



# Cromatografia Líquida Aplicada a Análise de Alimentos

Sidney Pacheco



# Conteúdo do Curso

- » História da Cromatografia Líquida
  - » Fases estacionárias
    - » Modos de Eluição

# História da CLAE



Historiador romano **Caio Plínio Segundo** (23-79)

Publicou uma grande enciclopédia chamada História Natural (77 a 79)

Descreve um método para verificar a autenticidade de verdigris

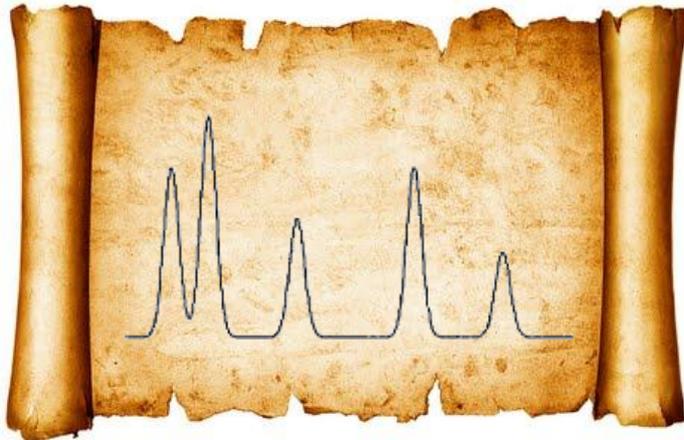
Tem sido usado como fungicida e pigmento verde



# História da CLAE

Fraude: Adição de pó de mármore verde ao verdigris

Plínio descreve um método onde se aplicava o produto em folhas de papiro embebidas com um extrato vegetal



Cromatografia em papiro !

Plínio falece atingido pela erupção do vulcão Vesúvio em Pompéia no ano 79

Outro relato de um fenômeno cromatográfico aparece 1700 anos depois de Plínio

**Jöns Jacob Berzelius** (1779–1848) descreve o fenômeno da desmineralização da água salgada por meio de filtração através de areia

Em 1847, o Físico Italiano **Carlo Matteucci** publica o livro “palestras sobre os fenômenos físicos de seres vivos”. Onde reproduz o experimento de Berzelius:

Uma solução salina foi filtrada através de um tubo de 8 metros contendo areia, a água que saía do tubo era menos densa que a inserida no topo

Matteucci relata ainda o fenômeno que ocorre quando gotas de chocolate ou tinta caem sobre a roupa ou papel, formando um ponto central escuro circundado por uma zona de líquido claro colorido

# História da CLAE

**Friedlieb Ferdinand Runge** (1795-1867) nasceu na Alemanha e se graduou em Medicina, no entanto nunca exerceu a profissão. Se encantou pela química e acabou se tornando professor e autor de diversos livros

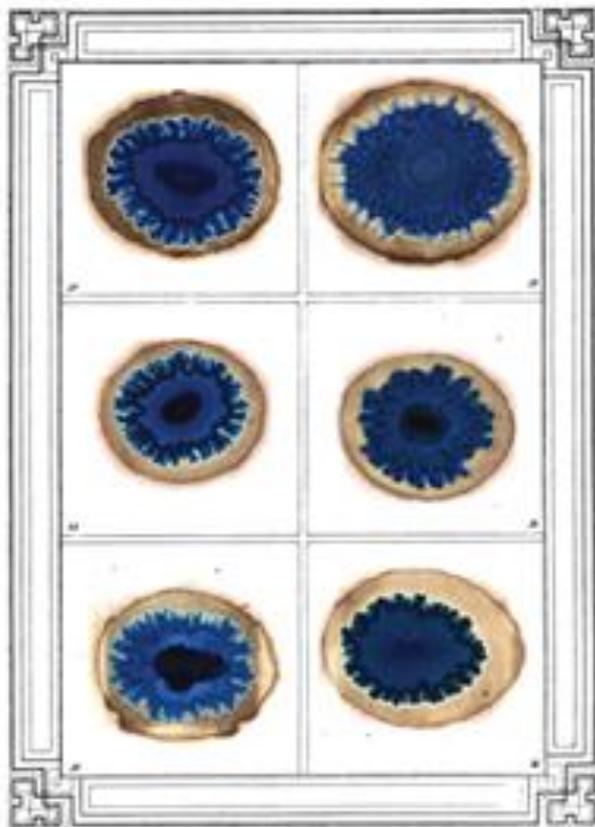
Em 1819 é o primeiro a isolar a substância estimulante do café

Runge dedicou grande parte de sua vida a pesquisa de tintas e pigmentos para a indústria têxtil

Publicou uma série de livros sobre a química da coloração, neles Runge apresenta exemplos de corantes em pequenos pedaços de tecidos e destaca como é útil a utilização de um pequeno filtro de papel para a separação e identificação dos pigmentos utilizados nos corantes de tecidos

# História da CLAE

“...devido à sua força de capilaridade, separa os componentes de uma gota colocada no centro... cria uma imagem com uma parte central escura e áreas ou anéis coloridos ou mesmo incolores”

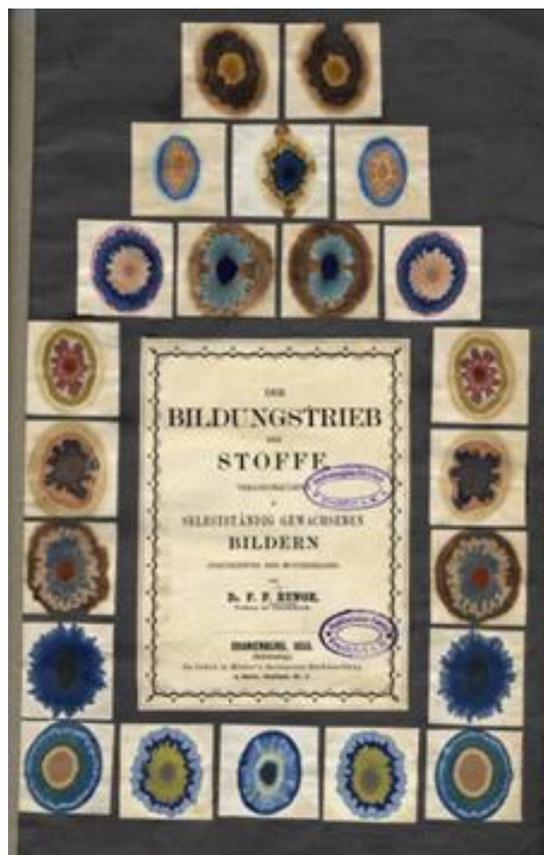


Livro: A química da coloração III (1850)

# História da CLAE

Runge ficou fascinado com a capacidade do teste em papel de filtro em separar os pigmentos de tintas, em especial as de cor escura que eram difíceis de identificar em solução

Em 1855 publica um livro inteiramente dedicado aos seus discos de papel de filtro com os desenhos formados por pigmentos



# História da CLAE

Após se aposentar Runge dedica seus últimos anos de vida a publicar seus livros, estes são citados muitas vezes como forma de expressão artística

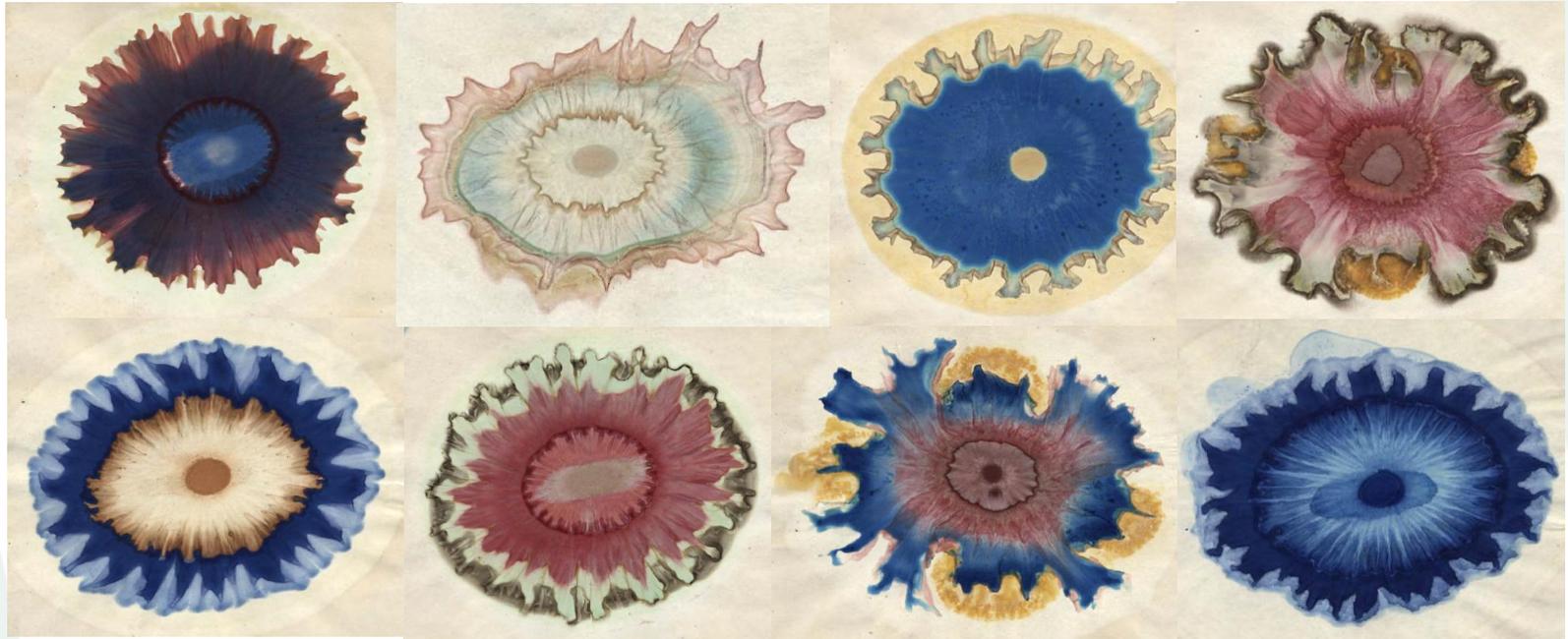


Abaixo de cada figura um texto com informações sobre a composição de pigmentos utilizados



