muito pequena
- usados principalmente em sistemas de cromatografia por exclusão
- técnica de parar a vazão da fase móvel com a amostra na cela e tirar o espectro infravermelho
- limitado a fases móveis transparentes no comprimento de onda utilizado

DETECTORES DE FLUORESCÊNCIA

- detecção específica para compostos que fluorescem e uma das mais sensíveis técnicas de detecção (picogramas, $10^{-12}g$); comparável ao detector por captura de elétrons em GC
- alta intensidade de fluorescência é esperada de compostos que sejam conjugados simetricamente ou que não podem produzir estruturas fortemente iônicas
- reações de derivação pós-coluna (esteróides podem produzir fluorescência quando aquecidos com ácido sulfúrico)
- aplicações: área farmacêutica, alimentos, caracterização de destilados do petróleo de alto p.e.
- fase móvel deve ser criteriosamente selecionada (intensidade de emissão depende do meio; efeito quencher)

ESQUEMA DE UM DETECTOR POR FLUORESCÊNCIA



- filtro primário é escolhido para deixar passar somente o comprimento de onda de excitação

- filtro secundário é escolhido para eliminar o comprimento de onda excitante, e deixar passar o comprimento de onda emitido pela amostra

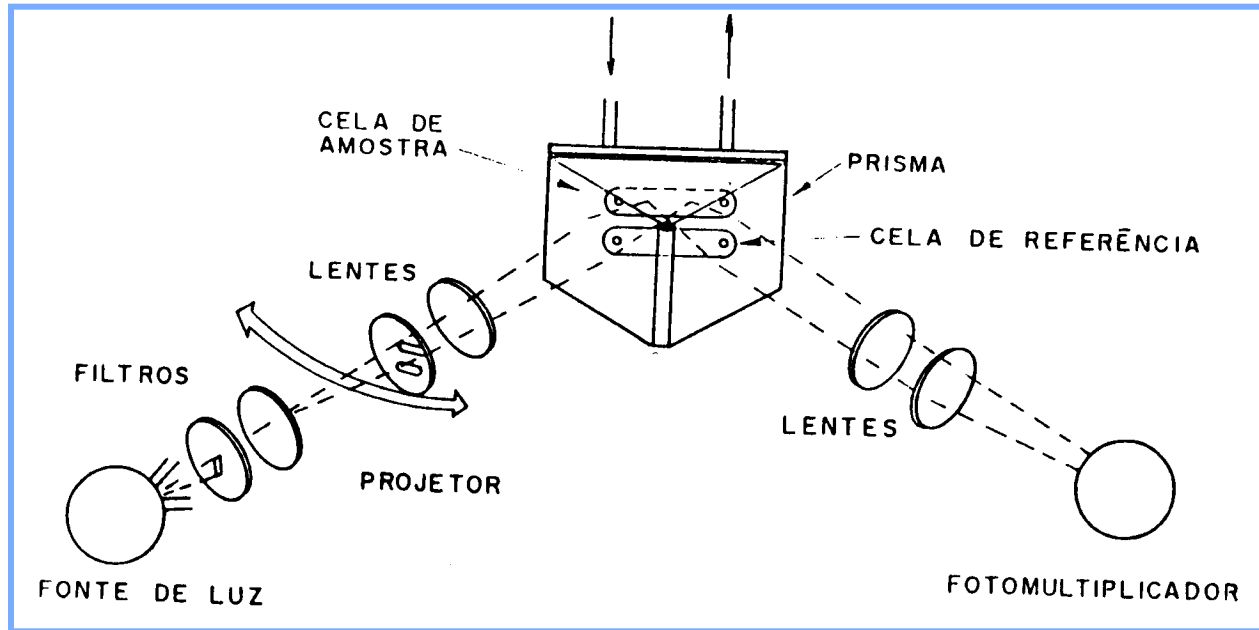
DETECTORES POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO

- acompanha continuamente a diferença de no índice de refração entre a fase móvel e o efluente que sai da coluna
- resposta universal e sensibilidade moderada (micrograma, $10^{-6}g$)
- controle rigoroso de temperatura ($0,001\text{ }^{\circ}C$): circulação de água de uma fonte termostatzada através do refratômetro ou controle da temperatura ambiente
- sensível a variações de vazão e mudanças na composição da fase móvel (dificulta/impede seu uso na eluição por gradiente); difícil encontrar um par de solventes com índices de refração idênticos
- não são instrumentos muito estáveis, nem de fácil manipulação
- emprego mais importante: em cromatografia por exclusão (polímeros, amostras de interesse biológico) e em cromatografia preparativa

ESQUEMA DE UM DETECTOR REFRAATOMÉTRICO tipo Fresnel

- na interface entre um prisma de vidro e um líquido, a quantidade de luz transmitida e refletida é proporcional ao ângulo de incidência da luz e ao índice de refração do líquido
- a luz da fonte atravessa um seletor, um filtro de infravermelho, outro seletor e uma lente
- os seletores e a lente produzem dois raios colimados que entram no prisma e incidem sobre a interface vidro-líquido das celas de referência e amostra
- o ajuste grosso e fino do ângulo de incidência nas interfaces é realizado através da rotação do corpo do projetor

ESQUEMA DE UM DETECTOR REFRAATOMÉTRICO tipo Fresnel

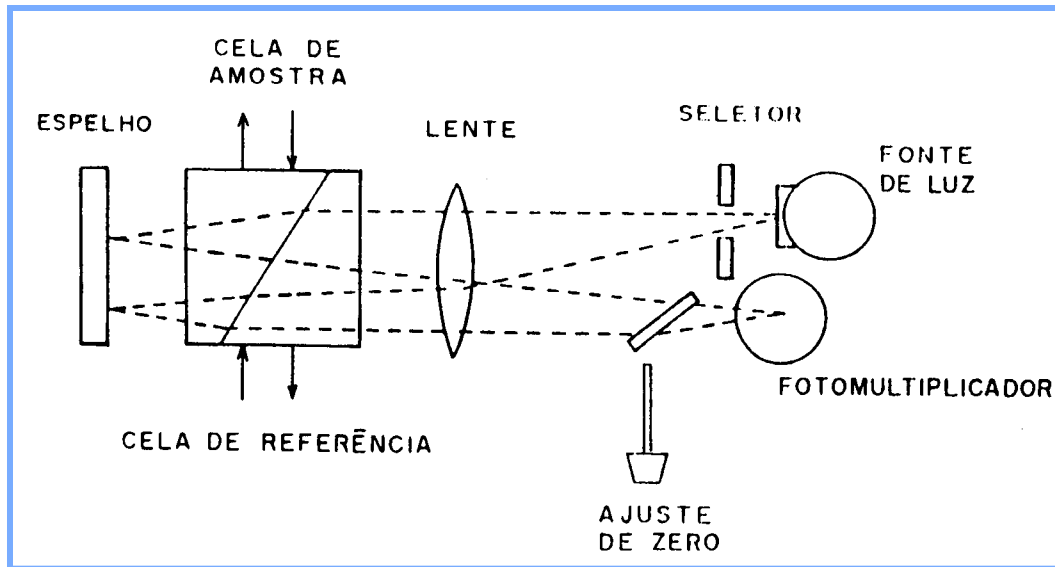


- as celas são cavidades ovaladas de teflon ($3 \mu\text{L}$) presas entre o prisma e a uma placa de aço inoxidável que contém os tubos de entrada e saída

