

MÓDULO CGF2036

Análise Química I:  
Físico-Química

CROMATOGRAFIA

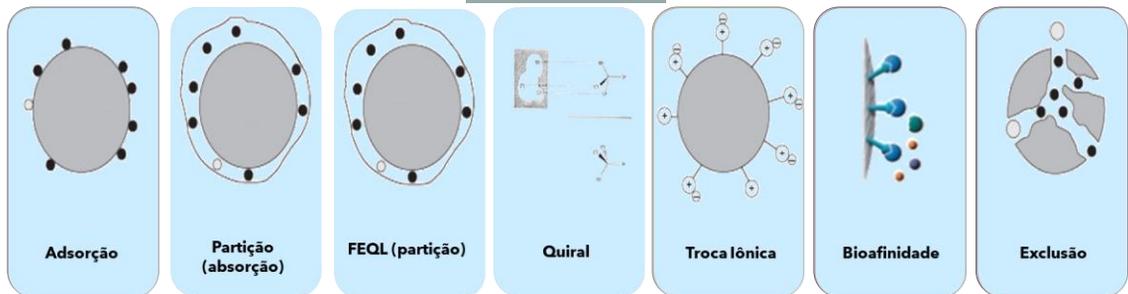
AULA 2:

Mecanismos de Separação  
(Parte I)

Prof. Dr. Jonas A. R. Paschoal



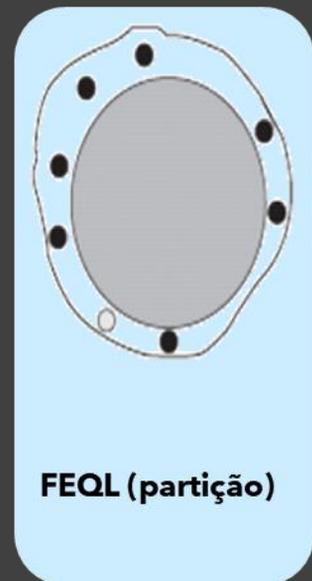
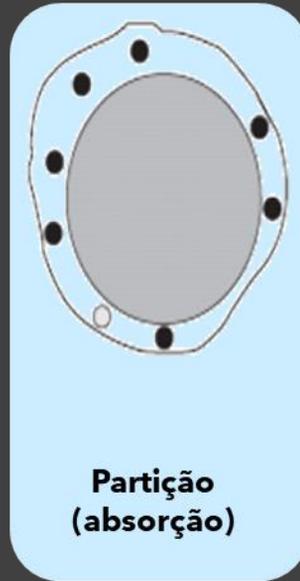
1



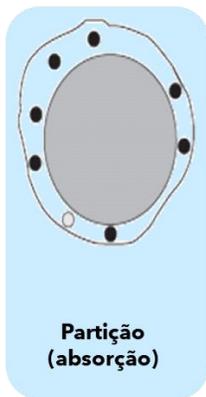
PRINCIPAIS MECANISMOS DE SEPARAÇÃO

2

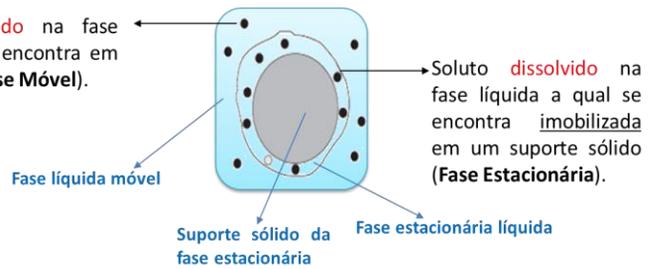
## PRINCIPAIS MECANISMOS DE SEPARAÇÃO



3

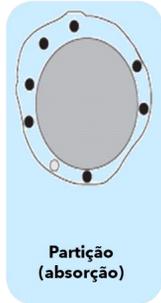


Soluto **dissolvido** na fase líquida que se encontra em movimento (Fase Móvel).

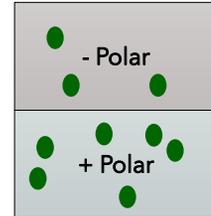
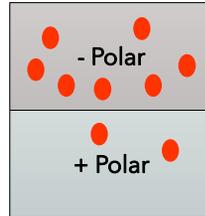
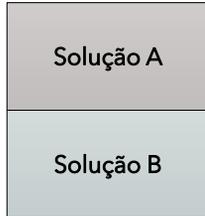


**\*Em cromatografia de partição, ambas as fases (FE e FM) são líquidas**

4

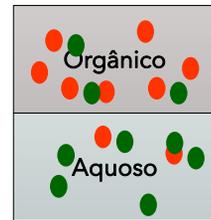


**Partição** (ou **Absorção**) é uma relação de equilíbrio químico na distribuição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis que estão em contato.

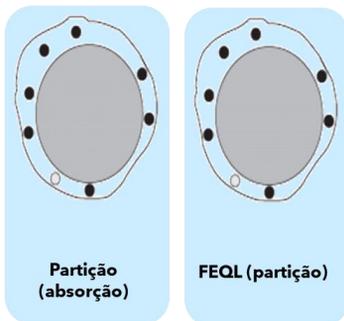


A diferença entre as **solubilidades** que o soluto possui para cada uma das fases líquidas (soluções) imiscíveis determinará o seu **coeficiente de distribuição** (partição) entre elas.

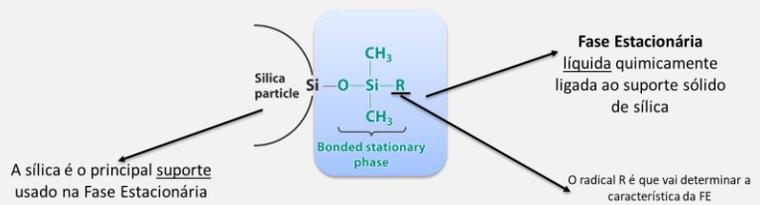
Em misturas de solutos, os diferentes coeficientes de partição entre eles farão com que tenham interações diferentes com as fases cromatográficas (FE e FM), promovendo sua **separação**. Forças fracas de Van der Waals.



