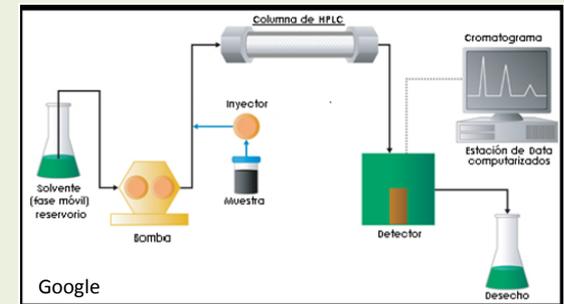
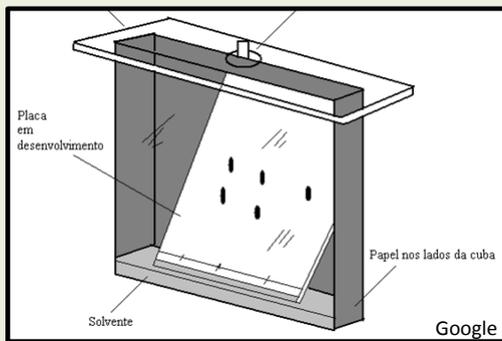


Técnicas Básicas de Cromatografia



-2016-

Metabólitos Vegetais: origem, diversidade e aplicações

*Cromatografia em Camada
Delgada*

Cromatografia em Coluna

HISTÓRICO

- **Mikhael Semenovich Tswett** – filho de imigrantes russos nascido em Asti, Itália.
- "Clorofilas no mundo vegetal e animal" (*Chlorophylls in the plant and animal world*) – doutorado em ciências.
- Descreve sua invenção para a separação de substâncias coloridas presentes em vegetais.

Botânico russo Tswett ao lado de sua "unidade cromatográfica" em 1910



O próprio termo foi criado por ele:

Das palavras gregas ***chroma*** (cor) e ***graph*** (grafia)

Cromatografia (grafia das cores)

DEFINIÇÃO

Cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada por meio da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em íntimo contato.

- **Fase estacionária**
- **Fase móvel: move-se sobre a fase estacionária**

TIPOS DE CROMATOGRAFIA

- Cromatografia em Camada Delgada (Planar) - a fase estacionária é colocada sobre uma placa.
- Cromatografia em Coluna - a fase estacionária é colocada em um tubo cilíndrico.
 - Preparativas: 6->50 mm;
 - Analíticas: 2-6 mm;
 - Microdiâmetro: 1-2 mm;
 - Capilares: < 1 mm.

Dependendo do estado físico da fase móvel pode-se ter:

Cromatografia gasosa: fase móvel é um gás inerte.

*Cromatografia líquida: fase móvel é um líquido.

Cromatografia supercrítica: fase móvel é um vapor pressurizado em temperatura e pressão acima do ponto crítico.

*Cromatografia líquida: “Clássica” – feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – utiliza-se colunas metálicas (normalmente) e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com o auxílio de uma bomba de alta pressão.

Processos Físicos da Cromatografia:

- adsorção: fase estacionária = sólido (ex.: sílica, alumina).
- partição (absorção): fase estacionária
 - líquido que se espalha sobre a superfície de um suporte sólido e inerte (ex.: **cromatografia em papel**)
 - adere às paredes de um tubo cromatográfico (***cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência**).

*na cromatografia gasosa, a fase estacionária se torna líquida na temperatura de trabalho

Baseados principalmente em atrações bipolares (forças de Van der Waals).

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD - TLC)

Definição:

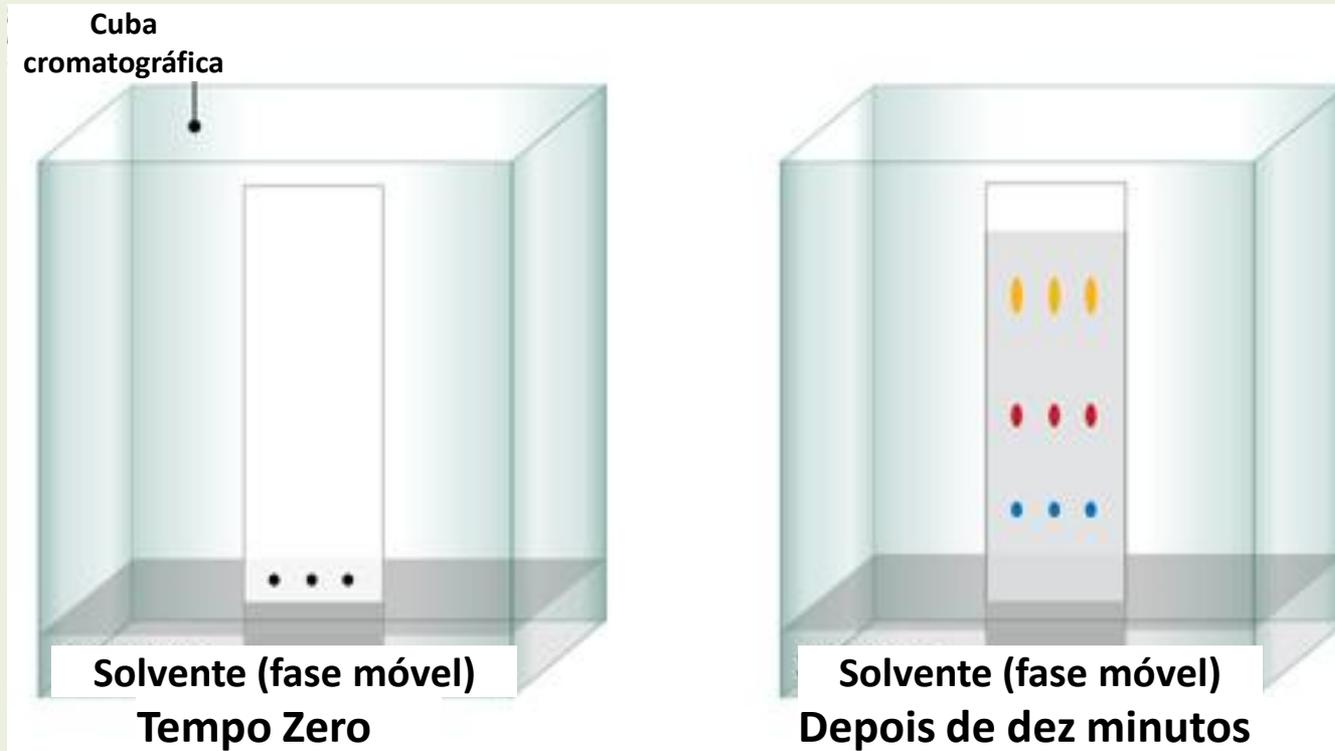
Consiste na separação dos componentes de uma mistura por meio da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana.

Teve início em 1938, mas somente na década de 1960 começou a ser largamente utilizada.

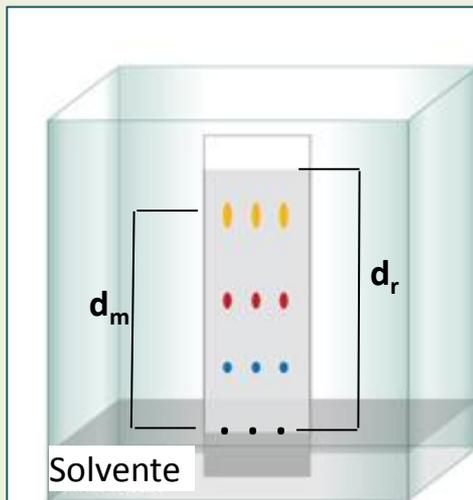
Vantagens:

- Fácil compreensão e execução;
- Separações rápidas;
- Fácil repetição;
- Baixo custo.

Cromatografia em camada delgada (CCD ou TLC)



Waters Co.



FATOR DE RETARDAMENTO ou FATOR DE RETENÇÃO – R_F
PARA CROMATOGRRAFIA PLANAR

É definido pela razão entre as distâncias percorridas pela substância e pela fase móvel.

$$R_F = d_m / d_r$$

A cromatografia em camada delgada é uma cromatografia de adsorção

Adsorvente polar (ex.: sílica ou alumina): terá afinidade por substâncias polares.

Portanto:

- Substâncias apolares (ex.: hidrocarbonetos – possuem apenas C e H): não terão afinidade pelo adsorvente. Nessa maneira, não serão retidas, **deslocando-se com a fase móvel.**
- Substâncias polares (ex.: substâncias aromáticas – possuem oxigênio na molécula) : serão retidas pela fase estacionária (adsorvente) polar, **não se deslocando.**

Aplicações:

- Analítica ou Preparativa: dependendo da espessura da camada de adsorvente e da quantidade de amostra a ser analisada.