- a diferença de intensidade da luz transmitida através das celas é função do Ind. Refr. de ambos os líquidos e se determina por meio de um fotodetector duplo, o qual gera um sinal elétrico, transmitido para o registrador

- desvantagem: para cobrir a faixa de Ind. Refr. normal ($n = 1,31$ a $1,63$), são necessários dois prismas

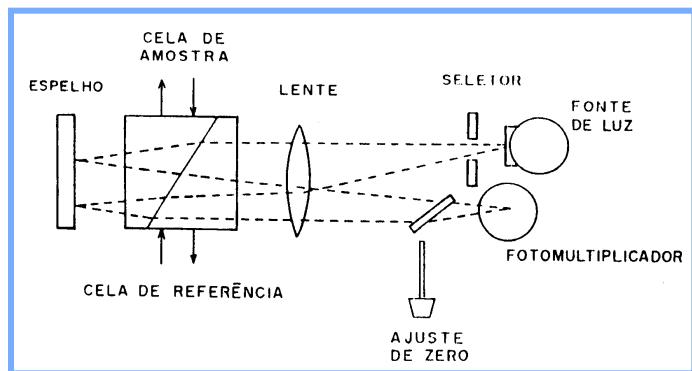
ESQUEMA DE UM DETECTOR REFRAATOMÉTRICO por deflexão



- a luz emitida pela fonte é limitada pelo seletor, colimada pela lente e passa através da célula

- a cela tem os compartimentos de amostra e referênciã separados por um pedaço de vidro
- quando a composição da fase móvel muda na cela da amostra, a mudança do índice de refração causa uma deflexão na posição final do raio de luz no fotodetector

ESQUEMA DE UM DETECTOR REFRAATOMÉTRICO por deflexão



- uma luz incidente passa através da cela, é defletida, refletida pelo espelho atrás da cela e, de novo defletida
- a lente focaliza a luz defletida no fotodetector que produz um sinal elétrico proporcional à posição da luz
- o sinal é então amplificado e registrado

- detector por deflexão possui ampla faixa de linearidade
- menos sensível a variações de temperatura
- muito sensível a vibrações ou movimento do instrumento
- celas não são tão pequenas como as do tipo Fresnel (10 a 15 μL)

DETECTORES outros tipos

detectores eletroquímicos: alta seletividade (análise de traços);
princípios: amperometria, polarografia, coulometria e conductometria;
uso comum do detector condutométrico: cromatografia por troca iônica,
por exclusão ou fase reversa por pares de íons

detectores de espalhamento de luz por evaporação: efluente da
coluna passa por nebulizador no qual é convertido em uma névoa fina por
um fluxo de nitrogênio ou ar; as gotículas são então conduzidas através
de um tubo com temperatura controlada no qual ocorre evaporação da
fase móvel, levando à formação de finas partículas do soluto; a nuvem
de partículas do soluto passa através de um feixe de laser; a radiação
espalhada é detectada perpendicularmente ao fluxo por um fotodiodo

detectores de radioatividade: projetados para detectar solutos
radiomarcados; aplicações cromatográficas com emissores γ ou β^- forte
(^{131}I , ^{210}Po e ^{125}Sb), usando sistemas de cintilação ou mesmo contador
Geiger, têm sido reportados

DETECTORES

espectrometria de massas

PRINCÍPIO: analito é ionizado na fonte; íons com razão carga-massa (m/z) discreta são separados e focalizados no analisador de massas; o feixe focalizado atinge um detector (electron multiplier) que determina sua intensidade

FONTE DE ÍONS (métodos de ionização): electron ionization (EI), chemical ionization (CI), fast-atom bombardment (FAB), electrospray ionization (ESI), thermospray (TSI), laser desorption (LD) são utilizadas nas aplicações de cromatografia a líquido

ANALIZADOR DE MASSAS magnetic sector, quadrupole, time-of-flight (TOF), Fourier transform ion cyclotron resonance (ICR)

exemplo: LCQ (Finningan): ESI, octapole (quadrupolo duplo), seguido de um ion-trap

