

MÓDULO CGF2036

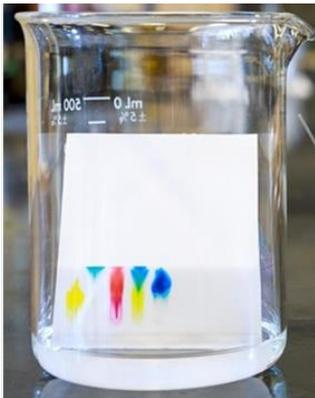
Análise Química I:
Físico-Química

CROMATOGRAFIA
AULA 3:
Planar e Clássica

Prof. Dr. Jonas A. R. Paschoal



1



COLUNA



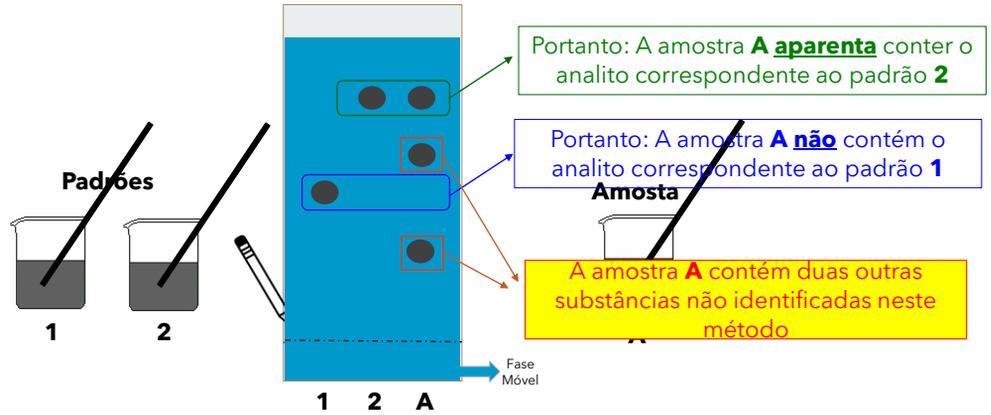
PLANAR

Cromatografia

◦ **FASE ESTACIONÁRIA**

Tipos de configuração: Coluna e Planar

2

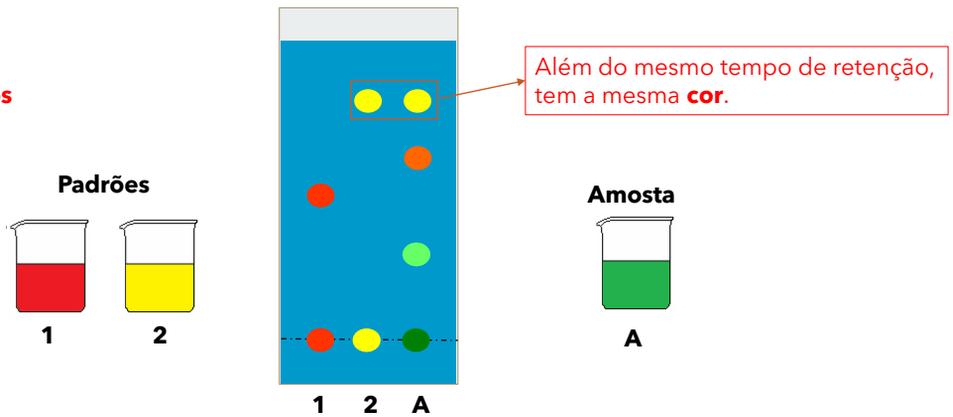


Cromatografia PLANAR

◦ ANÁLISE QUALITATIVA
✓ Identificação

3

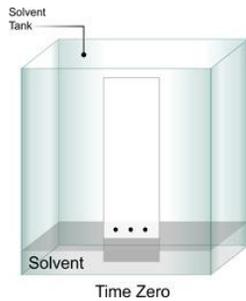
Quando os analitos possuem cores



Cromatografia PLANAR

◦ ANÁLISE QUALITATIVA
✓ Identificação

4

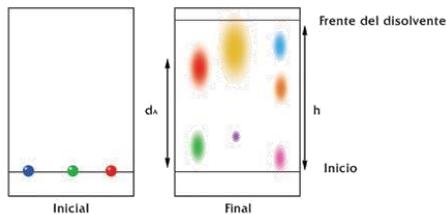


CROMATOGRAFIA PLANAR

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

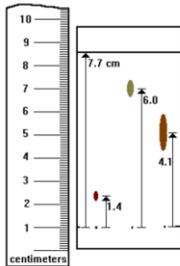
5

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



Spot 1: $R_f = \frac{1.4 \text{ cm}}{7.7 \text{ cm}} = 0.18$

Spot 2: $R_f = \frac{6.0 \text{ cm}}{7.7 \text{ cm}} = 0.78$

Spot 3: $R_f = \frac{4.1 \text{ cm}}{7.7 \text{ cm}} = 0.53$

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_s) e pela FM desde o ponto de partida (aplicação da amostra) até a frente da FM (d_m).