ADSORVENTES

O mercado dispõe de uma grande variedade de adsorventes que podem ser adquiridos para a confecção de placas nos laboratórios, ou sob a forma de placas prontas, nas quais os adsorventes são espalhados em várias espessuras (para cromatografia analítica ou preparativa).

Dentre os mais usados estão a **sílica (SiO_2)**, a **alumina (Al_2O_3)**, a **celulose** e a **poliamida**.

SÍLICA – é um dos adsorventes mais usados.

- ✓ apresenta caráter fracamente ácido.
- ✓ é utilizada na **separação de compostos lipofílicos** como ácidos graxos, terpenoides, esteroides, alcaloides etc.

ALUMINA – é o mais usado depois da sílica.

- ✓ tem caráter alcalino, mas existe no comércio na forma neutra ou ácida.
- ✓ é utilizada na **separação de compostos lipofílicos**
ex.: alcaloides, hidrocarbonetos policíclicos, aminas e vitaminas lipossolúveis.

CELULOSE – tem sido empregada como suporte da fase estacionária líquida em cromatografia de partição.

- ✓ pode ser impregnada com alguns materiais
ex.: polietilimina, carboximetil, dietilaminoetil
- ✓ empregada para **separar nucleotídeos, proteínas e ácidos nucleicos, substâncias fenólicas.**

POLIAMIDA – sua utilização vem crescendo, apesar de ser pouco aderente ao vidro.

- ✓ empregada com maior frequência na **separação de fenóis e ácidos carboxílicos.**

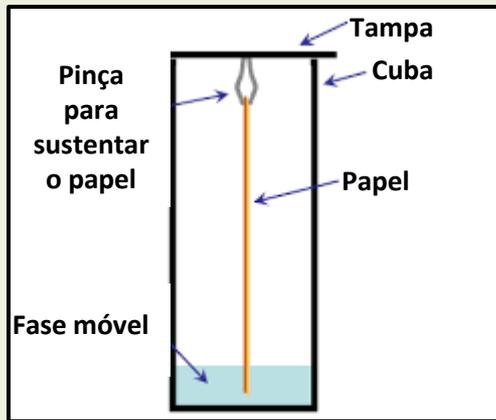
PONTOS IMPORTANTES A SEREM OBSERVADOS :

1. **Placas pré-fabricadas:** são mais uniformes e homogêneas do que as feitas no laboratório, melhorando a separação e tornando os valores de R_F mais reprodutíveis.
2. **Colocação da amostra:** exatamente na linha de partida, para não ocorrem variações nos valores de R_F .
3. **Seleção da fase móvel:** o solvente ou mistura de solventes usados como fase móvel devem ser escolhidos cuidadosamente, pois vai haver uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra pela superfície do adsorvente. Assim, deve-se considerar a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da fase móvel.
4. **Dissolução das amostras:** as amostras devem ser dissolvidas em solventes bastante voláteis, que possam ser rapidamente eliminados após a aplicação, numa concentração que varie de 0,1 a 1%. A aplicação pode ser feita com pipeta automática ou tubos capilares de vidro.

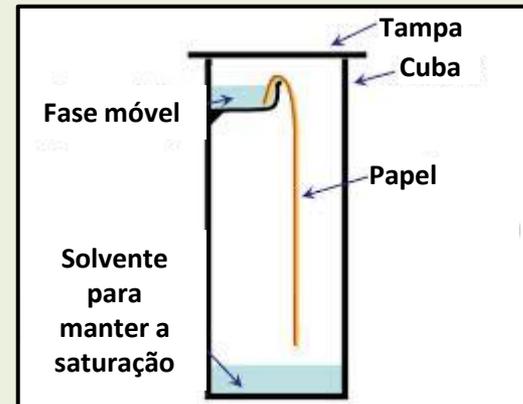
5. Formas de desenvolvimento:

- ✓ **Cromatografia ascendente** – é o método mais utilizado – a placa é colocada na cuba, quase na posição vertical, apoiada no seu fundo. A fase móvel sobe por capilaridade. A cuba deve estar perfeitamente vedada para evitar a evaporação do solvente para o meio, e dessa maneira permitir que a cuba fique saturada com a fase móvel, o que se consegue colocando papel de filtro molhado com a fase móvel nas paredes da cuba, antes do desenvolvimento do cromatograma.
- ✓ **Cromatografia descendente** – é o método utilizado para cromatografia em papel. Coloca-se a fase móvel num depósito existente na parte superior da cuba cromatográfica. No fundo da cuba coloca-se um pouco do solvente para assegurar sua saturação. A parte superior do papel é submersa na fase móvel e a cuba é fechada. A mancha é colocada na parte superior do papel.

