

MÓDULO CGF2036

Análise Química I:
Físico-Química

CROMATOGRAFIA

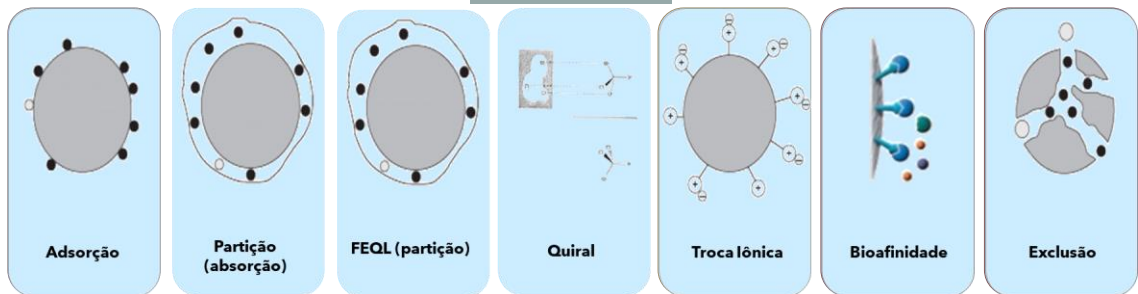
AULA 2:

Mecanismos de Separação
(Parte I)

Prof. Dr. Jonas A. R. Paschoal



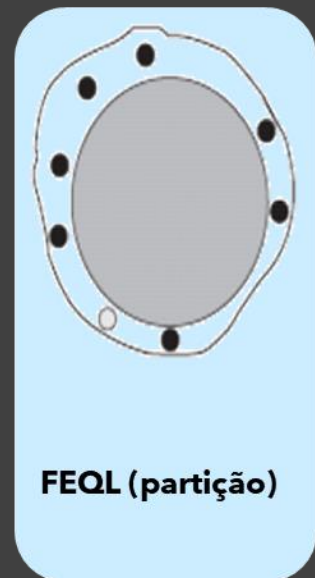
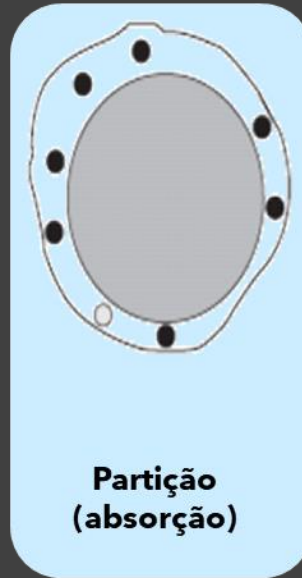
1



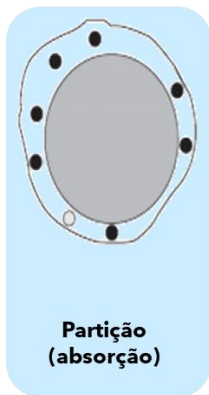
PRINCIPAIS MECANISMOS DE SEPARAÇÃO

2

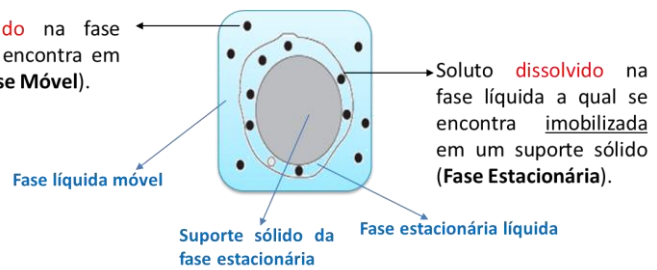
PRINCIPAIS MECANISMOS DE SEPARAÇÃO



3

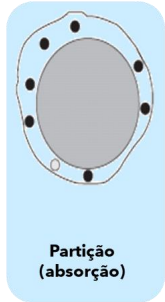


Soluto **dissolvido** na fase líquida que se encontra em movimento (Fase Móvel).

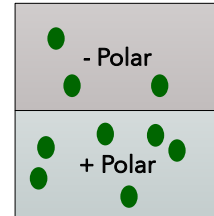
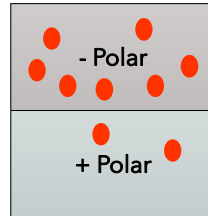
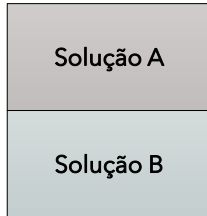


***Em cromatografia de partição, ambas as fases (FE e FM) são líquidas**

4

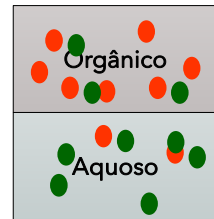


Partição (ou **Absorção**) é uma relação de equilíbrio químico na distribuição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis que estão em contato.

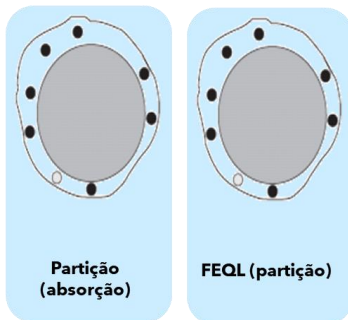


A diferença entre as **solubilidades** que o soluto possui para cada uma das fases líquidas (soluções) imiscíveis determinará o seu **coeficiente de distribuição** (partição) entre elas.