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

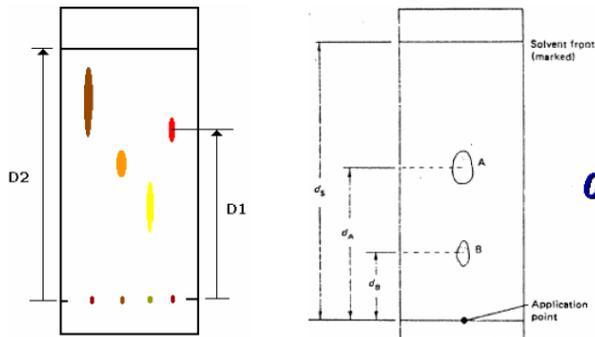
7

CROMATOGRAFIA PLANAR

MANCHAS

ASSIMÉTRICAS: para calcular o R_f a medida da dR é baseada na posição do máximo de intensidade da mancha.

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



$$0 \leq R_f \leq 1$$

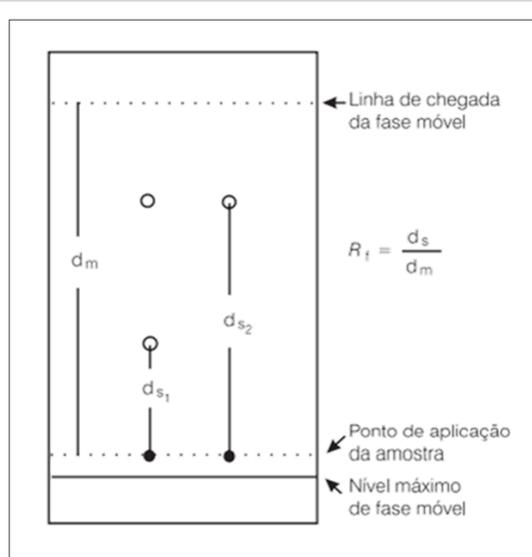
$$R_f A = dA/dS \text{ e } R_f B = dB/dS \quad 0 \leq R_f \leq 1$$

8

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.

$$\alpha_p = R_{f_2} / R_{f_1}$$



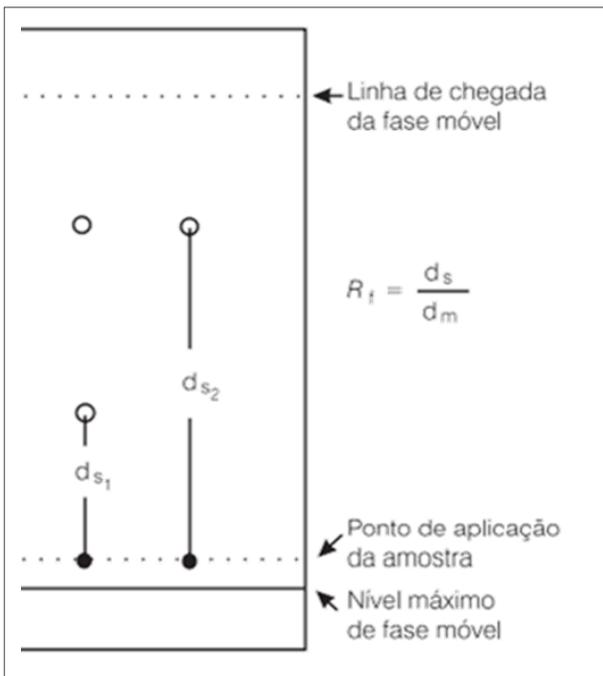
9

CROMATOGRAFIA PLANAR

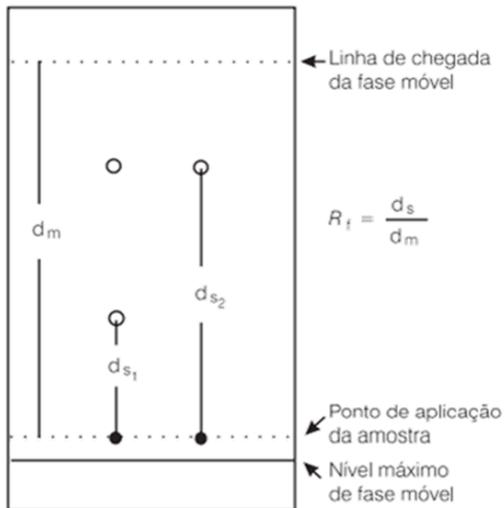
- **Resolução (R_s):** trata-se de outra medida de separação de dois componentes consecutivos; é a distância mínima em que se encontram duas manchas sendo possível distinguí-las individualmente.

$$R_s = 2 \times (d_{s_2} - d_{s_1}) / (w_{s_2} + w_{s_1})$$

*Onde: w_s 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).