✓ **Desenvolvimento circular** – a placa (ou papel cromatográfico) fica na posição horizontal. A amostra é depositada em um círculo ao redor do centro, no qual aplica-se a fase móvel. As manchas aparecem em círculos concêntricos.



Cromatografia ascendente



Cromatografia descendente



Cromatografia circular

6. **Revelação:** após o desenvolvimento dos cromatogramas, evapora-se o(s) solvente(s) e as placas são **reveladas**, a fim de tornar visível as substâncias incolores presentes na amostra.

Visualização pode ser feita por meio de:

métodos físicos - ex.: luz UV – substâncias fluorescentes .

Esse método não é destrutivo.

métodos químicos – substâncias são borrifadas sobre as placas e depois aquecidas a 100-120°C (ex.: vanilina-sulfúrica). **Esse método é destrutivo.**

métodos biológicos – reações enzimáticas ou bacterianas – ex. teste de substâncias antifúngicas.

7. **Documentação:**

- ✓ Fotografar as placas reveladas quimicamente.
- ✓ Desenhar em folha de papel de seda ou papel vegetal.



Reprodução do experimento de Tswett - separação de um extrato de folhas de espinafre por cromatografia em coluna aberta.

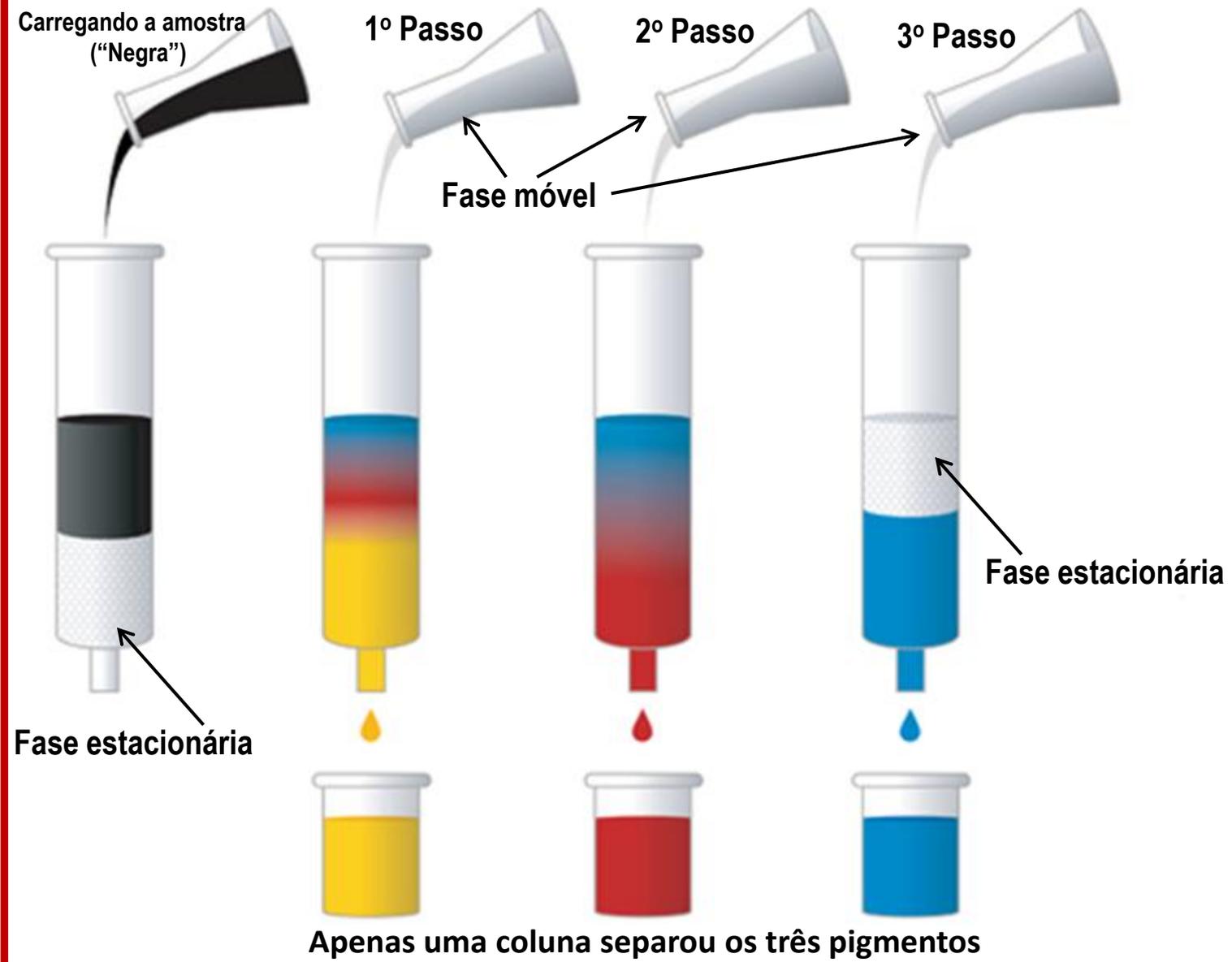
CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

