

**CEFET-QUÍMICA**  
**Unidade Rio de Janeiro**  
**ANÁLISE INSTRUMENTAL**  
**CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO**

## 1- INTRODUÇÃO

Nenhum registro das técnicas cromatográficas contemporâneas fica completo se não incluir a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). É um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sobre altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade. Somente a partir dos anos 70 se conseguiu um avanço considerável da cromatografia líquida moderna que até então era essencialmente subdesenvolvida, apesar de que um dos primeiros experimentos sobre cromatografia, no início do século, foi o tipo que é hoje chamado cromatografia líquida clássica. O avanço foi gradual e atingiu o atual nível de sofisticação que a CLAE apresenta, devido ao revolucionário desenvolvimento tecnológico da prática deste tipo de cromatografia. Desde 1968 tornou-se possível recheiar colunas com partículas de pequeno tamanho, necessárias para alta resolução e, também, adquirir equipamentos que funcionam nas altas pressões necessárias para obter uma boa velocidade de eluição. Nos últimos dez anos ocorreu o desenvolvimento de vários detectores espectrofotométricos que operam em comprimentos de onda variável até 190 nm, e houve um aumento na utilização dos detectores por fluorescência, eletroquímicos, e por fluorescência induzida por laser, bem como acoplamento com o espectrômetro de massas. Com estes, tornou-se possível a detecção da maioria dos compostos e a análise de traços em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, petróleo, etc. Hoje em dia são comuns estudos com partículas pequenas, a execução da CLAE com fase reversa e, particularmente, o uso de equipamentos para uma perfeita eluição com gradiente, bem como de métodos especiais, tais como a formação de pares iônicos. Como resultado, dificuldades anteriores ou separações difíceis de compostos como corantes polares, isômeros, drogas básicas e seus metabólitos são agora rotina.

## 2- O PROCESSO CROMATOGRÁFICO

O processo cromatográfico consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. No caso da cromatografia gasosa o fluido é um gás e na cromatografia líquida o fluido é um solvente. Na cromatografia líquida a fase estacionária é constituída de partículas sólidas empacotadas em uma coluna, a qual é atravessada pela fase móvel. São as forças físicas e químicas que atuam entre os solutos e as duas fases são responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e portanto a separação dos solutos individuais. As forças elementares que agem sobre as moléculas são de cinco tipos:

- 1) Forças de dispersão de London ou forças de Van der Waals;
- 2) Interações de dipolo induzido;
- 3) Ligações de hidrogênio;
- 4) Interações dielétricas;
- 5) Interações eletrostáticas e coulombianas.

As variáveis que afetarem essas forças intermoleculares iram influenciar o grau de separação obtido pela passagem dos solutos através da coluna cromatográfica.

## **2.1 - CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CLÁSSICA X CLAE**

Na cromatografia líquida clássica (CLC) o recheio da coluna é utilizado geralmente uma só vez, porque parte da amostra usualmente se adsorve de forma irreversível. O enchimento da coluna deve ser repetido para cada separação. A aplicação da amostra, para ser feita corretamente, requer alguma habilidade, fatos que representam um desperdício de material e tempo. A vazão de eluente na CLC é promovida pela ação da gravidade e as frações individuais da amostra são coletadas manualmente ou através de um coletor de frações. As separações requerem, geralmente, várias horas e a detecção e a quantificação das frações são realizadas por análise manual. Na CLAE emprega-se um coluna fechada, reaproveitável; portanto, até centenas de separações individuais podem ser realizadas com a mesma coluna. Essas colunas são muito eficazes, mas oferecem uma grande resistência à vazão da fase móvel, ou seja, ela sofre uma perda de carga. Por esta razão é necessário empregar sistemas de bomba de alta pressão (até 400 bars) que fazem a fase móvel migrar a uma velocidade razoável através da coluna. A vazão da fase móvel é controlada facilmente, resultando em operações mais reprodutíveis, que tornam as análises executadas por CLAE mais precisas. Vários tipos de detectores, que podem ser colocados na saída da coluna, proporcionam uma identificação e quantificação contínua dos componentes da amostra. A análise quantitativa pela CLAE pode atingir uma precisão superior a + 0.5%. Finalmente, separações em escala preparativa de miligramas de amostras são relativamente fáceis.

## **2.2 - CROMATOGRAFIA GASOSA X CLAE**

Na cromatografia gasosa (CG) é necessário que a amostra seja suficientemente volátil, a fim de que possa passar através da coluna na forma de vapor, e estável termicamente para não se decompor nas condições de separação. Os métodos de detecção utilizados em CG são mais rápidos e sensíveis, a aparelhagem mais fácil de ser manipulada e em geral mais barata. A CLAE requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel. Assim, a CLAE é um método ideal para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico e produtos naturais lábeis, bem como uma imensa variedade de outros compostos de alta massa molecular e/ou baixa estabilidade térmica. A CLAE possui como vantagens adicionais: duas fases cromatográficas de interação seletiva com as moléculas da amostra, versus somente uma na CG e maior variedade de possíveis mecanismos de separação. As principais características de ambas as técnicas estão resumidas na Tabela 1. E a conclusão que pode ser tirada sobre elas e que se complementam na análise de diferentes tipos de amostras.

**Tabela 1- Características da CG e da CLAE**

Quesito	CG	HPLC
Amostra	Amostra ou derivado volátil; termicamente estável nas condições de operação	Amostra solúvel na fase móvel
Tipos de amostra	Gases, líquidos e sólidos: MM de 2 até 1200	Líquidos e sólidos: MM de 32 até $4 \times 10^6$
Quant. mínima detectável	$10^{-12}$ g	$10^{-9}$ g
Capacidade preparativa	Baixa e trabalhosa	Boa, com fácil coleta e possibilidade de automação
Capacidade analítica	Excelente, com separação de amostras com cerca de 200 componentes	Excelente, com separação de amostras com até 50 componentes
Pratos teóricos por coluna	2000 – 300.000	500 – 25.000

A Tabela 2, cita algumas vantagens e limitações da CLAE;

**Tabela 2- Vantagens e limitações da CLAE**

Vantagens	Limitações
Menor tempo de análise	Alto custo da instrumentação
Alta resolução	Alto custo de operação
Resultados quantitativos	Pouco usada para análises qualitativas
Boa sensibilidade	Falta de detector universal sensível
Versatilidade	Necessidade de experiência no seu manuseio
Automação	

### 3- CARACTERÍSTICAS DAS FASES ESTACIONÁRIAS EM CLAE

Considerando as suas propriedades físicas, os recheios para CLAE podem ser classificados de acordo com os seguintes aspectos:

- a) Sólidos rígidos, semi-rígidos ou não rígidos;
- b) Partículas porosas ou peliculares;
- c) Partículas esféricas ou irregulares;
- d) Partículas com diferentes diâmetros.

Sólidos rígidos a base de sílica são os recheios mais usados atualmente. Esses recheios podem resistir a pressões relativamente altas, resultando em enchimento estável e colunas eficientes de partículas pequenas.

Sólidos semi-rígidos são geralmente constituídos de partículas porosas de poliestireno entrecruzadas com divinilbenzeno. O semi-rígido tem sido usado para pressões até 350 bars. O maior interesse no semi-rígido atualmente é para aplicações na CLAE por exclusão com fase móvel orgânica; contudo eles também são usados na troca iônica.

Sólidos não rígidos, tais como agarose ou dextrose, usados em cromatografia por exclusão, são aplicados exclusivamente para a separação de moléculas grandes, solúveis em água, como as proteínas. Contudo, estes sólidos não rígidos não podem resistir as pressões usadas na CLAE. Os dois tipos de materiais, peliculares e porosos, diferem em algumas de suas propriedades e têm muitas outras em comum. Ambos podem ser introduzidos na coluna com certa facilidade, obtendo-se colunas muito eficazes. Elas podem ser utilizadas em cromatografia líquido-sólido, dependendo da atividade da sua superfície ou pode ser recoberto com alguma fase líquida e obter-se uma coluna para CLAE com fase quimicamente ligada. Além destes tem-se os materiais de recheio do tipo pelicular ou poroso para cromatografia por troca iônica. A Figura 1 apresenta esquematicamente algumas formas mais comuns de partículas para cromatografia de líquidos.