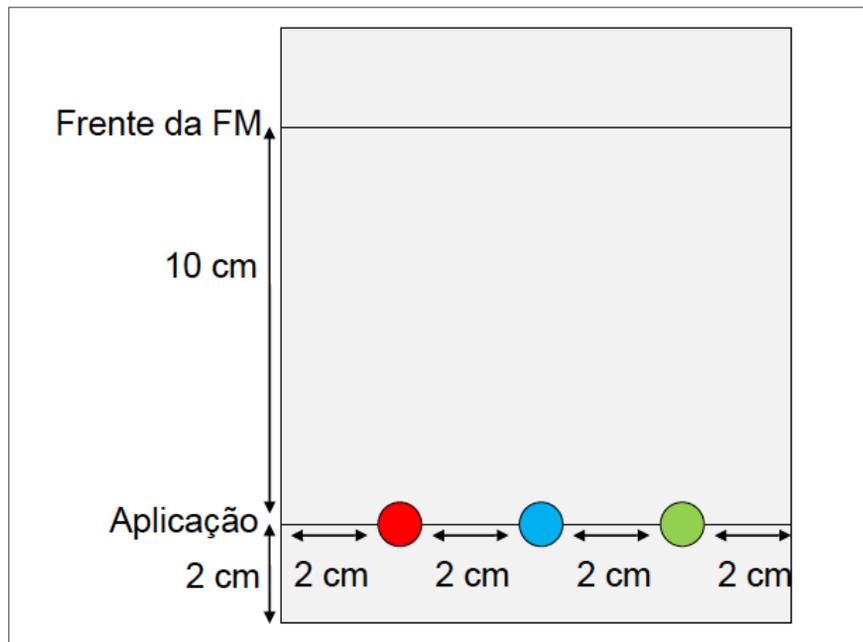
$$N = 16 \times (d_s^2 / w_s^2)$$

*Onde: w_s é a largura longitudinal da mancha

11

CROMATOGRAFIA PLANAR

- APLICAÇÃO DA AMOSTRA



12

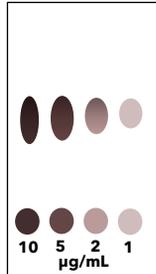
CROMATOGRAFIA PLANAR

◦ APLICAÇÃO DA AMOSTRA

SELEÇÃO DA **CONCENTRAÇÃO** DA AMOSTRA

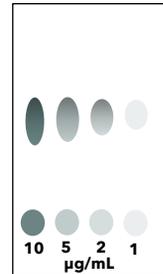
Aplicação de volume pré-determinado (1 μL) de soluções padrão, preparadas em diferentes concentrações, visando determinar a **concentração mínima detectável**.

Substância I



1 μL de cada solução

Substância II



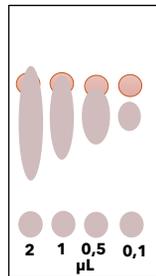
13

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

*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

Cromatografia em Papel

Cromatografia em Camada Delgada

15

- ✓ Constitui-se em uma das técnicas mais simples e requer menos instrumentos para a realização.
- ✓ Na sua aplicação **mais comum** trata-se de uma técnica de **partição por fase normal**, pois utiliza tanto a fase móvel como a fase estacionária em estados físicos líquidos (líquido-líquido)

- o **PARTIÇÃO**: a separação de uma mistura na CP ocorre devido as diferentes solubilidades relativas destes componentes na FM e FE.

- ✓ Celulose é constituída por 2.000 ou mais unidades de glicose anidra ligadas por átomos de oxigênio.

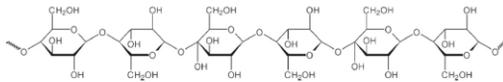


Figura 1: Estrutura de uma cadeia de celulose.

FE Água tem grande afinidade pelas hidroxilas de cada glicose, formando pontes de H, e ficam retidas funcionando como FE.

FM Líquidos menos polares (solventes orgânicos) são repelidos pela glicose e funcionam como a FM.

Aplicações: Separação e identificação de compostos polares: antibióticos hidrossolúveis, ácidos orgânicos e íons metálicos.

