

MÓDULO 03

Análise Química I:
Físico-Química

CROMATOGRAFIA
AULA 3:
Planar Clássica

Prof. Dr. Jonas A. R. Paschoal



1



COLUNA



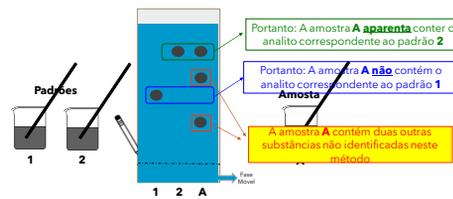
PLANAR

Cromatografia

- FASE ESTACIONÁRIA

Tipos de configuração: Coluna e Planar

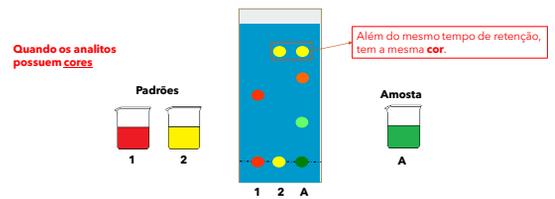
2



Cromatografia PLANAR

- ANÁLISE QUALITATIVA
- ✓ Identificação

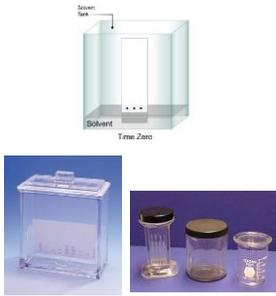
3



Cromatografia PLANAR

- ANÁLISE QUALITATIVA
- ✓ Identificação

4



5

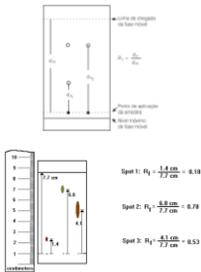
CROMATOGRAFIA PLANAR

- **Câmara ou cuba cromatográfica:** recipiente de vidro com tampa fechada hermeticamente, não deixando escapar vapores da FM e onde se coloca a placa cromatográfica.

CROMATOGRAFIA PLANAR

- **Frente da FM:** linha de chegada da FM, visível quando se retira a placa (CP ou CCD) da cuba cromatográfica.
- **Distância percorrida:** distância percorrida pela FM, desde o ponto de partida, até a linha de chegada ou a de um soluto (analito, padrão).

6



7

CROMATOGRAFIA PLANAR

Fator de Retenção ou de Retardamento (R_f): corresponde à razão entre a distância percorrida pelo soluto (centro de maior concentração da mancha, d_2) e pela FM desde o ponto de partida (aplicação da amostra) até a frente da FM (d_1).

R_f oferece maior precisão (repetibilidade) ao método do que o d_r .

CROMATOGRAFIA PLANAR

- **MANCHAS ASSIMÉTRICAS:** para calcular o R_f a medida da d_r é baseada na posição do máximo de intensidade da mancha.

8

CROMATOGRAFIA PLANAR

$R_f = \frac{\text{distância da amostra (D1)}}{\text{distância da frente do solvente (D2)}}$

$0 \leq R_f \leq 1$

$R_f A = dA/dS$ e $R_f B = dB/dS$ $0 \leq R_f \leq 1$

CROMATOGRAFIA PLANAR

Seletividade (α_p): é um parâmetro que indica a qualidade de uma separação em se distinguir duas manchas adjacentes, sendo representado pela razão entre os fatores de retardamento (R_f) dessas manchas.

$$\alpha_p = R_{f2} / R_{f1}$$

9

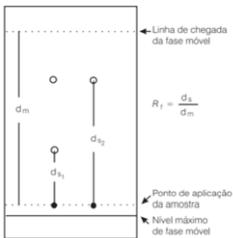
CROMATOGRAFIA PLANAR

Resolução (R_s): trata-se de outra medida de separação de dois componentes consecutivos; é a distância mínima em que se encontram duas manchas sendo possível distingui-las individualmente.