SPE - SELEÇÃO DE FASES E SOLVENTE

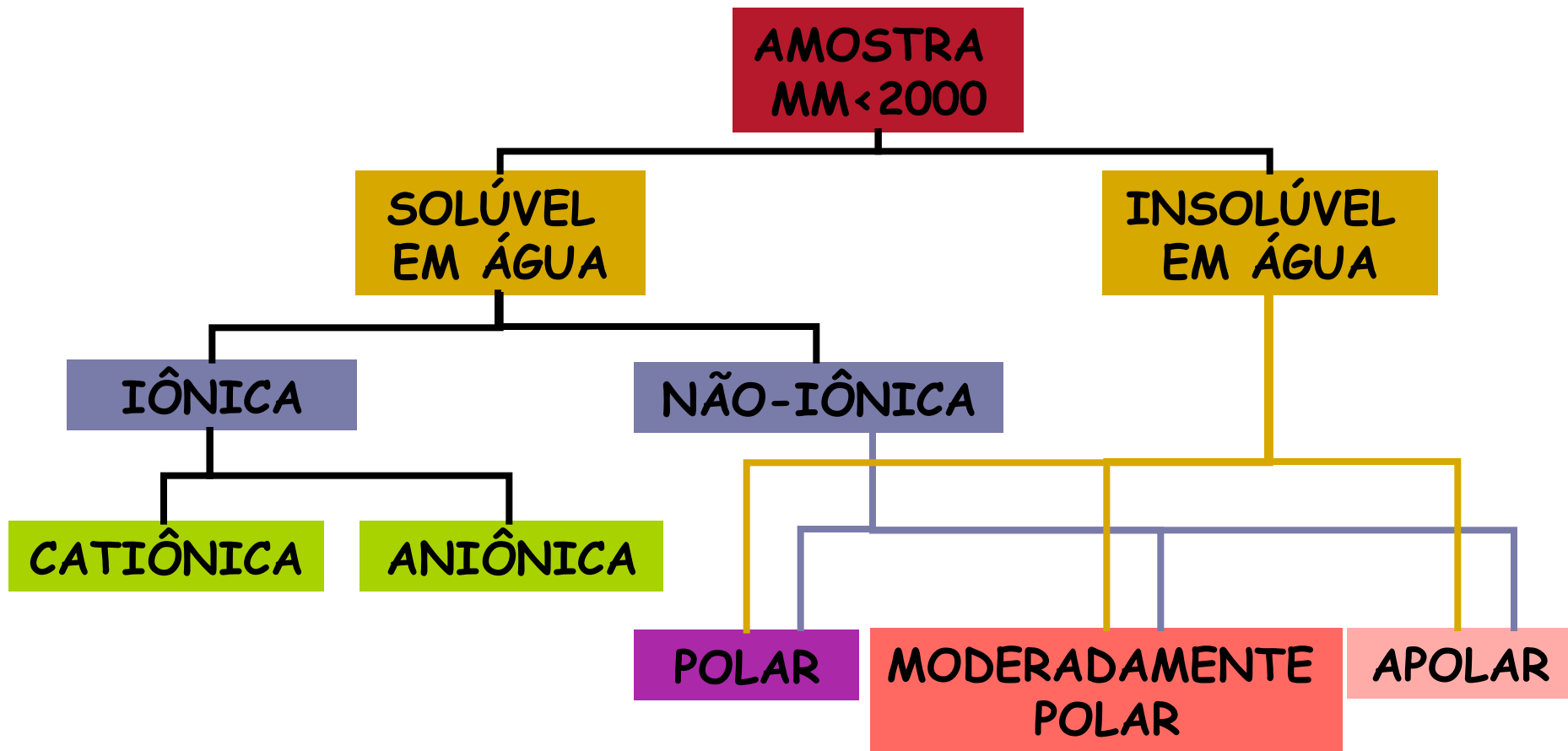


Figura 4.7 Snyder p133

SPE - SELEÇÃO DE FASES E SOLVENTE

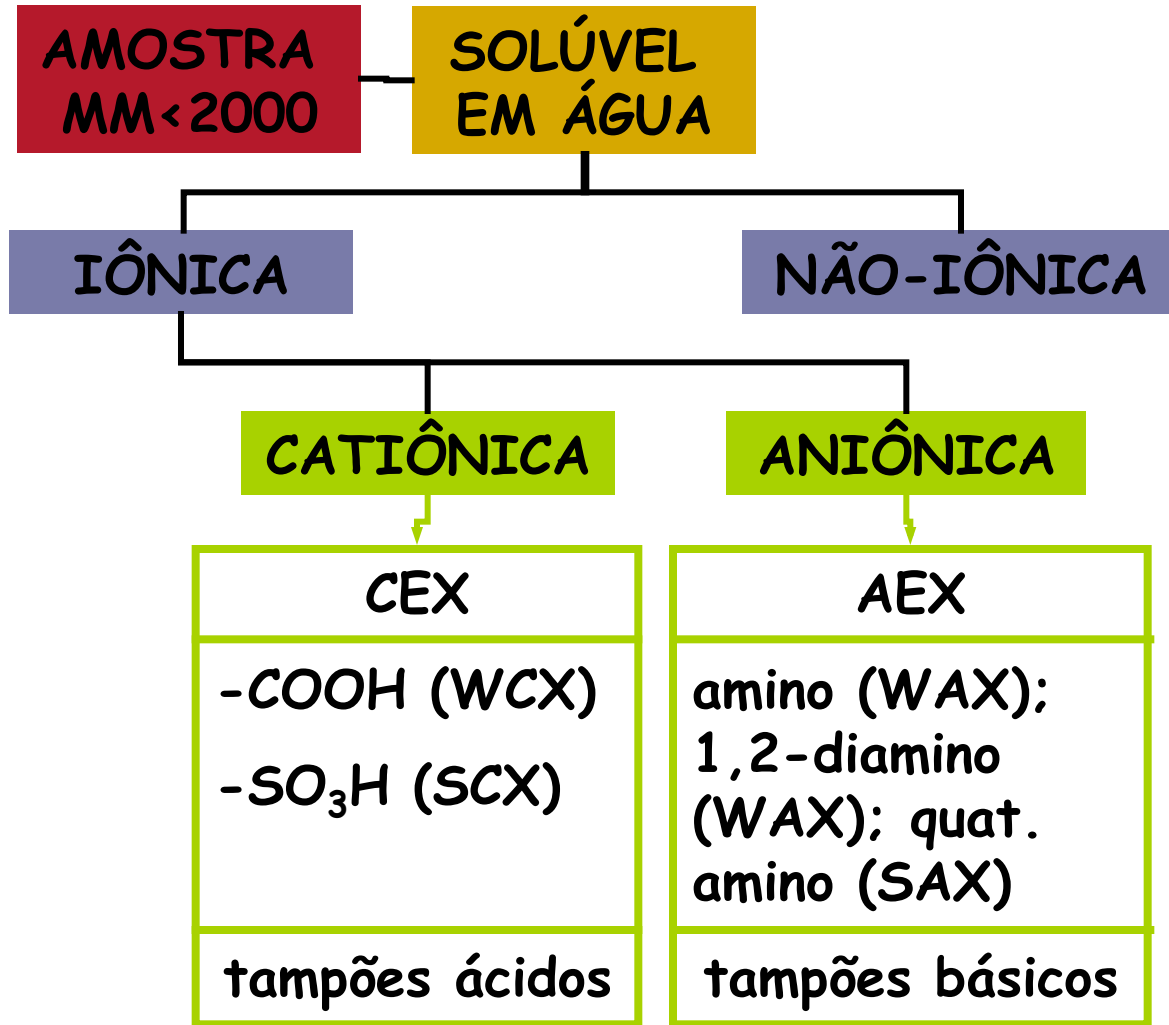


Figura 4.7 Snyder p133

SPE - SELEÇÃO DE FASES E SOLVENTE

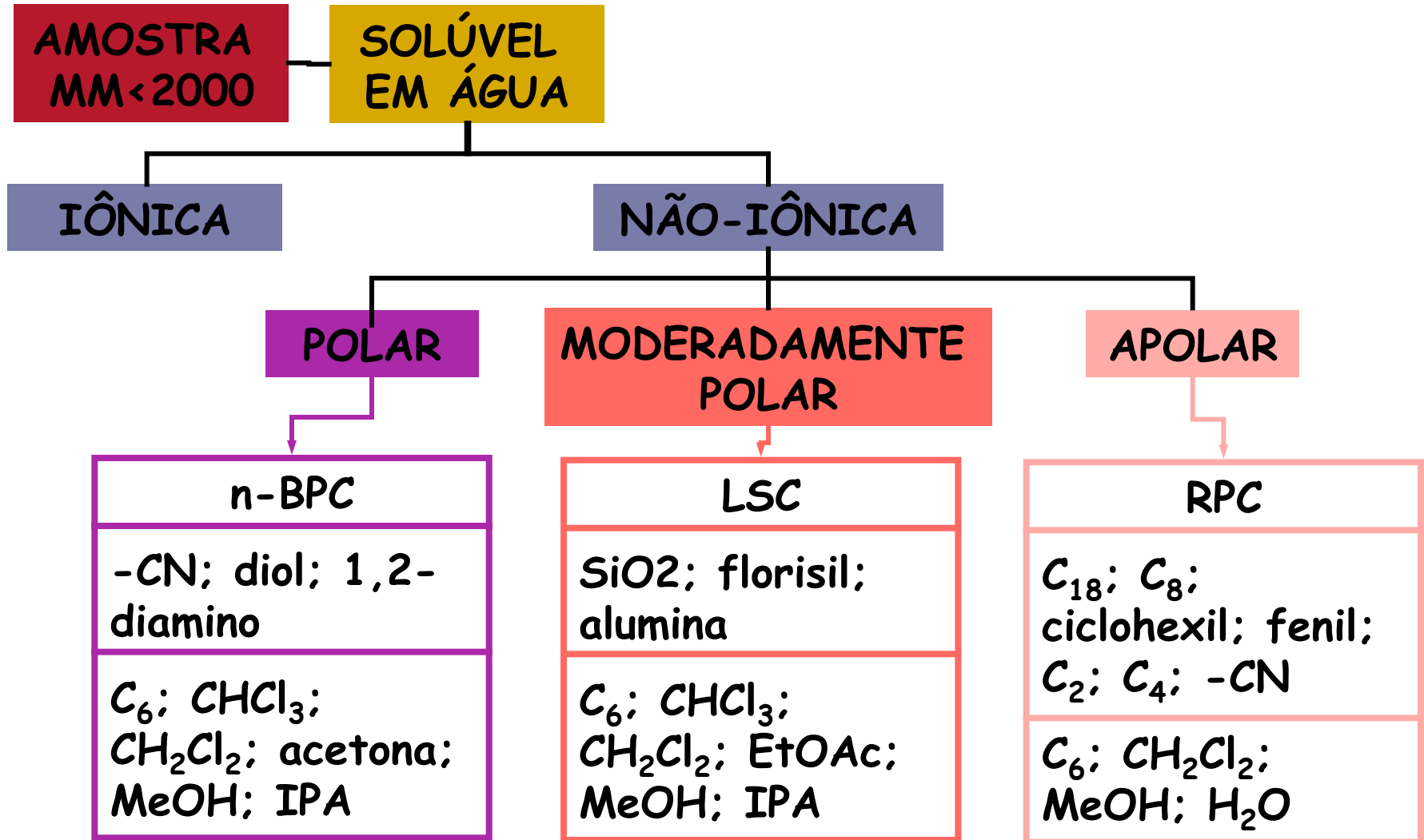