Os adsorventes peliculares, com diâmetro de partícula entre 30 e 45  $\mu\text{m}$ , apresentam eficiência, rapidez, reprodutibilidade e custo similar aos adsorventes porosos (5 - 10  $\mu\text{m}$ ), mas têm menor capacidade e, por isto, o seu emprego tem diminuído notavelmente nos últimos anos (Figura 2).



Figura 1- Formas mais comuns de partículas para cromatografia de líquidos.

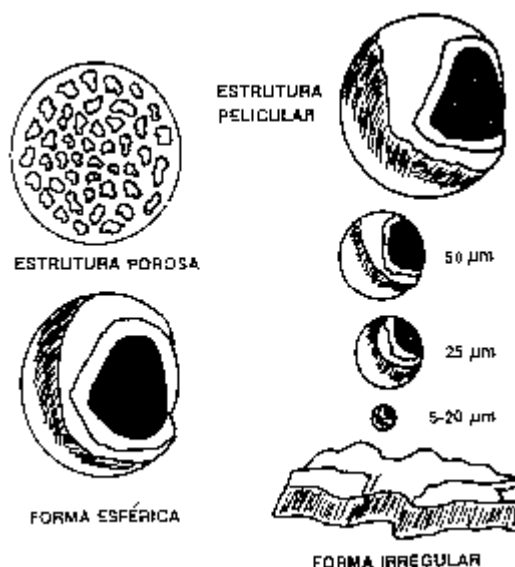


Figura 2- Diferentes formas e tamanhos dos materiais para empacotamento de colunas.

Para obter distribuição homogênea do recheio em toda extensão da coluna, o que aumenta a eficiência da separação, as partículas devem ter a menor variação de diâmetro possível. As partículas esféricas são melhores do que as irregulares, mas estas têm menor custo.

O tamanho da partícula controla o processo de difusão das moléculas da amostra ao penetrar e sair dos poros da partícula. Quanto maior o tamanho da partícula porosa, mais lento o processo de difusão e, como consequência, mais lenta a transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel. Isto acontece porque, à medida que aumenta o tamanho da partícula, aumenta também a profundidade dos poros e conseqüentemente a amostra demora mais tempo para sair destes poros profundos. Ao mesmo tempo deve-se considerar que um aumento da vazão da fase móvel, para obter-se análises rápidas, faz com que as moléculas da amostra nesta fase migrem rapidamente, em comparação com as da fase estacionária (independente dos poros). Isto resulta no alargamento dos picos. Conforme diminui o tamanho da partícula, a profundidade dos poros diminui e a saída dos poros acontece mais rapidamente, permitindo obter análises rápidas, sem perda na eficiência.

Estas explicações justificam porque na CLAE utilizam-se somente materiais porosos cujas partículas tem tamanho menor do que 30  $\mu\text{m}$ , com exceção da troca iônica.

Outros tipos de materiais utilizados são partículas esféricas, geralmente vítreas, não porosas, recobertas por uma camada muito fina de um adsorvente poroso. Este tipo de material é denominado de película de camada porosa, de porosidade superficial ou de centro não poroso. A Tabela 3, apresenta um resumo das propriedades gerais dos recheios peliculares e porosos em função dos tamanhos de suas partículas.

**Tabela 3- Características de diferentes recheios para CLAE.**

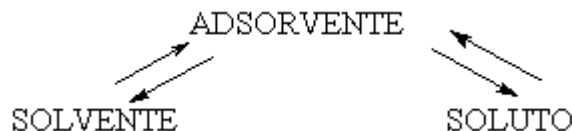
Propriedade	Irregulares ( > 30 $\mu\text{m}$ )	Porosos Esféricos ( > 30 $\mu\text{m}$ )	Esféricos ou Irregulares (5 ou 10 $\mu\text{m}$ )	Peliculares esféricos ( > 30 $\mu\text{m}$ )
Eficiência	Baixa a moderada	Baixa a moderada	Alta	Moderada a alta
Velocidade de análise	Moderada	Moderada	Rápida	Rápida
Facilidade de enchimento	Razoável	Boa	Razoável	Excelente
Quantidade de amostra	Grande	Grande	Grande	Pequena
Permeabilidade da coluna	Alta	Alta	Baixa	Muito alta
Capacidade	Alta	Alta	Alta	Baixa
Custo	Baixo	Moderado	Alto	Moderado a alto

#### 4- AS TÉCNICAS DA CLAE

Há cinco tipos de fases estacionárias com diferentes mecanismos que regem as separações cromatográficas na CLAE. Mediante a simples troca de coluna e fase móvel é possível utilizar um deles.

#### 4.1- CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-SÓLIDO OU POR ADSORÇÃO

O mecanismo de separação da cromatografia líquido sólido (CLS), ou adsorção, se baseia na competição que existe entre moléculas da amostra e as da fase móvel em ocupar os sítios ativos na superfície de um sólido (fase estacionária). O equilíbrio estabelecido é:



Para que a molécula do soluto possa ser adsorvida na fase estacionária, primeiro uma molécula da fase móvel deve ser deslocada da superfície. Se assumir que o adsorvente possui uma superfície polar (por exemplo: sílica ou alumina), grupos apolares (por ex.; hidrocarbonetos) terão pouca afinidade por essa superfície e não irão deslocar a molécula da fase móvel; por isso, não serão retidos. Grupos funcionais polares capazes de formar pontes de hidrogênio terão fortes afinidades pela superfície e serão fortemente retidos. Moléculas polarizáveis (por ex.: moléculas aromáticas) irão apresentar interação dipolo induzido-dipolo com a superfície do adsorvente e, portanto, também serão retidas; o grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional. É importante que as partículas da fase estacionária apresentem uma grande área de superfície, isto é, um grande número de sítios ativos. A atividade da superfície de muitos sólidos (incluindo a sílica e alumina) se encontra com frequência afetada pela retenção de certas moléculas de alta polaridade como álcoois, fenóis, água, etc., e, devido a eles, em determinadas ocasiões, é difícil reproduzir os resultados obtidos nas análises, porque as propriedades da superfície sofrem mudanças. Em consequência, a superfície da sílica empregada na CLAE é habitualmente submetida a determinados processos de desativação com o propósito de diminuir a retenção de moléculas muito polares e, assim, se mantém a superfície em condições uniformes, o que contribuirá para melhorar a reprodutibilidade das análises. Muitas vezes, devido a uma forte adsorção ou retenção de alguns componentes da amostra no sólido ativo, é necessário aumentar a polaridade da fase móvel de uma maneira constante e uniforme, com o qual se consegue um incremento de solubilidade dos componentes da amostra na fase móvel. A essa variação dá-se o nome de eluição por gradiente ou programação da fase móvel.

Para a maioria das separações realizadas por adsorção (CLS) usa-se partículas porosas, na faixa de 5-10  $\mu\text{m}$ , além de se empregar, às vezes, os materiais maiores (30-40  $\mu\text{m}$ ), como película porosa. Quase todas estas separações são limitadas a alguns tipos de adsorventes: sílica e alumina. A retenção e a separação nestes adsorventes são geralmente similares, os componentes mais polares da amostra serão retido preferencialmente.

Na modalidade de cromatografia por partição com fase líquida, é preferível usar suportes que sejam inertes; mas não existem suportes inertes com rigidez e uniformidade requeridas pela CLAE. Usa-se a sílica, sabendo-se que tem pontos adsorventes que necessitam ser completamente cobertos ou inativados, como em CG. Os poros deverão ser suficientemente

grandes para permitir total acesso das moléculas do soluto à fase estacionária contida dentro da estrutura dos poros, mas suficientemente pequeno para resistir a remoção do líquido estacionário pelo arraste mecânico da fase móvel.

A Tabela 4 apresenta uma lista de sólidos microporosos usados em cromatografia líquido sólido (CLS) e como suporte para cromatografia líquido-líquido (CLL).