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Indicação de vídeo complementar de CP:

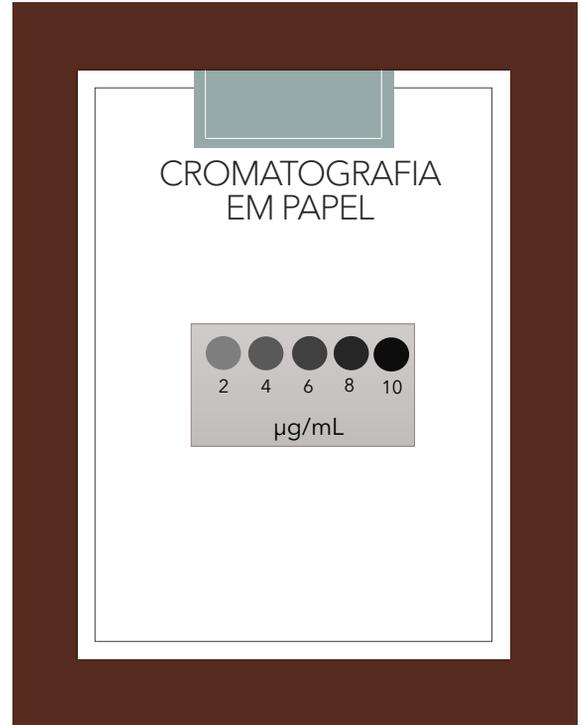
<https://www.youtube.com/watch?v=ASHaCoswGtQ>

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

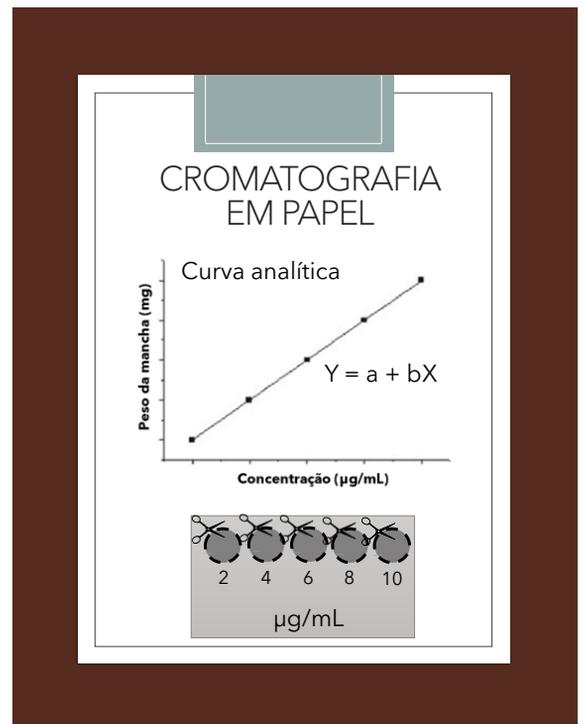


17

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.

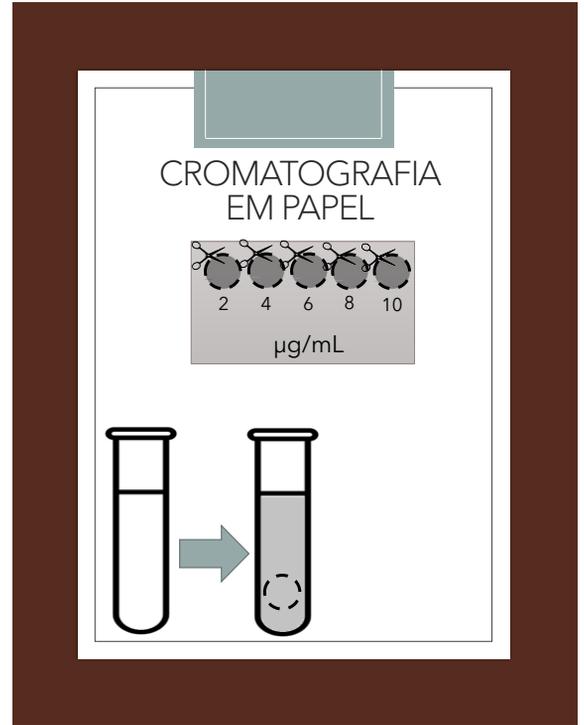
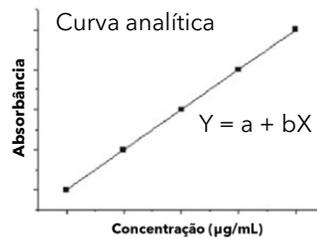


18

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

Cromatografia em Papel

Cromatografia em Camada Delgada

20

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

- ❖ 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.