Figura 4.7 Snyder p133

SPE - SELEÇÃO DE FASES E SOLVENTE

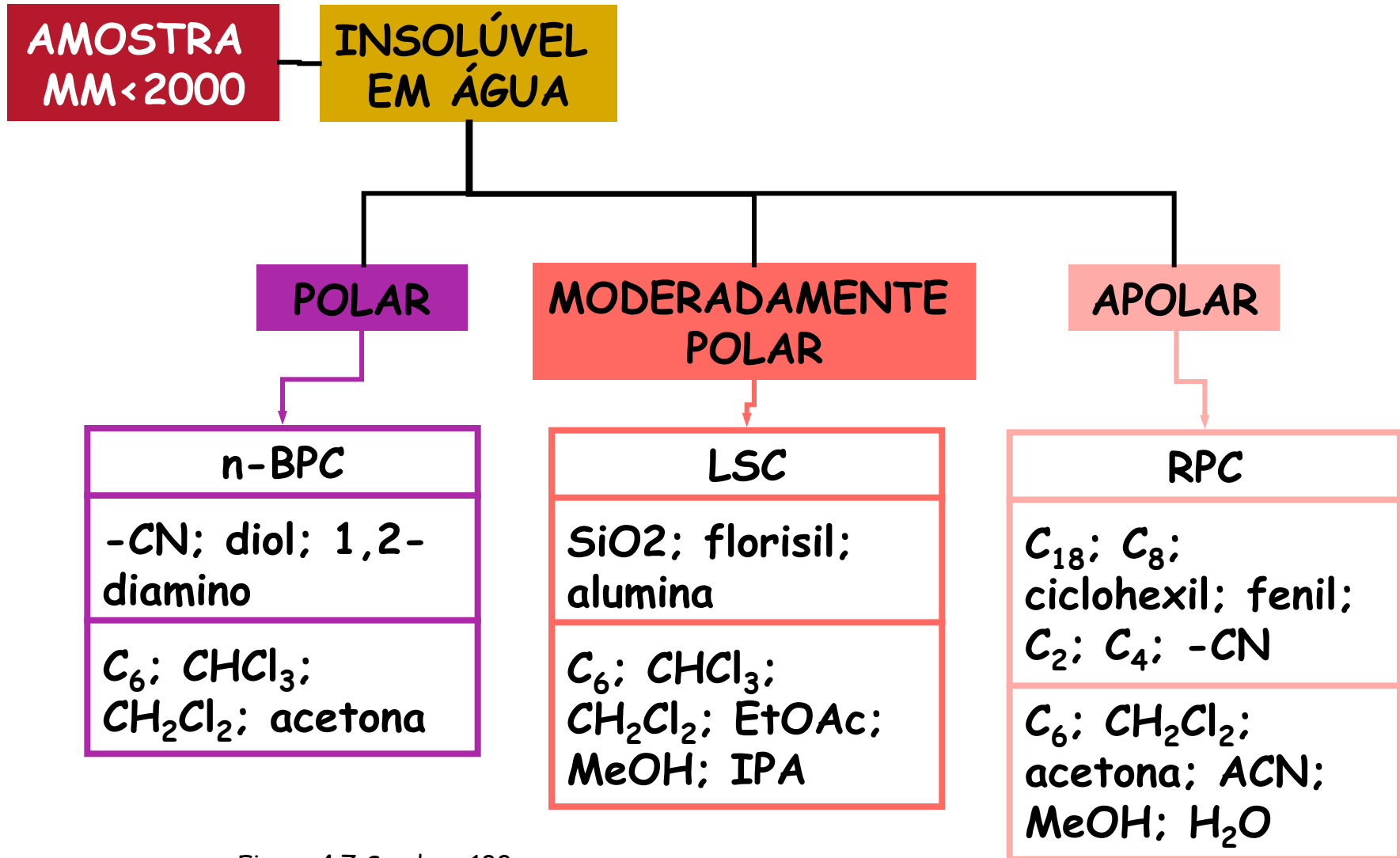
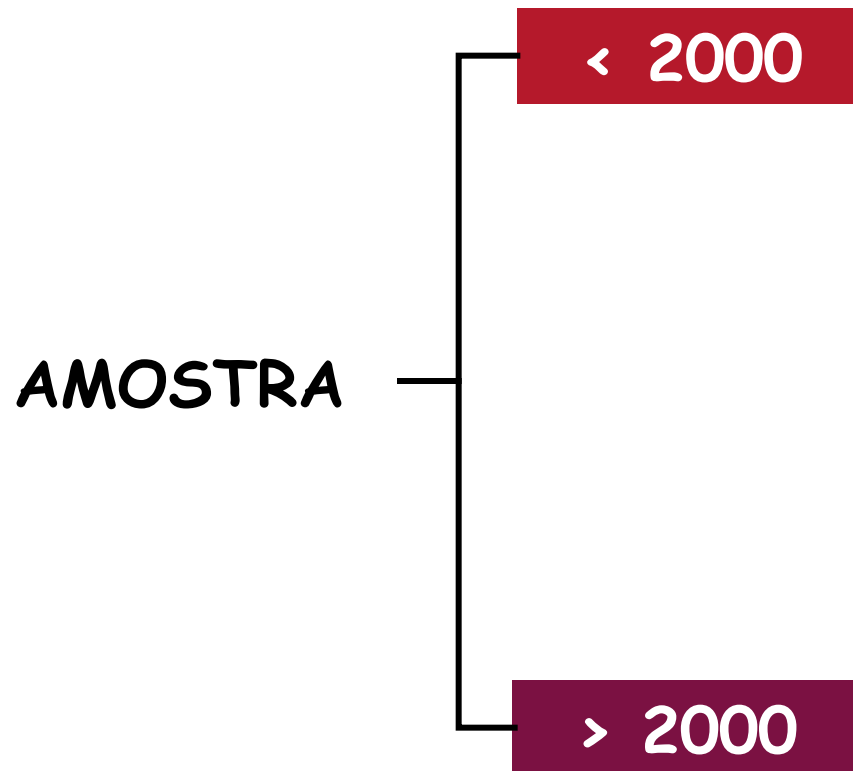


Figura 4.7 Snyder p133

•
•
•

ESCOLHA DA TÉCNICA CROMATOGRÁFICA EM FUNÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