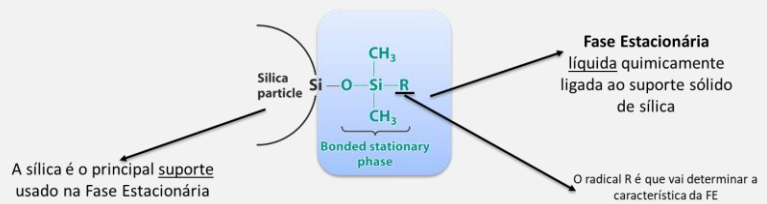
Em misturas de solutos, os diferentes coeficientes de partição entre eles farão com que tenham interações diferentes com as fases cromatográficas (FE e FM), promovendo sua **separação**. Forças fracas de Van der Waals.



5



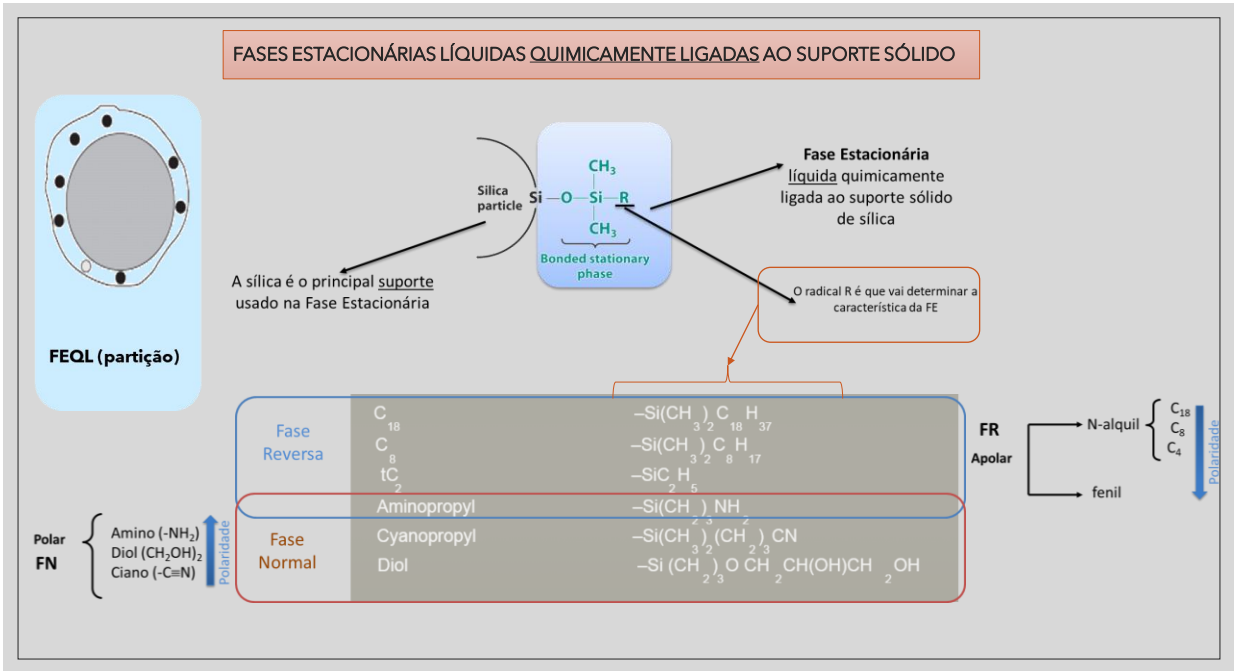
FASES ESTACIONÁRIAS LÍQUIDAS QUIMICAMENTE LIGADAS AO SUPORTE SÓLIDO



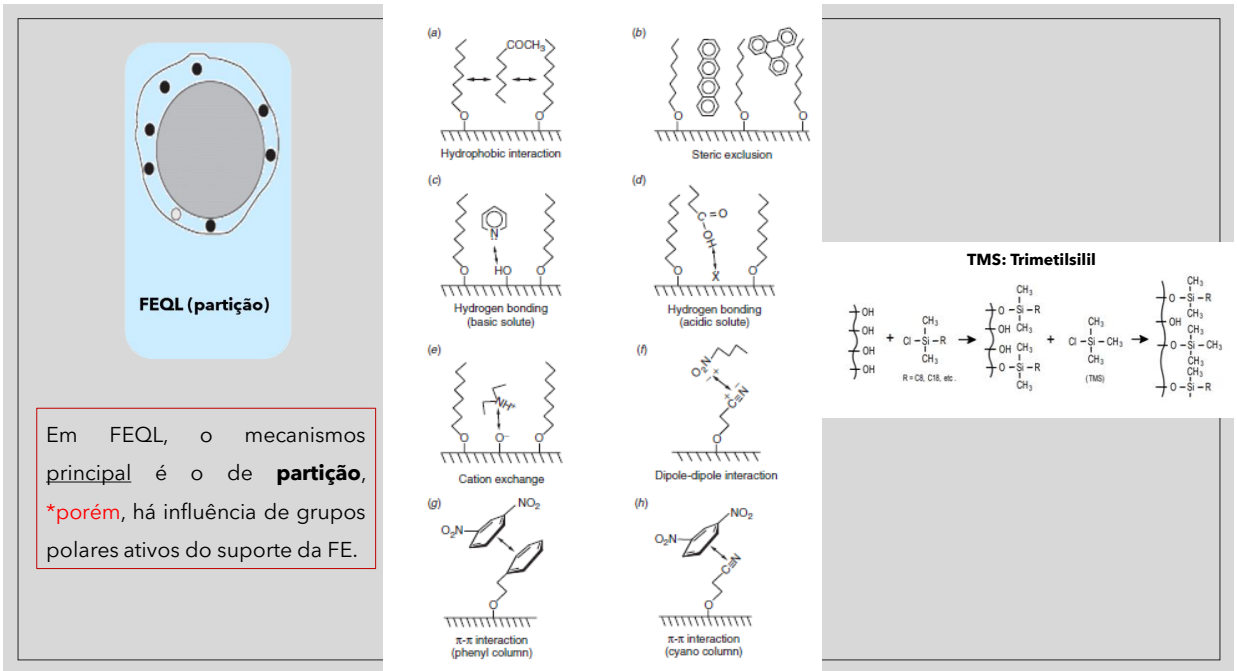
*É o modo mais comumente utilizado em cromatografia por ser muito versátil, podendo ser desenvolvido tanto em **Fase Normal** como em **Fase Reversa**, o que confere maior abrangência de aplicações:

- **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**

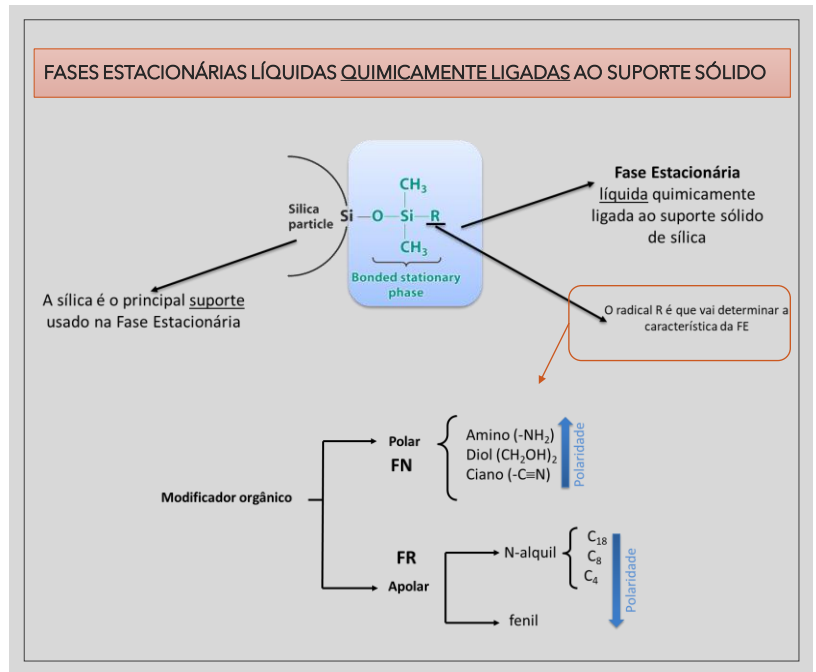
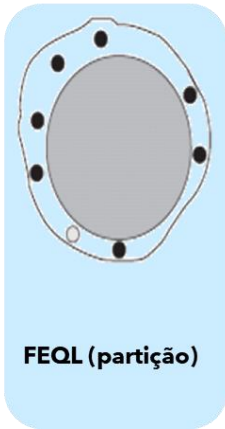
6