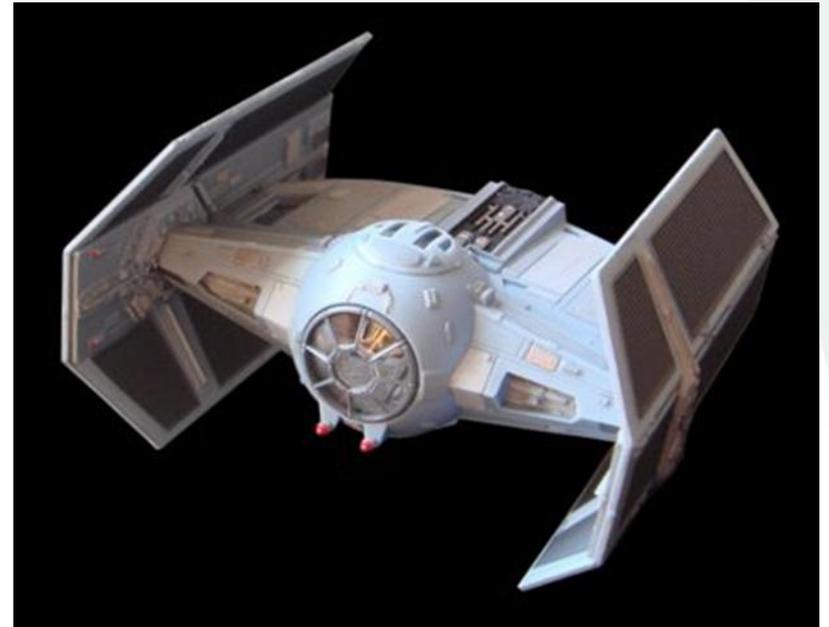
# História da CLAE

Figuras autoformadas de Runge





# História da CLAE



# História da CLAE

**Christian Friedrich Schönbein** (1799-1868), professor de química da Universidade da Basileia na Suíça, é reconhecido principalmente pela descoberta do ozônio e pela invenção da nitrocelulose

Fato no mínimo curioso, sem no entanto ter relação com a cromatografia, foi a descoberta acidental do explosivo nitrocelulose em 1845

Schönbein usou um avental para limpar respingos de uma mistura de ácidos nítrico e sulfúrico

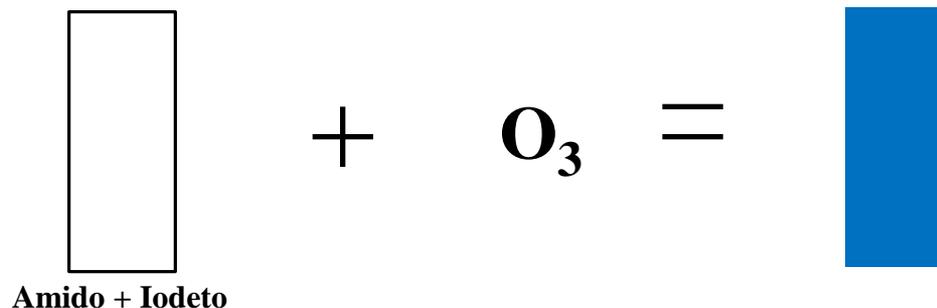
Ao colocar o avental para secar sobre o fogão, este se incendiou e quase que instantaneamente desapareceu

# História da CLAE

O trabalho que o levou a descoberta do ozônio é o que o relaciona com a história da cromatografia. Quando se realiza a eletrólise da água surge um odor característico no eletrodo positivo. Schönbein sugere que tal odor característico seja oriundo de uma substância química, e dá a ela o nome de ozônio

Schönbein utiliza tiras de papel embebidas em solução de amido contendo iodeto de potássio para a identificação qualitativa do ozônio. Este teste se mostrou o mais sensível e conveniente, indicando a presença do ozônio mesmo quando seu odor característico não era perceptível

A presença do ozônio decompõe o iodeto de potássio gerando iodo livre, este então reage com o amido deixando o papel azul



# História da CLAE

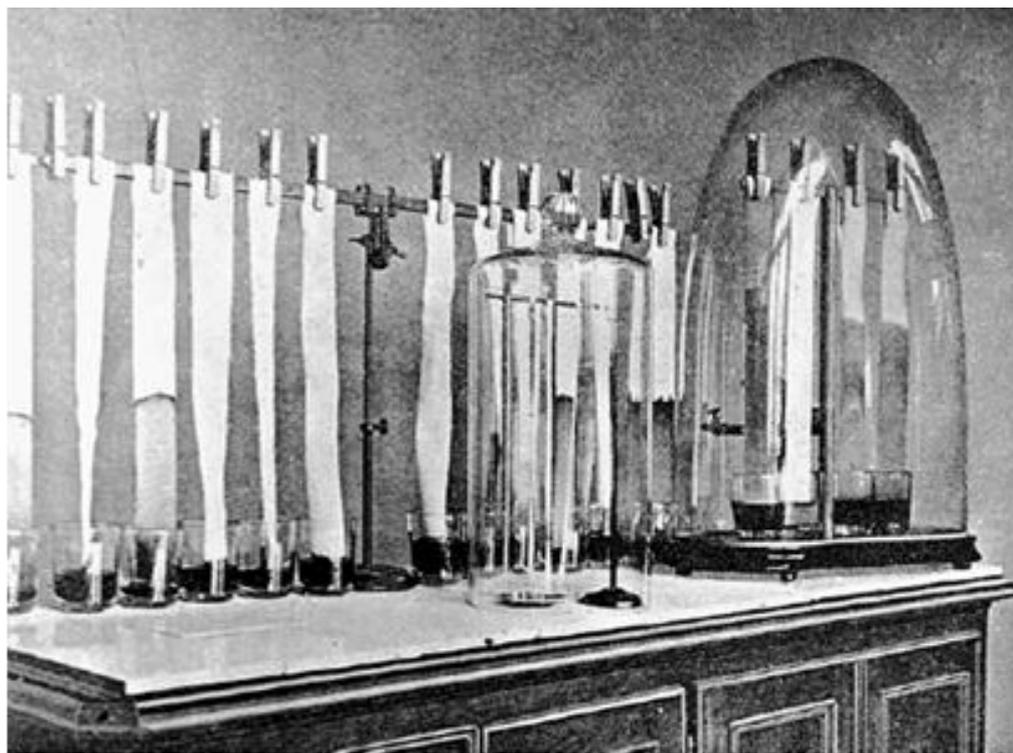
Schönbein cita, ao fazer experimentos com tiras de papel, que ao mergulhar uma ponta da tira em solução aquosa, o solvente e as substâncias dissolvidas sobem pelo papel com velocidades diferentes

Tais observações levaram um de seus alunos a dedicar praticamente toda sua carreira científica a realizar separações de pigmentos em tiras de papel

**Friedrich Goppelsroeder** (1837-1919) publicou em 1901 um livro com os resultados da técnica que chamou de Análise Capilar, em referência ao fenômeno de capilaridade, o qual julgava ser o responsável pela separação dos componentes de uma mistura em tiras de papel

# História da CLAE

Os experimentos de Goppelsroeder consistiam em mergulhar uma das pontas de uma tira comprida de papel na solução que desejava estudar, o papel permanecia durante todo o tempo imerso na solução



Goppelsroeder o “quase” pai da cromatografia

# A Invenção da Cromatografia

**Mikhail Semenovich Tswett** (1872-1919), nasceu em Asti na Itália em 14 de maio de 1872. Filho de russos, seus pais estavam em férias a caminho do lago Maggiore, no norte da Itália, no entanto as condições de saúde de sua mãe grávida exigiram que parassem em Asti. Sua mãe falece pouco tempo após seu nascimento e seu pai muda-se para a Suíça. Tswett vive na Suíça por 24 anos, graduando-se em botânica na Universidade de Genebra e em 1896 recebe seu PhD



# A Invenção da Cromatografia

Em 1896, Tswett deixa a Suíça e decide se repatriar à Rússia para se juntar a seu pai

Tswett então se dedica à preparação de uma nova dissertação de mestrado

Enfrenta muitas dificuldades, pois estava longe de ser fluente em russo, sua língua nativa era o francês

Em 1901 defende sua dissertação de mestrado na Universidade de Kazan, sob o título:

**“Um estudo físico químico do grão de clorofila. Experimentos e análises”**

Durante palestra ministrada em março de 1903, Tswett fala sobre uma nova categoria de fenômeno de adsorção e sua aplicação em análises bioquímicas. O que causa vívida discussão dentre os presentes, no mesmo ano ele publica um relatório.

**É então dado a 1903 o crédito do ano do nascimento da cromatografia**

# A Invenção da Cromatografia

Em 1906 Tswett publica dois artigos descrevendo a análise cromatográfica e sua aplicação no estudo da química da clorofila

Em 1908, integra a equipe do Instituto Politécnico de Varsóvia para estudar botânica. Em 1910 defende com elogios sua tese de doutorado

Tswett falece em 26 de junho de 1919, aos 47 anos, devido a uma doença cardíaca. Seu túmulo encontra-se em um convento na cidade russa de Voronezh



"Ele inventou a cromatografia

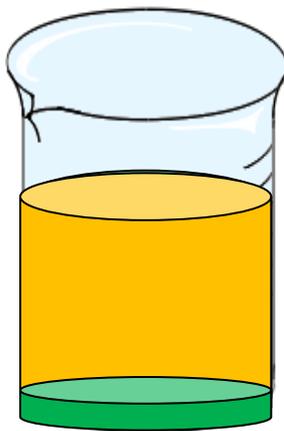
separando moléculas mas unindo pessoas"

# A Invenção da Cromatografia

**Relatório preliminar de Tswett publicado em 1903**

É considerado o marco da invenção da cromatografia

Nos seus estudos com a clorofila, Tswett observa um interessante fenômeno



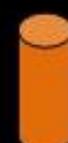
# A Invenção da Cromatografia

Tswett conclui, que os pigmentos dos extratos de plantas e a inulina estão envolvidos em um fenômeno de adsorção, e que estudos sistemáticos desta questão permitiriam a elaboração de uma nova técnica de separação física de substâncias

Realiza extensivos experimentos, chegando a listar mais de 100 substâncias estudadas como adsorventes além da inulina

Compreende a reversibilidade do processo de adsorção, afirmando que é possível, promover a dessorção dos pigmentos da inulina com a utilização de solventes adequados, sem afetar a estrutura química da substância adsorvida

Tswett demonstra que o fenômeno é mais evidente quando o extrato vegetal é filtrado através do adsorvente



# A Invenção da Cromatografia

1903

“...um novo método de separação física de diferentes substâncias em meios orgânicos pode ser proposto...”

