



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS– SANTA CATARINA

Introdução à Cromatografia

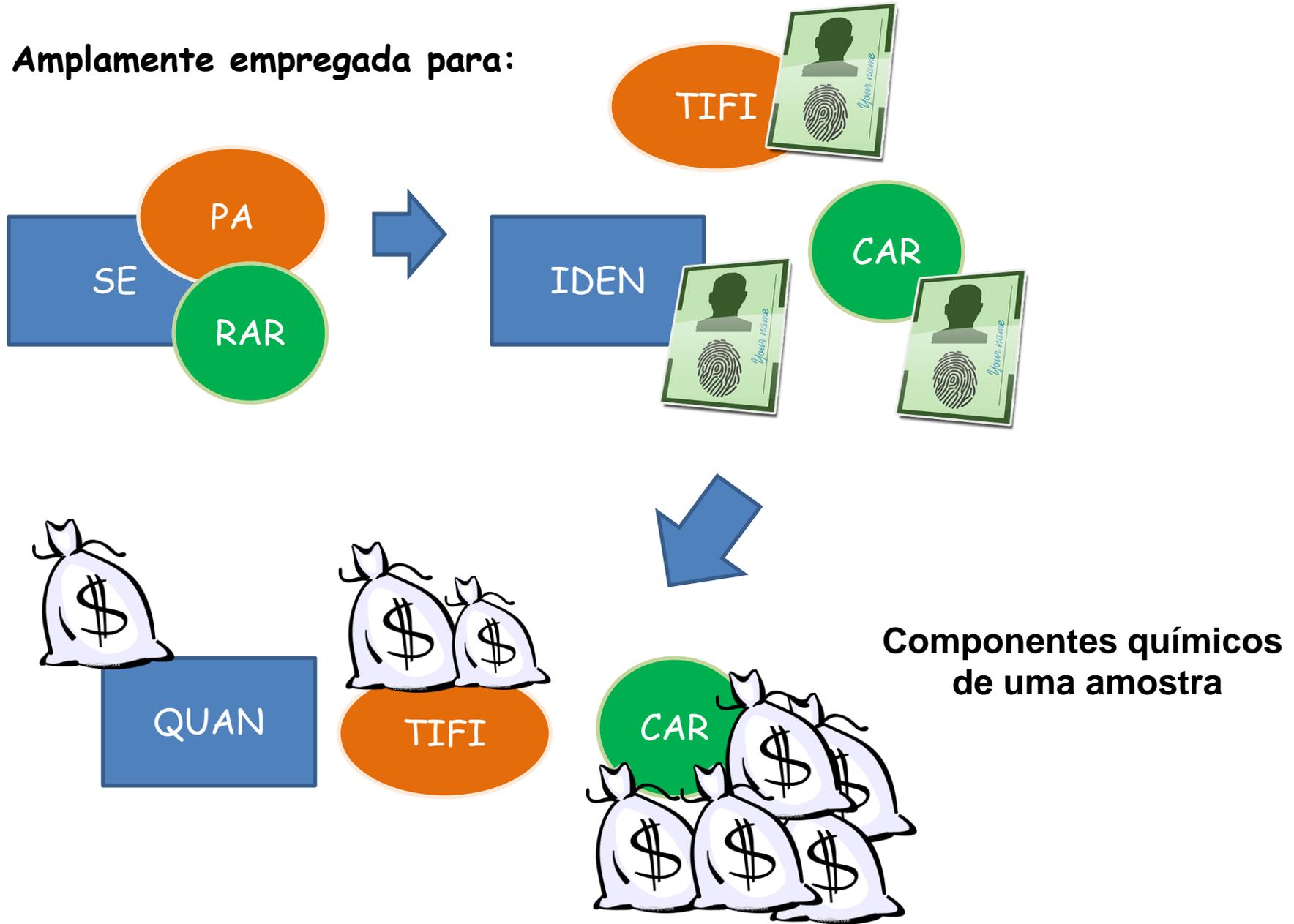
Prof. Marcel Piovezan

marcel.piovezan@ifsc.edu.br

UC: Análise Instrumental II

Aplicações da Cromatografia

Amplamente empregada para:



Definição da Técnica:

Baseada na **SEPARAÇÃO** de componentes de uma **MISTURA** pelas diferenças de Velocidades nas quais estes são **TRANSPORTADOS** através de uma **FASE FIXA "ESTACIONÁRIA"** por uma **FASE MÓVEL "Líquida ou Gasosa"**

Princípio Físico-Químico

- ▶ Fase estacionária (FE): sólido o líquido fixado a um sólido
- ▶ Fase móvel (FM) : fluído (líquido ou gás) que arrasta a amostra através da fase estacionária



Os diferentes componentes a mistura interagem de diferente maneiras com as duas fases estabelecendo uma partição entre ambas



Se estabelece um equilíbrio entre as moléculas adsorvidas e desorvidas

$$\alpha = \frac{[\text{moléculas adsorvidas}]}{[\text{mol. adsorvidas}] + [\text{mol. desorvidas}]}$$