**Tabela 4- Lista de sólidos microporosos para CLAE (CLS) e como suporte para CLAE (CLL)**

Tipo	Nome	Fornecedor	Diâmetro da partícula (µm)
Sílica (esférica)	ADSORBOSPHERE HS-Si	Alltech	3,5,10
	BAKERBOND-Si	J. T. Baker	3,5
	CHROMSPHERE	ChromPack	5
	LICHROSPHERE-Si	E. Merck	3,5,10
Sílica (irregular)	LICHROSORB-Si	E. Merck	5,7,10
Alumina (irregular)	LICHROSORB ALOX-T	E. Merck	5,10
Carbono grafitizado	HYPERCARB	Shandon	7
Polímero de estireno-divinilbenzeno	POLYSPHERE	E. Merck	10

#### **4.2- CROMATOGRAFIA LÍQUIDO-LÍQUIDO OU POR PARTIÇÃO**

A cromatografia líquido-líquido (CLL) foi desenvolvida por Martin e Synge em 1941 para separação de vários aminoácidos, usando fase estacionária de água em sílica e clorofórmio como fase móvel. O mecanismo de separação neste tipo de cromatografia, ou mecanismo de distribuição como também é chamado, baseia-se nas diferentes solubilidades que apresentam os componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. Então, os componentes mais solúveis na fase estacionária são seletivamente retidos por ela, enquanto os menos solúveis são transportados mais rapidamente pela fase móvel. O maior inconveniente desta técnica é a solubilidade da fase estacionária na fase móvel, o que rapidamente deteriora a coluna, levando a não reprodutibilidade nas separações repetitivas. Isto pode ser resolvido de duas maneiras. A primeira é saturando a fase móvel com a fase estacionária por meio de uma pré-coluna, colocada antes do injetor, que contenha uma alta percentagem de fase estacionária. A segunda é utilizando materiais que contenham a fase estacionária, quimicamente ligada a um suporte sólido.

#### **4.3- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM FASE LIGADA**

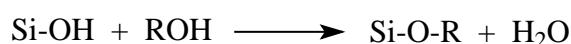
A fase estacionária para a cromatografia líquida com fase ligada (CLFL) surgiu como resposta aos problemas com a CLL. Como a fase estacionária é quimicamente ligada à superfície do suporte, não há mais solubilidade da fase estacionária na fase móvel. O mecanismo principal desta técnica baseia-se na partição. Por outro lado, como esta fase estacionária também apresenta influência de grupos ativos (polares) da superfície (isto é, também ocorre o mecanismo de

adsorção), a maioria dos pesquisadores considera esta técnica um método separado.

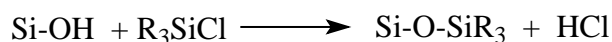
Variando a natureza dos grupos funcionais da fase estacionária é possível obter diferentes tipos de seletividade. Estes grupos podem ser polares, como o grupo amino (-NH<sub>2</sub>) e o grupo nitrilo (-CN), que funcionam similarmente às fases polares da CLS, sendo chamados de fase normal. E há os de natureza apolar, como os grupos octil (-C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>), octadecil (-C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>), fenil (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), etc., que são chamados de fase reversa. Na Tabela 5 encontram-se listadas fases estacionárias microporosas para CLFL e na Tabela 6 fases estacionárias peliculares para CLFL. Este tipo de cromatografia é muito útil e se aplica a moléculas de baixa ou média polaridade, não iônicas, de massa molecular inferior a 2000 e solúveis em solvente orgânico.

A superfície de sílica, que é o suporte mais popular, pode ser modificada por um destes caminhos, entre outros:

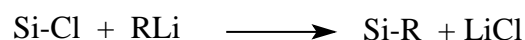
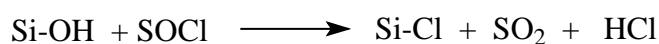
a) Formação do éster silicato (Si-O-R) por reação do grupo silanol com um álcool:



b) Formação de ligação siloxano (Si-O-SiR<sub>3</sub>) por reação do grupo silanol com um organoclorosilano:



c) Formação da ligação sílcio-carbono pelo tratamento do grupo silanol com cloreto de tionila, para produzir o cloreto, que, em seguida, reage com um composto organometálico para produzir um grupo orgânico ligado diretamente à superfície da sílica:



Estes materiais, quando preparados pelos métodos b e c têm, relativamente, uma grande estabilidade (até pH 8). O tipo éster, preparado pelo método a não é tão estável.

**Tabela 5- Fases estacionárias microporosas para CLAE com fase ligada (CLFL).**

Tipo	Nome	Fornecedor	Grupo ligado
Apolar	ADSOBOSPHERE C <sub>18</sub> ou C <sub>8</sub>	Alltech	Octadecil ou octil
	μBONDAPAK C <sub>18</sub>	Waters	octadecil
	PARTISIL ODS	Whatman	octadecil
Polaridade média	LICHROSORB CN	E. Merck	cianopropil
	HYPERSIL PHENYL	Shandon	fenil
	ZORBAX - CN	DuPont	cianopropil
Polaridade alta	BAKERBOND-NH <sub>2</sub>	J.T. Baker	alquilamina
	PARTISIL PAC	Whatman	ciano + diamina
	LICHROSORB-DIOL	E. Merck	alquidiol

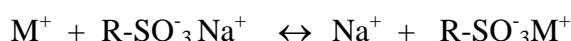
**Tabela 6- Fases estacionárias peliculares para CLAE com fase ligada (CLFL).**

Tipo	Nome	Fornecedor	Grupo ligado
Apolar	BONDAPAK C <sub>18</sub>	Waters	octadecil
Polaridade média	ZIPAC ANH	DuPont	alquilnitrila
Polaridade alta	ZIPAC PAM	DuPont	poliamida

Quando não é fácil manter todas as moléculas na forma não ionizadas, a cromatografia líquida por pares de íons (CLPI), uma forma especial de CLFL, pode ser usada. Nela, a amostra iônica ou ionizável forma um par de íons por associação com um contra-íon orgânico adequado e presente na fase móvel. O par de íons é então distribuído entre a fase estacionária, normalmente uma de fase reversa, onde o par de íons é solúvel, e a fase móvel, normalmente aquosa-orgânica, que solubiliza as espécies ionizadas. O equilíbrio envolvido confere um alto grau de solubilidade. A seletividade pode ser introduzida na separação pelo ajuste dos parâmetros de polaridade da fase móvel, pelo pH, pela natureza e concentração do contra-íon, e, em menor extensão, pela natureza da fase estacionária. A CLPI é uma alternativa à cromatografia por troca iônica e tem a vantagem de usar colunas de longa vida e maior reprodutividade. Além disso, a CLPI permite a determinação simultânea de compostos ácidos, básicos e neutros.

#### 4.4- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA POR TROCA IÔNICA

Na cromatografia por troca iônica (CTI), a fase estacionária possui grupamentos iônicos quimicamente ligados que podem ser trocadores de cátions ou de ânions. Esses grupamentos apresentam contra-íons que são deslocados pelos íons da amostra. Por exemplo, admitindo uma amostra com um cátion M<sup>+</sup>, tem-se:



Grupos quimicamente ligados, utilizados para troca iônica, são:

-SO<sub>3</sub><sup>-</sup> -trocadores fortes de cátions                      -NR<sub>3</sub><sup>+</sup> -trocadores fortes de ânions  
-CO<sub>2</sub><sup>-</sup> -trocadores fracos de cátions                      -NH<sub>2</sub>R<sup>+</sup> - trocadores fracos de ânions

As catiônicas são adquiridas comercialmente na forma de sais de sódio (Na<sup>+</sup>) ou de íon hidrogênio e as aniônicas na forma de cloreto (Cl<sup>-</sup>).

Os materiais usados como recheio para CLAE por troca iônica tem grupos (cátions ou ânions) quimicamente ligados a partículas porosas de resinas poliméricas, a sílica com camada pelicular, as micropartículas porosas de sílica e as micropartículas porosas de resinas poliméricas. Tradicionalmente, as partículas porosas de resina polimérica são usadas na separação de aminoácidos, peptídeos e carboidratos. Este material consiste em partículas rígidas do copolímero de poliestireno-divinilbenzeno, cuja superfície e poros contém os grupos trocadores de íons. Estes materiais são de capacidade elevada, geralmente da ordem de miliequivalentes por grama de material e são encontrados com diâmetros maiores (30 - 40 µm) ou menores (5 µm, 10 µm).

As sílicas com camadas peliculares consistem de uma partícula vítrea de forma esférica recoberta com uma camada fina do copolímero poliestireno-divinilbenzeno que contém os grupos ativos trocadores de íons. Estes materiais são de capacidade reduzida, da ordem de 10 µg/g, mas muito eficazes e podem ser utilizados com solventes orgânicos.