Cromatografia líquida “clássica” uma técnica de adsorção

Iniciada nos primeiros anos do século XX

- ✓ Fase estacionária (sólida): colocada numa coluna de vidro de diâmetro variado;
- ✓ Amostra: colocada no topo da coluna;
- ✓ Fase móvel (eluente): passa através dela.

Pode ser usada para **fins preparativos**, dependendo do tamanho da coluna.



Adsorventes: exs: sílica gel, óxido de alumínio, silicato de magnésio, carvão ativo, celulose microcristalina.

O tamanho das partículas dos adsorventes para CC são maiores que aquele para CCD (60-200 μm).

Eluentes: são selecionados de acordo com o seu poder de eluição.

Enchimento da coluna:

✓ **Por via úmida:** mistura-se a fase móvel ao adsorvente até formar uma pasta. Preenche-se a coluna com essa pasta. Coloca-se a amostra em solução no topo da coluna (ex.: separação de flavonoides em coluna de PVPP; eluente = metanol).

✓ **Por via seca:** coloca-se o adsorvente na coluna. Coloca-se a amostra no topo da coluna em mistura com um pouco de adsorvente. Passa-se a fase móvel (eluente) (ex.: separação de hidrocarbonetos de ceras epicuticulares em coluna de óxido de alumínio; eluente = hexano).

CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC)

Dependendo do estado físico da fase móvel:

Cromatografia gasosa: fase móvel é um gás inerte.

Cromatografia líquida: fase móvel é um líquido.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) – utiliza-se colunas metálicas (normalmente) e **pressões** elevadas para a fase móvel, obtidas com o auxílio de uma **bomba de alta pressão**.