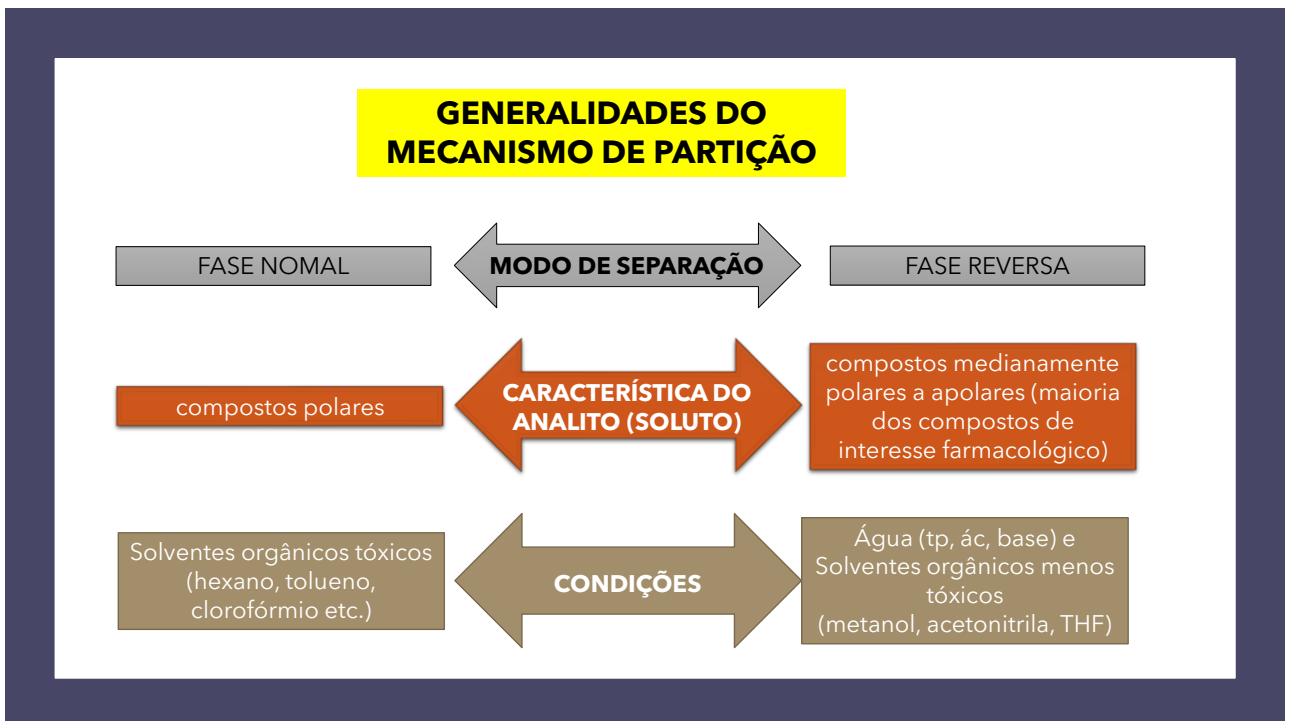
7



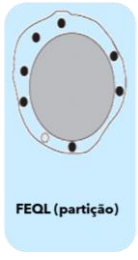
8



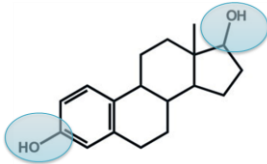
9



10

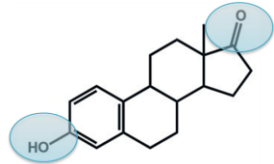


FEQL (partição)



ESTRADIOL

>



ESTRONA

(POLARIDADE)

FASE REVERSA MAIOR RETENÇÃO PARA COMPOSTOS MENOS POLARES

► 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

11



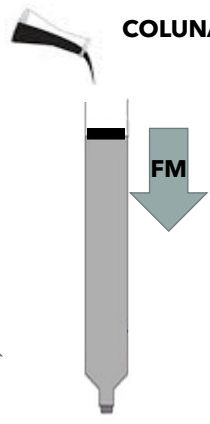
FEQL (partição)

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

PLANAR



COLUNA



► 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

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

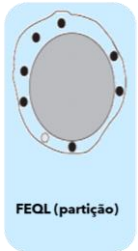
COLUNA



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



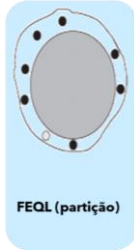
FEQL (partição)

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



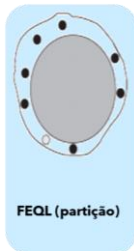
OTIMIZAÇÃO DAS
CONDIÇÕES DE
SEPARAÇÃO EM
FASE REVERSA

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

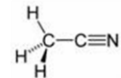
1. Alterar a Força da Fase Móvel

SOLVENTES COMUNS USADOS EM FASE REVERSA

Metanol



Acetonitrila



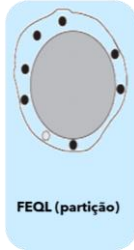
Tetraidrofurano



Água

Baixa viscosidade
Disponíveis em alta pureza
Transparentes no UV

16



FEQL (partição)

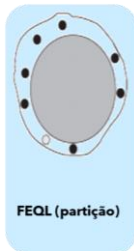
OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

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



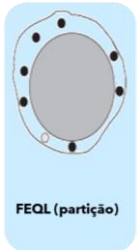
FEQL (partição)

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

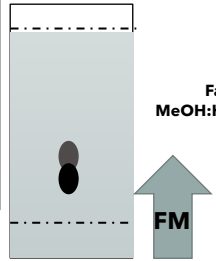
18



FEQL (partição)

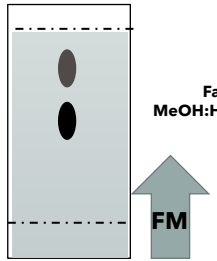
1. Alterar a Força da Fase Móvel

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



Fase Móvel
MeOH:H2O (50:50, v/v)

FM



Fase Móvel
MeOH:H2O (70:30, v/v)

FM

OTIMIZAÇÃO DAS
CONDIÇÕES DE
SEPARAÇÃO EM
FASE REVERSA

19



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

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



Fase Móvel
MeOH:H2O (50:50, v/v)

FM

Alteração da SELETIVIDADE da FM:

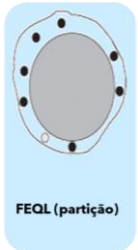
✓ Trocar MeOH por ACN mantendo a força da FM

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

$$\varnothing_{ACN} = 41$$

OTIMIZAÇÃO DAS
CONDIÇÕES DE
SEPARAÇÃO EM
FASE REVERSA

20



FEQL (partição)

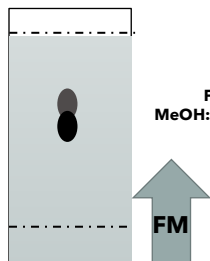
Solvente	Fator Peso de Força Fase Reversa*
Metanol	2,6
Acetonitrila	3,2
Tetraidrofurano	4,5
Água	0

1. Alterar a Força da Fase Móvel

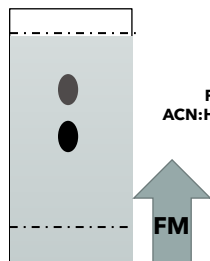
2. Alterar a composição da Fase Móvel (Seletividade da FM)

$\phi_1 \times F_1 = \phi_2 \times F_2$

ϕ_1 : fração (proporção) em volume do solvente inicial
 F_1 : fator força peso do solvente da mistura inicial
 ϕ_2 : fração (proporção) em volume do novo solvente
 F_2 : fator força peso do novo solvente