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Indicação de vídeo complementar de CCD:

<https://www.youtube.com/watch?v=t66p7vZbVOU>

21

TÉCNICA GERAL DA CCD

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

A ativação é um aquecimento e varia para cada adsorvente.

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

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

22

*Em caso de Mecanismo de ADSORÇÃO

ATIVAÇÃO DAS PLACAS

Retirar a água da superfície do adsorvente → aquecimento

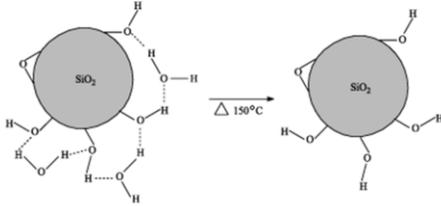


Figura 2. Esquema da remoção da água de hidratação da sílica pelo tratamento térmico, desobstruindo os grupos silanóis

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

23

Cromatografia em Camada Delgada

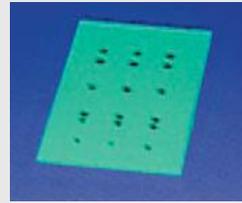
TÉCNICA GERAL DA CCD

REVELAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS

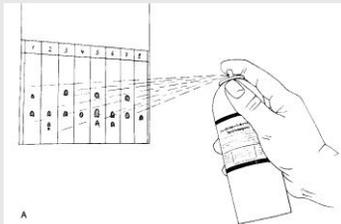
- **Utilizando-se lâmpada UV (254 e 365 nm):** Visualiza substâncias fluorescentes (método direto) ou utilizando placa com indicador fluorescente (método indireto).



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 (FeCl_2) 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 CrO_3 ou KMnO_4 ;
- (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

✓ Vantagens:

- técnica simples
- não requer instrumentação sofisticada
- baixo custo

✓ Limitações:

- uso limitado
- alargamento de banda-difusão-
- pouca alternativa de reveladores

CCD

✓ Vantagens:

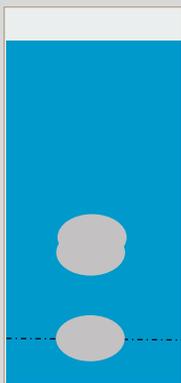
- maior sensibilidade
- mais rápido
- > repetibilidade
- < difusão
- > faixa de aplicação
- reveladores reativos
- permite aquecimento

✓ Limitações

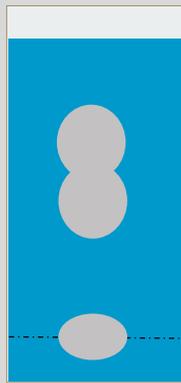
- degradação de compostos lábeis devido á grande superfície de exposição
- dificuldades na quantificação

27

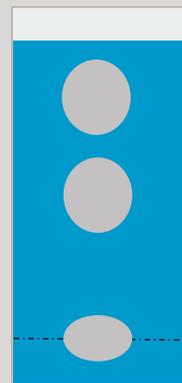
CCD DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO



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



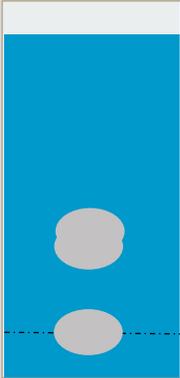
FE: C₁₈
FM: água:metanol (3:1, v/v)
***Força da FM**



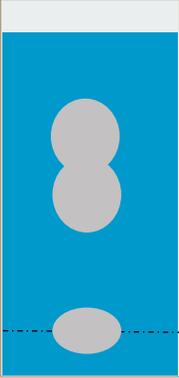
FE: C₁₈
FM: água:acetonitrila (3:0,8, v/v)
***Seletividade da FM**

28

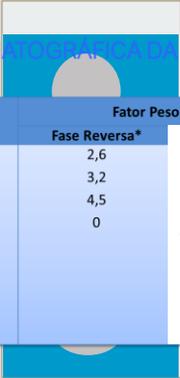
CCD
DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO



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



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

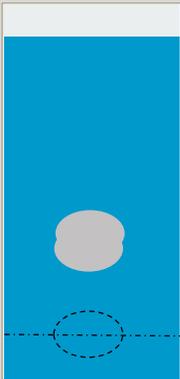


FE: C₁₈
FM: água:acetonitrila (3:0,8, v/v)
***Seletividade da FM**

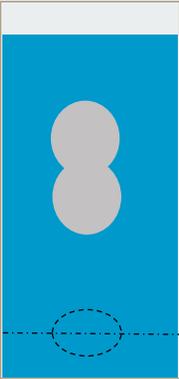
Solvente	Fator Peso de Força	
	Fase Reversa*	
Metanol	2,6	$P_M \times F_M = P_A \times F_A$ $1 \times 2,6 = P_A \times 3,2$ $P_A = 0,8$
Acetonitrila	3,2	
Tetraidrofurano	4,5	
Água	0	
Clorofórmio		
Diclorometano		
Éter metil t-butílico		
Éter etílico		
Hexano		