...o princípio deste método baseia-se na propriedade de substâncias dissolvidas sofrerem processo de adsorção em materiais sólidos de origem mineral e orgânica...

...o montante da substância encontrada no composto de adsorção depende do grau de moagem, bem como da sua natureza, da natureza da substância dissolvida, e da natureza do solvente...

...todas estas diferenças podem ser utilizadas para a separação da substância por meio de sua precipitação fracionada de adsorção”

**“Sem qualquer dúvida, uma investigação mais aprofundada sobre o mecanismo de adsorção levaria à perfeição de sua aplicação analítica”**

# A Invenção da Cromatografia

Em 1906 Tswett publica dois artigos onde descreve em detalhes o método cromatográfico para a separação dos pigmentos de plantas

Sua mais famosa frase:

**“Como raios de luz no espectro, os diferentes componentes de uma mistura de pigmentos, obedecendo a uma lei, são resolvidos na coluna e podem então ser qualitativa e quantitativamente determinados. Eu chamo esta preparação de cromatograma, e o método correspondente de método cromatográfico.”**

# A Invenção da Cromatografia

## CROMATOLOGRAFIA

**Chroma = cor**

**Graphein = escrever**

**CROMATOLOGRAFIA = ESCRITA DAS CORES**

Tswett provavelmente inspirou-se na visualização dos anéis multicoloridos separados na coluna cromatográfica

No entanto, existe outra interpretação para o termo:

# A Invenção da Cromatografia

Tswett em russo escreve-se **ЦВЕТ**

Google

Google Tradutor

De: rus (detectat)



A: português

Tradueix



portuguès anglès castellà rus (detectat)

anglès português català

ЦВЕТ



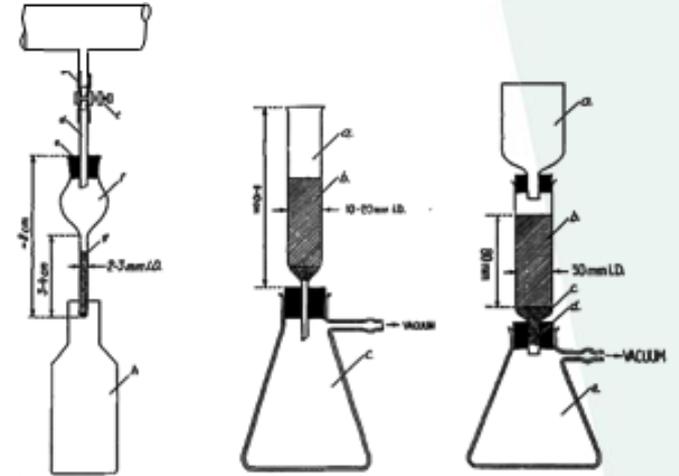
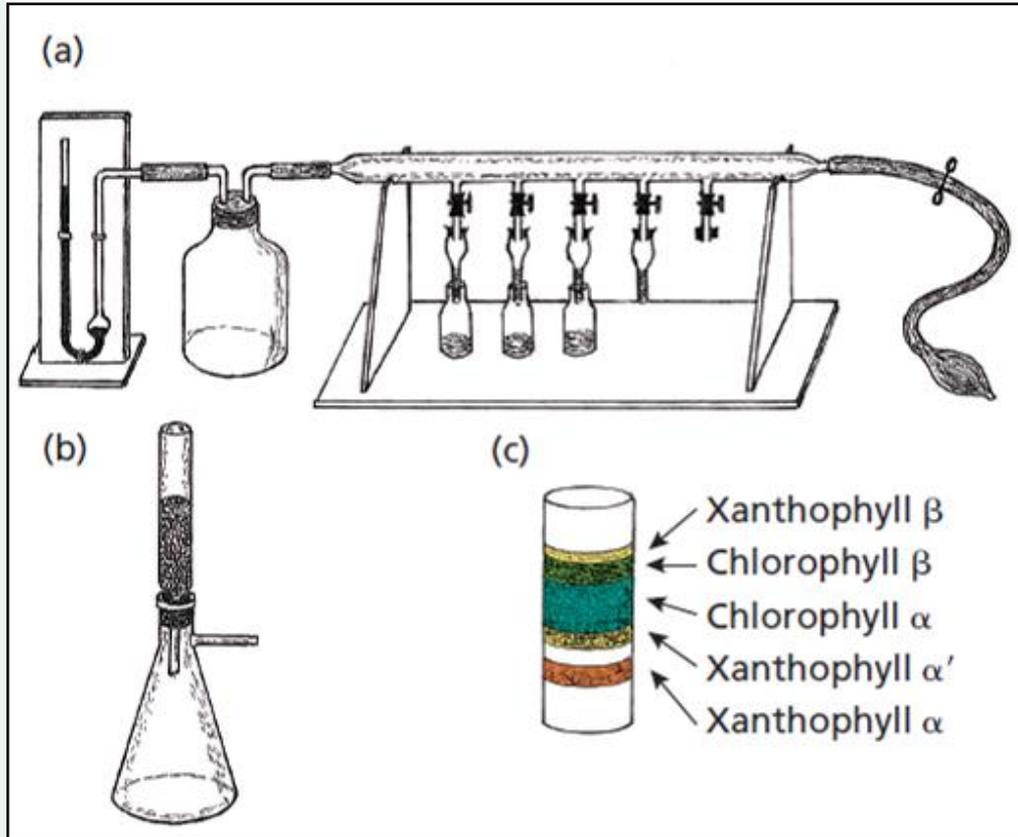
COR



Cromatografia pode ser a tradução da frase

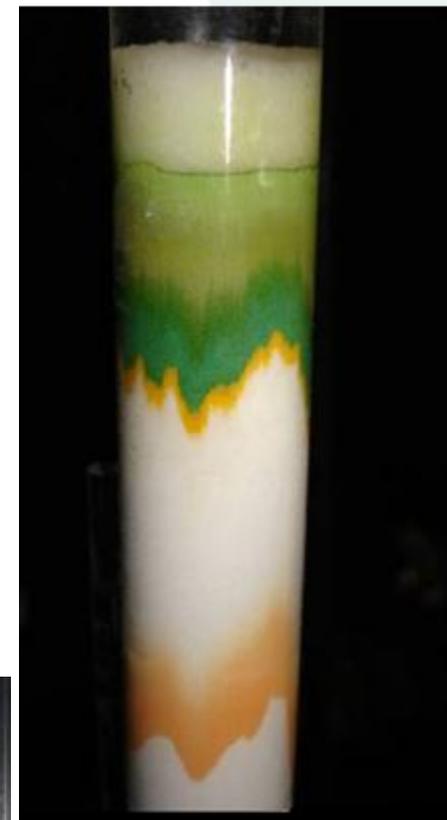
“Escrita de Tswett”

# O aparato cromatográfico de Tswett



# A Invenção da Cromatografia

## Colunas Cromatográficas



# A Invenção da Cromatografia

Em 1910 Tswett sumariza todo o conhecimento adquirido com seus experimentos em um livro publicado em russo sob o título: “Clorofilas no mundo animal e vegetal”. O livro lhe serve ainda para a obtenção do grau de Doutor



# A Invenção da Cromatografia

Tswett enfatizou que as substâncias cromatograficamente separadas, são ao menos tão puras quanto às obtidas por meios tradicionais, como reações químicas, destilação e recristalização

O químico alemão **Willstätter**, “competidor” de Tswett no estudo da clorofila, publicou livro em 1913 sobre o assunto, o trabalho o levou a receber o prêmio Nobel de química em 1915, tornando-o a principal referência no assunto. No livro, Willstätter afirma que a cromatografia de Tswett era uma estranha maneira de se obter compostos puros, e que ele jamais lidou com substâncias puras

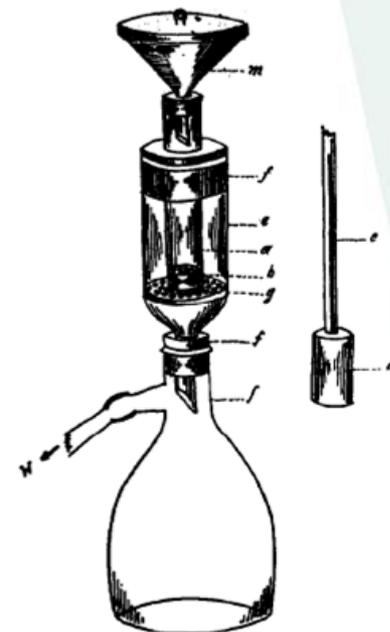
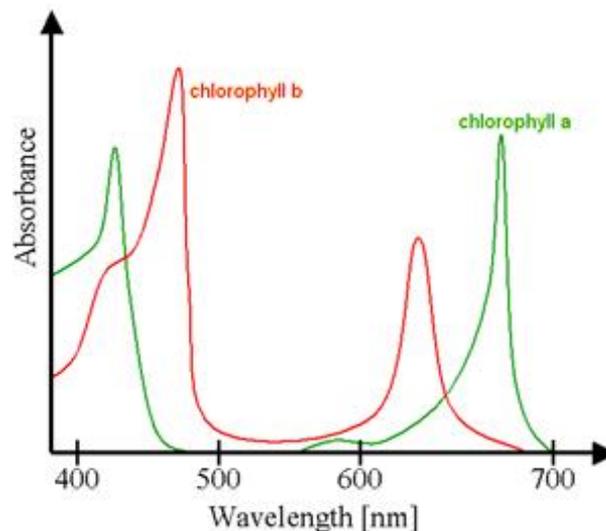
**Período de dormência da cromatografia**