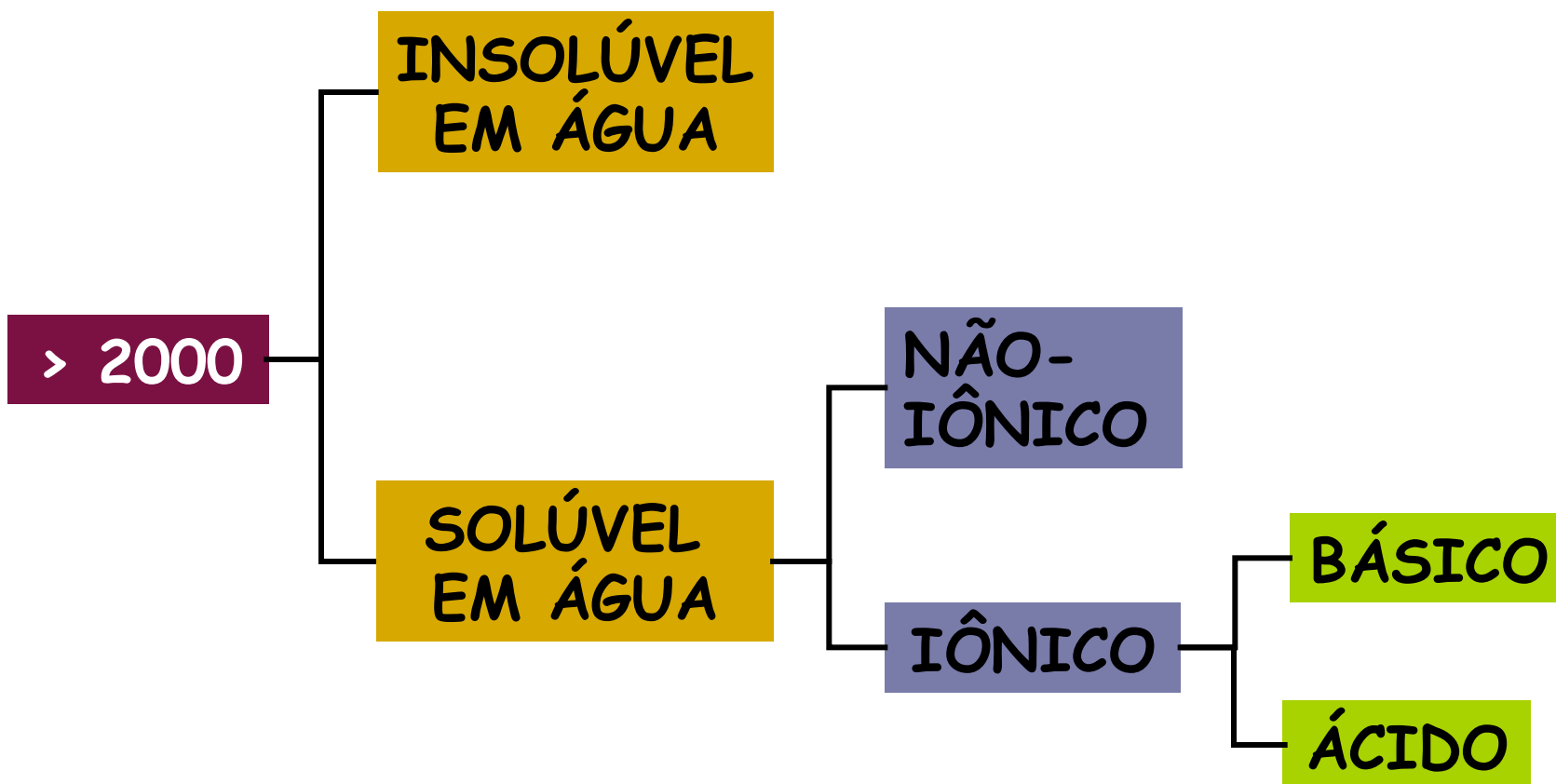
MASSA MOLECULAR



ALTA MASSA MOLECULAR

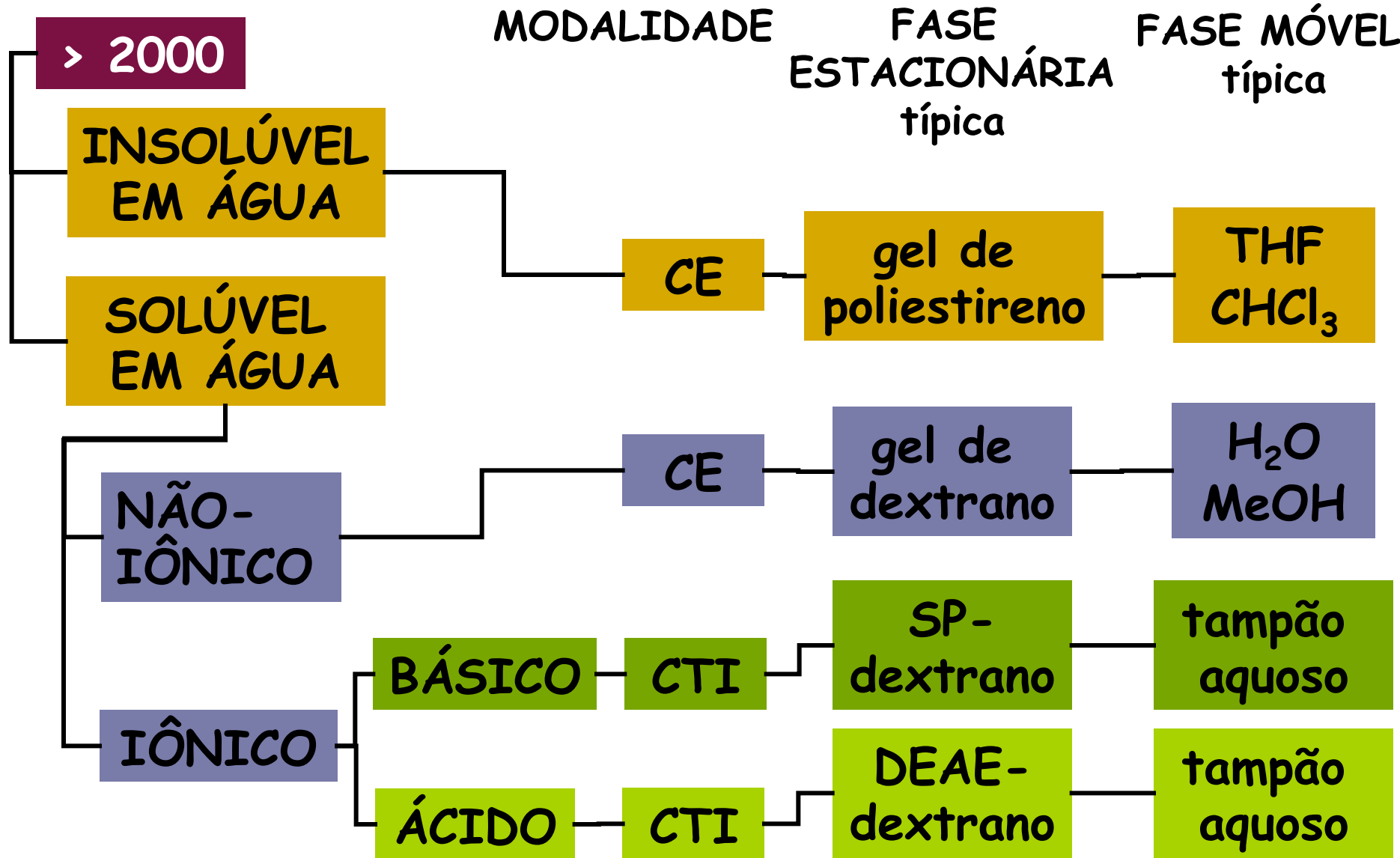
MASSA
MOLECULAR

PROPRIEDADES



SP: sulfopropil
DEAE: dietilaminoetil

CE: cromatografia por exclusão
CTI: cromatografia por troca iônica