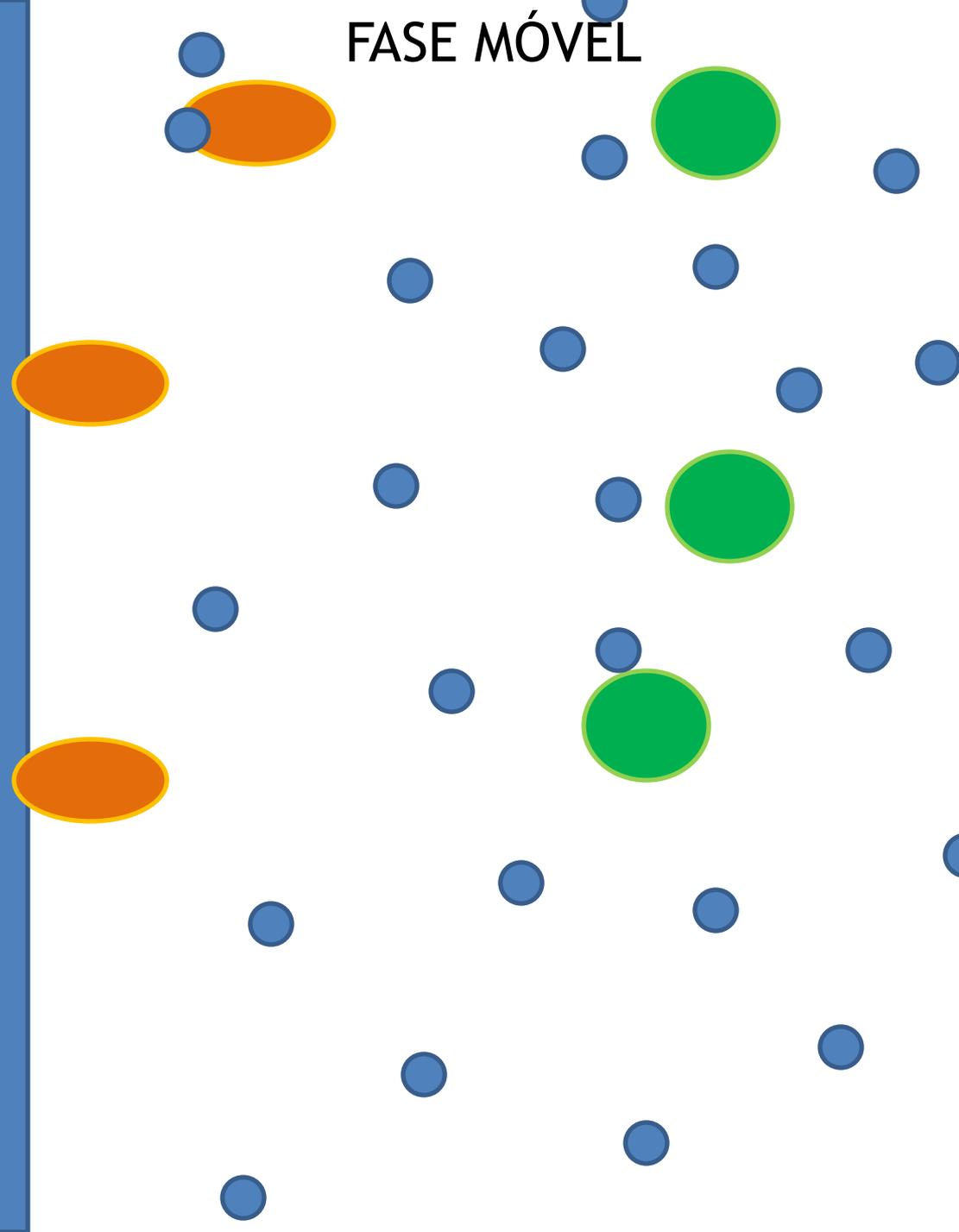


coeficiente de partição

FASE
ESTACIONÁRIA

FASE MÓVEL

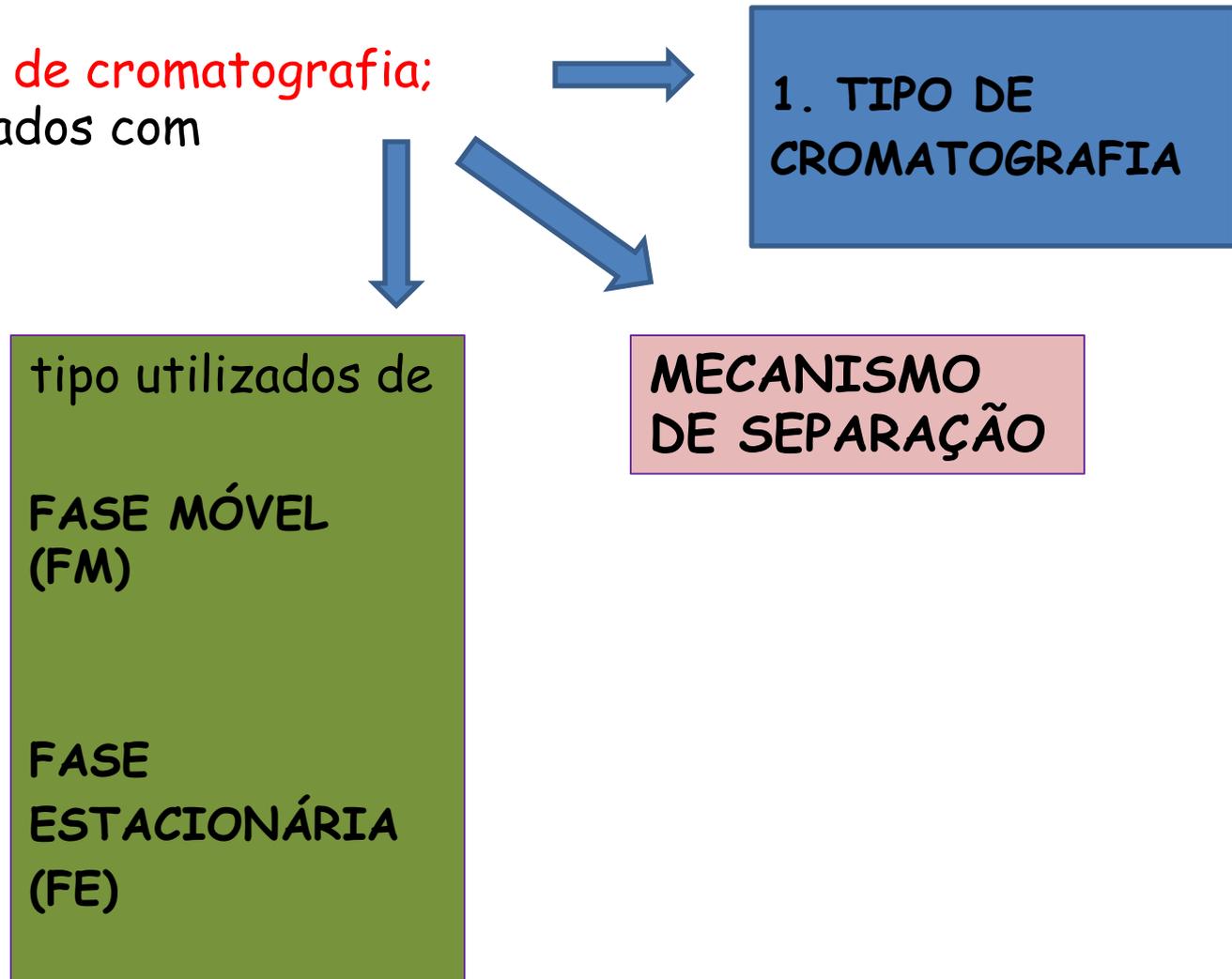
Componentes da mistura



CLASSIFICAÇÃO:

Vários critérios para a classificação das diferentes

modalidades de cromatografia;
são relacionados com



A forma física do sistema define a técnica:

1. TIPO DE CROMATOGRAFIA

a. Tubo Cilíndrico

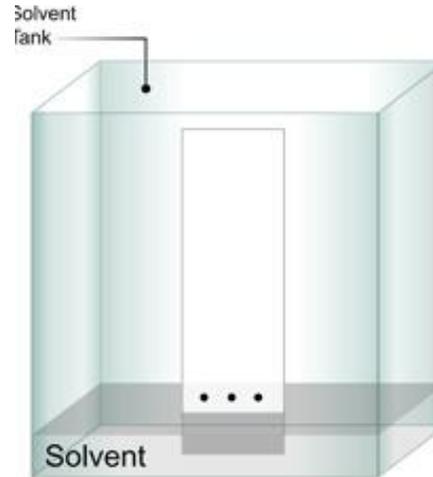
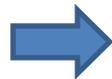


Cromatografia em COLUNA

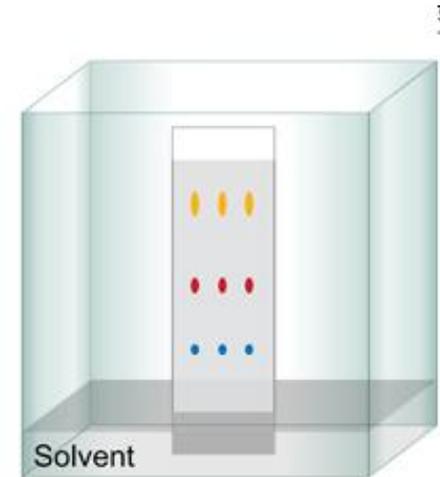


Líquida e Gasosa

b. Disposta sobre uma superfície planar



Time Zero



After Ten Minutes

Cromatografia PLANAR

Papel e Camada Delgada

Sub-divisão da Cromatografia Líquida:

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA EM COLUNA:

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



ALTA EFICIÊNCIA: colunas metálicas, ou capilares, sob pressão elevada



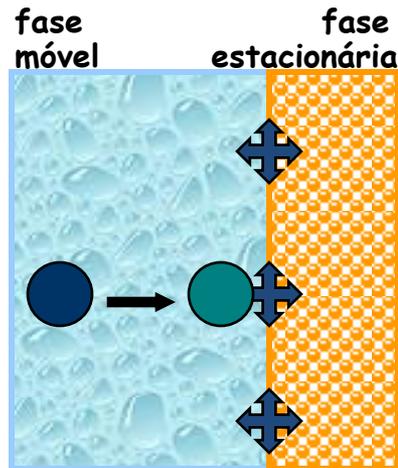
CROMATOGRAFIA:

MECANISMO DE SEPARAÇÃO

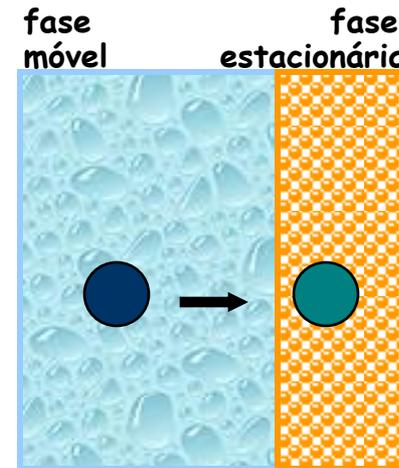
Físicos

Mecanismos de transferências de soluto entre FM e FE

ADSORÇÃO



PARTIÇÃO

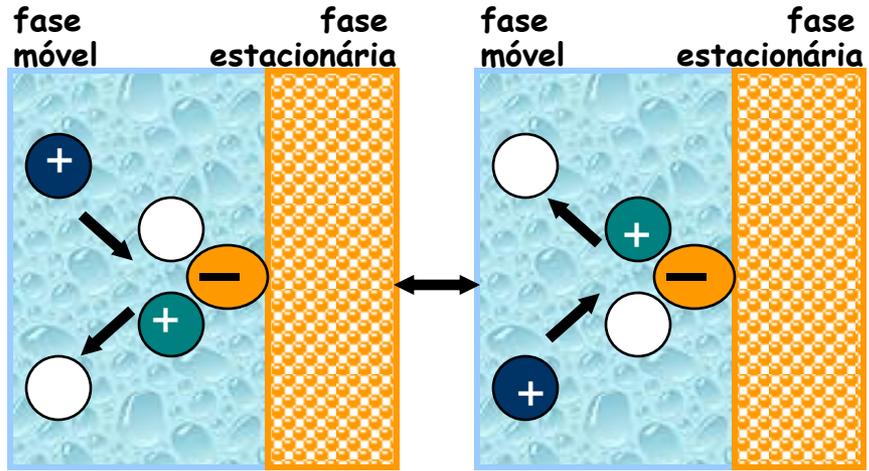


CROMATOGRAFIA:

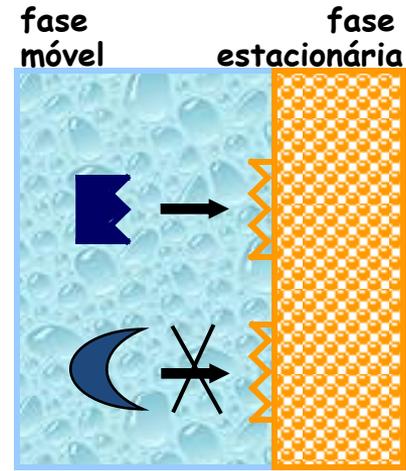
MECANISMO DE SEPARAÇÃO

químicos

TROCA IÔNICA



BIOAFINIDADE

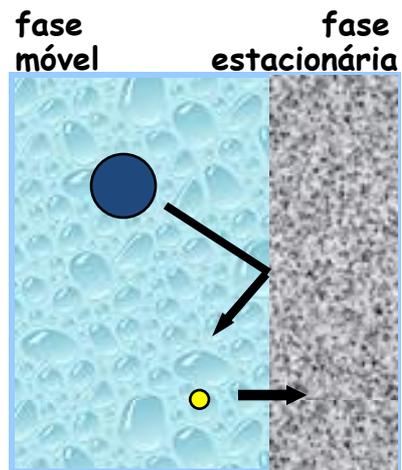


CROMATOGRAFIA:

MECANISMO
DE SEPARAÇÃO

mecânicos

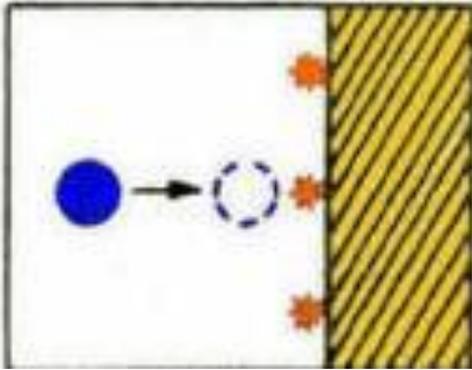
EXCLUSÃO



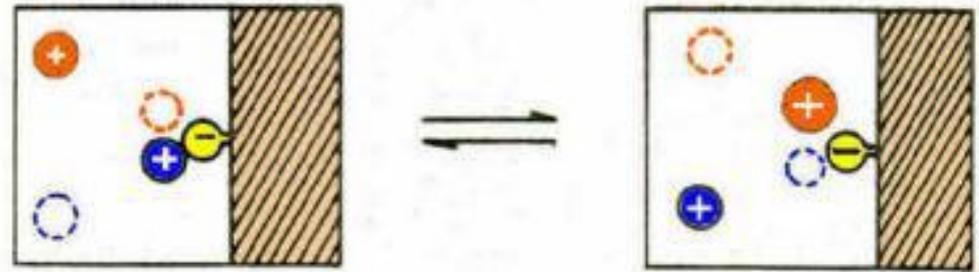
CROMATOGRAFIA:

MECANISMO DE SEPARAÇÃO

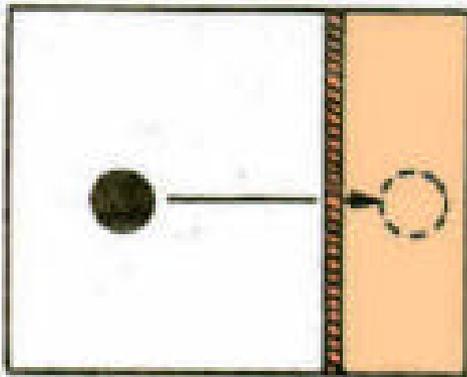
Mecanismos de transferências de soluto entre FM e FE



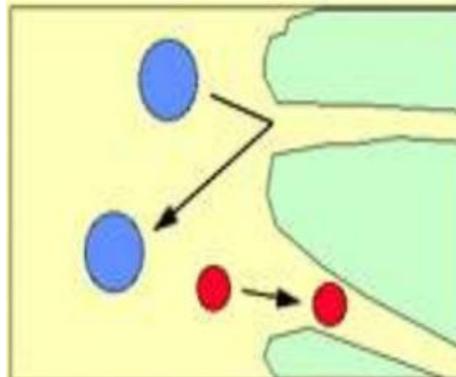
ADSORÇÃO



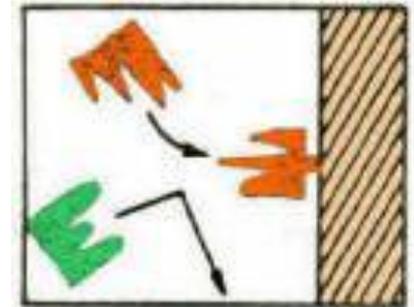
TROCA IÔNICA



PARTIÇÃO



EXCLUSÃO



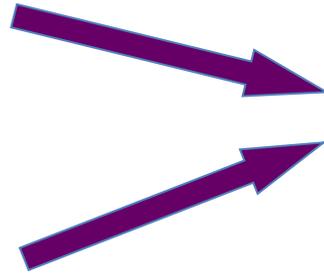
BIOAFINIDADE

CROMATOGRAFIA:

Fase estacionaria (FE)

Fase móvel (FM)

Sólida



Líquida ou gasosa

Líquido adsorvido

POLARIDADE RELATIVA DAS FASES:

FASE NORMAL: fase estacionária **POLAR**, fase móvel apolar.

FASE REVERSA: (inverso) fase estacionária **APOLAR**, fase móvel polar.

CLASSIFICAÇÃO

- CP – Cromatografia Planar
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CGL - Cromatografia Gás -Líquido
- CGS - Cromatografia Gás -Sólido
- CLL – Cromatografia Líquido -Líquido
- CLS – Cromatografia Líquido -Sólido
- CTI – Cromatografia de Troca Iônica
- CB – Cromatografia de Bioafinidade
- CLFL – Cromatografia Líquida de fase Ligada
- CE- Cromatografia de Exclusão

Tipo de Técnica

Planar

Coluna

FM

Líquido

Gás

Líquido

FE

Líq

Sól

Líq

Sól

Líq

Sól

Troca Iônica

Afinidade

Fase Ligada

Exclusão

Tipo de cromatografia

CP

CCD

CGL

CGS

CLL

CLS

CTI

CB

CLFL

CE

CLASSIFICAÇÃO

Técnica

Planar

Coluna

Fluído Supercrítico

Sól

Fase ligada

CSS

CSFL

FM

Líquido

Gás

Líquido

FE

Líq

Sól

Líq

Sól

Líq

Sól

Troca Iônica

Afinidade

Fase Ligada

Exclusão

Tipo de cromatografia

CP

CCD

CGL

CGS

CLL

CLS

CTI

CB

CLFL

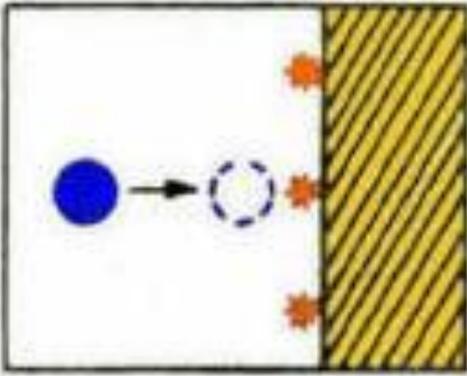
CE

CROMATOGRAFIA:

Mecanismos envolvidos nas transferências de solutos

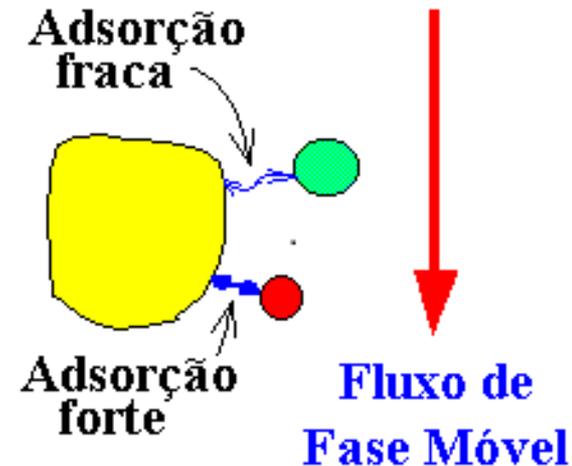
ADSORÇÃO (CCD, CGS, CLS, CSS)

Físico



- ✓ Interações eletrostáticas que ocorrem entre grupos ativos presentes na superfície da **fase estacionária SÓLIDA** e a fase móvel.