Existem também materiais que têm a vantagem de resistir a pressões elevadas e possuir uma capacidade de troca superior à dos materiais peliculares; são as micropartículas porosas de sílica com grupos trocadores quimicamente ligados. Na Tabela 7 destacam-se características de alguns materiais empregados como fase estacionária na CLAE por troca iônica.

Os processos de troca iônica dependem muito da temperatura, é conveniente ter algum sistema de controle térmico quando for empregado este tipo de fase estacionária, pois mudanças normais na temperatura ambiente podem afetar os resultados.

**Tabela 7- Fases estacionárias para CLAE por troca iônica (CTI).**

Tipo	Nome	Fornecedor	Suporte	Grupo funcional
Aniônico	ADSORBOSPHERE SAX	Alltech	sílica	-NH <sup>+</sup> <sub>3</sub>
	AMINEX	Bio-Rad	es-dvb*	-NH <sup>+</sup> <sub>3</sub>
	PARTISIL SAX	Whatman	sílica	-NH <sup>+</sup> <sub>3</sub>
Catiônico	AMINEX	Bio-Rad	es-dvb	-φSO <sup>-</sup> <sub>3</sub>
	AQUAPORE CX	Brownlee	sílica	-SO <sup>-</sup> <sub>3</sub>
	PARTISIL SCX	Whatman	sílica	-φSO <sup>-</sup> <sub>3</sub>

\* copolímero de estireno e polidivinilbenzeno

#### 4.5- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA POR EXCLUSÃO

A cromatografia por exclusão tem sua resolução baseada no tamanho efetivo das moléculas dos componentes da amostra em solução. E existem limites que determinam o intervalo de tamanhos em que um material é útil. O primeiro é o inferior, chamado de limite de permeação, abaixo do qual todas as moléculas de menor tamanho são igualmente difundidas dentro dos poros do material e o segundo é o superior, chamado limite de exclusão, acima do qual todas as moléculas são muito grandes para penetrar nos poros. Moléculas de tamanho intermediário entre ambos os limites serão separadas totalmente ou parcialmente de acordo com a seletividade característica de cada material. Então, serão eluídas sem resolução as moléculas menores que o limite de permeação e as maiores do que o limite de exclusão, separando somente as que se encontram dentro destes limites.

Atualmente dispõe-se de um grande número de materiais para cromatografia por exclusão. Eles variam de acordo com a sua rigidez e com o intervalo de tamanho dentro do qual são úteis, isto é, o material a ser utilizado na coluna dependerá do tamanho efetivo das moléculas que devem ser separadas.

Quanto à rigidez existem três tipos de materiais. Os primeiros são os materiais fracos

(não rígidos), constituídos de géis de polidextrano (Sephadex), poliacrilamidas (Bio-Gel P ) e poliagaroses (Sepharose e Bio Gel A), usados quase sempre com fases móveis aquosas. Sua capacidade é elevada mas eles não resistem a pressões superiores a 3 bars; então, são usados somente na CE clássica.

Os segundos são os materiais semi-rígidos que normalmente resistem a pressões da ordem de 100 a 150 bars. Estes materiais são constituídos de microesferas de algum copolímero, como o poliestireno-divinilbenzeno. Podem ser empregados com fases móveis aquosas ou não aquosas e existem em uma grande variedade de porosidade. São usados em CLAE e também em CE clássica.

Os terceiros são os materiais rígidos que resistem a qualquer pressão e são geralmente constituídos de partículas de sílica porosa ou de vidro poroso. Devido a sua rigidez podem-se obter separações muito rápidas com fluxo de fase móvel muito alto, o que produz pressões elevadas, para o uso de CLAE.

Os materiais à base de sílica ou vidro podem ter a superfície muito ativa e apresentar adsorção ou degradação de certos materiais (por exemplo, desnaturação de proteínas). Existem tratamentos para eliminar estes efeitos mediante processos de desativação química, tais como silanizar a sua superfície de modo muito similar ao tratamento químico dos suportes em cromatografia gasosa.

Na Tabela 8 são citados alguns desses materiais de recheio para colunas de CLAE.

**Tabela 8- Fases estacionárias microporosas para CLAE por exclusão (CE)**

Nome	Fornecedor	Material	Partícula (Ø em µm)	Massa Molar	Fase móvel
BIOSIL SEC	Bio-Rad	silica	10	500 - 10 <sup>6</sup>	aq/org**
µ-BONDAGEL	Waters	silica	10	2 x 10 <sup>3</sup> - 7 x 10 <sup>6</sup>	aq/org
MICROGEL	ChromPack	es-dvb*	5,10	10 <sup>2</sup> - 4 x 10 <sup>7</sup>	org
SHODEX A	Showa Denko	es-dvb	10	10 <sup>2</sup> - 2 x 10 <sup>8</sup>	org
ULTRAHYDRAGEL	Waters	polimetacrilato	10	2 x 10 <sup>3</sup> - 7 x 10 <sup>6</sup>	aq.

\* copolímero de estireno e polidivinilbenzeno

\*\*aq = soluções aquosas tamponadas; org = soluções não aquosas

## 5- CARACTERÍSTICAS DAS COLUNAS USADAS EM CLAE

As colunas são constituídas de um pedaço de tubo de algum material inerte, de diâmetro interno uniforme e capaz de resistir as pressões em que será usado. O aço inoxidável é o mais usado entre todos os materiais. Existem também algumas feitas com vidro de paredes grossas, mas apresentam o inconveniente de não se conseguir conexões adequadas, entre o vidro e o metal, que resistam a altas pressões sem vazamento.

Geralmente, o diâmetro interno das colunas para fias analíticos é ao redor de 3 a 5 mm e

para colunas preparativas igual ou maior do que 10 mm. As colunas com microdiâmetro apresentam diâmetros internos entre 0.05 e 2 mm. O comprimento na maioria dos casos, fica entre 10 e 50 cm, com exceção da cromatografia por exclusão onde, às vezes, usam-se colunas de comprimento maior ou várias colunas conectadas uma na outra.

A capacidade da coluna é determinada pelo seu comprimento, diâmetro e material de recheio. As colunas são normalmente retas porque apresentam uma perda de eficiência quando são dobradas. Nos extremos da coluna coloca-se um disco de teflon ou metal poroso para evitar a perda do recheio ou mudanças na sua compactação. É importante que este disco retenha as partículas do recheio sem produzir um aumento muito grande na pressão. Nas colunas atuais é comum obter-se eficiência da ordem de 50.000 pratos teóricos por metro de coluna, que é superior as eficiências normalmente obtidas em cromatografia gasosa com colunas recheadas.

### **5.1- TÉCNICAS DE ENCHIMENTO DAS COLUNAS**

O enchimento de colunas para CLAE pode ser feito a seco ou usando uma suspensão da fase estacionária em um solvente apropriado. Sendo que as pequenas partículas, durante o enchimento a seco com vibração, tendem a formar aglomerados, produzindo um acúmulo das partículas maiores perto da parede e das menores no centro da coluna, o método de enchimento por suspensão com alta pressão é preferido para recheiar colunas com partículas de diâmetro menor do que 25  $\mu\text{m}$ .

### **5.2- CUIDADOS COM AS COLUNAS DA CLAE**

No emprego das colunas de partículas microporosas são necessárias algumas precauções. Em amostras muito sujas convém utilizar uma pré-coluna. A pré-coluna é uma coluna pequena com o mesmo recheio ou similar da camada porosa usada na coluna. Coloca-se entre o injetor e a coluna. As pré-colunas com esta finalidade geralmente são de 2 - 5 cm de comprimento com o mesmo diâmetro interno da própria coluna, para que apresentem as mesmas características de separação. Os solventes devem ter um alto grau de pureza para evitar a contaminação da coluna. Um outro cuidado importante é que os solventes devem ser filtrados, em filtros de 0.2  $\mu\text{m}$ , para retirar partículas sólidas, que podem riscar o pistão ou a válvula injetora ou mesmo entupir os tubos do sistema. Solventes halogenados podem conter traços de HCl, HBr, etc., que podem reagir com o aço inoxidável da coluna e outras partes do sistema. Dependendo da natureza potencialmente corrosiva de cada solvente, eles podem também trazer problemas para a coluna, com a solubilização de íons metálicos.