5



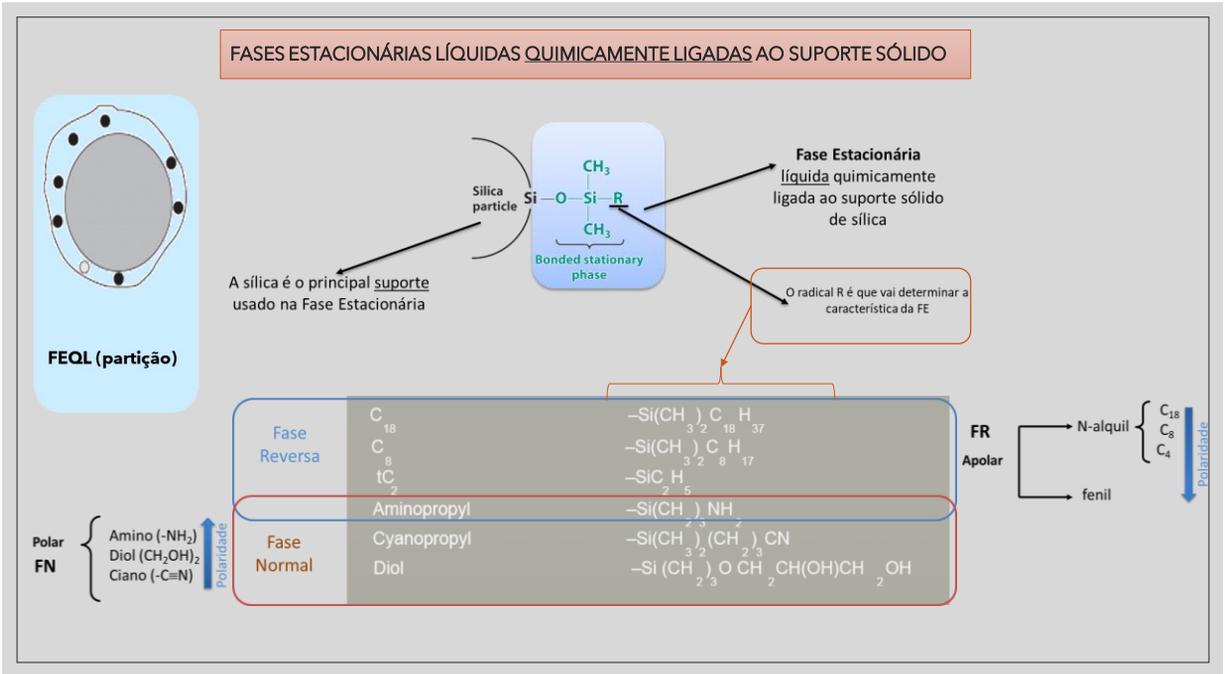
## FASES ESTACIONÁRIAS LÍQUIDAS QUIMICAMENTE LIGADAS AO SUPORTE SÓLIDO



\*É o modo mais comumente utilizado em cromatografia por ser muito versátil, podendo ser desenvolvido tanto em **Fase Normal** como em **Fase Reversa**, o que confere maior abrangência de aplicações:

- **Fase Normal:** modo no qual a **FE** é mais polar que a **FM**
- **Fase Reversa:** modo no qual a **FM** é mais polar que a **FE**

6



7

**FEQL (partição)**

Em FEQL, o mecanismo principal é o de **partição**, **\*porém**, há influência de grupos polares ativos do suporte da FE.

(a) Hydrophobic interaction

(b) Steric exclusion

(c) Hydrogen bonding (basic solute)

(d) Hydrogen bonding (acidic solute)

(e) Cation exchange

(f) Dipole-dipole interaction

(g) π-π interaction (phenyl column)

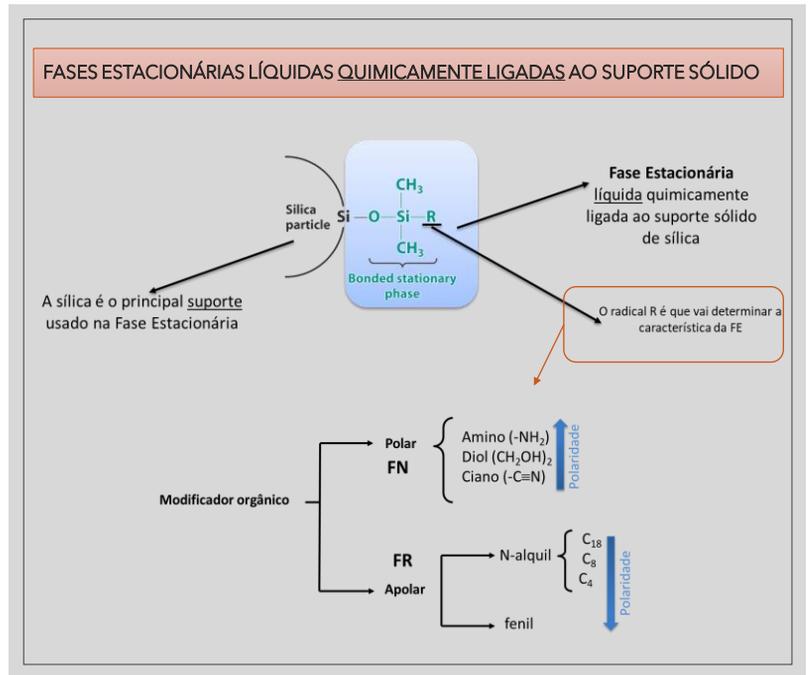
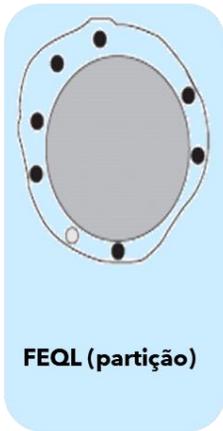
(h) π-π interaction (cyano column)