29

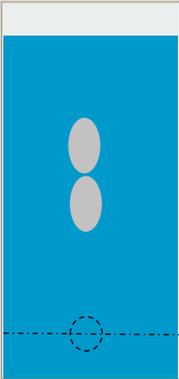
CCD
DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO



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

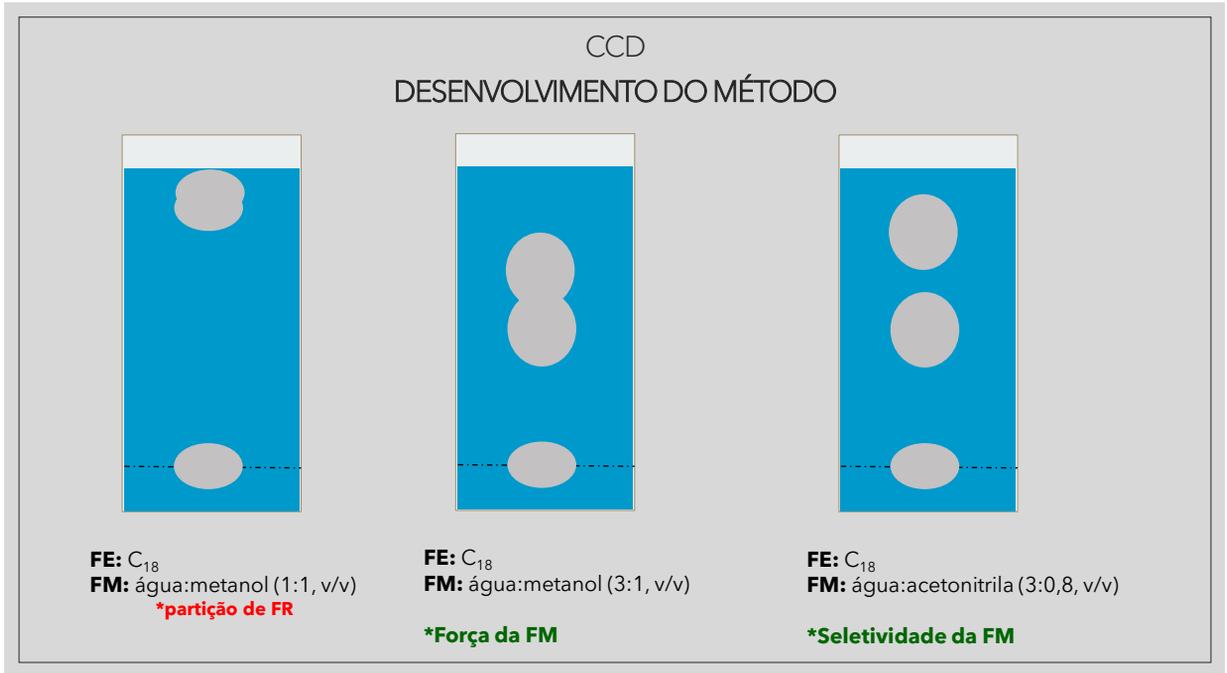


FE: C₁₈