# A Invenção da Cromatografia

**Wladyslaw Franciszek de Rogowski** (1886-1945), em 1914, conseguiu isolar as clorofilas a e b além de alguns carotenoides para seus estudos espectroscópicos

Os espectros obtidos por Rogowski, apresentados em sua tese, são notavelmente mais puros do que os apresentados por Willstätter em suas publicações

Estudos posteriores provaram que a clorofila b isolada por Willstätter apresentava contaminação da ordem de 15% com a clorofila a



No início de 1930 a técnica descrita por Tswett foi difundida

# A cromatografia Gasosa

**Martin e Synge** em 1941

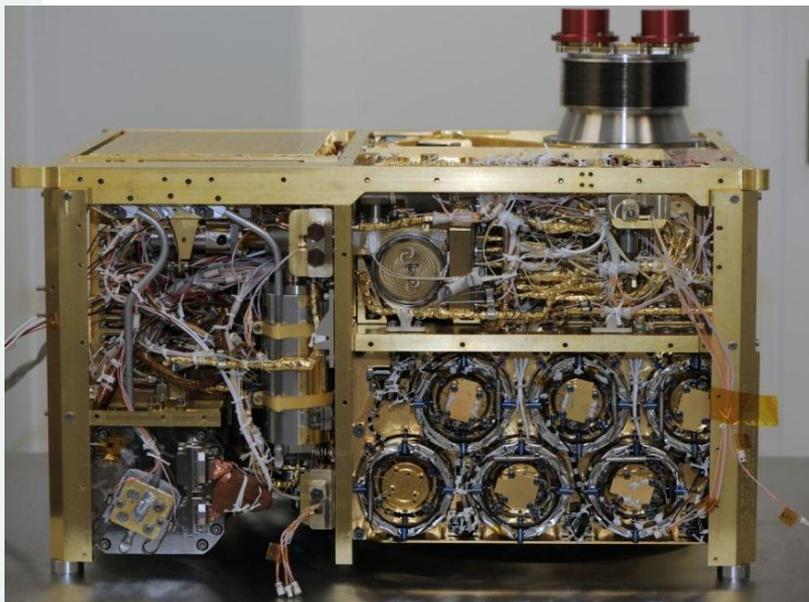
Ideia de saturar sílica com água e então usá-la como fase estacionária. Desta maneira a fase estacionária seria um líquido imobilizado, agindo a sílica apenas como um suporte, e a fase móvel seria outro líquido imiscível em água. A separação era fundamentada na diferença de partição das substâncias entre as duas fases líquidas, e não mais na adsorção

**“A fase móvel não necessariamente precisa ser um líquido, mas pode ser um vapor... Separações muito refinadas de substâncias voláteis podem ser conseguidas em uma coluna onde um gás permanente seja forçado a fluir através de gel impregnado com um solvente não volátil...”**

Em 1952 são agraciados com o prêmio Nobel de Química pela invenção da cromatografia de partição

# A cromatografia Gasosa

Os cromatógrafos gasosos estão de tal maneira difundidos que existe um equipamento funcionando remotamente na superfície de Marte para estudos de composição do solo e atmosférica, acoplado como instrumento de bordo do jipe *curiosity* da Nasa, que aterrissou no planeta em 2012



# O cromatógrafo de Moore e Stein

A dupla de cientistas do Laboratório do Instituto Rockefeller de Pesquisas Médicas de Nova York **Stanford Moore** e **William Howard Stein**

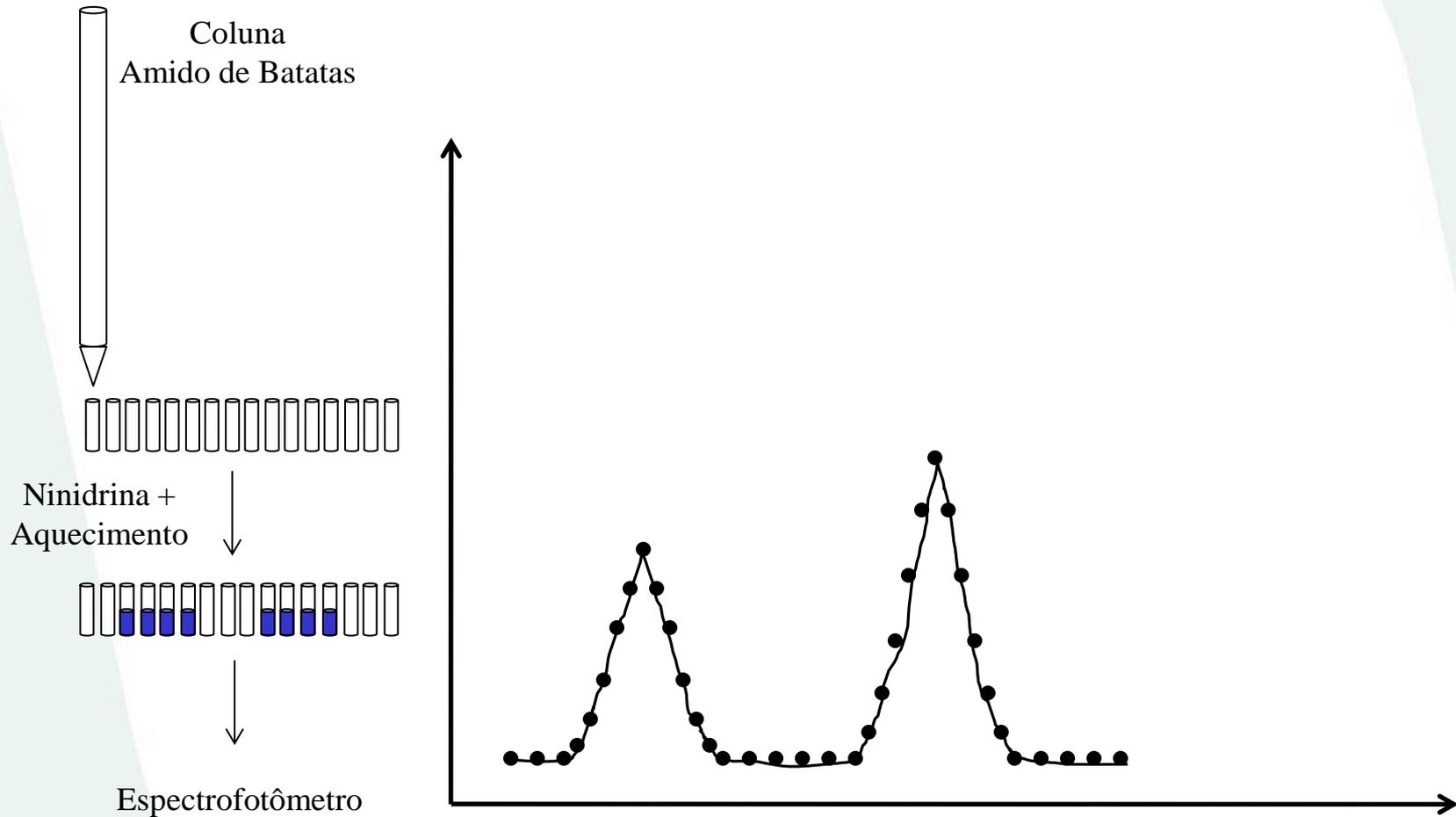


# O cromatógrafo de Moore e Stein

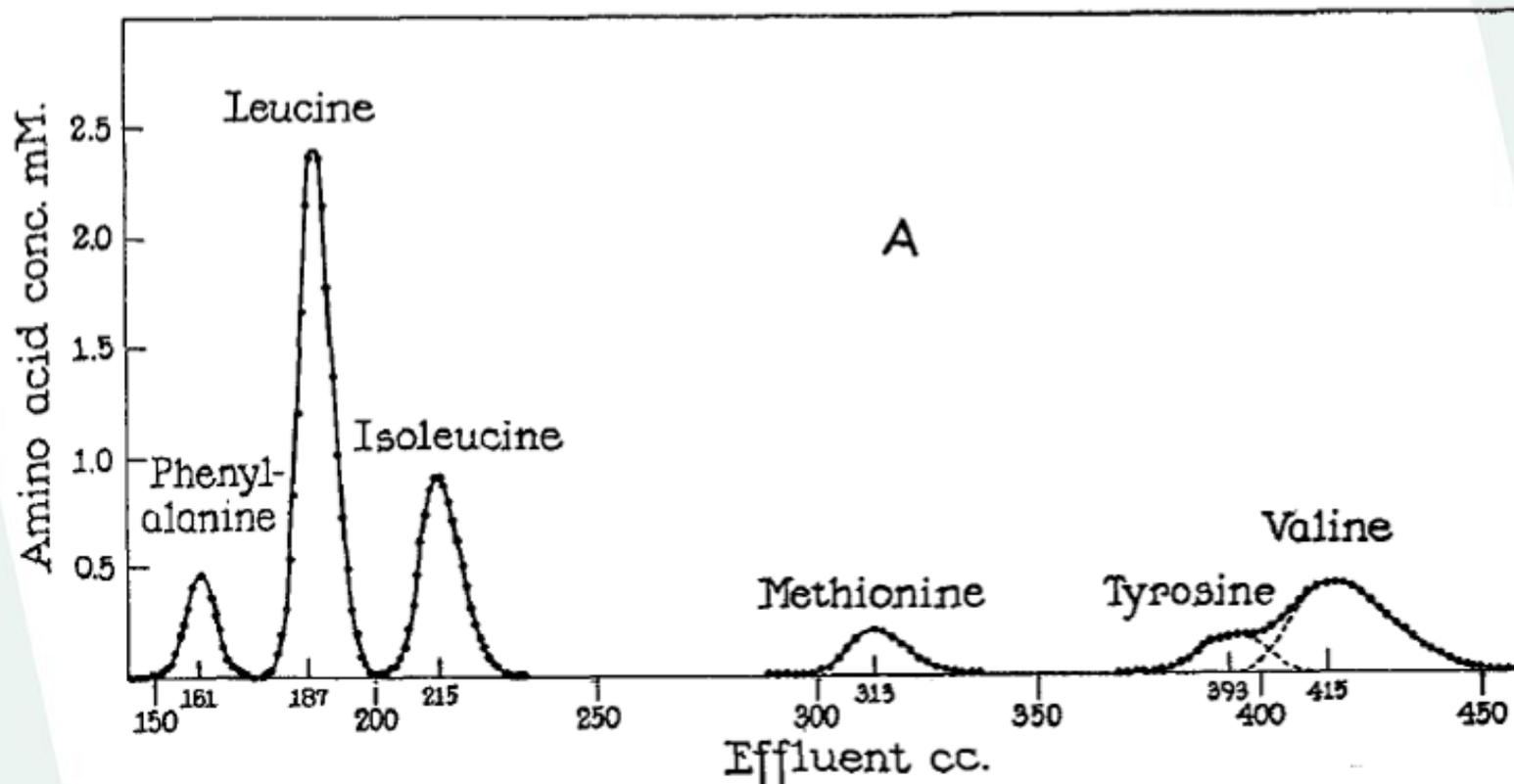
O trabalho de Stein e Moore com a elucidação da sequência de aminoácidos da enzima ribonuclease, bem como de sua estrutura espacial, levou ambos a dividirem com **Christian B. Anfinsen** o Prêmio Nobel de Química de 1972