**TMS: Trimetilsilil**

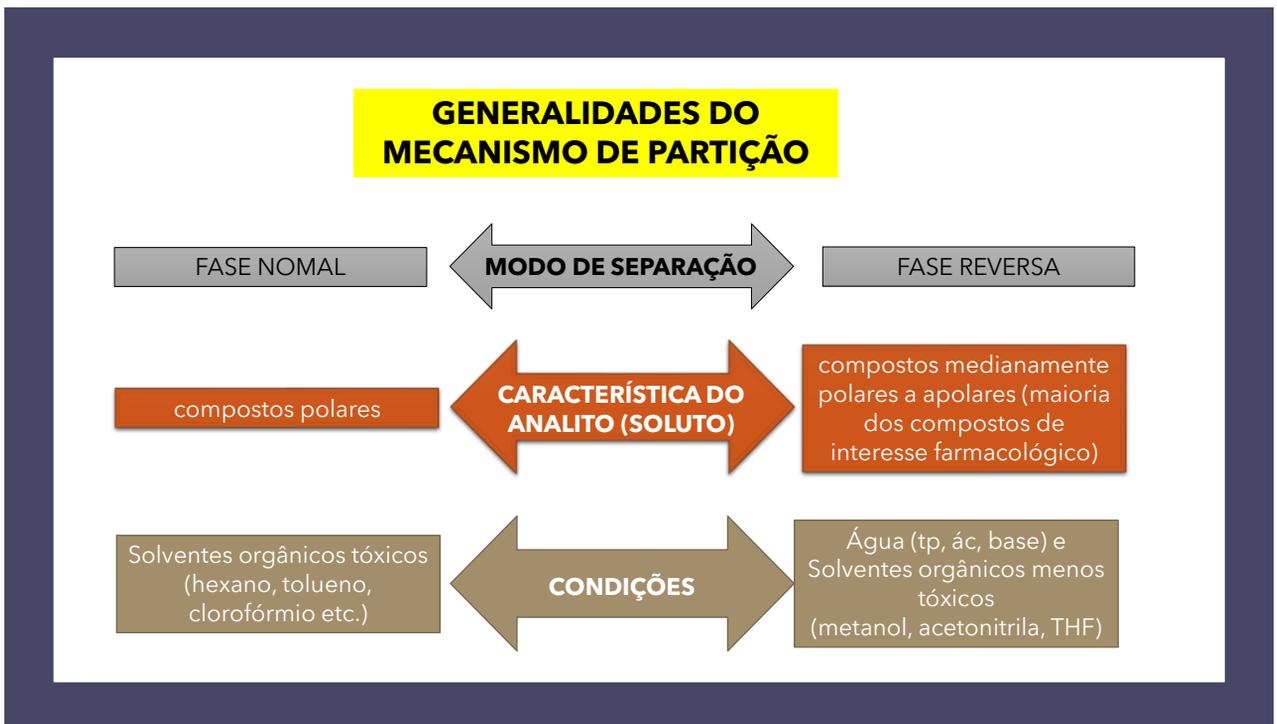
$$\begin{array}{c}
 \text{OH} \\
 | \\
 \text{---} \text{Si} \text{---} \\
 | \\
 \text{OH}
 \end{array}
 + \text{Cl} \text{---} \text{Si} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{---} \text{R} \end{array}
 \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{---} \text{Si} \text{---} \text{R} \\ | \\ \text{OH} \\ | \\ \text{---} \text{Si} \text{---} \\ | \\ \text{OH} \\ | \\ \text{---} \text{Si} \text{---} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}
 + \text{Cl} \text{---} \text{Si} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{---} \text{CH}_3 \end{array}
 \rightarrow \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{---} \text{Si} \text{---} \text{R} \\ | \\ \text{OH} \\ | \\ \text{---} \text{Si} \text{---} \text{CH}_3 \\ | \\ \text{---} \text{Si} \text{---} \\ | \\ \text{CH}_3 \\ | \\ \text{---} \text{Si} \text{---} \text{R} \end{array}$$

R = Cl, C<sub>18</sub>, etc.

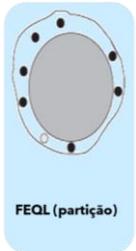
8



9



10



**FEQL (partição)**

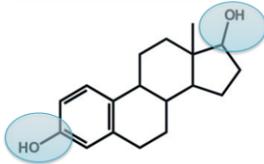
---

► Aplicação como Fase Reversa.

Fase estacionária é MENOS polar que a fase móvel

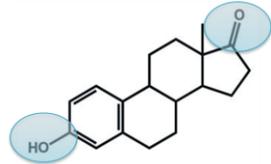
Ex: FE = C18  
FM = Metanol:água (90:10)

Solutos MENOS polares ficam mais retidos



**ESTRADIOL**

>

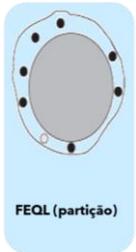


**ESTRONA**

(POLARIDADE)

FASE REVERSA MAIOR RETENÇÃO PARA COMPOSTOS MENOS POLARES

11



**FEQL (partição)**

---

► Aplicação como Fase Reversa.

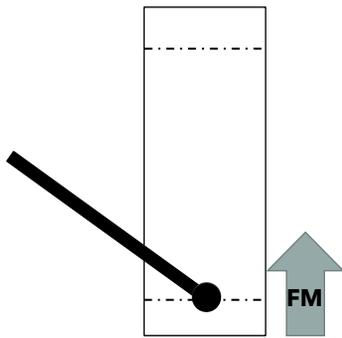
Fase estacionária é MENOS polar que a fase móvel

Ex: FE = C18  
FM = Metanol:água (90:10)

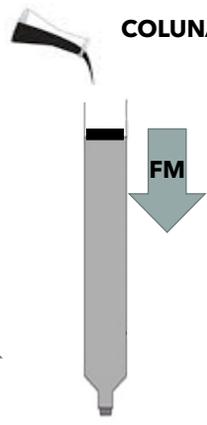
Solutos MENOS polares ficam mais retidos

## OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

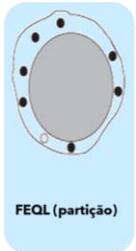
**PLANAR**



**COLUNA**



12



FEQL (partição)

---

► Aplicação como **Fase Reversa**.