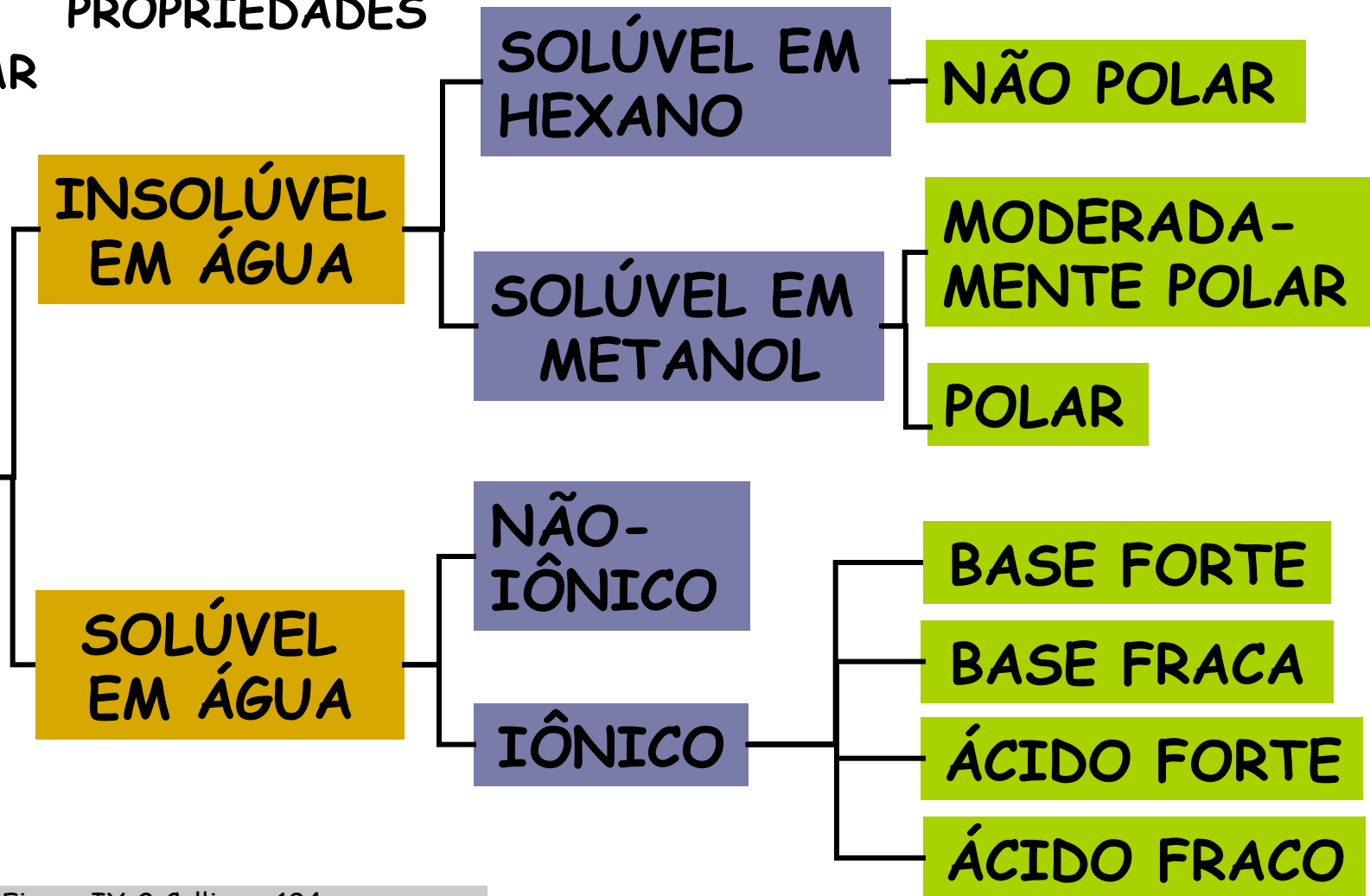


BAlXA MASSA MOLECULAR

MASSA MOLECULAR

PROPRIEDADES

< 2000



FR: fase reversa FN: fase normal CN-nitrilo
 sílica*=sílica desativada ACN=acetonitrila MeOH=metanol pr-OH: propanol
 CLFL: cromatografia em fase ligada CLS: cromatografia líquido-sólido