- ✓ Dipolo-dipolo, Van de Waals ou ligações de hidrogênio.



- ✓ Em processos cromatográficos, a ADSORÇÃO é sempre reversível.

CLASSIFICAÇÃO

Técnica

Planar

Coluna

Sól

Fase ligada

CSS

CSFL

FM

Líquido

Gás

Líquido

FE

Líq

Sól

Líq

Sól

Líq

Sól

Troca Iônica

Afinidade

Fase Ligada

Exclusão

Tipo de cromatografia

CP

CCD

CGL

CGS

CLL

CLS

CTI

CB

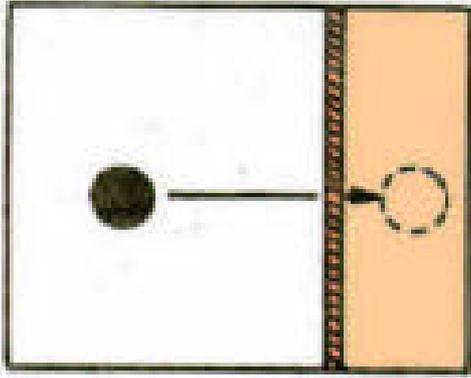
CLFL

CE

CROMATOGRAFIA:

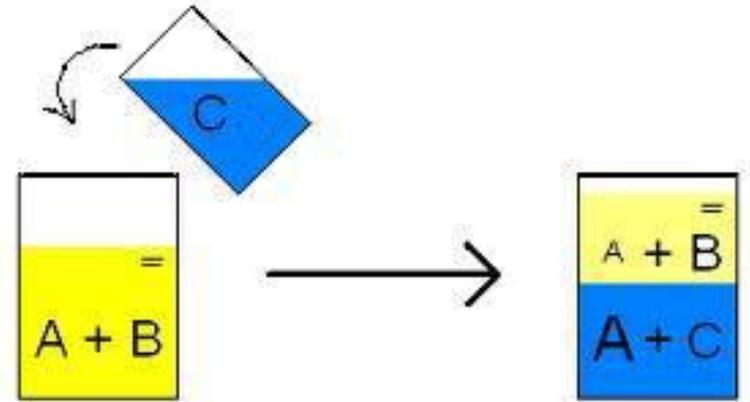
Mecanismos envolvidos nas transferências de solutos

PARTIÇÃO (CP, CGL e CLL)



Físico

- ✓ Ocorre quando a **fase estacionária é um LÍQUIDO**, espalhado na superfície de um suporte sólido e inerte.



- ✓ Baseada nas **diferentes solubilidades** dos componentes da amostra (analitos) em uma mistura de líquidos (Entre a FM e FE).

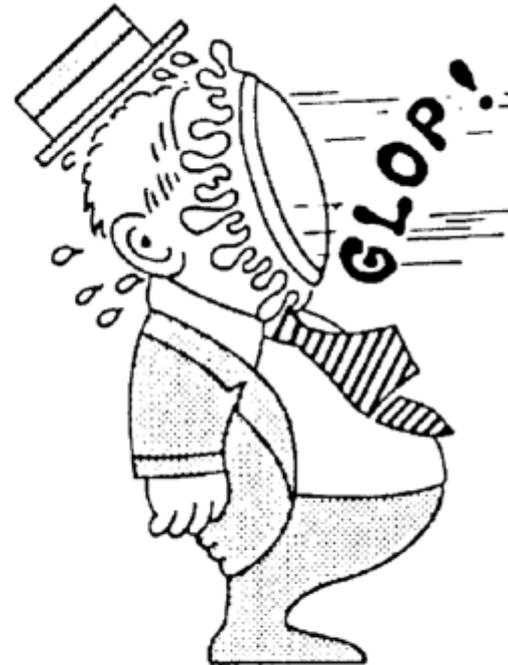
CROMATOGRAFIA:

Mecanismos envolvidos nas transferências de solutos

Diferença entre Absorção e Adsorção



ABsorção

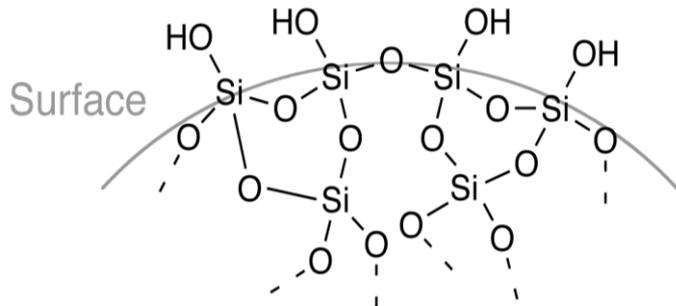


ADsorção

CROMATOGRAFIA:

Mecanismos envolvidos nas transferências de solutos

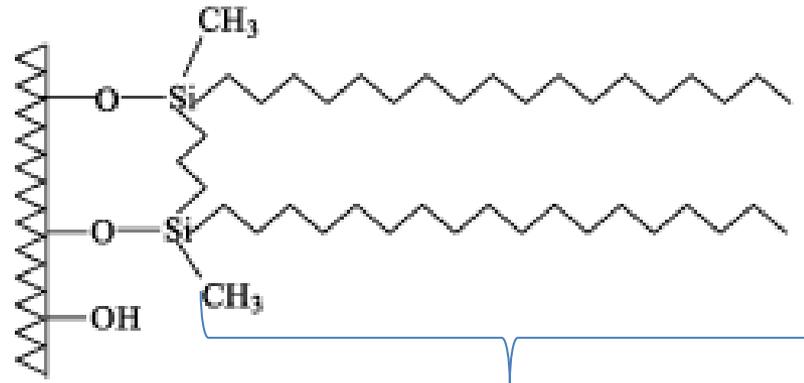
FASE QUIMICAMENTE LIGADA - ADSORÇÃO E PARTIÇÃO



<https://www.youtube.com/watch?v=MLoitPJQH3g>



Suporte da fase estacionária: Sílica
Chamada de fase NORMAL



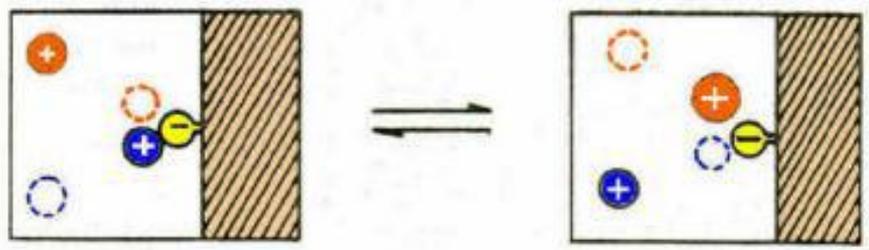
Grupos alquila quimicamente ligados
ao suporte sólido