Fase estacionária é **MENOS** polar que a fase móvel

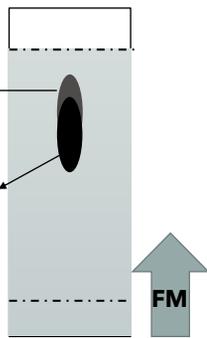
Ex: FE = C18  
FM = Metanol:água (90:10)

Solutos **MENOS** polares ficam mais retidos

## OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

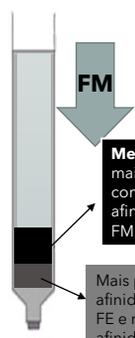
### PLANAR

**Mais polar:**  
menor afinidade com a FE e maior afinidade com a FM



**Menos polar:**  
maior afinidade com a FE e menor afinidade com a FM

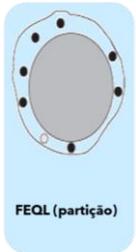
### COLUNA



**Menos polar:**  
maior afinidade com a FE e menor afinidade com a FM

**Mais polar:** menor afinidade com a FE e maior afinidade com a FM

13



FEQL (partição)

---

## OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

- 1. Alterar a Força da Fase Móvel**
- 2. Alterar a composição da Fase Móvel (Seletividade da FM)**
  - ✓ pH da FM
  - ✓ Tipo do tampão (fosfato, acetato)
  - ✓ Força iônica (concentração do sal)

} **Analitos ionizáveis**
- 3. Alterar a Fase Estacionária (Seletividade das interações com a FE)**

14



OTIMIZAÇÃO DAS  
CONDIÇÕES DE  
SEPARAÇÃO EM  
FASE REVERSA

### 1. Alterar a Força da Fase Móvel

- ✓ A Força da FM é a medida que se refere à capacidade que a FM tem para competir com a FE pelo analito.
- ✓ Quanto maior a Força da FM, menos retido ficará(o) analito(s) na FE.

✓ **No caso de Cromatografia de Fase Reversa, quanto menos polar for a FM, mais forte ela será.**

15



OTIMIZAÇÃO DAS  
CONDIÇÕES DE  
SEPARAÇÃO EM  
FASE REVERSA

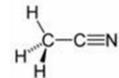
### 1. Alterar a Força da Fase Móvel

#### SOLVENTES COMUNS USADOS EM FASE REVERSA

Metanol



Acetonitrila



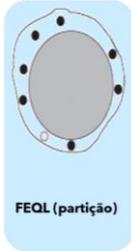
Tetraidrofurano



Água

Baixa viscosidade  
Disponíveis em alta pureza  
Transparentes no UV

16



FEQL (partição)

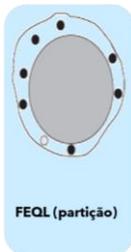
## OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

### 1. Alterar a Força da Fase Móvel

Em Fase Reversa, geralmente empregam-se misturas de solventes aquosos e solventes orgânicos na mistura:

- Fase móvel **binária** é uma mistura de dois solventes.
  - Exemplo: MeOH e Água (20:80, v/v)
- Fase móvel **ternária** é uma mistura de três solventes.
  - Exemplo: THF, MeOH e Água (2:35:63, v/v/v)
- Fase móvel **quaternária** é uma mistura de quatro solventes.
  - Exemplo: THF, ACN, MeOH e Água (3:15:17:65, v/v/v/v)

17



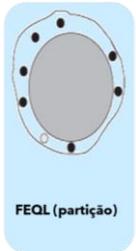
FEQL (partição)

## OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

### 1. Alterar a Força da Fase Móvel

Solvente	Fator Peso de Força
	Fase Reversa*
Metanol	2,6
Acetonitrila	3,2
Tetraidrofurano	4,5
Água	0

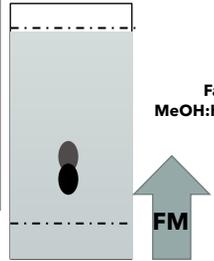
18

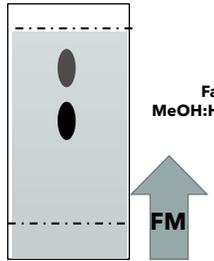


FEQL (partição)

**1. Alterar a Força da Fase Móvel**

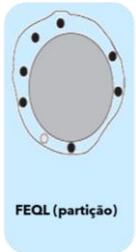
Solvente	Fator Peso de Força Fase Reversa*
Metanol	2,6
Acetonitrila	3,2
Tetraidrofurano	4,5
Água	0





OTIMIZAÇÃO DAS  
CONDIÇÕES DE  
SEPARAÇÃO EM  
FASE REVERSA

19



FEQL (partição)

**1. Alterar a Força da Fase Móvel**

**2. Alterar a composição da Fase Móvel (Seletividade da FM)**

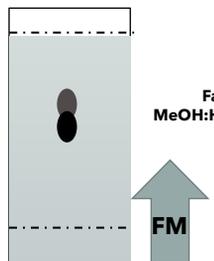
$$\varnothing_1 \times F_1 = \varnothing_2 \times F_2$$

$\varnothing_1$ : fração (proporção) em volume do solvente inicial

$F_1$ : fator força peso do solvente da mistura inicial

$\varnothing_2$ : fração (proporção) em volume do novo solvente

$F_2$ : fator força peso do novo solvente



**Alteração da SELETIVIDADE da FM:**

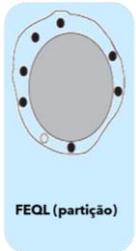
✓ Trocar MeOH por ACN mantendo a força da FM

$$50 \times 2,6 = \varnothing_{ACN} \times 3,2$$

$$\varnothing_{ACN} = 41$$

OTIMIZAÇÃO DAS  
CONDIÇÕES DE  
SEPARAÇÃO EM  
FASE REVERSA

20



FEQL (partição)

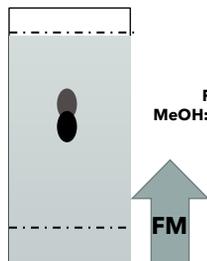
Solvente	Fator Peso de Força Fase Reversa*
Metanol	2,6
Acetonitrila	3,2
Tetraidrofurano	4,5
Água	0

**1. Alterar a Força da Fase Móvel**

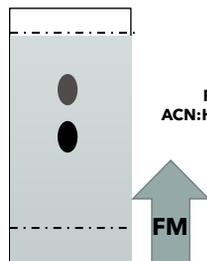
**2. Alterar a composição da Fase Móvel (Seletividade da FM)**

$$\emptyset_1 \times F_1 = \emptyset_2 \times F_2$$

$\emptyset_1$ : fração (proporção) em volume do solvente inicial  
 $F_1$ : fator força peso do solvente da mistura inicial  
 $\emptyset_2$ : fração (proporção) em volume do novo solvente  
 $F_2$ : fator força peso do novo solvente



Fase Móvel  
MeOH:H2O (50:50, v/v)



Fase Móvel  
ACN:H2O (41:59, v/v)