### **5.3- ALARGAMENTO DA BANDA CROMATOGRÁFICA**

Uma característica indesejável na cromatografia líquida é o alargamento da banda cromatográfica. Os fatores que provocam este alargamento podem ser: colunares e mecânicos.

#### **5.3.1- FATORES COLUNARES**

Difusão por turbilhonamento: É consequência dos diversos caminhos que as moléculas da amostra podem ter através da coluna devido a não homogeneidade do suporte. Pode ser

diminuída utilizando-se partículas esféricas de tamanho uniforme e melhorando-se o empacotamento.

- a) Difusão axial: A amostra difunde-se axialmente na coluna provocando o alargamento da banda. Se a velocidade for relativamente alta a tendência da banda é aumentar. Hoje, as colunas apresentam disco de distribuição no topo da coluna, para evitar a difusão axial.
- b) Difusão longitudinal: Ocorre o fenômeno de dispersão à medida que a amostra caminha ao longo da coluna, aumentando a largura da faixa. Se o fluxo for muito elevado a difusão tende a ser zero. Entretanto, se o fluxo é muito lento a difusão é relativamente alta.
- c) Canais diferenciais: Os canais diferenciais podem ser provocados durante os processos de empacotamento da coluna, devido a quedas que, provocam rachaduras microscópicas, ou mudanças bruscas de solventes.
- d) Porosidade do suporte

### **5.3.2- FATORES MECÂNICOS**

- a) Volume morto das conexões;
- b) Volume morto das tubulações;
- c) Volume morto do injetor (loop);
- d) Volume morto dos detectores;
- e) Tubo de saída (não deve apresentar diâmetro superior ao das conexões utilizadas)

## **6- CARACTERÍSTICAS DAS FASES MÓVEIS EM CLAE**

### **6.1-VISCOSIDADE**

A viscosidade do solvente, ou misturas de solventes, empregados em cromatografia a líquido têm importância fundamental durante o bombeamento isocrático ou por gradiente. Muitos solventes são descartados como fase móvel, devido à sua grande viscosidade, que vai acarretar dificuldades no bombeamento. Álcool, metanol, e todos os compostos que têm viscosidade inferior a um, são considerados ótimos quanto à viscosidade e portanto aumentam a facilidade de bombeamento. Os hidrocarbonetos, nesse aspecto, são ótimos mesmo para homólogos com 8 ou mais átomos de carbono.

Em uma mistura de solventes, a viscosidade geralmente não varia linearmente com a composição, mas sim com suas características de polaridade ou de possibilidade de formação de pontes de hidrogênio. Esse fato é extremamente importante quando se trabalha com variação da composição da mistura durante uma análise.

A viscosidade é uma propriedade que afeta a queda de pressão dentro da coluna (a queda de pressão é proporcional à viscosidade), porém, afeta também a sua eficiência, pois a fase quanto mais viscosa for, mais afetará o coeficiente de difusão da substância analisada, acarretando uma perda considerável na eficiência de separação.

## 6.2-COMPATIBILIDADE COM TIPO DE DETECTOR UTILIZADO

O índice de refração é um parâmetro importante para a escolha da fase móvel, quando se trabalha com os detectores que utilizam esta propriedade para detecção. A maioria dos compostos alifáticos simples tem um índice de refração entre 1,3 e 1,4; compostos de maior peso molecular ou clorados entre 1,3 e 1,5 e a maioria dos compostos aromáticos entre 1,5 e 1,55. Ao se trabalhar com gradiente é recomendado que o índice de refração dos componentes da fase tenham valores bem próximos, apresentando nesse caso uma menor variação da linha de base. Dos solventes miscíveis, a água, acetonitrila e o metanol possuem índices de refração satisfatórios para operação com misturas. Verifica-se que, quanto maior a diferença entre o índice de refração da substância a ser analisada e o da fase móvel, menor será o valor da quantidade mínima detectada, QMD, isto é, maior a sensibilidade.

Trabalhando-se com detectores espectrofotométricos (UV-VIS), deve-se conhecer as regiões de absorção da fase móvel utilizada. Uma indicação melhor é obtida pela análise do espectro do solvente; em caso de presença de impurezas, as regiões em que o mesmo absorve podem ser alteradas. Denomina-se de “cutoff” o comprimento de onda abaixo do qual o solvente absorve mais de 1,0 unidade de absorbância numa célula de 1 cm de comprimento. Tabelas apresentando os valores de “cutoff” podem ser úteis para a escolha da fase móvel adequada. Esses dados são importantes, uma vez que a resposta do detector depende da diferença entre a absorbância do solvente e a do composto analisado.

## 6.3-POLARIDADE DA FASE MÓVEL

Quatro tipos de interações entre moléculas do solvente e analito devem ser consideradas:

a) Dispersão: As interações de dispersão ocorrem porque os elétrons estão em movimento caótico e em certos momentos podem assumir uma configuração assimétrica. Em um determinado instante pode-se criar um momento dipolar temporário numa molécula, polarizando os elétrons de um lado de uma molécula adjacente, repelindo-os conseqüentemente. Esse dipolo resultante acarretará numa atração eletrostática dessas moléculas. As interações de dispersão são maiores para as moléculas mais fáceis de polarizar.

b) Interação dielétrica: É a interação dos íons da amostra com os líquidos de alta constante dielétrica. A carga polariza as moléculas do solvente que as rodeia, resultando numa atração eletrostática da substância com o solvente. Ela facilita a dissolução de substâncias iônicas e ionizáveis da amostra em fases polares como a água, metanol, etc.

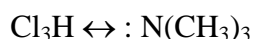
c) Dipolos: Ocorrem quando existem moléculas de solventes e analitos que têm dipolos permanentes. Ocorrem geralmente entre grupos funcionais das próprias moléculas.

Os momentos dipolares de alguns grupos funcionais estão mostrados na Tabela 9, abaixo:

**Tabela 9- Momento dipolar em unidade debyes**

Grupo	unidade	Grupo	unidade
amina	0,8	halogênios	1,6
éter	1,2	éster	1,8
sulfeto	1,4	tiol	1,4
carboxila -COOH	1,7	hidroxila	1,7
aldeído -CHO	2,3	cetona	2,7
nitro -NO <sub>2</sub>	3,2	nitrila -CN	3,5

d)Pontes de hidrogênio: Pontes de hidrogênio entre doadores e aceptores de hidrogênio são encontrados comumente na química. O par clorofórmio/trimetilamina é um bom exemplo de um doador de prótons (clorofórmio) e um aceptor (trimetilamina).



A polaridade é então a habilidade que tem um solvente de atuar em combinação com os quatro tipos de interações citadas. A força do solvente aumenta com a polaridade na partição com fases normais e em adsorção enquanto que, em fase reversa, a força do solvente diminui com o aumento da polaridade.

#### 6.4-MISCIBILIDADE

A necessidade de se efetuar análises por gradiente ou empregando misturas de solventes, requer que eles sejam miscíveis entre si. Insolubilidade leva à formação de gotículas de solventes suspensas na saída da coluna, produzindo ruído nos detectores.

A substituição de solventes requer que eles sejam miscíveis entre si, a fim de se poder lavar a bomba, a tubulação, a coluna e o detector. A Tabela 10 mostra um diagrama de solubilidade entre os solventes mais empregados em CLAE.

**Tabela 10- Diagrama de solubilidade entre os solventes mais empregados em CLAE**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
hexano (1)								•		•	•	
tetracloro de carbono (2)											•	
clorofórmio (3)											•	
cloro de metileno (4)											•	
éter etílico (5)											•	
acetato de etila (6)											•	
acetona (7)												
acetonitrila (8)	•											
isopropanol (9)												
metanol (10)	•											
água (11)	•	•	•	•	•	•						
ácido acético (12)												

• indica imiscibilidade

## **6.5-DICAS E CUIDADOS COM AS FASES MÓVEIS**

A fase móvel deve ser de alta pureza, como um solvente de grau cromatográfico, permitindo realizar análises de alta sensibilidade com detectores por fluorescência ou por absorvância no ultravioleta, onde as impurezas da fase móvel podem absorver e diminuir a sensibilidade do detector para os componentes da amostra.