< 2000

MODALIDADE FASE ESTACIONÁRIA típica FASE MÓVEL típica

INSOLÚVEL EM ÁGUA

NÃO POLAR

CLS

sílica

$n-C_7H_{16}/CHCl_3/C_6H_5CH_3$

CLFL/FR

C_{18}

MeOH/H₂O
ACN/H₂O

SOLÚVEL EM HEXANO

moderada mente POLAR

CLFL/FR

C_8

MeOH/H₂O

CLS

sílica

$n-C_7H_{16}/CHCl_3$

SOLÚVEL EM METANOL

POLAR

CLS

sílica*

$n-C_7H_{16}/CHCl_3$

CLFL/FN

CN

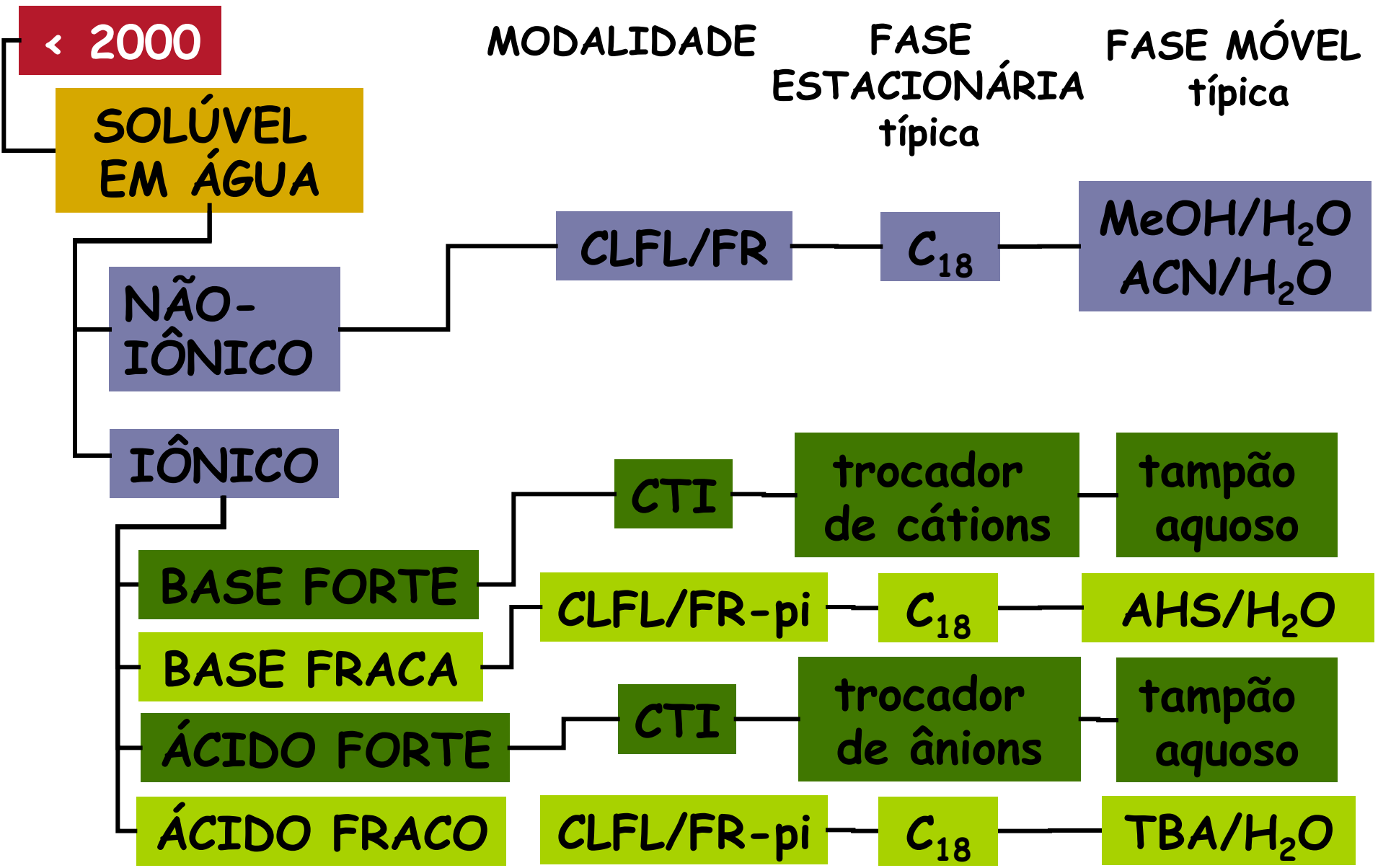
$n-C_7H_{16}/CHCl_3/pr-OH$

CLFL/FR

C_8

ACN/H₂O

FR: fase reversa pi: pareamento iônico MeOH: metanol ACN: acetonitrila
 AHS: ác. hexanossulfônico TBA: hidróxido de tetrabutylamônio
 CLFL: cromatografia em fase ligada CTI: cromatografia por troca iônica



P4. PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS PARA CROMATOGRAFIA

1. Introdução
2. Tipo de amostras
3. Processamento preliminar de amostras sólidas e semi-sólidas
 - 3.a. Redução do tamanho de partícula
 - 3.b. Secagem da amostra
 - 3.c. Filtração
4. Pré-tratamento de amostras líquidas
 - 4.a. LLE
 - 4.b. SPE
 - 4.c. SPME
 - 4.d. MSPD (matrix solid-phase dispersion)
 - 4.c. Membranas
5. Pré-tratamento de amostras sólidas
 - 5.a. Métodos tradicionais de extração
 - 5.b. SFE
 - 5.c. Microwave-assisted Solvent Extraction
 - 5.d. Accelerated Solvent Extraction
6. Column switching
7. Derivatização
 - 7.a. Detectabilidade (UV e fluorescência)
 - 7.b. Derivatização pré e pós-coluna

OPÇÕES PARA PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRA

- **AMOSTRAGEM:** amostra representativa (procedimentos estatísticos)
- **ESTOCAGEM E PRESERVAÇÃO:** frascos apropriados; compostos voláteis, instáveis ou reativos requerem tratamento especial; amostras biológicas podem requerer congelamento
- **PROCESSAMENTO PRELIMINAR:** secagem; moagem; peneiramento
- **PESAGEM E DILUIÇÃO:** material volumétrico aferido e balanças aferidas
- **MÉTODOS ALTERNATIVOS DE PROCESSAMENTO:** troca de solvente; dessalinização; evaporação, freeze-drying
- **REMOÇÃO DE PARTICULADOS:** filtração; SPE; centrifugação
- **EXTRAÇÃO:** métodos para amostras líquidas e sólidas (tabelas a seguir)
- **DERIVAÇÃO:** aumentar a detectabilidade; promover a separação

MÉTODOS TÍPICOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS GASOSAS

princípios e comentários

- **CAPTURA EM FASE SÓLIDA:** amostra gasosa passa através de um tubo contendo sorvente (sílica gel, carvão ativo); os analitos são capturados e eluídos posteriormente com um solvente forte; **vazão deve ser controlada para evitar formação de aerossóis, sobrecarga e adsorção irreversível do analito; complexantes podem ser adicionados para melhorar eficiência da captura (purge and trap technique)**
- **CAPTURA EM LÍQUIDO:** amostra gasosa é passada por uma solução que captura os analitos; **vazão de gás deve ser baixa o suficiente para não criar espumas ou aerossóis; complexante pode ser adicionado ao solvente para auxiliar captura; temperatura pode ser baixada para espécies voláteis**

MÉTODOS TÍPICOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS LÍQUIDAS

princípios e comentários

- **EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA:** amostra líquida passa através de uma fase sólida que remove seletivamente o analito; analito é então eluído com solvente forte; em alguns casos os interferentes são retidos; várias fases disponíveis comercialmente para uma ampla faixa de aplicações (análise de traços)
- **EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO:** amostra é distribuída entre 2 fases imiscíveis, escolhidas para apresentarem a maior diferença possível de solubilidade; formação de emulsões é possível (quebrar com aquecimento, adição de sal); o coeficiente de distribuição, K_D , é alterado pelo tipo de solvente e aditivos (tampões para ajuste de pH, sais para ajuste de força iônica, agentes complexantes, reagentes para pareamento iônico); recomenda-se extração contínua para K_D pequenos ou grandes volumes

MÉTODOS TÍPICOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS LÍQUIDAS

- **DILUIÇÃO:** amostra é diluída com solvente apropriado para a fase móvel escolhida; para evitar sobrecarga (overload) ou para estar dentro da faixa linear de resposta do detector; para evitar alargamento de banda, solvente da amostra não deve ser muito forte comparado com a fase móvel; "dilute and shoot"
- **EVAPORAÇÃO:** líquido é removido por aquecimento brando a pressão ambiente sob fluxo de ar ou gás inerte ou sob vácuo; perdas de amostras podem ocorrer por evaporação rápida, adsorção nas paredes do frasco; uso de gases inertes é aconselhável; evaporador rotatório; sistemas automatizados (Turbovap)
- **DESTILAÇÃO:** amostra é aquecida ao ponto de ebulição do solvente e analitos voláteis são concentrados na fase de vapor, condensados e coletados; uso limitado para amostras facilmente volatilizadas; amostra pode decompor se aquecida em demasia; destilação a vácuo, por arraste de vapor são recomendadas

MÉTODOS TÍPICOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS LÍQUIDAS

• **MICRODIÁLISE:** membrana semipermeável é colocada entre 2 fases aquosas líquidas e os solutos são transferidos de um líquido para outro de acordo com suas concentrações diferenciais; técnicas de enriquecimento, como SPE, são por vezes requeridas para concentração dializatos; microdiálise é usada para exame de fluidos extracelulares em tecidos de plantas e animais, em estudos de fermentação; já foi usada on-line com micro-LC; diálise com membranas específicas para certas massas moleculares são amplamente usadas para desproteínizar amostras antes da injeção cromatográfica; ultrafiltração e osmose reversa são usadas de forma semelhante

• **LIOFILIZAÇÃO:** amostra aquosa é congelada e a água é removida por sublimação sob vácuo; excelente para compostos não voláteis; grandes quantidades de amostra podem ser manipuladas; possível perda de componentes voláteis; sais inorgânicos são concentrados no processo