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

21



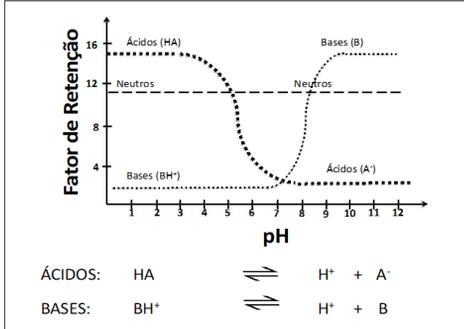
FEQL (partição)

**1. Alterar a Força da Fase Móvel**

**2. Alterar a composição da Fase Móvel (Seletividade da FM)**

- ✓ pH da FM
- ✓ Tipo do tampão (fosfato, acetato)
- ✓ Força iônica (concentração do sal)

Influência do pH da fase móvel no fator de retenção em cromatografia de fase reversa

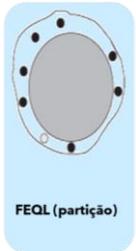


ÁCIDOS:  $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$

BASES:  $BH^+ \rightleftharpoons H^+ + B$

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

22



FEQL (partição)

**1. Alterar a Força da Fase Móvel**

**2. Alterar a composição da Fase Móvel (Seletividade da FM)**

- ✓ pH da FM
- ✓ Tipo do tampão (fosfato, acetato)
- ✓ Força iônica (concentração do sal)

**Analitos ionizáveis**

Equação de Henderson-Hasselbalch

**Compostos ácidos**

$$\text{HA} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{A}^-$$

ácido                      base conjugada

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\text{base conj}}{\text{ácido}}$$

**Compostos básicos**

$$\text{BH}^+ \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{B}$$

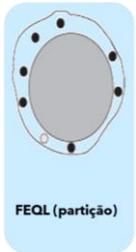
ácido conjugado                      base

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{\text{base}}{\text{ácido conj.}}$$

**Log 1 = 0                  log <1 = valor negativo                  log >1 = valor positivo**

OTIMIZAÇÃO DAS  
CONDIÇÕES DE  
SEPARAÇÃO EM  
FASE REVERSA

23



FEQL (partição)

**Analitos ionizáveis**

**Influência do pH da fase móvel no fator de retenção em cromatografia de fase reversa**

**USO DE TAMPÃO (FM)**

- ▶ Variação de 0,1 unidade de pH da fase móvel na região próxima ao valor do pKa do analito tem efeito significativo na retenção de compostos ionizáveis em Fase Reversa (onde a FE é menos polar que a FM).
- ▶ Daí surge a necessidade do uso de tampão a fim de regular o valor de pH da fase móvel.
- ▶ pH do tampão deve estar em *duas unidades abaixo do pKa de um analito ácido* ou *2 unidades acima do pKa de um analito básico*.
- ▶ Devem ser usados em concentrações abaixo de 100 mM (dê preferência aos tampões orgânicos).

OTIMIZAÇÃO DAS  
CONDIÇÕES DE  
SEPARAÇÃO EM  
FASE REVERSA

24

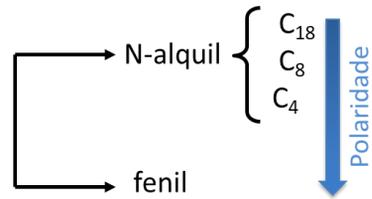


OTIMIZAÇÃO DAS  
CONDIÇÕES DE  
SEPARAÇÃO EM  
FASE REVERSA

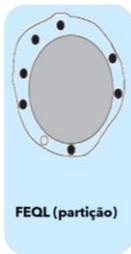
1. Alterar a Força da Fase Móvel

2. Alterar a composição da Fase Móvel (Seletividade da FM)

3. Alterar a Fase Estacionária (Seletividade das interações com a FE)



25



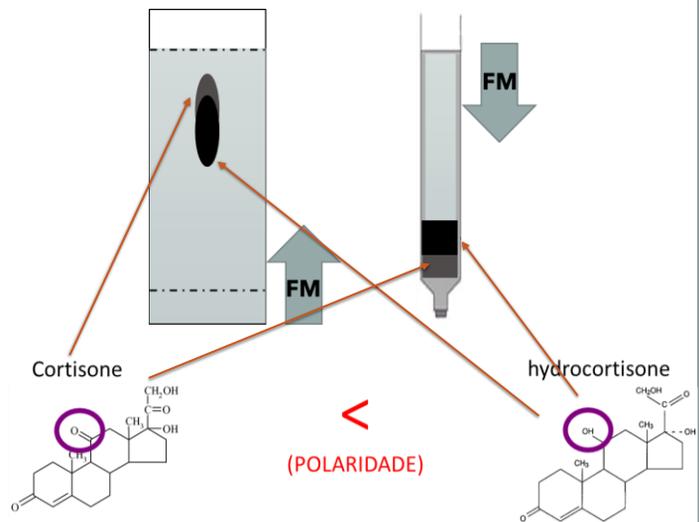
► Aplicação como **Fase Normal**.

Fase estacionária é MAIS polar que a fase móvel

Ex: FE = CN

FM = Hexano: isopropanol (9:1)

Solutos MAIS polares ficam mais retidos



FASE NORMAL MAIOR RETENÇÃO PARA COMPOSTOS MAIS POLARES

26



FEQL (partição)

► Aplicação como **Fase Normal**.

Fase estacionária é MAIS polar que a fase móvel

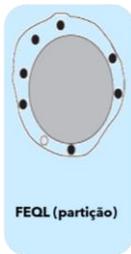
Ex: FE = CN  
FM = Hexano: isopropanol (9:1)

Solutos MAIS polares ficam mais retidos

## QUANDO UTILIZAR

- Analitos muito hidrofílicos (polares)
  - Quando uma separação adequada não for obtida por outros mecanismos/modo
  - Separação de isômeros posicionais, estereoisômeros ou diastereoisômeros
- (a força de interação não só depende dos grupos funcionais do composto de interesse, mas também de fatores estéricos de forma que os isômeros estruturais com frequência se podem diferenciar o um do outro)
- Cromatografia preparativa (recuperação de analitos solúveis em solventes orgânicos)
  - Analito é solúvel apenas em solvente não-polar (ex.: lipídios)

27



FEQL (partição)

► Aplicação como **Fase Normal**.