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

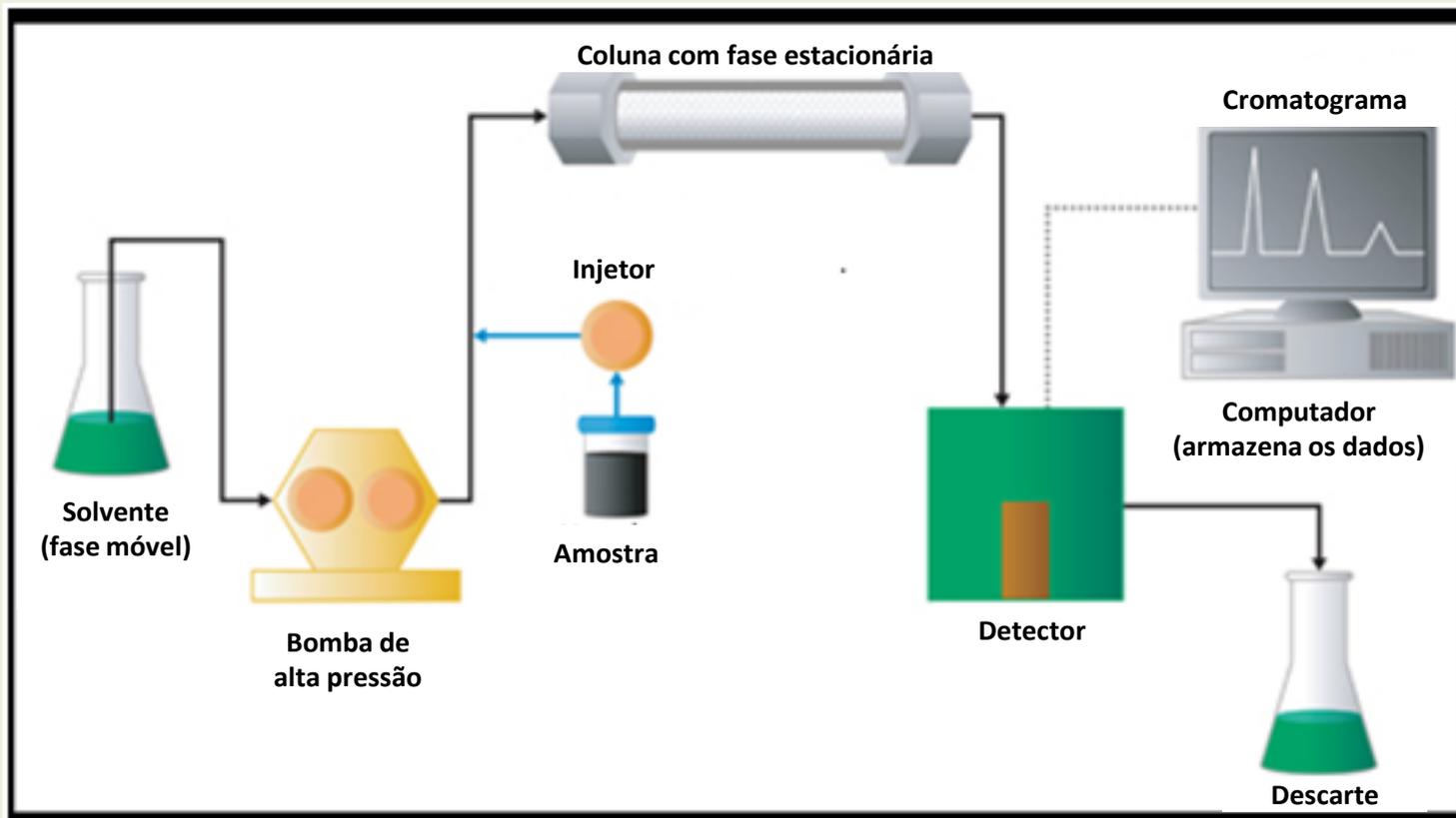
- Década de 1970 - avanço considerável em CLAE.
- Últimas décadas - acoplamento com espectrômetro de massas .
- ✓ Separa misturas de compostos semelhantes.
- ✓ É processada a temperaturas pouco acima da temperatura ambiente: separa substâncias termicamente instáveis.
- ✓ Utiliza colunas metálicas (normalmente) e **pressões** elevadas para a fase móvel, obtidas com o auxílio de uma **bomba de alta pressão**.

Característica da amostra: ser solúvel na fase móvel.

Mecanismo de separação: competição entre as moléculas da amostra e as da fase móvel pelos sítios ativos da fase estacionária.

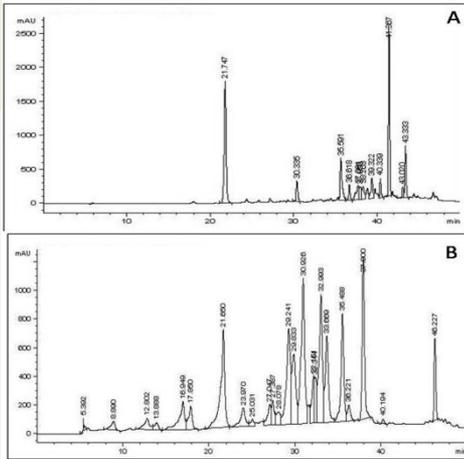
É uma cromatografia de partição.

Eluição por gradiente: aumento da polaridade da fase móvel – devido a retenção da amostra pela fase estacionária.



Esquema de um cromatógrafo líquido

CLAE Analítico
CLAE Semi-preparativo
CLAE Preparativo



Cromatogramas dos extratos de acetato de etila de duas amostras de própolis brasileiras, obtidos por CLAE com detecção a 270 nm.