MÉTODOS TÍPICOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA SUSPENSÕES

princípios e comentários

- **FILTRAÇÃO**: amostra é passada através de filtros de papel ou membrana para remover partículas em suspensão; **altamente recomendado para prevenir problemas com pressão de retorno e para preservar a vida da coluna; filtros de membrana devem ser compatíveis com o solvente para evitar sua dissolução durante o tratamento da amostra; uso de filtros de alta porosidade ($>2 \mu\text{m}$) é recomendado para vazões altas e filtros de porosidade baixa ($<0,2 \mu\text{m}$) são usados para remover bactérias**
- **CENTRIFUGAÇÃO**: amostra é colocada no tubo da centrífuga fechado e submetida a alta rotação para decantação; **remoção dos sólidos do fundo do tubo pode apresentar problemas práticos; ideal quando o sobrenadante contém o analito de interesse**

MÉTODOS TÍPICOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA SUSPENSÕES

- **SEDIMENTAÇÃO**: amostra é levada à sedimentação em um tanque, permanecendo alí por um tempo longo; velocidade de decantação depende do raio de Stokes; **processo extremamente lento; recuperação manual de partículas de diferentes tamanhos pode ser obtida em tempo determinados, que dependem da velocidade de sedimentação**

MÉTODOS TRADICIONAIS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS SÓLIDAS

princípios e comentários

- **EXTRAÇÃO LÍQUIDO-SÓLIDO:** amostra é colocada em um frasco fechado e solvente é adicionado para dissolver o analito de interesse; solução é separada do sólido por filtração ("shaker/filter" method); solvente é algumas vezes aquecido ou usado sob refluxo para aumentar a solubilidade; amostra deve ser finamente dividida; amostra pode ser agitada manualmente ou automaticamente; amostra é filtrada, decantada ou centrifugada para separar sólidos insolúveis
- **EXTRAÇÃO EM SOXHLET:** amostra é colocada em um reservatório poroso descartável (*thimble* (*dedal*) ou papel); refluxo constante de solvente passa pelo dedal e dissolve os analitos de interesse que são coletados continuamente em um frasco de destilação; extração ocorre em solvente puro; amostra deve ser estável no p.e. do solvente; lento, mas o processo não necessita supervisão (extração exaustiva); barato; recuperações excelentes; em geral usado como método de referência

MÉTODOS TRADICIONAIS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS SÓLIDAS

- **FORCED-FLOW LEACHING**: amostra é colocada em um tubo pelo qual é forçada a passagem de solvente; tubo é aquecido a temperaturas próximas à ebulição do solvente; **adequado para amostras particuladas; solvente deve ser bombeado ou forçado através da amostra com o auxílio de pressão externa (nitrogênio); requer um volume menor que o Soxhlet, com recuperações semelhantes e mais rápida**
- **HOMOGENEIZAÇÃO**: amostra é colocada em um liquidificador (blender) juntamente com solvente; amostra é dividida em finamente durante processo; solvente é filtrado para tratamento posterior; **usado para tecidos de plantas e animais, na análise de alimentos e amostras ambientais; solventes orgânicos ou inorgânicos podem ser usados; gelo seco ou terra diatomáceas podem ser adicionados**

MÉTODOS TRADICIONAIS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS SÓLIDAS

- **SONICAÇÃO**: amostra finamente dividida é dispersa em solvente e submetida à radiação em um banho de ultra-som; **dissolução é promovida pelo processo de ultra-som; banho pode ser aquecido; seguro; rápido; melhor para partículas grossas ou materiais granulares; contato eficiente da amostra e solvente**
- **DISSOLUÇÃO**: amostra é tratada com solvente extrator e levada diretamente à solução com ou sem reação química; **sólidos inorgânicos requerem soluções ácidas ou básicas para dissolução completa; amostras orgânicas podem ser dissolvidas diretamente em solvente; filtração pode ser indicada após dissolução**

MÉTODOS MODERNOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS SÓLIDAS

princípios e comentários

- **ACCELERATED SOLVENT EXTRACTION (ASE)**: amostra é colocada em um frasco apropriado fechado e aquecida acima do seu ponto de ebulição, causando um aumento de pressão no frasco; amostra extraída é removida automaticamente e transferida para um vial para tratamento posterior; **umenta grandemente o processo de extração sólido-líquido; automatizado; amostra extraída é diluída, portanto deve ser posteriormente concentrada; questões de segurança**
- **EXTRAÇÃO EM SOXHLET AUTOMATIZADA**: combinação de solvente aquecido e extração em Soxhlet; amostra é colocada no *thimble* (dedal?) e imersa em solvente aquecido; em seguida procede-se à extração por Soxhlet convencional; **usa menos solvente que a extração convencional; solvente é recuperado para uso posterior; diminui o tempo de extração devido ao processamento em duas etapas**

MÉTODOS MODERNOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS SÓLIDAS

• **EXTRAÇÃO EM FLUIDO SUPERCRÍTICO:** amostra é colocada em um frasco apropriado fechado onde um fluido supercrítico (CO_2 , por exemplo) é passado; após despressurização do sistema, o analito extraído é coletado diretamente em solvente ou capturado em um sorvente sólido, requerendo dessorção deste último por passagem de solvente; **versões automatizadas e manuais estão disponíveis; modificação da polaridade do fluido, sua densidade pode ser alterada pela adição de solvente; amostra coletada é geralmente concentrada e livre de contaminantes (CO_2 é removido após extração)**

MÉTODOS MODERNOS DE PRÉ-TRATAMENTO PARA AMOSTRAS SÓLIDAS

•**EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS:** amostra é colocada em um frasco aberto ou fechado, com solvente apropriado, e aquecida pela energia de micro-ondas; **solvente de extração pode absorver a radiação do micro-ondas ou não;** no primeiro caso, a amostra é colocada em um frasco especial que resiste a altas pressões e aquecida a temperaturas bem superiores ao seu p.e.; no caso do solvente não absorvente de radiação micro-ondas, o frasco pode ser aberto, pois não há aumento de pressão; precauções com uso de solventes orgânicos e altas pressões

•**EXTRAÇÃO TÉRMICA:** forma de amostragem por *headspace* onde a amostra é aquecida a temperaturas elevadas (até 350 °C); **sistema pode ser construído com quartzo ou sílica fundida para evitar reação dos analitos extraídos com o material do frasco;** usado para solutos com baixa pressão de vapor

- P2. INTRODUÇÃO AOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS
- EM FASE LÍQUIDA

P10. DETECTORES ÓPTICOS DE USO COMUM EM CROMATOGRAFIA

- 14. Métodos qualitativos
- 15. Métodos quantitativos
- 16. Validação

MÉTODOS QUALITATIVOS

- Spiking com padrões
- Razão de comprimentos de onda (antigas anotações de CE)
- Coleta de frações para IR, NMR e MS (MS como detector)

MÉTODOS QUANTITATIVOS

- MEDIDA DO SINAL:
 - ruído (constante de tempo)
 - altura de pico
 - área de pico
- MÉTODO QUANTITATIVO
 - Normalização da área
 - Fator de resposta
 - Calibração externa
 - Padronização interna
 - Adição de padrão
- FONTES DE ERRO
- ANÁLISE DE TRAÇOS

VALIDAÇÃO

• EXATIDÃO

- comparação com padrão de referência
- recuperação
- adição de padrão

• PRECISÃO

• LINEARIDADE

• INTERVALO LINEAR

• LIMITE DE DETECÇÃO

• LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

• ESPECIFICIDADE

- spiking com interferentes
- degradação da amostra
- aquisição de dados
- cross-check

• ROBUSTEZ

• RESISTÊNCIA

• ESTABILIDADE

• EQUIVALÊNCIA

• t-teste

• F-teste

• ANOVA

• Q-teste