$$R_s = 2 \times (d_2 - d_1) / (w_2 + w_1)$$

*Onde: w_x é a largura longitudinal da mancha

10



CROMATOGRAFIA PLANAR

Eficiência (N): trata-se de uma medida de capacidade da condição cromatográfica em promover uma boa separação. É medida em termos de pratos gerados, sendo um prato equivalente a uma etapa de equilíbrio entre as duas fases (FM e FE).

$$N = 16 \times (d_s^2 / w_s^2)$$

*Onde: w_s é a largura longitudinal da mancha

11

CROMATOGRAFIA PLANAR

APLICAÇÃO DA AMOSTRA

10 cm

2 cm

2 cm

2 cm

2 cm

2 cm

12

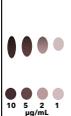
CROMATOGRAFIA PLANAR

- APLICAÇÃO DA AMOSTRA

SELEÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA

Aplicação de volume pré-determinado (1 µL) de soluções padrão, preparadas em diferentes concentrações, visando determinar a **concentração mínima detectável**.

Substância I



10 5 2 1
µg/mL

Substância II



10 5 2 1
µg/mL

1 µL de cada solução

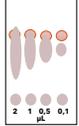
13

CROMATOGRAFIA PLANAR

- APLICAÇÃO DA AMOSTRA

SELEÇÃO DO VOLUME DE AMOSTRA

Aplicação de padrão para determinação do **volume de amostra ideal** para as análises.



Volumes de aplicação: 2 1 0,5 0,1 µL

*As aplicações das amostras nesse teste são feitas em ordem sequencial de 1 µL por vez para evitar que a mancha se espalhe na aplicação.

14

Cromatografia Planar

15

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

*Constitui-se em uma das técnicas mais simples e requer menos instrumentos para a realização.

*No seu princípio baseia-se (baseia-se) em uma técnica de partição por fase normal (utiliza-se) para a separação de compostos orgânicos em fase móvel e fase estacionária (fase estacionária líquida) (fase estacionária sólida).

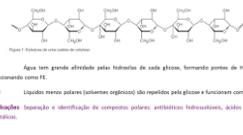
Aplicação: separação e identificação de compostos orgânicos em fase móvel e fase estacionária.

Princípio: separação e identificação de compostos orgânicos em fase móvel e fase estacionária.

Características: simples e rápida; não requer grandes investimentos; pode ser realizada em qualquer laboratório; não requer grandes quantidades de amostra; não requer grandes quantidades de reagentes.

Limitações: não permite a separação de compostos orgânicos com estruturas muito semelhantes; não permite a separação de compostos orgânicos com estruturas muito semelhantes; não permite a separação de compostos orgânicos com estruturas muito semelhantes.

Exemplo: separação e identificação de compostos orgânicos em fase móvel e fase estacionária.

Diagrama: 

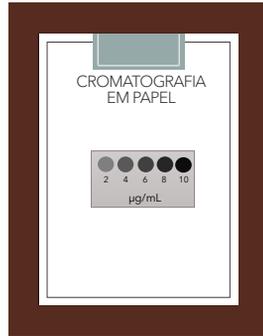
CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Indicação de vídeo complementar de CP:
<https://www.youtube.com/watch?v=ASHaCoswGtQ>

16

ANÁLISE QUANTITATIVA

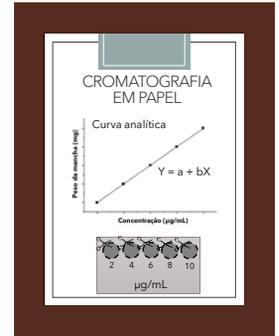
- **Diretamente no papel:**
- ✓ Comparação da intensidade da mancha cromatográfica com padrões preparados em diferentes concentrações
- ✓ Análise densiométrica: determina a intensidade da mancha com um densiômetro