Chamada de fase REVERSA

CROMATOGRAFIA:

Mecanismos envolvidos nas transferências de solutos

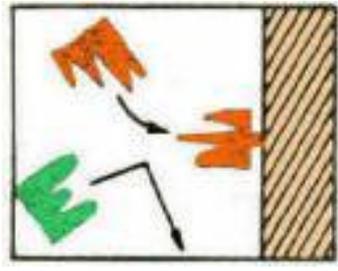
TROCA IÔNICA



<https://www.youtube.com/watch?v=q3fMqgT1do8>

Químicos

BIOAFINIDADE



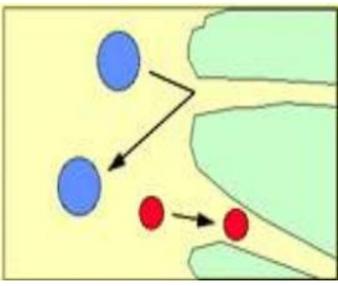
<https://www.youtube.com/watch?v=ezej9MVGcf8c>

componentes complementares

- Antígenos → anticorpos
- Substratos → enzimas
- Lectinas → açúcares

Mecânico

EXCLUSÃO



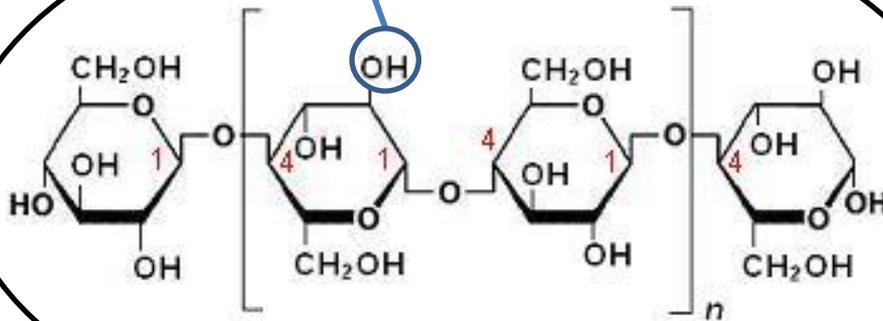
<https://www.youtube.com/watch?v=oV5VB5kO3tQ>

- ✓ Processo de separação mecânico que ocorre por diferença de tamanho entre as moléculas.
- ✓ Fase estacionária inerte.

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

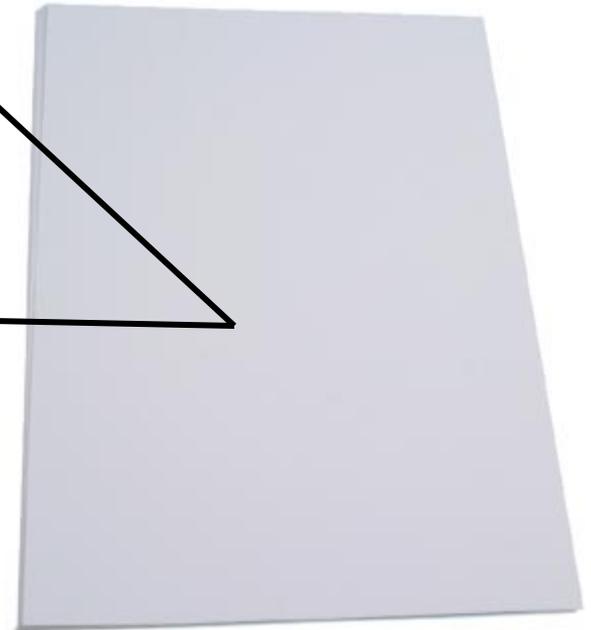
Grande afinidade com moléculas de água

Mecanismo envolvido:
PARTIÇÃO



Celulose

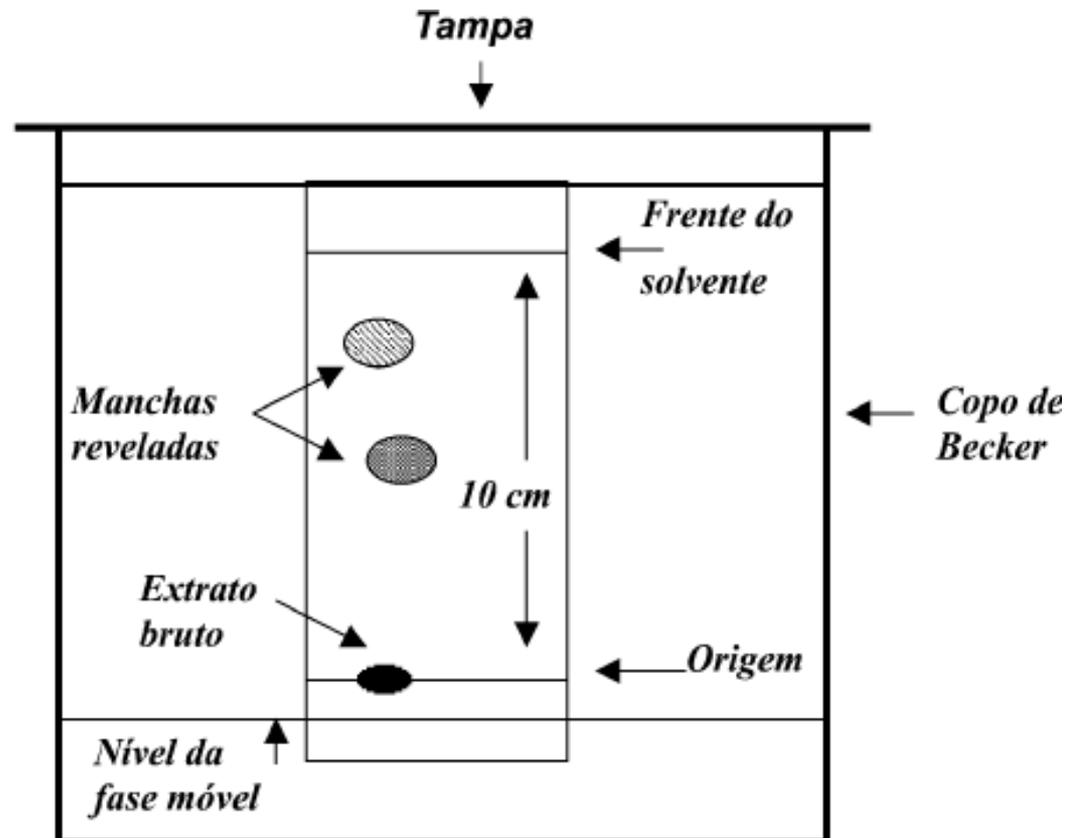
2000 ou mais unidades de glicose



CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Definições e termos usados na CP