As colunas eram preparadas com amido de batatas, tinham aproximadamente 30 centímetros de comprimento por 0,9 de diâmetro, o cuidado com sua preparação permitiram resultados excelentes de reprodutibilidade

# O cromatógrafo de Moore e Stein



# O cromatógrafo de Moore e Stein



Para realizar uma corrida típica, era necessária a coleta das frações durante aproximadamente 7 dias

# O cromatógrafo de Moore e Stein

Inicialmente, as frações eram coletadas manualmente

Com o tempo foi desenvolvida uma máquina capaz de coletar automaticamente as frações

As frações eram coletadas em tubos de ensaio colocados em um rack contendo até 320 tubos dispostos em círculos concêntricos

Cada gota de efluente da coluna atravessava um feixe de luz, deste modo o mecanismo contava automaticamente o número de gotas

Ao chegar ao número de gotas estabelecido, um motor fazia o rack girar para o próximo tubo, desta maneira era possível coletar frações de 0,5mL

O artigo traz detalhes, plantas, marcas e modelos dos componentes utilizados para a construção do coletor de frações

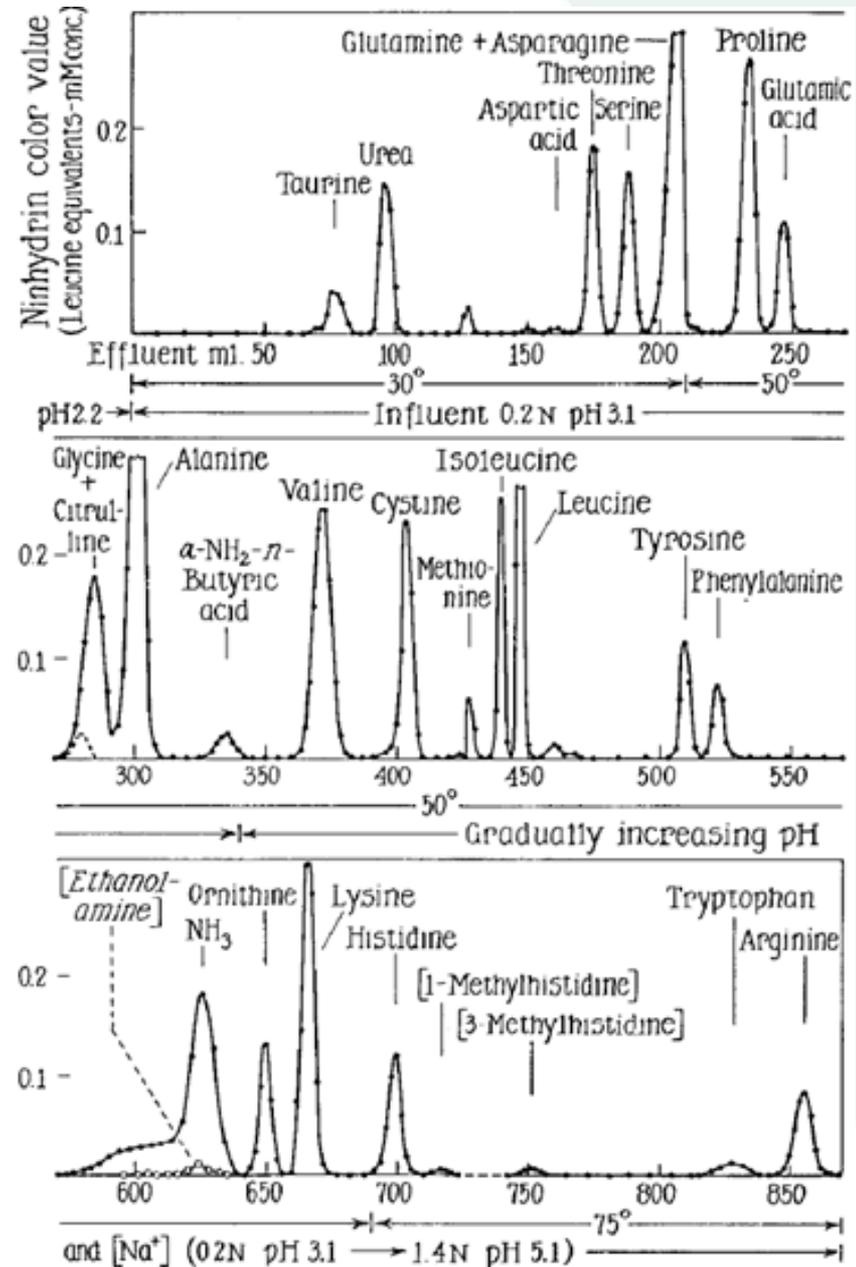


# O cromatógrafo de Moore e Stein

Moore e Stein iniciam estudo para otimização da separação quantitativa de aminoácidos em resina de troca iônica

As colunas assim preparadas tinham a vantagem de poderem ser reutilizadas, bastando reequilibrá-las com a fase móvel inicial utilizada para a separação

A análise se mostrou duas vezes mais rápida, tendo a separação completa dos aminoácidos em 5 dias



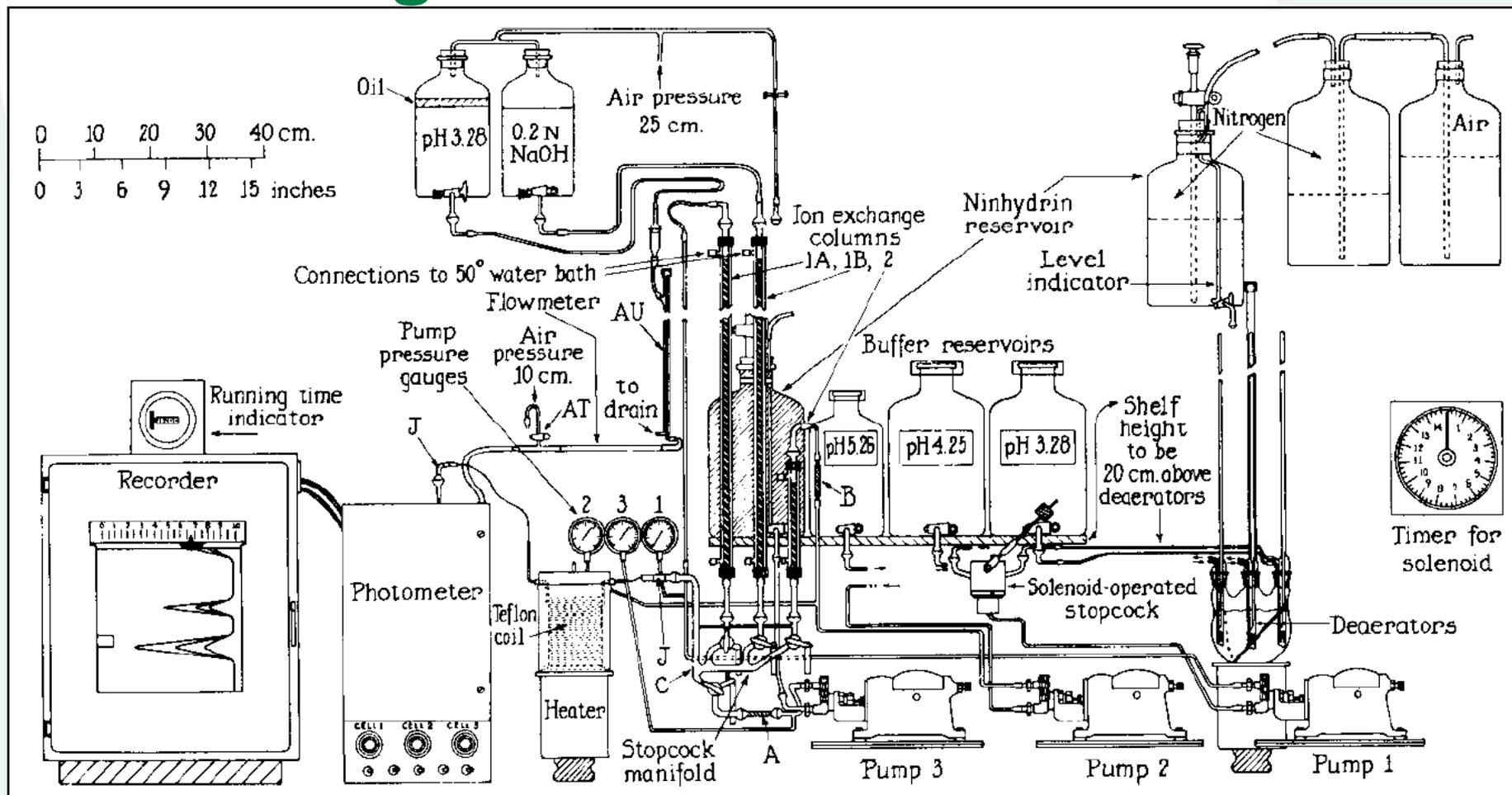
# O cromatógrafo de Moore e Stein

Após uma série de publicações com os resultados de investigações bioquímicas, que se utilizaram da cromatografia em resinas de troca iônica para determinações de aminoácidos e peptídeos hidrolisados de enzimas, a dupla de pesquisadores volta a relatar os avanços práticos da metodologia alcançados durante suas pesquisas. São de 1958 duas publicações que apresentam os detalhes do método e da instrumentação construída