Quando se utilizar cromatografia líquido-líquido, a fase móvel pode dissolver a fase estacionaria. Para evitar isto, satura-se a fase móvel com a fase estacionaria utilizando-se para isso uma pré-coluna contendo uma alta concentrado da mesma fase estacionaria.

No preparo da fase móvel deve-se filtrar o solvente (trabalhar com filtro Millipore) e desgaseificá-lo. Deixar o solvente no frasco dentro de banho ultra-som por, no mínimo, 15 minutos. Esse tempo varia conforme a solução a ser preparada. No caso de solvente orgânico com água, esse tempo pode ser maior. Por exemplo, em uma mistura de água e álcool, que é exotérmica, deve-se efetuar a mistura e depois desgaseificá-la. Em mistura de acetonitrila e água a desgaseificação deve ser feita em temperatura baixa devido à grande volatilidade da acetonitrila.

Ao se trabalhar com água, tomar todos os cuidados para que não se forme fungo dentro da coluna. Lavar sempre o sistema abundantemente e passar um agente de esterilização (por ex, MeOH ou Acetonitrila). Para análise de açúcares utilizar água ligeiramente acidificada.

O mesmo cuidado se deve ter quando se trabalha com solução tampão. Nesse caso uma atenção a mais deve ser dada. Não deixar o sistema parado quando se trabalha com tampão, pois pode cristalizar sal na região do pistão da bomba. Ao se reiniciar o trabalho, esse sal cristalizado pode danificar o corpo do pistão.

## **7- EQUIPAMENTOS PARA CLAE**

As principais características que devem ser levadas em consideração na escolha de um equipamento para CLAE são:

- a) **Versatilidade:** o equipamento deve resolver amostras de diferentes tipos, servir a distintas técnicas cromatográficas e realizar o máximo de operações, tais como, gradiente de fase móvel, coleta das frações, reciclagem de frações, etc., necessárias às análises sofisticadas.
- b) **Rapidez:** Para se conseguir análises rápidas, deve-se obter as melhores condições de CLAE, isto é, fase móvel de baixa viscosidade, bomba de alta pressão e colunas com partículas de pequeno diâmetro (grande área de superfície, que ajuda os processos de separação).
- c) **Reprodutibilidade e Estabilidade:** características essenciais para obter do equipamento um bom funcionamento em longo prazo. O equipamento deve ter controle adequado sobre os parâmetros de operação, como vazão, temperatura, pressão e composição da fase móvel.
- d) **Sensibilidade:** Um bom equipamento, mesmo trabalhando com pequenas quantidades de amostra, deve gerar sinais de intensidade apreciável.

A Figura 3 mostra O esquema de um cromatógrafo básico para CLAE cujos componentes, bem como outros não ilustrados, são descritos a seguir.

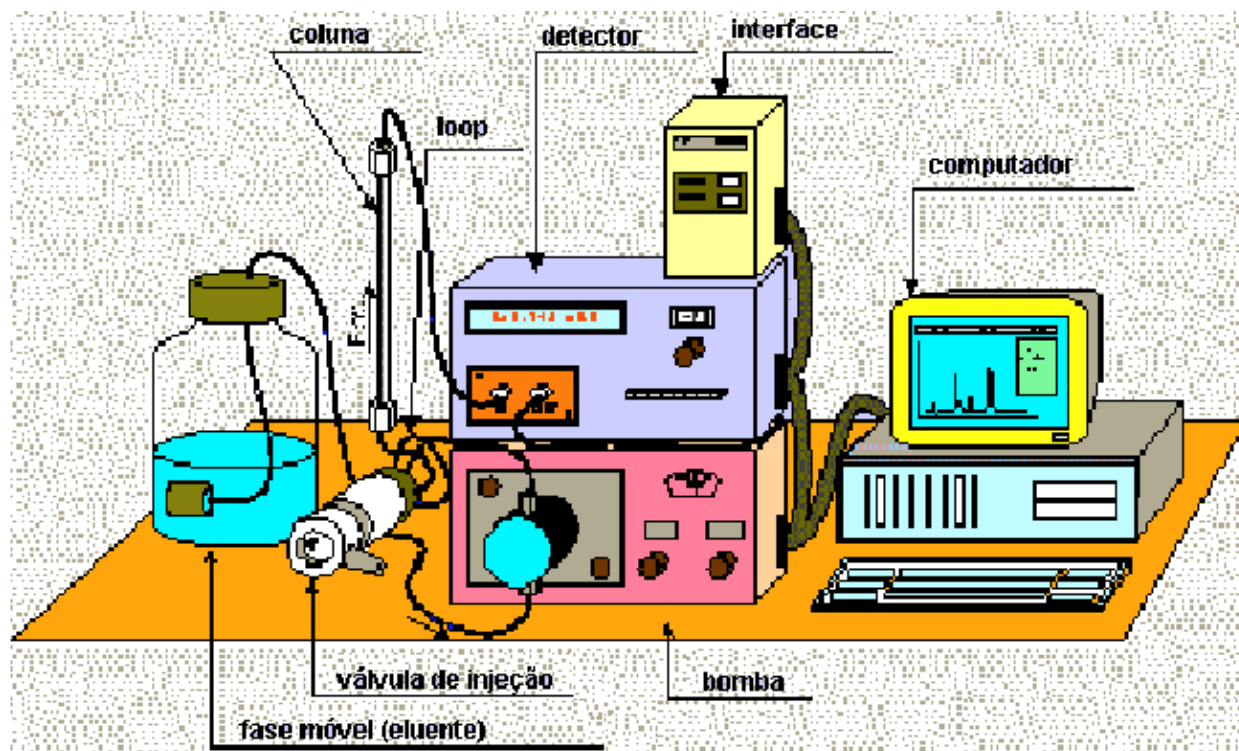


Figura 3- Esquema básico de um cromatógrafo para CLAE

### 7.1- RESERVATÓRIO DA FASE MÓVEL

O reservatório pode ser uma garrafa de solvente bem limpa. Para análise de íons não se utiliza reservatório de vidro comum, para evitar que a solução tenha íons provenientes da parede do reservatório. Pode-se trabalhar com frasco de polietileno. Utiliza-se esse tipo de frasco quando se trabalha com soluções tampão, soluções contendo íons  $F^-$  ou soluções levemente alcalinas. Não se lava o reservatório com solução sulfocrômica, nem muito alcalina, pois estas corroem as paredes internas, favorecendo a transferência de íons para a solução. O volume desses frascos varia de 1 a 3 litros de capacidade, o que normalmente é suficiente para um dia de trabalho. A captação da fase móvel é feita através de filtro, para remover partículas que possam obstruir e estragar o sistema de bombeamento e a coluna. Este filtro deve ter a capacidade de reter partículas sem produzir queda excessiva de pressão.

As fases móveis polares têm tendência a dissolver oxigênio e outros gases. Se esses gases são liberados dentro do equipamento, formam bolhas e podem afetar o funcionamento do detector e a eficiência da coluna. Por esse motivo é necessário remover os gases dissolvidos na fase móvel. Em muitos equipamentos, o próprio reservatório está condicionado a efetuar a remoção, por exemplo, pela aplicação de vácuo no reservatório e agitação da fase móvel sob ação de ultra-som e/ou aquecimento. O problema da formação de bolhas tem sido reduzido pela adição de um filtro na saída do detector, o que restringe um pouco a vazão e produz uma pequena pressão na cela do detector, impedindo a formação de bolhas.

## **7.2- SISTEMA DE BOMBEAMENTO**

O desenvolvimento do sistema de bombeamento adequado foi o fator mais importante para o desenvolvimento da CLAE. A bomba tem que proporcionar uma vazão razoável através da coluna, para que a análise não seja lenta, e uma vazão constante, para não atrapalhar o sistema de detecção. Os aspectos mais importantes para o sistema de bombeamento são:

- a) Pressão máxima de operação na faixa de 600 bars.
- b) Vazão contínua, sem pulsos (usando, por exemplo, amortecedor de pulsos).
- c) Intervalo de vazões entre 0.01 e 10 mL/min, para aplicações analíticas, e até 100 mL/min, para aplicações preparativas.
- d) Reprodutibilidade e constância da vazão de 1 %.
- e) Inércia química a solventes comuns.
- f) Pequeno volume bombeado (máximo de 0,5 mL) nos sistemas com bomba de pistão, para uso em eluição com gradiente e reciclagem.
- g) Volume interno pequeno.