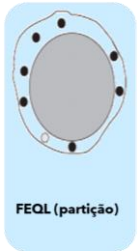
Fase Móvel
MeOH:H2O (50:50, v/v)



Fase Móvel
ACN:H2O (41:59, v/v)

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

21



FEQL (partição)

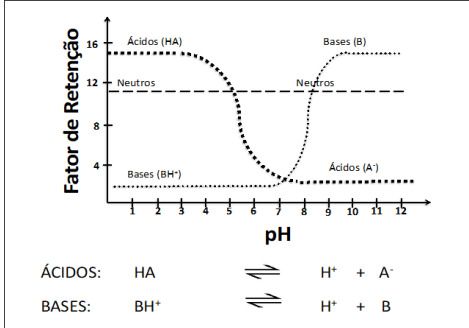
1. Alterar a Força da Fase Móvel

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

Analitos ionizáveis

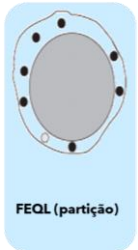


ÁCIDOS: $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$

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

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

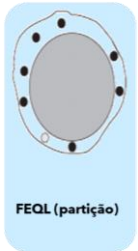
ácido conjugado base

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

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

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO EM FASE REVERSA

23



FEQL (partição)

Analitos ionizáveis

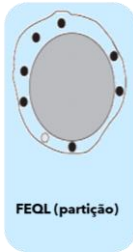
Influência do pH da fase móvel no fator de retenção em cromatografia de fase reversa

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

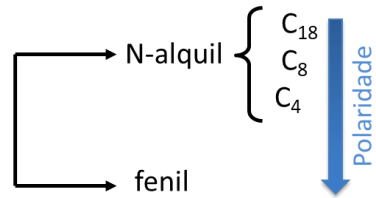


OTIMIZAÇÃO DAS
CONDIÇÕES DE
SEPARAÇÃO EM
FASE REVERSA

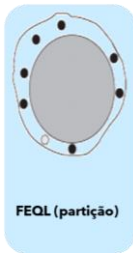
1. Alterar a Força da Fase Móvel

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

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



25



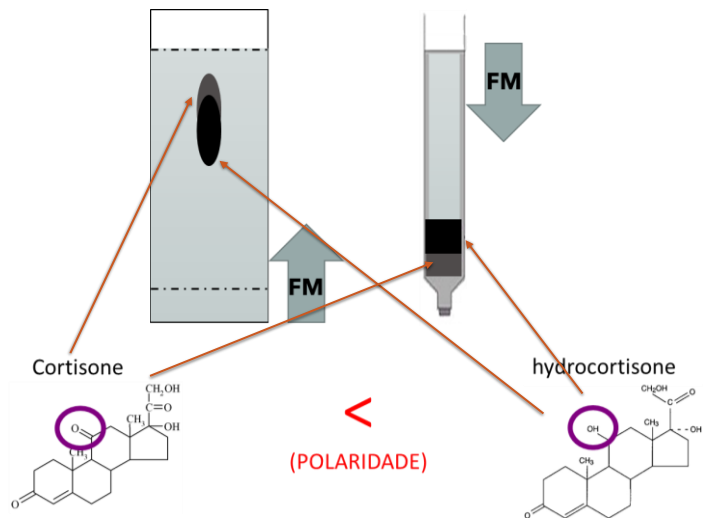
► Aplicação como **Fase Normal**.

Fase estacionária é MAIS polar que a fase móvel

Ex: FE = CN

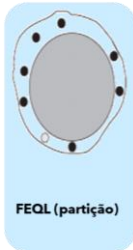
FM = Hexano: isopropanol (9:1)

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

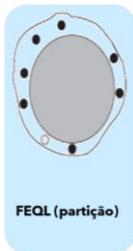
Ex: FE = CN
FM = Hexano: isopropanol (9:1)

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.: lípidios)

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

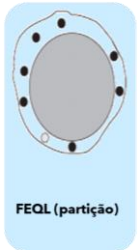
CARACTERÍSTICAS DA FN

- 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

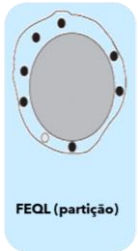
Ex: FE = CN
FM = Hexano: isopropanol (9:1)

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 (CH_2OH)₂ > ciano ($-\text{C}\equiv\text{N}$)
- F.E. (poder de separação, α): 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.

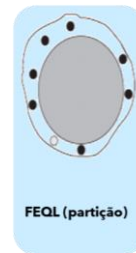
30

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

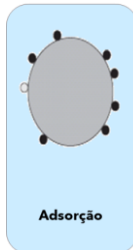
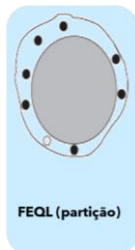
**COMPARAÇÃO
FN vs FR**