Com a utilização de resinas com tamanho de partícula menores, foi possível aumentar o fluxo da fase móvel para valores superiores a 30mL/hora. Para isso, foi necessária a utilização de uma bomba posicionada entre a coluna e o frasco de tampão, ao invés da pressurização dos frascos de eluente com ar. As tubulações e conexões também foram trocadas por material capaz de suportar as maiores pressões geradas pelo sistema de bombeamento

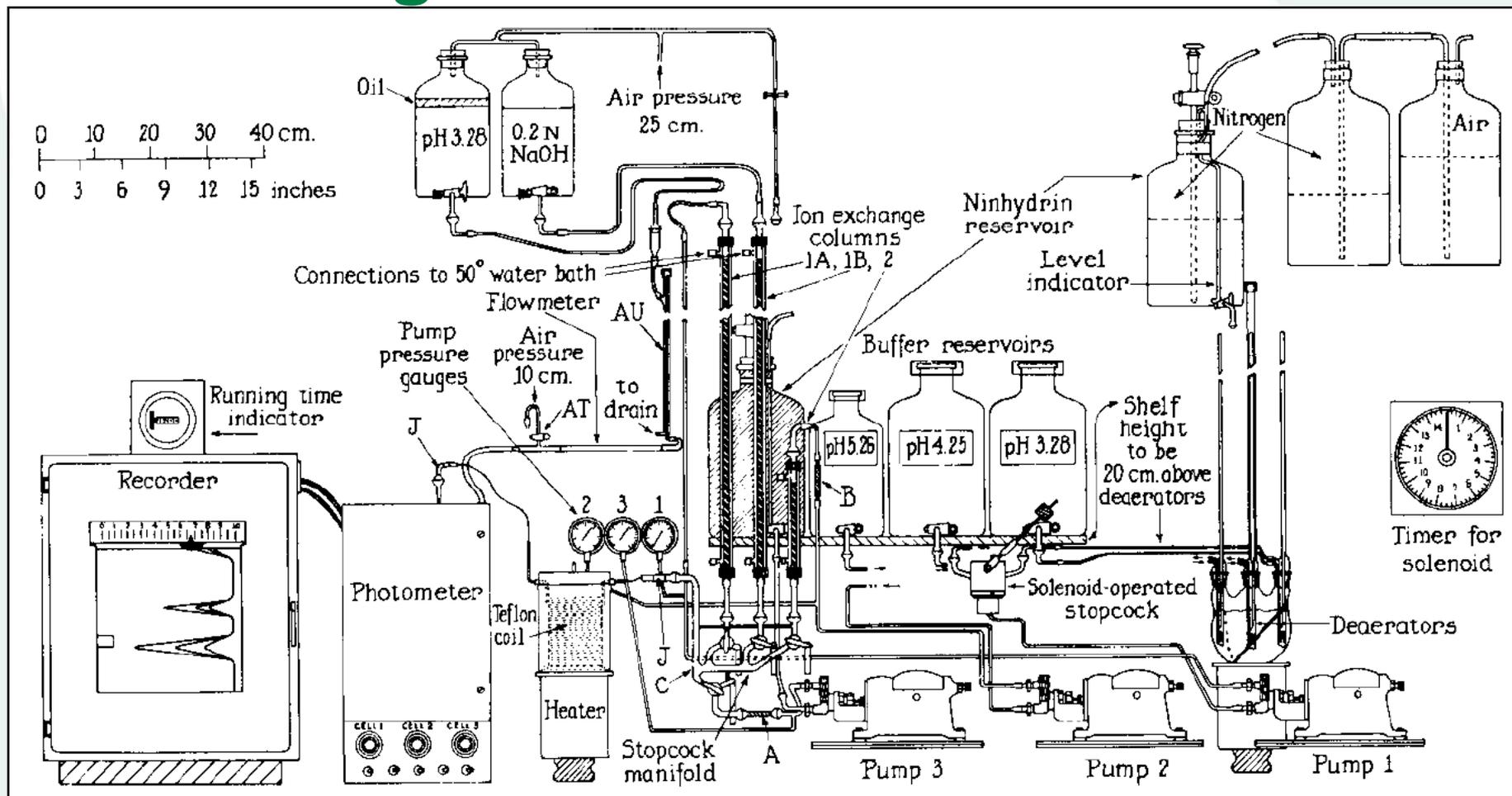
O equipamento construído foi fruto da necessidade de um método mais preciso, rápido e menos trabalhoso. A análise completa de aminoácidos era agora realizada em apenas 24 horas, com grau de automação que exigia atenção mínima do operador

# O cromatógrafo de Moore e Stein



O fluxo passava por deaeradores, a fim de remover o ar dissolvido e evitar a formação de bolhas de ar quando a solução era misturada ao fluxo de ninidrina. A remoção do ar era realizada por aquecimento, o ar removido era liberado através de um longo tubo que funcionava ainda como condensador para os vapores liberado da solução.

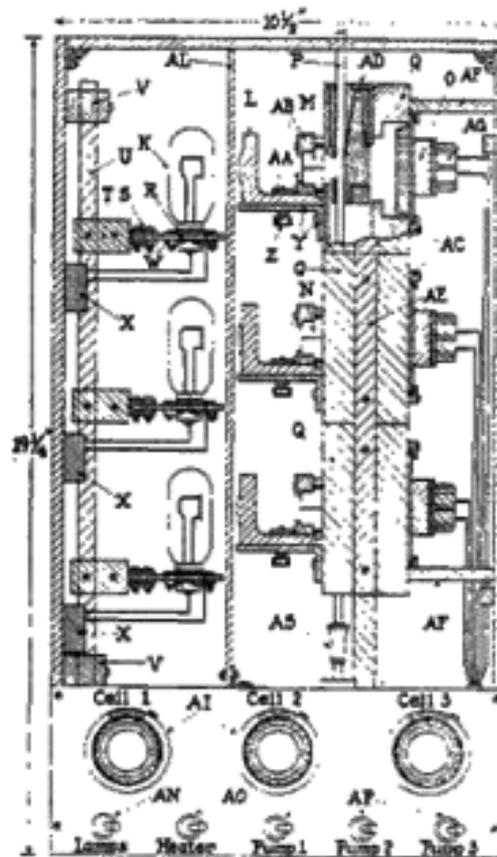
# O cromatógrafo de Moore e Stein



O fluxo da mistura do efluente da coluna e da solução de ninidrina proveniente da válvula de vidro era conduzido para uma bobina construída com um tubo de teflon de 29 metros de comprimento e 0,7 milímetros de diâmetro interno. A bobina era mantida submersa dentro de um banho de aquecimento a 100°C.

# O cromatógrafo de Moore e Stein

Depois de passar pelo reator, o fluxo de efluente era direcionado diretamente a um fotômetro. O fotômetro utilizado foi projetado e construído no próprio Instituto Rockefeller e sempre que possível foram utilizados componentes disponíveis comercialmente. A montagem consistia em três fotômetros individuais em uma mesma unidade, cada um com sua própria fonte de luz, lente, filtro, célula de absorção e célula fotovoltaica.



# O cromatógrafo de Moore e Stein

As três células foram montadas de modo a se obter todos os dados necessários com apenas uma análise

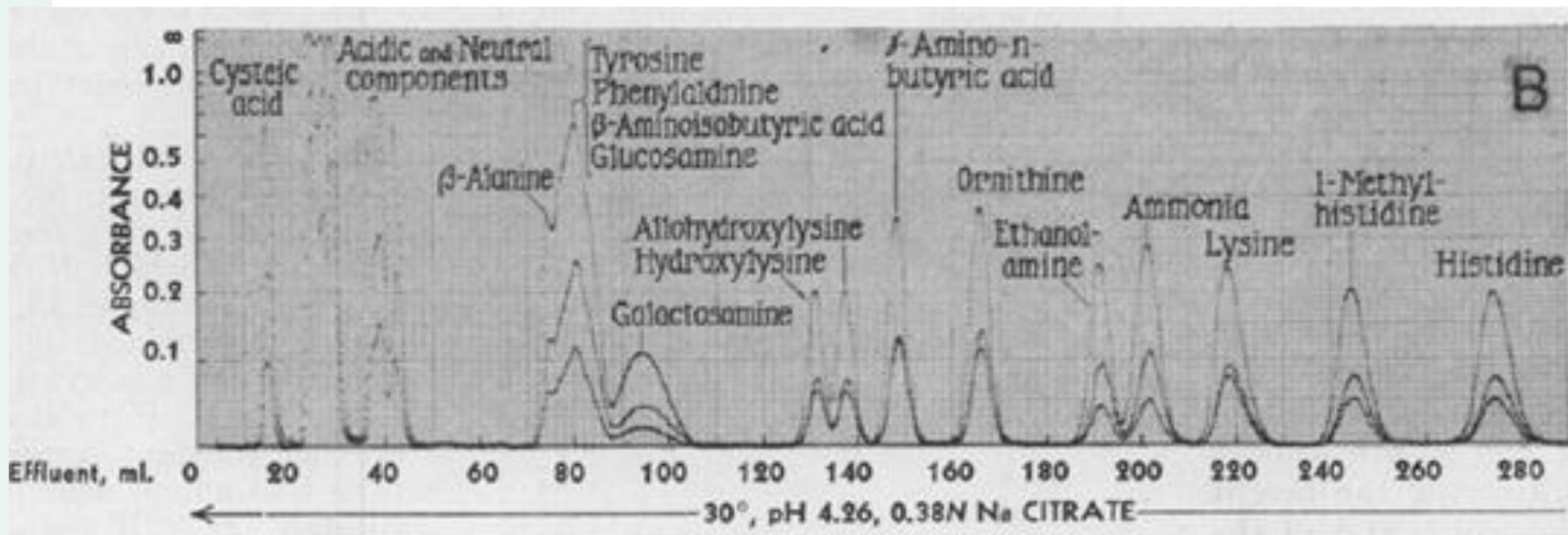
Duas células tinham filtros em comprimento de onda de 570nm, e a outra em 440nm