Podem ser considerados basicamente dois tipos de bombas, as mecânicas e as pneumáticas. Entre as bombas mecânicas existem dois tipos diferentes, recíprocas (pistão ou diafragma) e do tipo seringa.

### **7.2.1- BOMBAS DE SERINGAS COM VOLUME CONSTANTE**

Chamadas também de êmbolo ou de deslocamento contínuo, estas bombas possuem um êmbolo ou pistão que é deslocado de forma contínua e uniforme por um motor de precisão, comprimindo o líquido contido em uma câmara de volume constante. As vantagens apresentadas por essas bombas são não apresentarem pulsação e terem fluxo constante da fase móvel. A desvantagem é um reservatório de solvente limitado, o que dificulta o reenchimento e a mudança da fase móvel, pois implica parar o sistema e despressurizar.

### **7.2.2- BOMBAS DE SERINGAS COM PRESSÃO CONSTANTE**

Esta bomba tem um pistão que se movimenta pela ação de agente pneumático. O reservatório da bomba é cheio pela força do ar comprimido, que desloca o pistão ou diafragma. As vazões obtidas são livres de pulsações e de pressão constante, mas isso significa que, se a resistência à pressão da coluna muda, a vazão também muda. As desvantagens deste sistema são:

- Instabilidade na velocidade do fluxo;
- Mudanças no tempo de retenção, dificultando a interpretação dos resultados;
- Capacidade limitada do volume total que pode ser bombeado;

### **7.2.3- BOMBAS RECIPROCADORAS**

São bombas que escoam volumes constantes de forma não contínua, isto é, pulsante. Essas bombas operam mediante o movimento de um pistão (movimentado por via de um eixo

excêntrico) e através de um sistema de válvulas que alternadamente se abrem e fecham, onde se enche e esvazia, de modo alternativo, uma pequena câmara. Estas bombas apresentam um volume interno de 100-200  $\mu\text{L}$  (Figura 4).

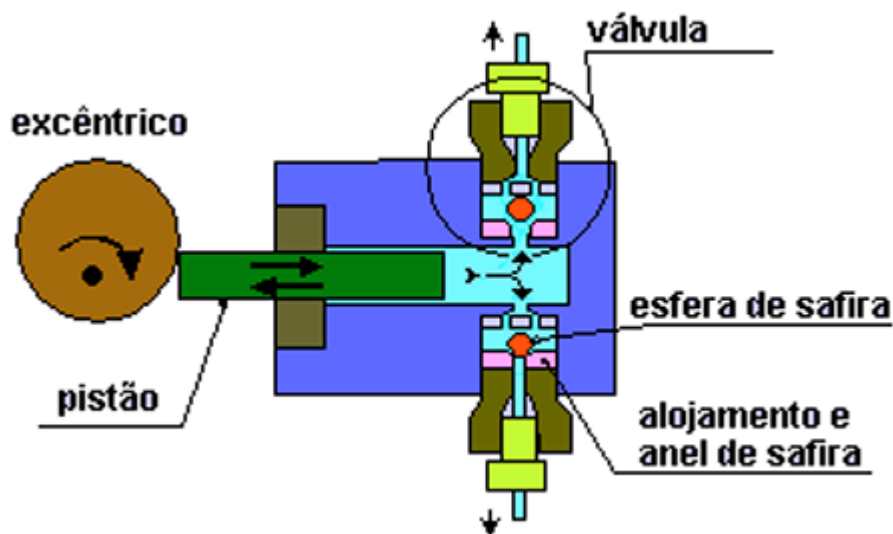


Figura 4- Desenho esquemático de bomba recíproca.

O selo do pistão é um disco de teflon fixo no interior do corpo da bomba, feito de aço inoxidável quimicamente resistente. Os pistões são de safira, que confere resistência ao ataque da maioria dos solventes utilizados em CLAE. Uma válvula (check-valve) típica consiste em uma esfera de rubi aparada em base de safira, formando um selo. A pressão dentro do reservatório da bomba é a responsável pela abertura e o fechamento do selo. Estes movimentos dependem da localização da esfera (na entrada ou na saída da válvula). Existem dois tipos de válvula (check-valve). Na primeira a esfera funciona através da força da gravidade. E na segunda a válvula tem uma mola metálica (aço inoxidável apoiada sobre a esfera de rubi). A mola mantém a válvula fechada até que a pressão desenvolvida pela bomba force a contração da mola, possibilitando a passagem do solvente. Além disso, a mola impede que a válvula abra em baixas pressões.

As principais vantagens deste tipo de bomba são uma vazão com volume constante, capacidade de alimentação contínua do sistema, facilidade na mudança da fase móvel e o trabalho com pequenos volumes.

Uma das desvantagens deste tipo de bomba é que se obtém uma vazão pulsante e não uniforme e contínua. Isto pode causar perda de eficiência na coluna e instabilidade no detector. Sistemas de amortização hidro-pneumáticos, localizados entre a bomba e a coluna, têm sido utilizados para solucionar esse problema. A forma mais simples de amortecedor utilizada consiste de uma secção normalmente espiralada de espessura reduzida de aço inoxidável ou tubo de teflon (6 m x 1 mm). Este tubo capilar se deixa fluir livremente e assim absorve as pulsações produzidas pela bomba. A grande desvantagem desse tipo de amortecedor é seu grande volume morto, que pode provocar alargamento da banda cromatográfica, além de tornar o processo de mudança da fase móvel lento e dispendioso.

### 7.2.4- BOMBAS RECIPROCADORAS DE DUPLO-PISTÃO

Neste tipo de bomba, dois pistões são acionados por um mesmo eixo excêntrico, de forma que, quando um pistão succiona a fase móvel, o outro expulsa o líquido para fora da bomba. A vazão de ambos os pistões, já quase livre de pulsação, é encaminhada à coluna por uma via comum. Assim o sistema de duplo pistão tem todas as vantagens da reciprocadora de pistão simples, além da vantagem adicional da grande diminuição do problema de pulsação.

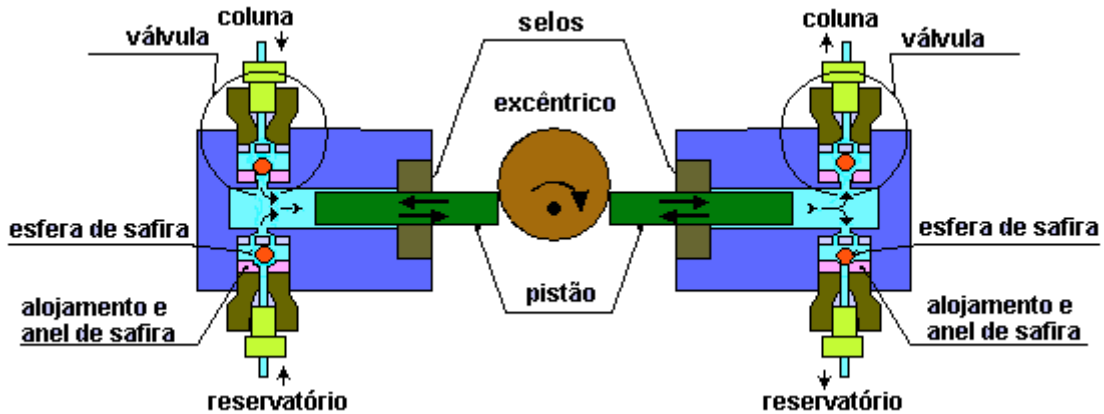


Figura 5- Desenho esquemático de bomba reciprocadora de duplo pistão.

### 7.3- VÁLVULAS PARA AMOSTRAGEM

Anteriormente, a introdução da amostra era efetuada de forma similar à realizada na cromatografia gasosa, ou seja, mediante micro-seringa que injeta a amostra dentro de uma pequena câmara, de onde é eluída pela fase móvel. Os equipamentos modernos empregam válvulas para amostragem, como a ilustrada esquematicamente na Figura 6. A amostra, introduzida na válvula mediante seringa, deve encher o espaço interno da porção do tubo capilar de aço, a alça de amostragem (carga). Normalmente o volume contido na alça é de 1 a 100  $\mu$ L. A amostra é injetada na coluna, ao girar a válvula para que a posição de entrada e saída mude (injeção na coluna). Desta forma pode injetar-se na coluna pressurizada um intervalo amplo de volumes de amostra, dependendo do tubo capilar (alça de amostragem) utilizado, com um alto grau de reprodutibilidade. As válvulas para amostragem são fabricadas somente de material inerte, como teflon e aço inoxidável, e seu desenho é tal que resistem a pressões muito elevadas.