17

ANÁLISE QUANTITATIVA

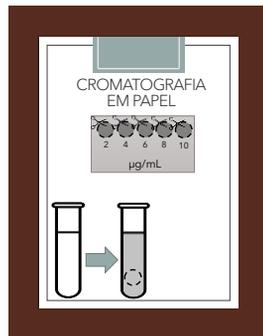
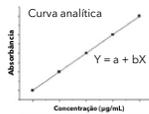
- **Diretamente no papel:**
- ✓ Comparação da intensidade da mancha cromatográfica com padrões preparados em diferentes concentrações
- ✓ Análise densiométrica: determina a intensidade da mancha com um densiômetro
- ✓ Área da mancha: cortar a área da mancha e pesar. Então, constrói-se um gráfico que correlacione a quantidade do analito com o peso da mancha, a partir do qual se pode obter uma curva analítica.



18

ANÁLISE QUANTITATIVA

- **Extraindo a(s) substância(s) do papel:**
- ✓ Extrai a mancha cromatográfica do papel e faz a leitura da absorbância em espectrofotômetro UV-Vis, por exemplo. Neste caso, constrói-se um gráfico relacionando a concentração do analito com a intensidade de absorbância UV-Vis, a partir do qual se pode obter uma curva analítica.



19

Cromatografia Planar

20



A cromatografia em camada delgada é outra forma de cromatografia onde o material adsorvente fica sobre um vidro, alumínio ou filme plástico.

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

- ♦ A Fase Estacionária constitui uma *camada delgada* retida em uma superfície plana (suporte).
- ♦ O processo de separação está fundamentado, *principalmente*, no fenômeno de **ADSORÇÃO**. Porém, a partir de FE tratadas, pode ocorrer por **PARTIÇÃO** ou **TROCA IÔNICA** → **VERSATILIDADE**: separação tanto de substâncias hidrofóbicas como hidrofílicas
- ♦ **Vantagens**: fácil compreensão e execução, separações em breve espaço de tempo, versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo.

Indicação de vídeo complementar de CCD:
<https://www.youtube.com/watch?v=t66p7vZbVOU>

21

TÉCNICA GERAL DA CCD

ATIVÇÃO DAS PLACAS: Em algumas separações, deve-se ativar as placas, para se retirar substancias aderidas ao adsorvente.

A ativação é um aquecimento e varia para cada adsorvente.

- ✓ **Silica, alumina e terra diatomácea:** 105 – 110°C por 30 a 60 min

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

22

*Em caso de Mecanismo de **ADSORÇÃO**
ATIVÇÃO DAS PLACAS

Retirar a água da superfície do adsorvente → aquecimento

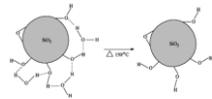


Figura 2. Esquema da remoção da água de hidratação da sílica pelo tratamento térmico, desobstruindo os grupos silanóis

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

23

Cromatografia em Camada Delgada

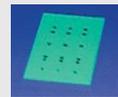
TÉCNICA GERAL DA CCD

REVELAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

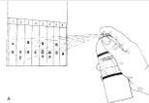
- **Utilizando-se lâmpada UV (254 e 365 nm):** Visualiza substâncias fluorescentes (método direto) ou utilizando placa com indicador fluorescente (método indireto).



Método direto



Método indireto



- **Utilizando-se câmara de iodo:** Iodo reage com muitos compostos orgânicos, formando complexos, e levando a manchas amarelas até marrons.

24

Cromatografia em Camada Delgada

TÉCNICA GERAL DA CCD
REVELAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

➤ **Métodos específicos para detecção de grupos funcionais (métodos destrutivos):**

- (i) ácido sulfúrico concentrado e aquecimento (manchas pretas);
- (ii) nitrato de prata para visualizar haletos de alquila (manchas escuras de prata da decomposição dos compostos de prata formados);
- (iii) formação de 2,4-dinitrofenil hidrazonas a partir de compostos carbonílicos (coloração amarela ou alaranjada);
- (iv) cloreto férrico (FeCl₃) leva a complexos coloridos com fenóis;
- (v) ácidos podem ser visualizados com indicadores de pH como verde de bromocresol;
- (vi) compostos facilmente oxidados podem ser visualizados com oxidantes coloridos como CrO₃ ou KMnO₄;
- (vii) detecção de aminas com p-dimetilamino-benzaldeído e de aminoácidos com ninidrina.