Com essa montagem, era possível determinar a absorção no comprimento máximo dos derivados azuis de aminoácidos (570nm) e dos derivados amarelos formados pela prolina e hidroxiprolina (440nm)

A terceira célula, com filtro em 570nm, diferia-se da outra pela espessura do caminho ótico, que sendo mais estreito permitia a detecção de altas concentrações de derivados de aminoácidos, aumentando assim a faixa de trabalho do detector

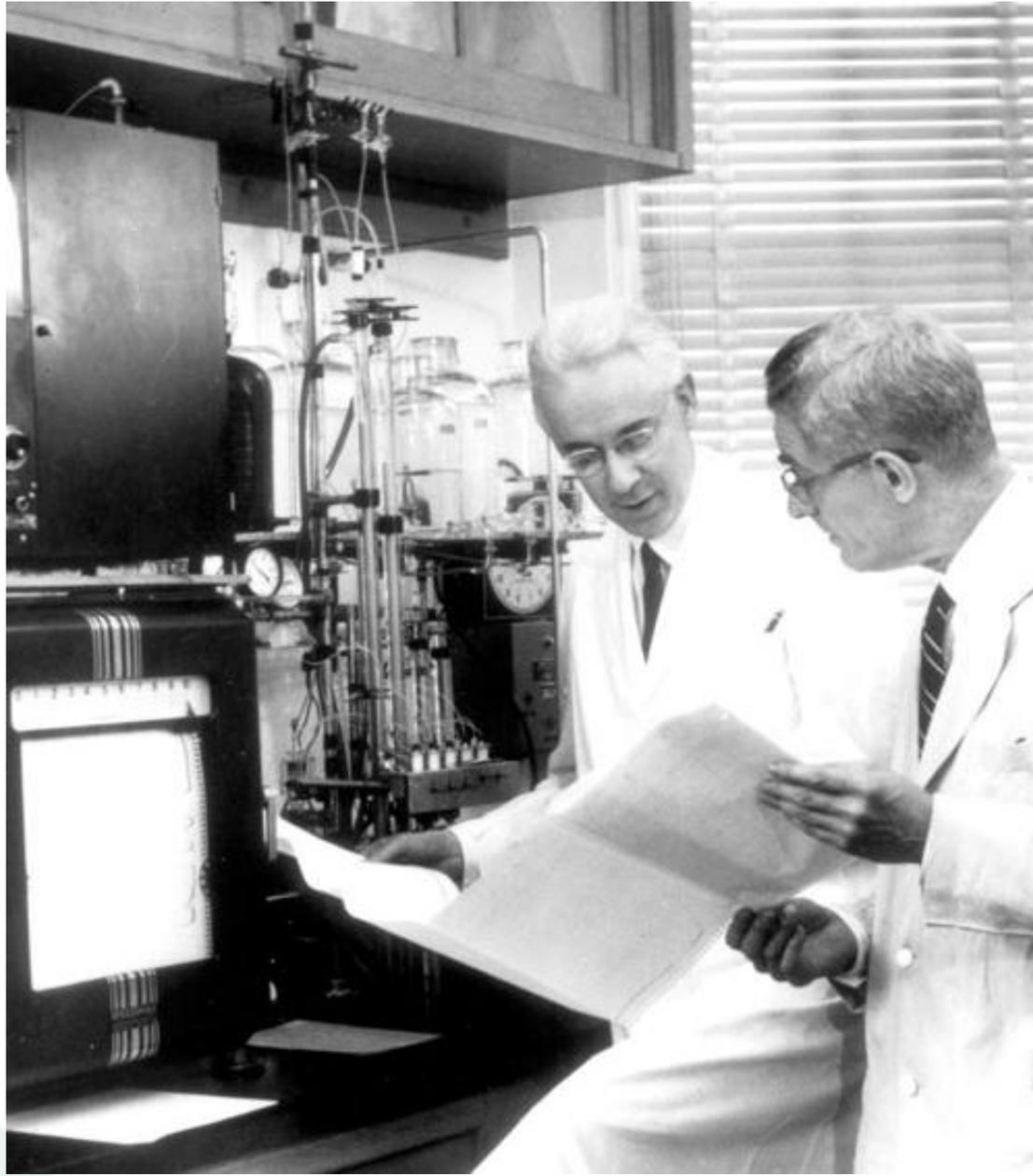
# O cromatógrafo de Moore e Stein

O registrador utilizado estava comercialmente disponível, consistia em um medidor de corrente de três pontos com velocidade de papel de 7,6 centímetros por hora. Dessa maneira, os dados dos três fotômetros individuais eram impressos simultaneamente em cores diferentes, sendo que a cada 4 segundos um valor de leitura era registrado através de um ponto



Separações mais rápidas exigiriam fluxos maiores e altas pressões, o sistema de vidro teria que ser substituído por aço

# O cromatógrafo de Moore e Stein



# O cromatógrafo Comercial

## HPLC

No início, os equipamentos eram chamados de cromatógrafos líquidos de alta pressão, isto porque altas pressões são necessárias para mover o líquido através da coluna quando comparado aos cromatógrafos gasosos. Logo, o termo pressão foi substituído por eficiência, e até os dias de hoje é utilizado

**HPLC = *High Pressure Liquid Chromatography***

**HPLC = *High Performance Liquid Chromatography***

Como a instrumentação não existia comercialmente em 1968, vários autores descreveram em detalhes como modificar e montar um equipamento de cromatografia líquida com componentes disponíveis. Em 1969, durante o 5º Simpósio sobre avanços em cromatografia, uma sessão especial sobre CLAE foi organizada e algumas companhias apresentaram suas instrumentações

# O cromatógrafo Comercial

## HPLC

Como os preços dos sistemas cromatográficos em fase líquida eram muito superiores aos dos já difundidos cromatógrafos em fase gasosa:

**HPLC = *High Price Liquid Chromatography***

Mais tarde, com a difusão dos sistemas cromatográficos, a discussão tomou rumos de anedota:

**HPLC = *High Patience Liquid Chromatography***

O que pode ser explicado pela dificuldade de adaptação dos usuários de cromatógrafos gasosos, que ao iniciarem com os novos sistemas de CLAE deparavam-se com vazamentos de solventes, bolhas de ar, e com o fato da fase móvel agora não ser mais inerte, interferindo ativamente na separação das substâncias. Não bastasse, ainda existia a necessidade de um sistema de bombeamento do solvente através da coluna, o que não existe em cromatógrafos gasosos pelo fato da fase gasosa apresentar-se pressurizada em cilindros. A adaptação exigia muita dedicação e paciência dos usuários

# Fases estacionárias

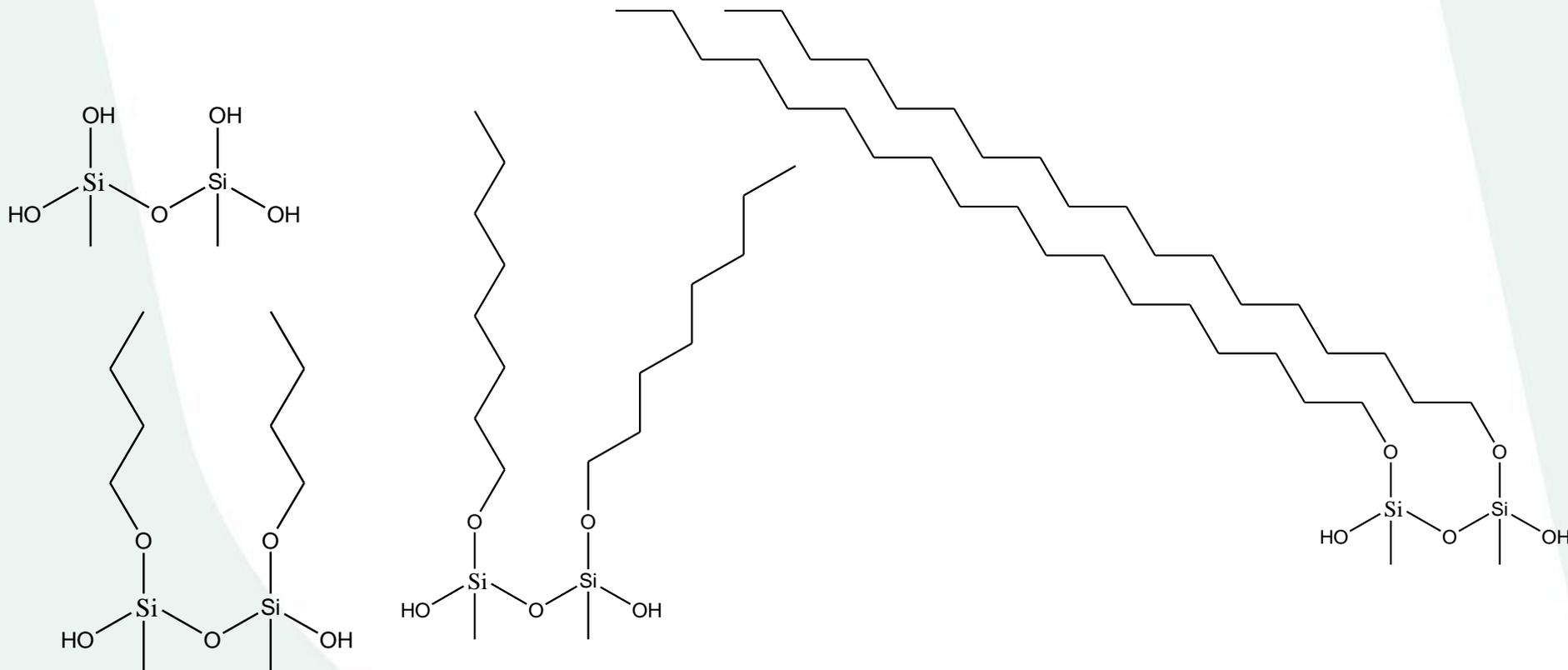
No início da década de 1970, estavam disponíveis no mercado apenas partículas grandes para a fabricação de colunas. Para melhorar a eficiência, partículas de sílica foram revestidas com fina camada ativa em sistemas de partição líquido-líquido, no entanto, sérios problemas de estabilidade das fases assim construídas não permitiram a disseminação da técnica

O problema é que esta tecnologia não funcionou bem para colunas de cromatografia líquida, o fluxo da fase móvel acabava dissolvendo a fase estacionária, conseqüentemente as separações apresentavam sérios problemas de reprodutibilidade.