FM: água:metanol (3:1, v/v)
***Força da FM**

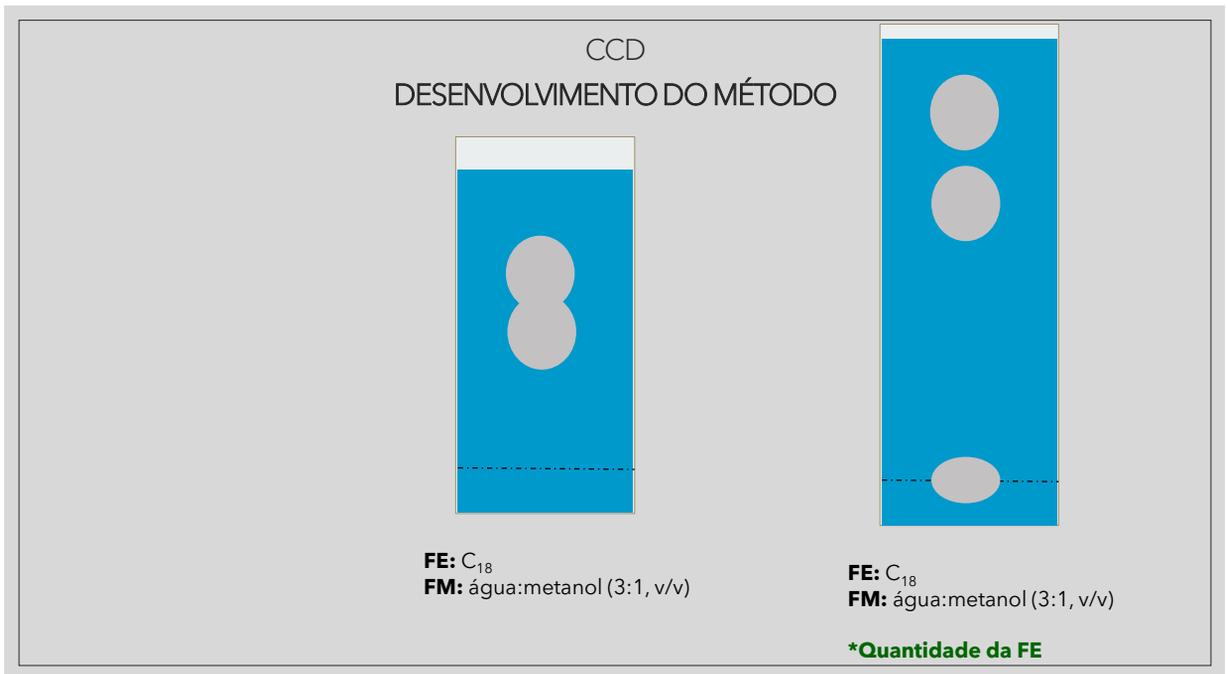


FE: C₁₈
FM: água:metanol (3:1, v/v)
***Capacidade de amostra**

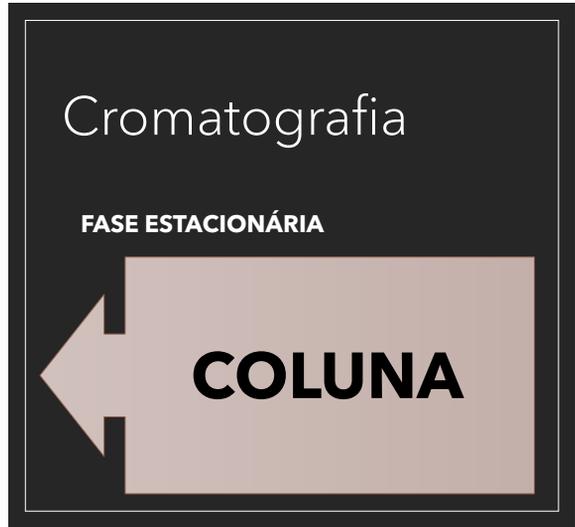
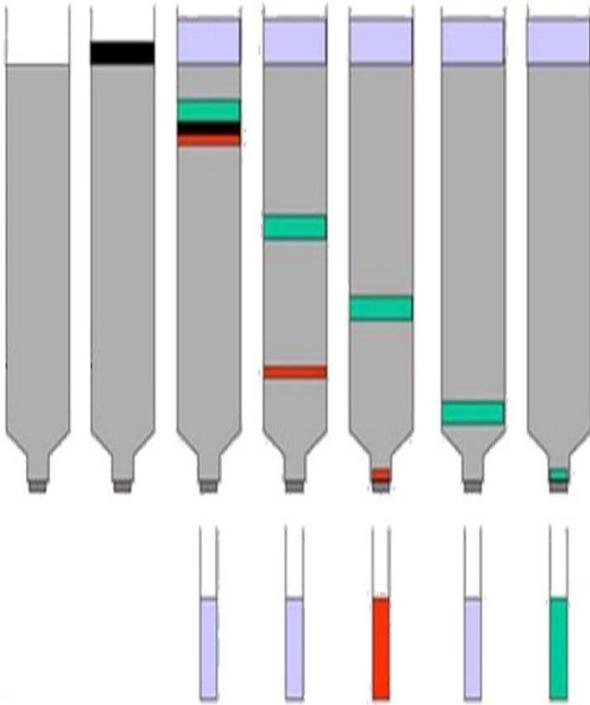
30