25

ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

ANÁLISE QUANTITATIVA: Retira-se da cromatoplaça a área que contenha a substância desejada que é extraída e quantificada. Frequentemente utiliza-se a densimetria, medidas de fluorescência e radioatividade.

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

26

COMPARAÇÃO ENTRE CP E CCD

CP	CCD
<p>✓ Vantagens:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ técnica simples ○ não requer instrumentação sofisticada ○ baixo custo <p>✓ Limitações:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ uso limitado ○ alargamento de banda-difusão ○ pouca alternativa de reveladores 	<p>✓ Vantagens:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ maior sensibilidade ○ mais rápido ○ > repetibilidade ○ < difusão ○ > faixa de aplicação ○ reveladores reativos ○ permite aquecimento <p>✓ Limitações:</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ degradação de compostos lábeis devido à grande superfície de exposição ○ dificuldades na quantificação

27

DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

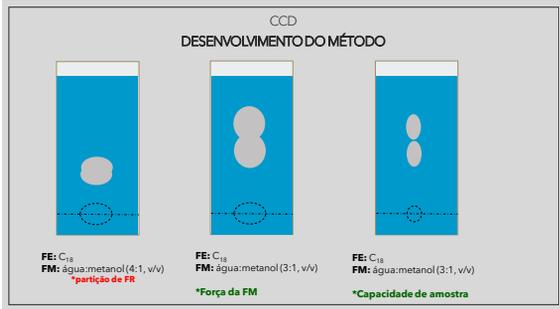
FE: C₁₈
FM: água:metanol (4:1, v/v)
***partição de FE**

FE: C₁₈
FM: água:metanol (3:1, v/v)
***Força da FM**

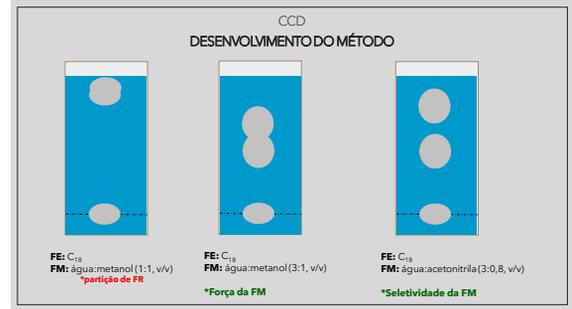
FE: C₁₈
FM: água:acetoneitrila (3:0,8, v/v)
***Seletividade da FM**

Solvente	Fase Estacionária*	Fator Peso de Força
Metanol	3,6	$P_{12} \times F_{12} = P_A \times F_A$ $1 \times 2,6 = P_A \times 3,2$ $P_A = 0,8$
Acetonitrila	3,2	
Tetrahidrofano	4,5	
Água	0	
Clorofórmio	0	
Oxocromatano		
Eter metil e butílico		
Eter etílico		
Hexano		