- Suporte?
- Câmara ou cuba cromatográfica;
- Revelador ou agente cromogênico;
- Resolução;
- Desenvolvimento;
- Aplicação;
- Frente da FM;
- Distância percorrida;
- Rf;
- Saturação da cuba;



CROMATOGRAFIA EM PAPEL

FASE MÓVEL:

- ✓ Variável que possui maior efeito na separação dos componentes da mistura.
- ✓ Para separar os componentes de uma mistura tem que se levar em consideração a natureza química das substâncias que devem ser separadas, assim como a viscosidade e a polaridade da fase móvel.

Algumas FM ordenadas em função de suas polaridades.

Solvente	Solubilidade da água (g/100mL a 20°C)	Const. dielétrica (20°C)	Viscosidade (mPa.s a 20°C)
Éter de petróleo (30-60°C)	Imiscível	1,84	0,3
Hexano	imiscível	1,88	0,32
Clorofórmio	0,82	4,80	0,57
Acetato de etila	8,60	6,02	0,45
Acetona	miscível	21,50	0,32
Metanol	miscível	33,60	0,60
Água	miscível	80,40	1,00

Nota: Ácidos orgânicos são razoavelmente solúveis em água. Ácidos e bases inorgânicas são altamente solúveis em água.

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

1) Com base nas fórmulas estruturais dos compostos: etano, etanol, ácido etanoico e metoximetano, pode-se concluir que os compostos mais solúveis em água são:

- a) etano e metoxietano.
- b) etanol e ácido etanoico.
- c) etano e ácido etanoico.
- d) etanol e metoximetano.
- e) ácido etanoico e metoximetano.

2) Em qual das seguintes substâncias o benzeno (C_6H_6) é menos solúvel?

- a) água.
- b) tetracloreto de carbono.
- c) metoximetano.
- d) metanol.
- e) ácido etanoico

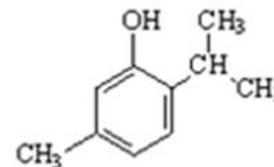
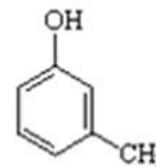
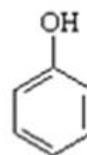
CROMATOGRAFIA EM PAPEL

3) Com relação ao tetracloreto de carbono, de fórmula CCl_4 , pode-se afirmar que se trata de um composto:

- a) iônico facilmente solúvel em água.
- b) iônico capaz de remover manchas de um tecido branco.
- c) covalente polar facilmente solúvel em etanol.
- d) covalente apolar capaz de remover manchas de iodo (I_2) de um tecido branco.
- e) molecular altamente polarizado capaz de remover manchas provocadas por compostos iônicos.

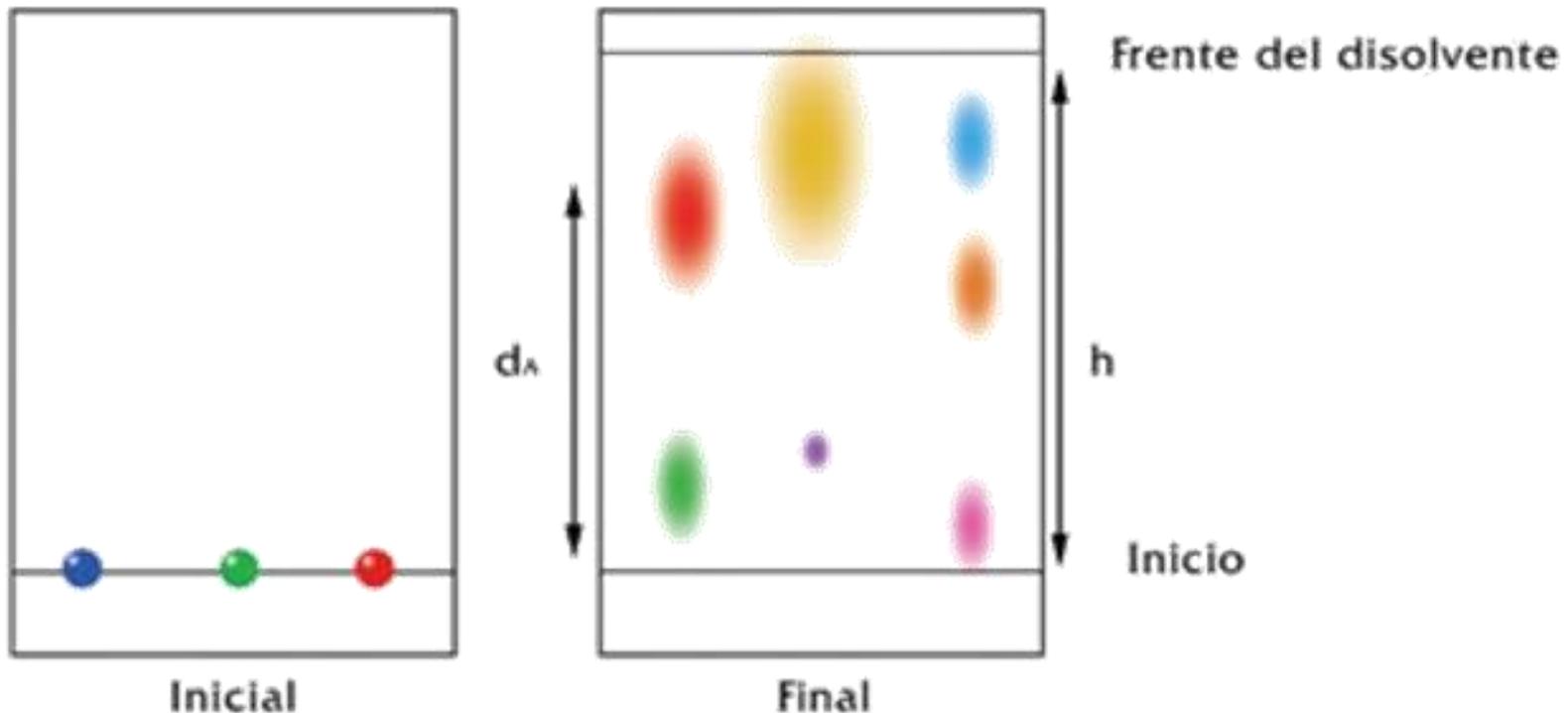
4) (UFC-CE) A atividade bactericida de determinados compostos fenólicos deve-se, em parte, à atuação desses compostos como detergentes, que solubilizam e destroem a membrana celular fosfolipídica das bactérias. Quanto menor for a solubilidade dos compostos fenólicos em água, maior será a ação antisséptica. Com relação às solubilidades dos compostos fenólicos I, II e III, em água, identifique a opção correta:

- a) I é mais solúvel que II e II é mais solúvel que III.
- b) I é menos solúvel que II e II é menos solúvel que III.
- c) II é menos solúvel que I e I é menos solúvel que III.
- d) II é mais solúvel que I e I é mais solúvel que III.
- e) I, II e III têm, individualmente, a mesma solubilidade.



CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Interpretando o cromatograma da CP



$$R_f = \frac{d_r}{d_m}$$

R_f = Fator de retenção.

d_r = distância percorrida pelos componentes.

d_m = distância percorrida pela fase móvel.

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

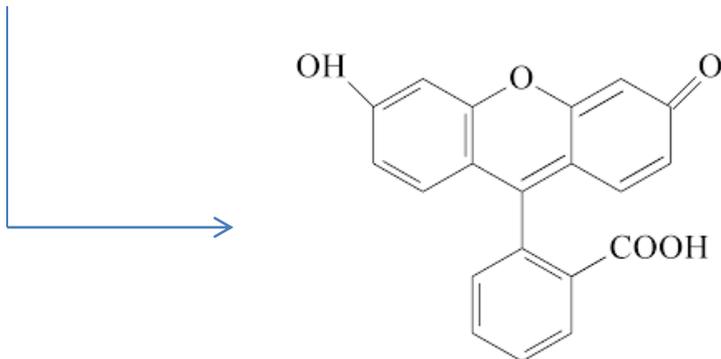
MÉTODOS DE DETECÇÃO:

Normalmente as substâncias separadas são incolores ou invisíveis à luz ordinária.

Como visualizar a separação?

Métodos químicos: a solução reveladora é borrifada sobre o papel.

Métodos físicos: o papel quando **tratado com** solução de **fluoresceína**, frequentemente, destaca as manchas sob radiação UV.



-Ninhidrina (Aminoácidos)

-AgNO₃ (ânions inorgânicos)

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

ANÁLISE QUALITATIVA:

- ✓ Realizada em função da cor e do R_f apresentados pela substância.
- ✓ Utilizar padrões para fins comparativos.
- ✓ Substâncias desconhecidas: após separadas, extrair do papel por eluição e aplicar um método instrumental adequado.

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

ANÁLISE QUANTITATIVA:

Diretamente sobre o papel: após o cromatograma ser revelado.

- ✓ Comparação de intensidade das cores reveladas: variando as concentrações dos padrões e amostras (Erro \pm 20%).
- ✓ Área da mancha: cortar a área da mancha e pesar. Construir um gráfico das quantidades da substância presente na mancha.
- ✓ Análise densitométrica: determina a intensidade da cor com um densitômetro.

Extração da substância: após o cromatograma ser revelado.

- ✓ Extrair o derivado colorido do papel e fazer a leitura em espectrofotômetro. A quantificação se dá a partir da comparação com a curva analítica da mesma substância.
- ✓ Podem ser utilizados outros métodos analíticos como, microtitulação, microgravimetria...

Aplicações da CP:

- Separação e identificação de compostos:
 - Polares;
 - Antibióticos hidrossolúveis;
 - Ácidos Orgânicos
 - Íons metálicos
- Útil para acompanhar reações químicas (**Síntese Orgânica**);
- Substituída pela CCD, mas aplicada em compostos radiomarcados (compostos radioativos)

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

5) Três compostos foram separados por CP e as seguintes distâncias, a partir do ponto de injeção, das manchas foram determinados:

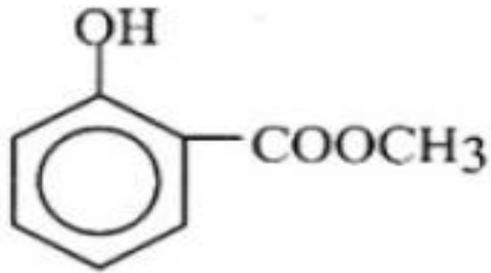
Composto	Distância (cm)
A	2,5
B	7,5
C	10,0
Solvente	15,0

Determine o R_f das manchas e comente sobre a solubilidade dos compostos.

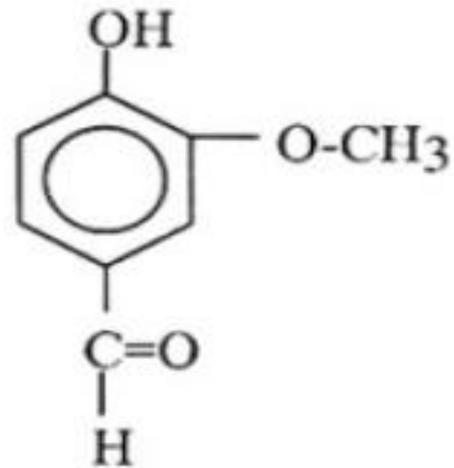
6) Cátions inorgânicos podem ser separados por cromatografia em papel de acordo com a habilidade de formar complexos com íons cloreto. Para a separação, uma solução de ácido clorídrico em acetona foi utilizada como fase móvel. Sabendo que as solubilidades relativas dos seguintes cloretos em ácido clorídrico concentrado são $\text{CuCl}_2 > \text{CoCl}_2 > \text{NiCl}_2$, qual a ordem de eluição? Justifique.

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

7) Uma análise cromatográfica identificou os seguintes compostos quando acetona foi utilizada como fase móvel. Qual a ordem de eluição? Desenhe o cromatograma.



I - salicilato de metila



II - vanilina

CROMATOGRAFIA EM PAPEL

Vantagens:

- Técnica simples.
- Não requer instrumentação sofisticada.
- Baixo custo.

Desvantagens:

- Uso limitado.
- Alargamento de banda-difusão.
- Pouca alternativa de reveladores.

Referências

<https://www.slideshare.net/IsabelleMacedo/cromatografia-64106182>

Introdução à cromatografia de troca iônica:

<https://www.youtube.com/watch?v=lp40a7mtc4E>