31

**COMPARAÇÃO
FN vs
ADSORÇÃO**

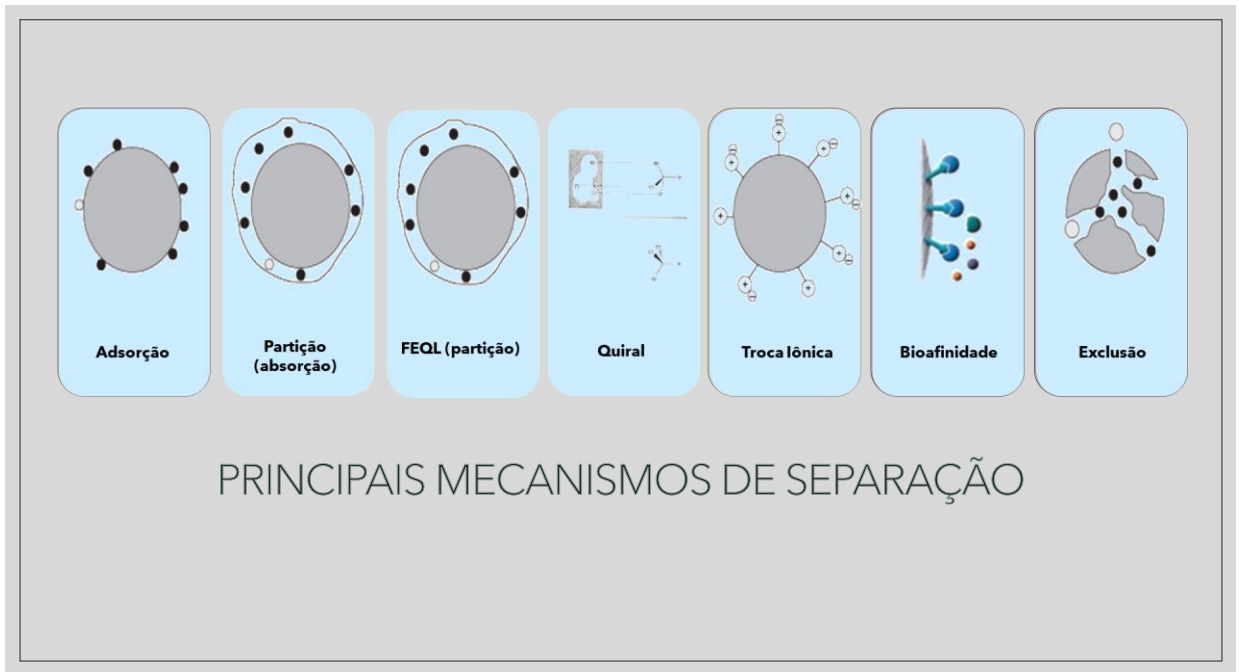
ADSORÇÃO Compostos inorgânicos (FEI) → Sílica, alumina, carbono grafítizado poroso

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

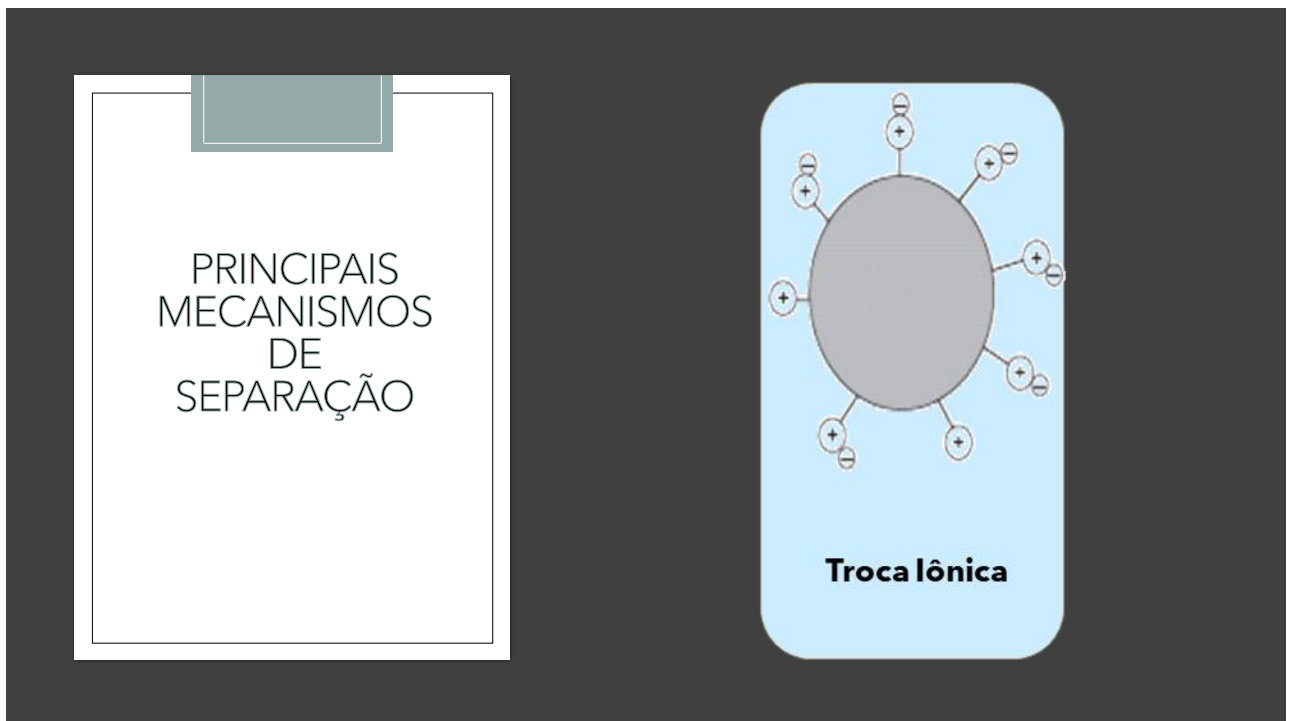


Característica	Comparação
• Conveniência e reprodutibilidade	FQL são preferidas, pois FEI requerem controle da presença de água
• Equilíbrio da FE após mudar a FM	FEI podem requerer longo tempo para equilíbrio
• Estabilidade da FE	Ambas estáveis, porém, FEI geralmente têm maior durabilidade
• Seletividade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