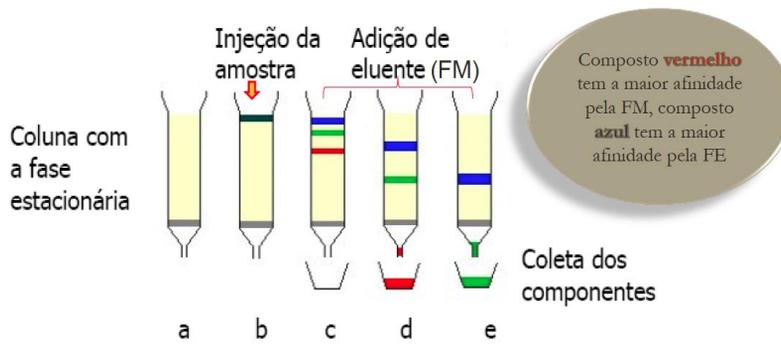
31



32



33



CROMATOLOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA

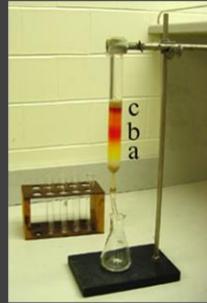
34

CROMATOGRAFIA
EM COLUNA
CLÁSSICA

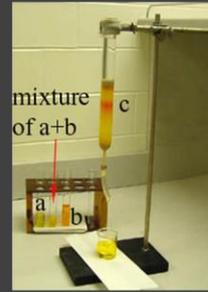
Tempo 1



Tempo 2



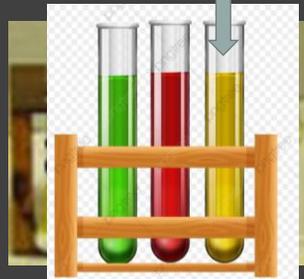
Tempo 3



35

CROMATOGRAFIA
EM COLUNA
CLÁSSICA

A Fração Amarela
desperta interesse de
identificação



36

CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA

Associação CCC e CCD (ou CP)

PLANAR

37

CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA

Associação CCC e CCD (ou CP)

PLANAR

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

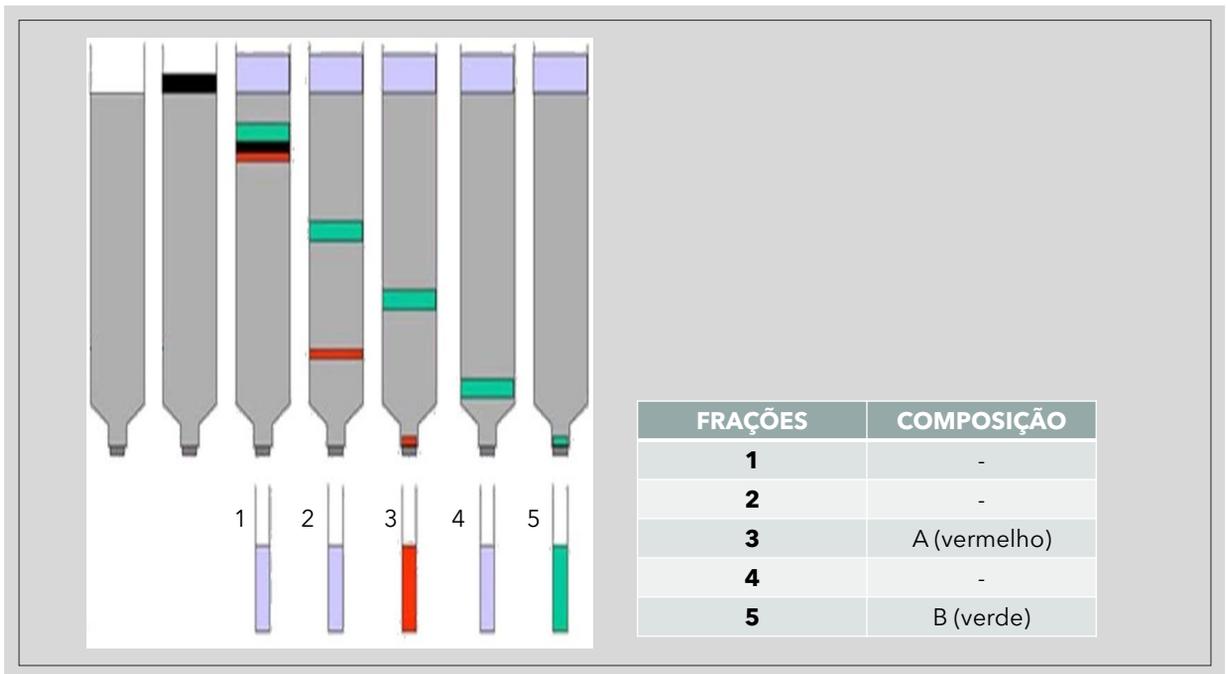
38

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 citadas 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

39



40

Amostra contendo 3 analitos: A, B e C

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

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

FE: Sílica
FM: ac. etila:hexano (1:3, v/v)
***adsorção**

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

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

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

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

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

41

Amostra contendo 3 analitos: A, B e C

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

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

FE: Sílica
FM: ac. etila:hexano (1:3, v/v)
***adsorção**



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

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

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

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

42

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