Fase estacionária é MAIS polar que a fase móvel

Ex: FE = CN  
FM = Hexano: isopropanol (9:1)

Solutos MAIS polares ficam mais retidos

## CARACTERÍSTICAS DA FN

- A separação é fortemente influenciada quando se altera as proporções dos componentes da Fase Móvel (**força da FM**).

### FORÇA CROMATOGRÁFICA DA FASE MÓVEL

Solvente	Fator Peso de Força	
	Fase Reversa*	Fase Normal
Metanol	2,6	5,1
Acetonitrila	3,2	5,8
Tetraidrofurano	4,5	4,0
Água	0	10,2
Clorofórmio		4,1
Diclorometano		3,1
Éter metil t-butílico		2,5
Éter etílico		2,8
Hexano		0

28



**FEQL (partição)**

## CARACTERÍSTICAS DA FN

- ▶ A separação é fortemente influenciada quando se altera as proporções dos componentes da Fase Móvel (**força da FM**).
- ▶ A separação é **ainda mais** fortemente influenciada quando se promove a alteração de algum componente da fase móvel (**seletividade da FM**).

▶ Aplicação como **Fase Normal**.

Fase estacionária é MAIS polar que a fase móvel

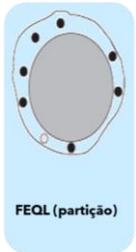
Ex: FE = CN  
FM = Hexano: isopropanol (9:1)

Solutos MAIS polares ficam mais retidos

**Polaridade dos solventes**



29



**FEQL (partição)**

## CARACTERÍSTICAS DA FN

- ▶ A separação é fortemente influenciada quando se altera as proporções dos componentes da Fase Móvel (**força da FM**).
- ▶ A separação é ainda mais fortemente influenciada quando se promove a alteração de algum componente da fase móvel (**seletividade da FM**).

▶ Aplicação como **Fase Normal**.

Fase estacionária é MAIS polar que a fase móvel

Ex: FE = CN  
FM = Hexano: isopropanol (9:1)

Solutos MAIS polares ficam mais retidos

▶ A troca da FE é a alternativa que mais influencia a separação (**seletividade da FE**).

- F.E. (poder de retenção,  $k$ ): amino ( $-\text{NH}_2$ ) > diol ( $\text{CH}_2\text{OH}$ )<sub>2</sub> > ciano ( $-\text{C}\equiv\text{N}$ )
- F.E. (poder de separação,  $\alpha$ ): ciano > diol > amino

Portanto, a alteração no resultado da separação cromatográfica a partir da mudança da FE é menos previsível no modo Normal do que no Reverso.

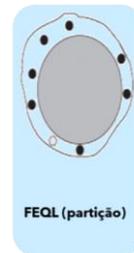
30

**Vantagens**

1. São possíveis muitas mudanças na seletividade, alterando f.m. e f.e.
2. FE estáveis quando se utiliza solventes não aquosos
3. Muitos compostos orgânicos são mais solúveis em solventes mais apolares
4. Maior fluidez da FM devido à baixa viscosidade dos solventes (velocidade da análise)
5. Útil para amostras que possam se decompor em soluções aquosas.

**Desvantagens**

1. Amostras iônicas mais facilmente separadas por RP
2. Controle da força do solvente não muito previsível (tedioso ajuste da FM)
3. Geralmente a separação é melhor em RP
4. Ponto de ebulição reduzido da FM (volatilidade)
5. Alto custo dos solventes orgânicos

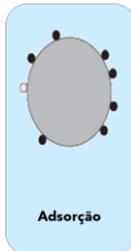
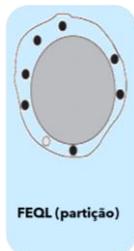
**COMPARAÇÃO  
FN vs FR**

31

**COMPARAÇÃO  
FN vs  
ADSORÇÃO**

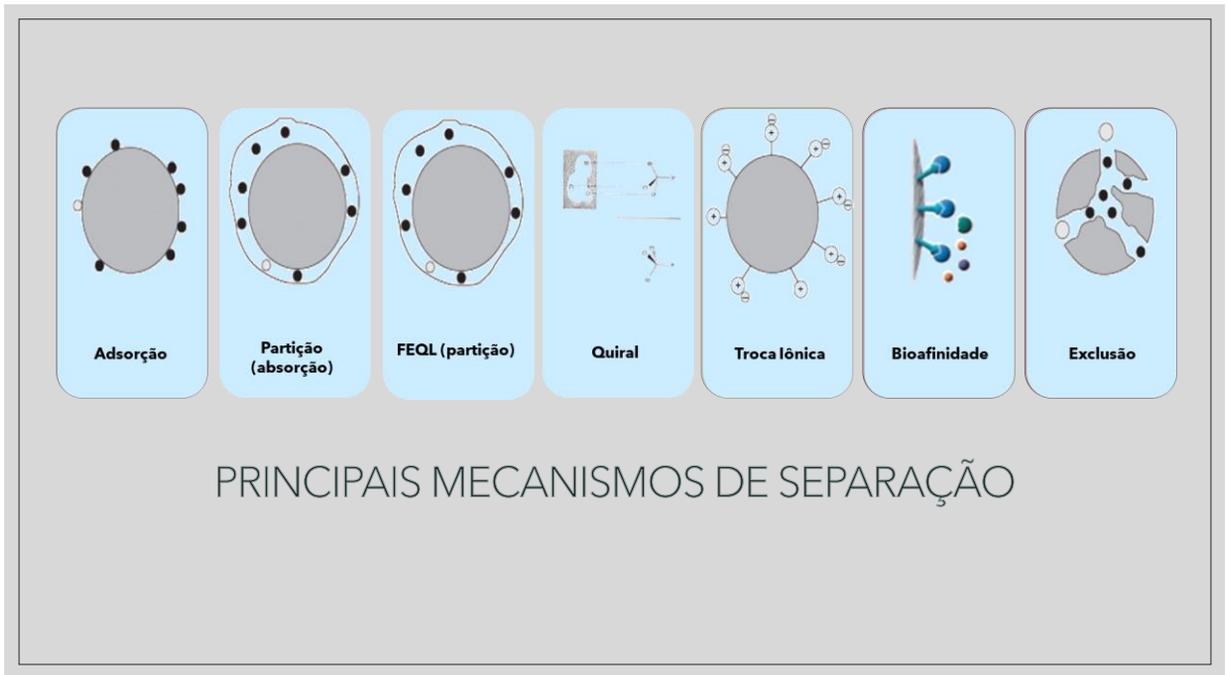
**ADSORÇÃO** Compostos inorgânicos (FEI) → Sílica, alumina, carbono grafítizado poroso