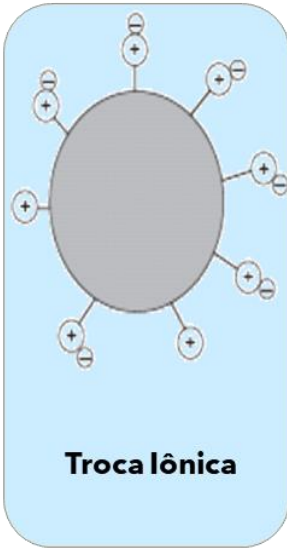
32



33

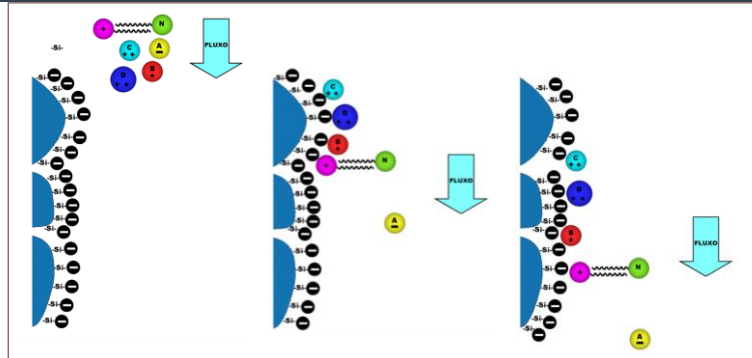
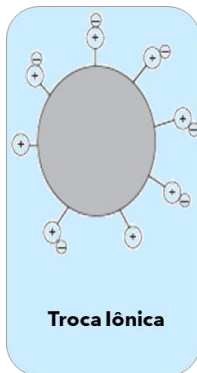


34



- 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⁻
CIEC: Ba²⁺ > NH₄⁺ > H⁺
- 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

CCCC1=CC=C(C=C1)S(=O)(=O)[O-]

\longleftrightarrow

CCN([NH3+])CC1=CC=C(C=C1)

(a) benzenesulfonic acid-modified silica sorbent

Troca Aniônica SAX

Silica

CCCC[N+](C)(C)C

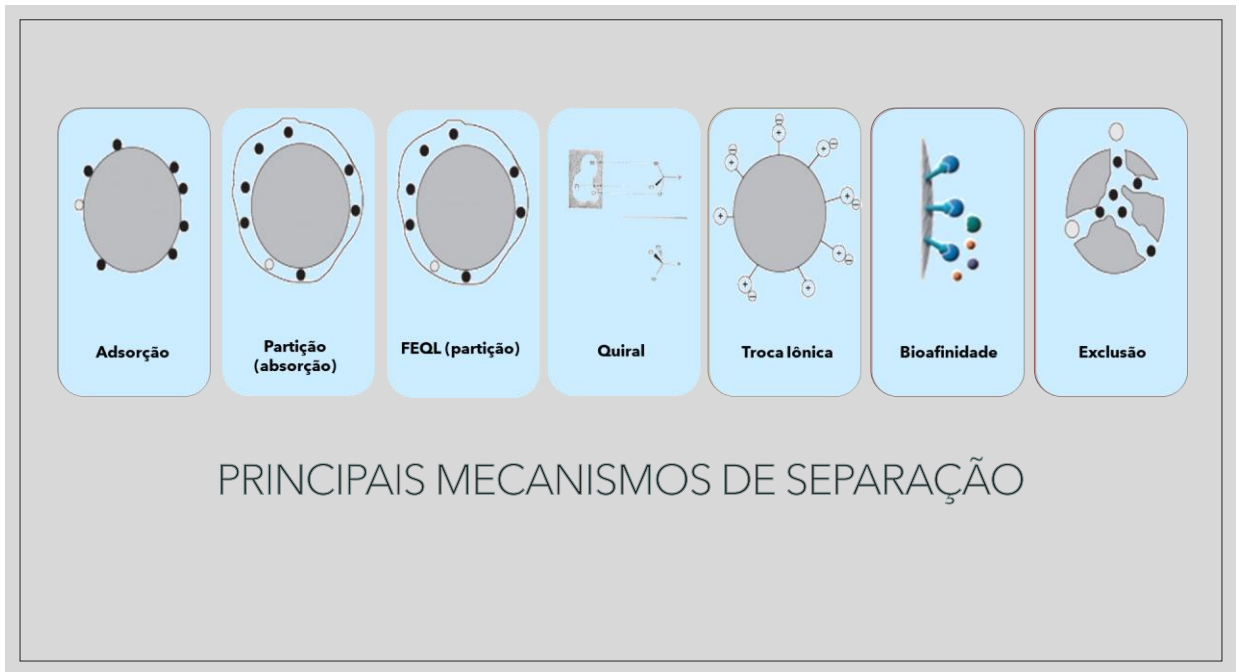
\longleftrightarrow

CCCC(=O)[O-]C1=CC=C(C=C1)