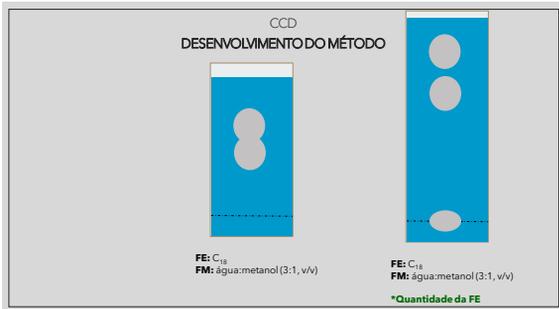
28



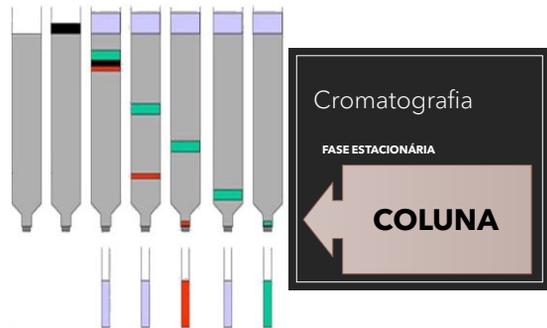
29



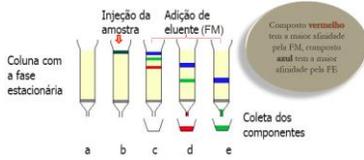
30



31



32



CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA

33

CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA

Tempo 1

Tempo 2

Tempo 3

mixture of a+b

34

CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA

A Fração Amarela desperta interesse de identificação

35

CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA

Associação CCC e CCD (ou CP)

PLANAR

36

Associação CCC e CCD (ou CP)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA

PLANAR

A Fração amarela constitui-se numa mistura de compostos (A e B)

37

Características da Cromatografia em Coluna Clássica (CCC)

*Também é conhecida como Cromatografia em Coluna Aberta

- Conhecida como a configuração mais antiga de cromatografia;
- Permite a aplicação de uma maior volume (quantidade) de amostra do que a Planar;
- É considerada mais vantajosa em aplicações preparativas, justamente devido às características citada logo acima.
- Não requer o uso de equipamento mais sofisticados, como por exemplo, HPLC ou UPLC (*assunto das próximas aulas*);
- Muito empregada na purificação de produtos de reações químicas
- Muito empregada para o isolamento e/ou purificação de produtos naturais

38

FRAÇÕES	COMPOSIÇÃO
1	-
2	-
3	A (vermelho)
4	-
5	B (verde)

39

Amostra contendo 3 analitos: A, B e C

FE: Sílica
FM: ac. etilhexano (1:4, v/v)
*adsorção

FE: Sílica
FM: ac. etilhexano (1:2, v/v)
*adsorção

FE: Sílica
FM: ac. etilhexano (1:1, v/v)
*adsorção

Menos polar ↑

FRAÇÕES	COMPOSIÇÃO	FRAÇÕES	COMPOSIÇÃO	FRAÇÕES	COMPOSIÇÃO
1	-	1	-	1	A
2	-	2	A	2	-
3	-	3	-	3	B
4	-	4	B	4	-
5	-	5	-	5	-
6	A	6	-	6	C
7	A	7	B	7	C
8	A+B	8	-	8	-
9	A+B	9	C	9	-

n-Hexano
 Ciclohexano
 i-Propiléter
 Tolueno
 Benzeno
 Éter dietílico
 Clorofórmio
 Cloreto de metileno
 1,2-Dicloroetano
 Acetona
 Acetato de etila
 Nitrometano
 Acetonitrila
 n-Propanol
 Etanol
 Metanol
 Ácido acético
 Água
 Sais, tampões, uréia

40

COMPARAÇÃO ENTRE PLANAR (CP ou CCD) e CCC

PLANAR (CP ou CCD)

- ✓ **Vantagens:**
 - técnica simples e mais rápida
 - Baixo custo (CP)
 - Escolha preferencial para seleção e otimização de FE e FM
 - Fins analíticos (quali e quanti)
- ✓ **Limitações:**
 - Menor quantidade de amostra (limitante para fins preparativos)

COLUNA (CCC)

- ✓ **Vantagens:**
 - técnica simples, mas geralmente é mais demorada
 - Baixo custo
 - Escolha preferencial para fins preparativos
 - Maior quantidade de amostra
- ✓ **Limitações:**
 - Menor sensibilidade/detectabilidade