**Computador
(armazena os dados)**



**Solventes
(fase móvel)**

**Módulo de
controle**

**Bomba de
alta pressão**

Coluna com fase estacionária

Injetor

Detector



Cromatógrafo Líquido Analítico – Agilent Technologies

Cromatografia em Fase Gasosa

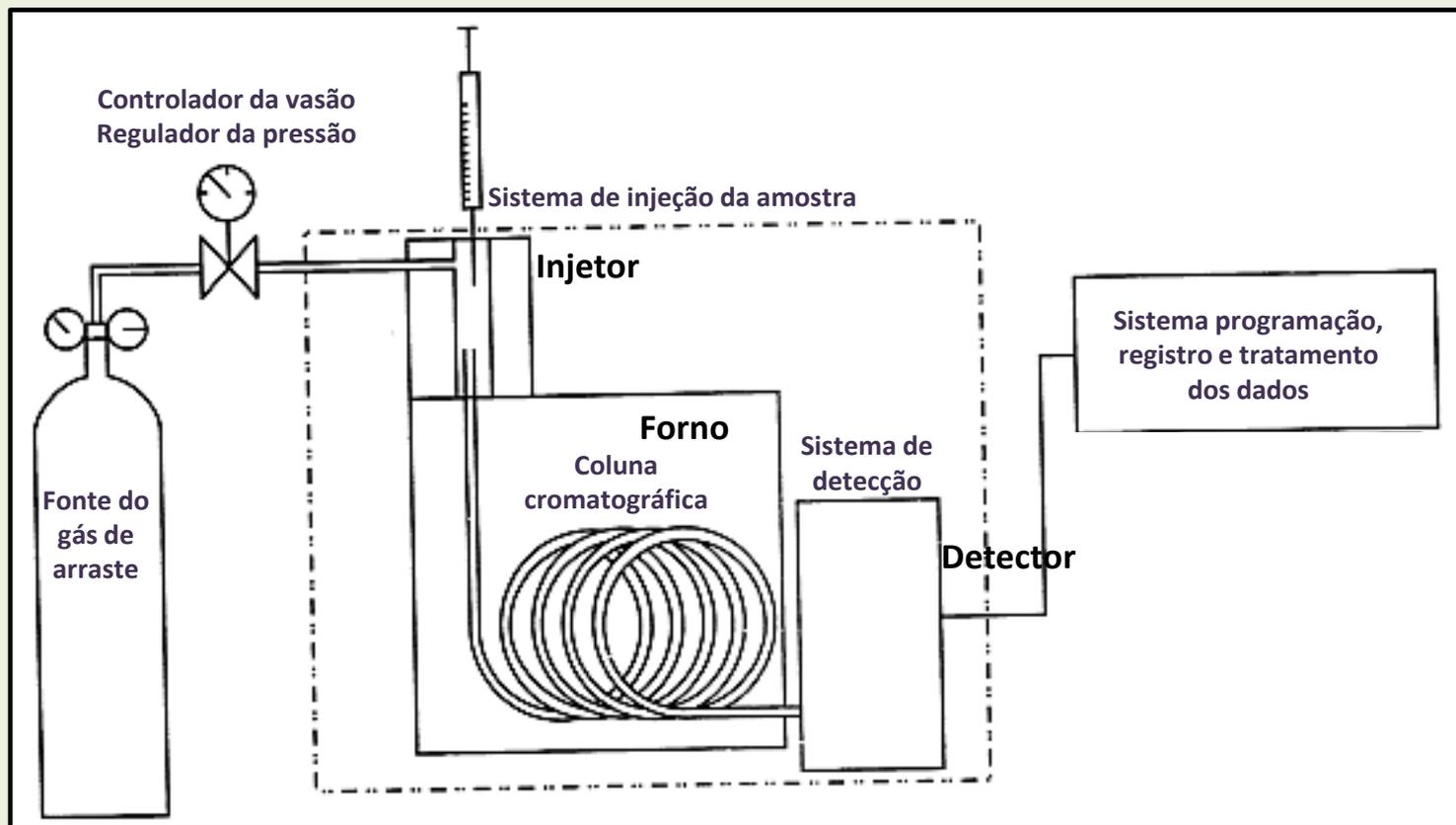
É uma cromatografia de partição

- Iniciou-se de forma acelerada na década de 1950.
- Separa dezenas de substâncias de uma mesma amostra.
- Técnica sensível - Analisa **pequenas quantidades** de amostra.
Separa **substâncias voláteis e termicamente estáveis**.