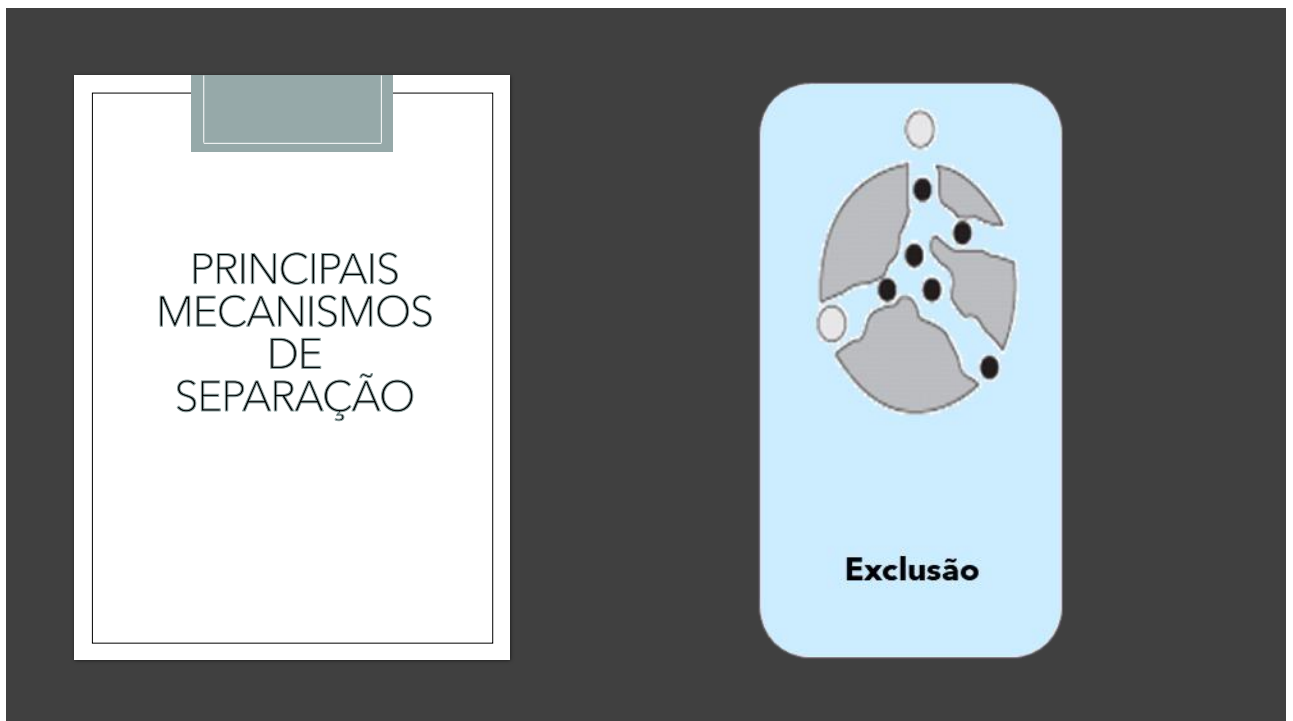
(b) trimethylaminopropyl-modified silica sorbent

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

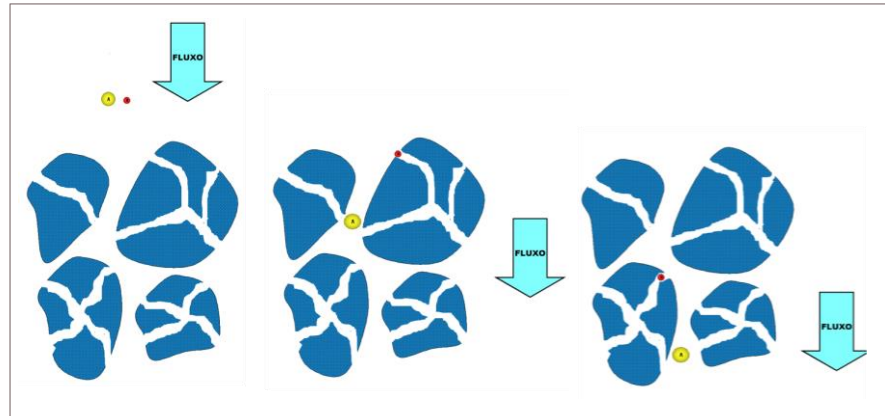
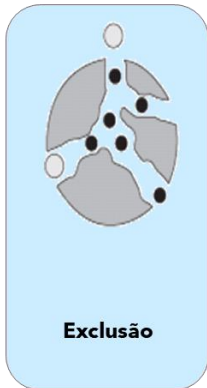
38



39

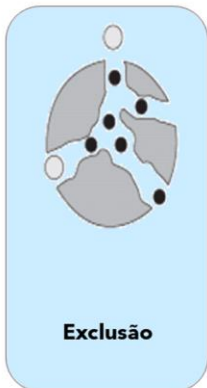


40



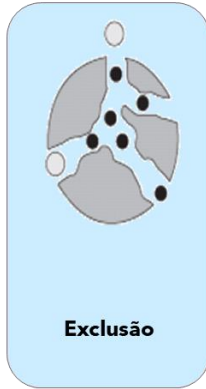
- ✓ Mecanismo de separação baseado na interação física (mecânica) de moléculas de diferentes tamanhos por entre os poros da F.E.
- ✓ As opções de F.E. consistem em partículas pequenas (~10 µm) de sílica ou polímeros contendo uma rede de poros uniformes dentro dos quais as moléculas do soluto e do solvente 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