**FASE NORMAL** Grupos polares (FQL) → Diol, aminopropil e cianopropil

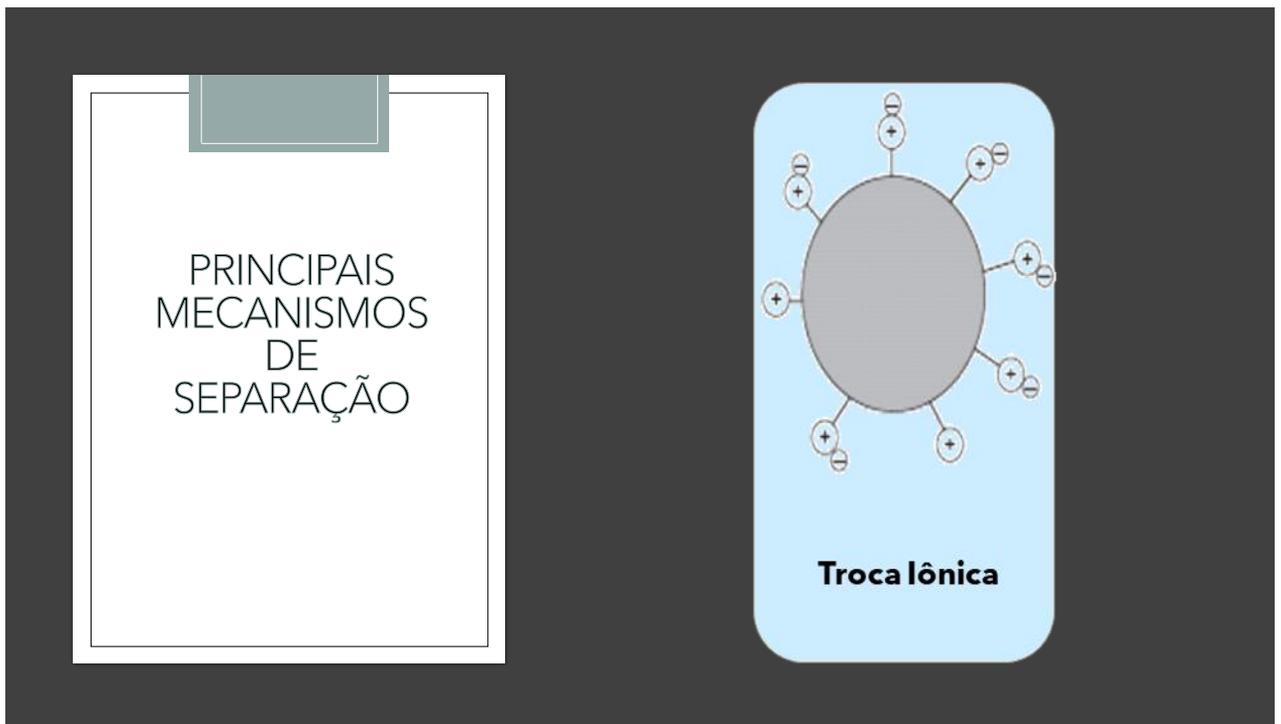


Característica	Comparação
• Conveniência e reprodutibilidade	FQL são preferidas, pois FEI requerem controle da presença de água
• Equilíbrio da FE após mudar a FM	FEI podem requerer longo tempo para equilíbrio
• Estabilidade da FE	Ambas estáveis, porém, FEI geralmente têm maior durabilidade
• Seletividade para isômeros	FEI preferida
• Análise preparativa	FEI preferida pelo menor custo, maior estabilidade, alta capacidade de amostra

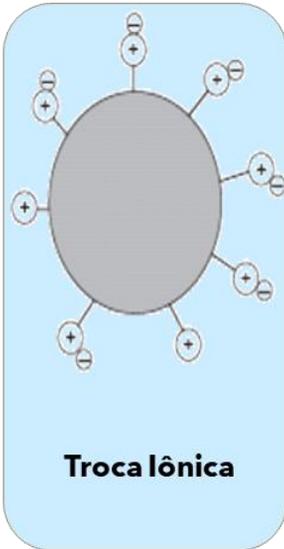
32



33

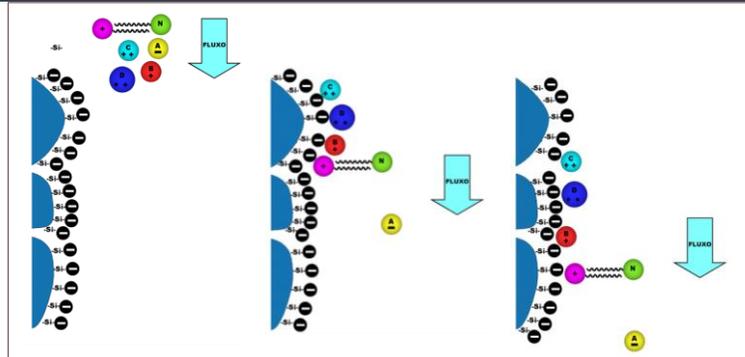
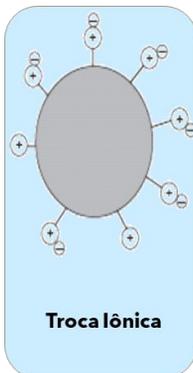


34



- Adsorção reversível de íons na FE contendo grupos funcionais de carga oposta. A F.E. contém grupos iônicos ligados em sua superfície (ânions ou cátions), que são “trocados” pelos íons a serem determinados em uma amostra.

35



#### Parâmetros importantes

- FASES MÓVEIS**
- Soluções de eletrólitos aquosos.
  - Modificadores orgânicos: suprimir interação hidrofóbica.
- Tipo de contra-íon:
    - AIEC: citrato>oxalato>formiato>acetato>OH<sup>-</sup>
    - CIEC: Ba<sup>2+</sup> > NH<sub>4</sub><sup>+</sup> > H<sup>+</sup>
  - Força iônica do eletrólito
  - pH
  - Temperatura.

36

**Troca Iônica**

**Troca Iônica**

pH

Ionic strength

37

## FASES ESTACIONÁRIAS

► Sílica gel ou copolímero de estireno-divinilbenzeno com grupos iônicos ligados.