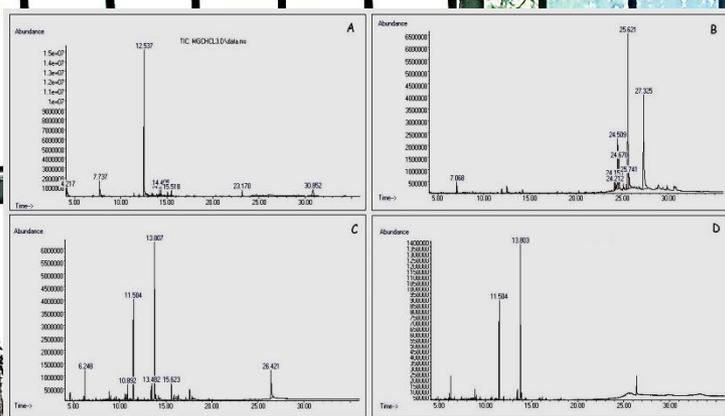
Fase estacionária – sólida – coluna capilar com diâmetro < 1 mm e comprimentos de 25-30 m.

Fase móvel – gás inerte (hélio, nitrogênio, hidrogênio, argônio).

Temperatura da coluna: constante -**isotérmica**
com variação (linear ou não) – **temperatura programada**



Esquema de um cromatógrafo de fase gasosa
(retirado de Collins C.H. *et al*, 2006)



Cromatogramas das frações de clorofórmio de quatro amostras de própolis brasileiras, obtidos por cromatografia gasosa.

Sistema de programação, registro e tratamento de dados

Detector de Massas

Interface do detector de massas

Injetor automático

Detector de Ionização de Chamas

Forno para coluna

Impressora



Cromatógrafo a gás – Agilent Technologies

Prática 2 – Análise de pigmentos foliares por cromatografia em camada delgada

A. Extração

1. Pegue folhas frescas de *Tradescantia pallida* var. *purpurea* (Commelinaceae) ou *Tradescantia zebrina* (Commelinaceae) ou *Cordyline terminalis* (Asparagaceae) ou *Acalypha wilkesiana* (Euphorbiaceae) e corte-as em tiras finas;
2. Transfira-as para um gral, adicione 15 mL de acetato de etila e 20 gotas de ácido acético glacial. Triture o material com pistilo;
3. Filtre o extrato para um tubo Falcon (de 50 mL), usando funil e algodão, tomando o cuidado para que o resíduo permaneça no gral;
4. Trate o resíduo com mais 10 mL do solvente anterior e filtre o extrato para o mesmo tubo. Acrescente ao resíduo, 2 vezes 10 mL de água, triture, e filtre os extratos aquosos para o mesmo tubo.

B. Separação e caracterização dos pigmentos hidrossolúveis e lipossolúveis

1. Agite levemente o tubo. Separam-se duas fases: a inferior, aquosa, de cor rósea (**A**) e a superior, de cor verde (**B**);
2. Transfira por meio de uma pipeta Pasteur, cuidadosamente, 4 mL da fase aquosa (**A**) para um novo tubo Falcon (de 15 mL);
3. Acrescente ao tubo 30 - 40 gotas de uma solução de NaOH 10% e agite;
4. Adicione agora, à solução anterior, 20 gotas de ácido acético e agite.

C. Cromatografia

1. Com auxílio de uma pipeta automática, deposite cuidadosamente 20 μL (10 x 2 μL) da solução **B** no ponto central de uma placa cromatográfica a cerca de 1 cm da extremidade inferior. Tome cuidado para que o diâmetro do extrato na placa não exceda 0,5 cm;
2. Coloque cerca de 1 cm de uma mistura de hexano:acetato de etila (8:2) em um béquer;
3. Coloque a placa no béquer, e cubra com um vidro de relógio;
4. Acompanhe a ascensão do solvente, até chegar a 2/3 da placa. Retire a placa do béquer e deixe evaporar o solvente;

Obtém-se uma zona amarela, superior, correspondente aos carotenoides, e duas verdes, inferiores, correspondentes às clorofilas.

Responda:

- a) As folhas não verdes fazem fotossíntese?
- b) Qual substância é responsável pela coloração rósea da fase aquosa (**A**)?
- c) O que aconteceu com a coloração da solução A após as misturas indicadas no item 3? Qual a explicação para as reações vistas acima?
- d) Quais substâncias são responsáveis pela fase (**B**)?



Tradescantia zebrina - Commelinaceae



Tradescantia pallida var. *purpurea* - Commelinaceae



Cordyline terminalis - Asparagaceae



Acalypha wilkesiana - Euphorbiaceae