# Fases estacionárias

A disponibilidade de partículas de sílica de aproximadamente 10 $\mu$ m e o surgimento da técnica de modificação química das fases estacionárias, em especial as fases reversas octadecilsilano (C<sub>18</sub>) e octil (C<sub>8</sub>), foram os responsáveis pela construção de colunas robustas e de grande seletividade. A evolução das fases estacionárias foi contínua e rápida, o que aumentou exponencialmente as aplicações e a popularização dos sistemas de separação



# Fases estacionárias

Em 1975, a tecnologia de empacotamento e a redução do tamanho da partícula ( $5\mu\text{m}$ ) aumentaram a eficiências das colunas

Em 1978, as partículas chegaram a  $3\mu\text{m}$  e a  $1,5\mu\text{m}$  em 1990

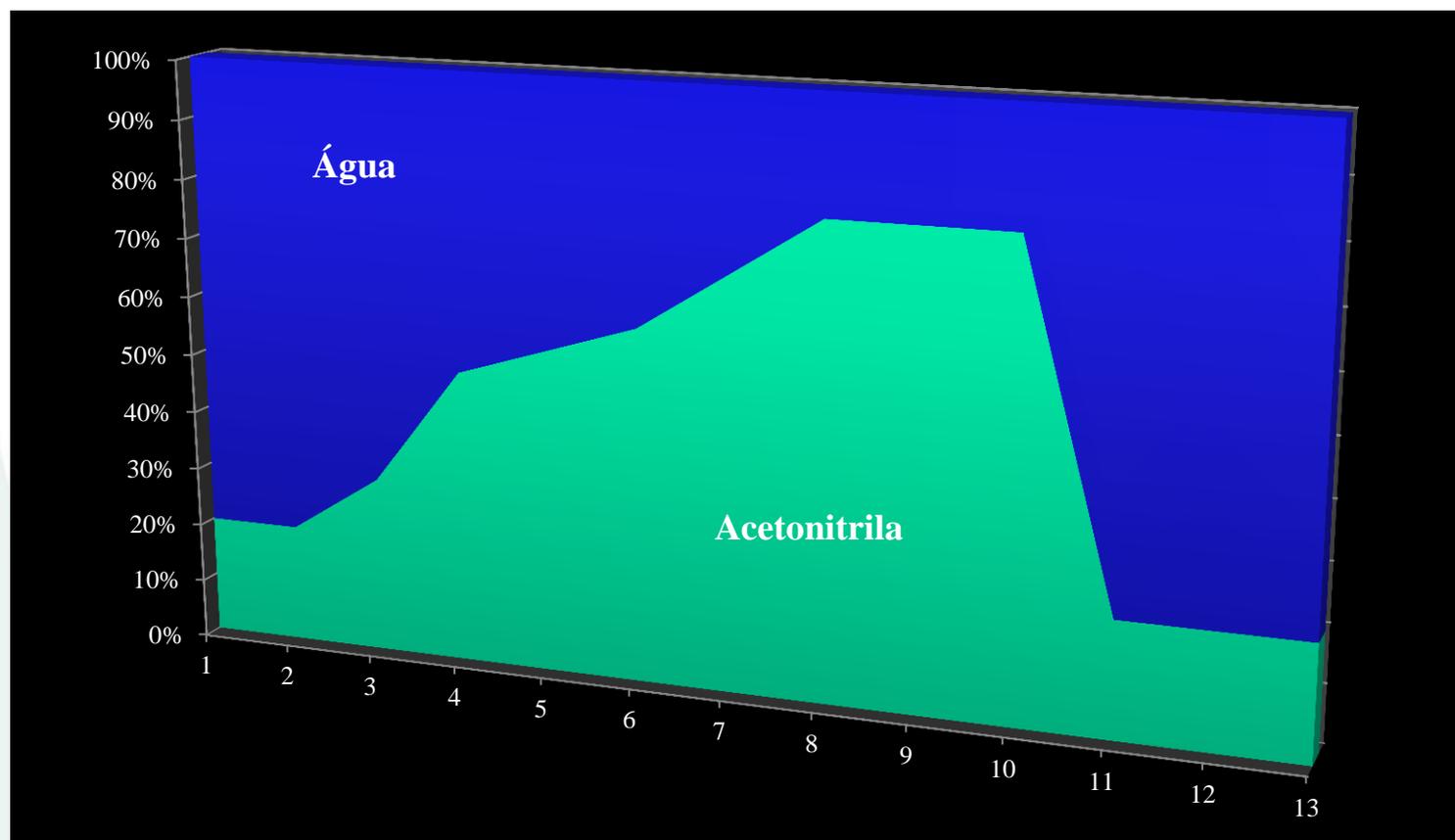
A evolução dos equipamentos e a necessidade da indústria, em especial a química e farmacêutica, levou os sistemas cromatográficos CLAE a serem a terceira maior força, em presença de equipamentos nos laboratórios, perdendo apenas para balanças e pHmetros



# Modos de Eluição

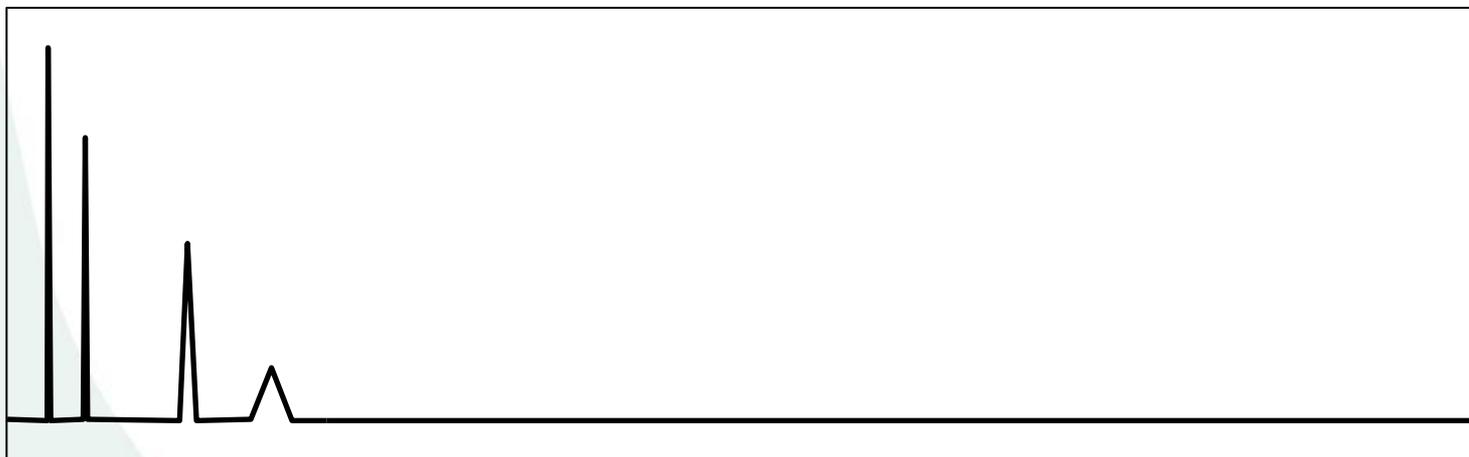
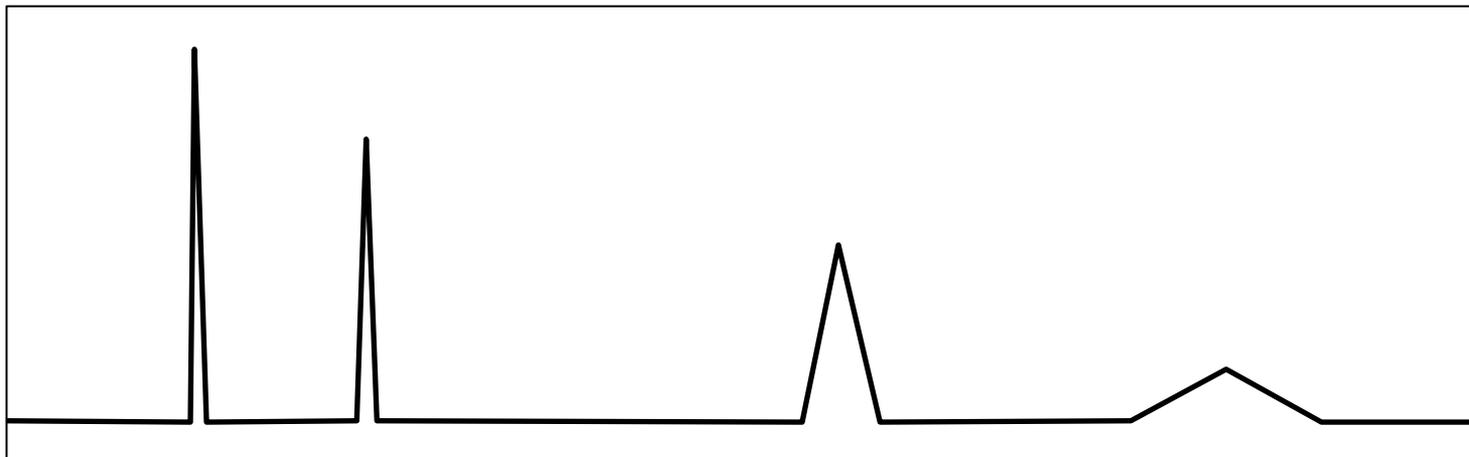
Isocrático – A composição da fase móvel não se altera ao longo da análise

Gradiente - A composição da fase móvel se modifica ao longo da análise



# Modos de Eluição

Gradiente x Isocrático



# Sidney Pacheco

## Embrapa Agroindústria de Alimentos Laboratório de Cromatografia Líquida

[sidney.pacheco@embrapa.br](mailto:sidney.pacheco@embrapa.br)  
[www.cromatografialiquida.com.br](http://www.cromatografialiquida.com.br)



Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