**Troca Iônica**

**Troca Catiônica SCX**

Silica

(a) benzenesulfonic acid-modified silica sorbent

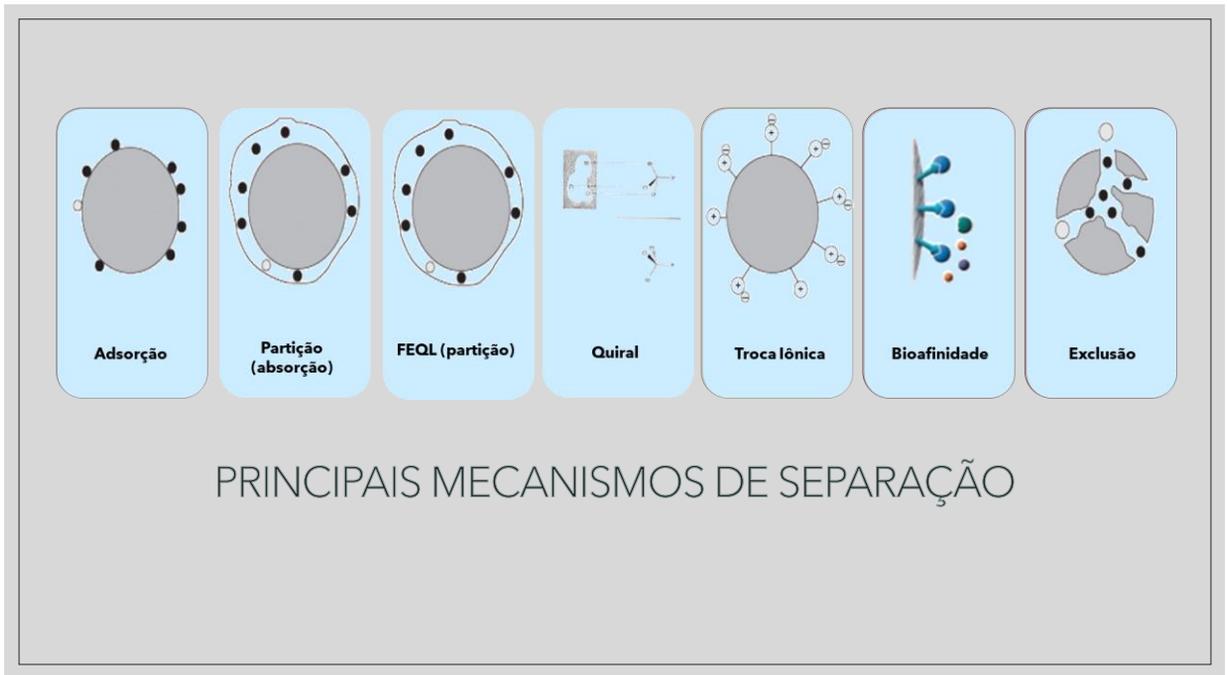
**Troca Aniônica SAX**

Silica

(b) trimethylaminopropyl-modified silica sorbent

**Aplicações:** Todos compostos iônicos comuns, ânions, cátions, açúcares, ácidos carboxílicos, aminas, etc.

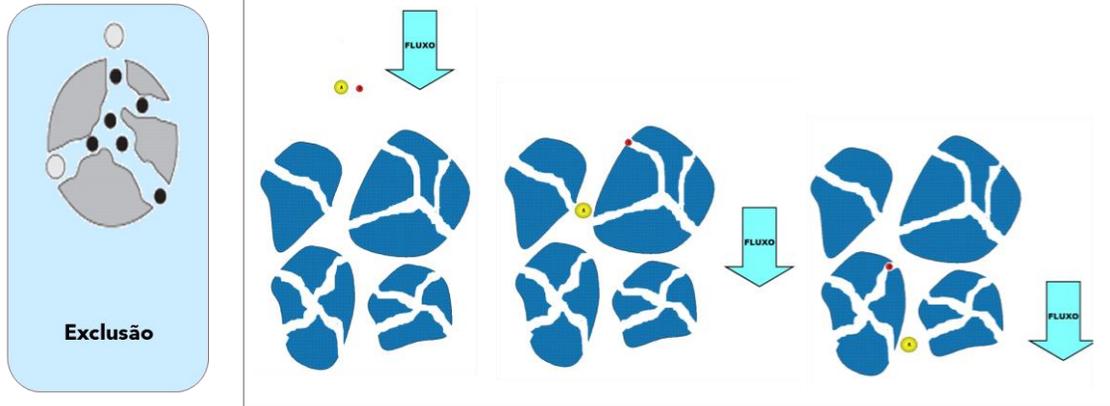
38



39

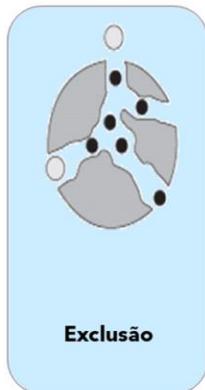


40



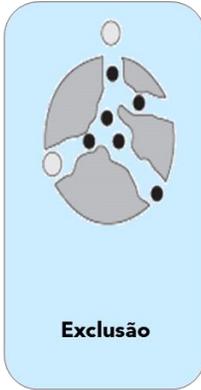
- ✓ Mecanismo de separação baseado na interação física (mecânica) de moléculas de diferentes tamanhos por entre os poros da F.E.
- ✓ As opções de F.E. consistem em partículas pequenas ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) de sílica ou polímeros contendo uma rede de poros uniformes dentro dos quais as moléculas do soluto e do solvente podem difundir.

41



- **As moléculas muito grandes são excluídas do leito cromatográfico e eluem primeiro;**
- **As moléculas médias poderão penetrar os poros em vários graus dependendo de seu tamanho; e**
- **As moléculas menores difundindo-se mais dentro da estrutura dos poros eluem por último**

42



	Name of the gel	Exclusion limit(Da)
1	Sephadex G-10	0 to 700
2	Sephadex G-25	1000 to 5000
3	Sephadex G-50	1500 to 30000
4	Sephadex G-75	3000 to 70000
5	Sephadex G-100	4000 to 150000
6	Sephadex G-150	5000 to 300000
7	Sephadex G-200	5000 to 800000
8	Bio-gel P-2	100 to 1800
9	Bio-gel P-6	1000 to 6000