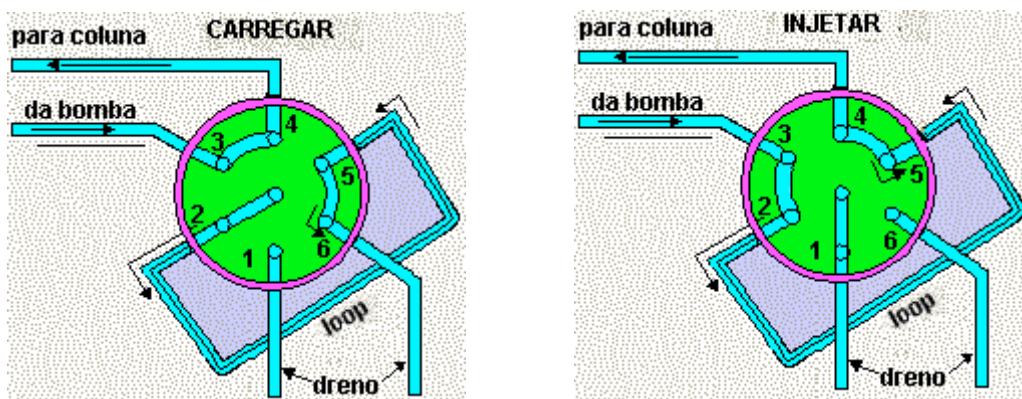


Figura 6: Válvula de amostragem para CLAE. Posição de carregar e posição de injeção.

## 7.4- DETETORES USADOS EM CLAE

Uma instrumentação melhor é requerida para a CLAE, em relação à sensibilidade dos detectores, para monitorização do efluente que sai da coluna. Infelizmente as propriedades físicas ou físico-químicas da amostra e fase móvel são, muitas vezes, similares. Algumas soluções para o problema de detecção tem sido procuradas no desenvolvimento da CLAE:

- Medidas diferenciadas de propriedades gerais de ambas: amostras e fase móvel
- Medidas de uma propriedade da amostra que não é apresentada pela fase móvel.
- Detecção após a eliminação da fase móvel.

Uma variedade de detectores tem sido desenvolvida para CLAE, baseando-se em uma destas soluções. Um detector ideal para a CLAE seria aquele com as seguintes características:

- a) Alta sensibilidade e baixo limite de detecção
- b) Resposta rápida a todos os solutos
- c) Insensibilidade a mudanças nas temperatura e na vazão da fase móvel.
- d) Resposta independente da fase móvel
- e) Pequena contribuição ao alargamento do pico pelo volume extra da cela do detector.
- f) Resposta que aumente linearmente com a quantidade do soluto
- g) Não destruição do soluto.
- h) Segurança e conveniência de uso.
- i) Informação qualitativa do pico desejado.

Infelizmente, não existe um detector que apresente todas estas propriedades, a não ser que ele seja desenvolvido. A Tabela 11 resume algumas das propriedades dos detectores.

**Tabela 11- Propriedades de alguns detectores usados em CLAE**

Item	Detector espectrofotométrico (UV-VIS)	Detector por índice de refração	Detector por fluorescência	Detector eletroquímico
Princípio de operação	absorbância de luz na faixa do UV-VIS	mudanças no índice de refração da fase móvel	emissão fluorescente após excitação com luz	oxidação ou redução em potencial fixo
Tipo	seletivo	universal	altamente seletivo	seletivo
Quantidade mín. detectável (g/mL)	Fixo: $10^{-10}$ Var: $10^{-9}$	$10^{-7}$	de $10^{-9}$ até $10^{-12}$	$10^{-12}$
Sensibilidade à temperatura	baixa	alta	baixa	média
Sensível à vazão da fase móvel	não	não	não	sim
Útil com gradientes	sim	não	sim	não
Aplicações	compostos que absorvem na região de trabalho	compostos em geral	compostos ou derivados que fluorescem	Espécies que se oxidam ou se reduzem

#### 7.4.1- DETECTORES POR ABSORBÂNCIA NO ULTRAVIOLETA E NO VISÍVEL

Nos detectores espectrofotométricos o seu funcionamento baseia-se na absorbância de luz por parte da amostra ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética; normalmente isto ocorre no ultravioleta até o infravermelho, em um dado comprimento de onda. Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta: o de comprimento de onda variável (espectrofotômetros), que não só é de aplicação mais variada e sensível, mas também é mais caro, e o chamado fotométrico que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos. Este último é sensível, econômico e mais que suficiente para se conseguir bons resultados com todos os compostos que absorvem luz no comprimento de onda em que ele funciona. Este tipo de detector é normalmente insensível a variações de vazão e temperatura. A maioria dos detectores de comprimento de onda fixo, oferecidos no mercado, operam em um comprimento de onda de 254 nm e um de 280 nm, resultado da absorbância de luz em 254 nm e da emissão de luz em 280 nm por uma substância fosforescente. Em ótimas condições, pode-se atingir sensibilidades de até 0,001 unidades de absorbância e, se o composto absorve intensamente na faixa de UV, é possível detectar quantidades de amostras da ordem de nanogramas ( $10^{-9}$  g). Quando se aplica gradiente na fase móvel e ela apresenta variação significativa de absorbância para o UV, é necessário utilizar a cela de referência para compensar esta variação. Se a fase móvel não absorve ou se a absorbância é constante, pode-se deixar a cela de referência vazia ou cheia com um dos componentes da fase móvel. A Figura 7 mostra o desenho de uma célula para CLAE.

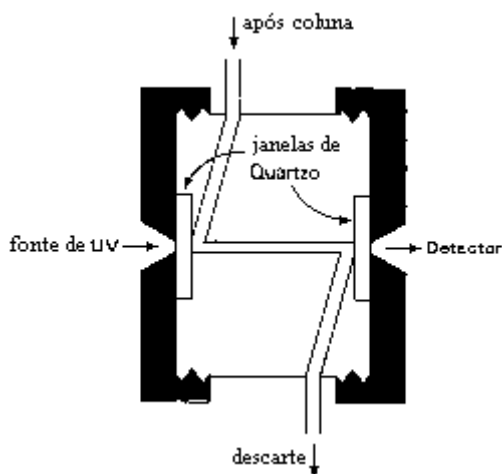


Figura 7- Célula do detector de ultravioleta para CLAE.

Espectrofotômetros de comprimentos de onda variável UV-VIS, cobrindo a faixa de 190-800 nm, através de monocromador que seleciona o comprimento de onda desejado do feixe de luz emitido pelas lâmpadas de deutério (UV) ou tungstênio (VIS), oferecem várias vantagens sobre os instrumentos de comprimento de onda fixo:

- a) Apresenta alta absorbância para vários componentes devido à escolha de comprimento de onda e, conseqüentemente, tem maior sensibilidade.
- b) Permite maior seletividade, desde que um determinado comprimento de onda pode ser escolhido, onde o soluto de interesse absorve bastante e outros não.

- c) Promove eficiência em eluição por gradiente através da habilidade de selecionar um comprimento de onda onde os componentes da fase móvel não apresentam uma variação de absorvância para diferentes concentrações.
- d) Permitir obter o espectro de absorvância de cada componente em separado após parar a vazão da fase móvel.

Análises em diferentes comprimentos de onda também são possíveis com os detectores espectrofotométricos através de um conjunto de fotodiodos. Esses fotodiodos, seletivos a determinados comprimentos de onda, em grande número, cerca de 250, permitem levantar o espectro da substância durante a eluição. Este detector é denominado detector de rede de diodos (diode array detector), cujo esquema se encontra na figura 8. Os detectores de rede de diodos eram, até a alguns anos, pouco sensíveis, mas na atualidade, com a melhora dos computadores com programas dedicados para este fim, com o aumento da sensibilidade dos diodos e com correções da aberração da rede de difração, eles aumentaram sua sensibilidade e aplicabilidade.

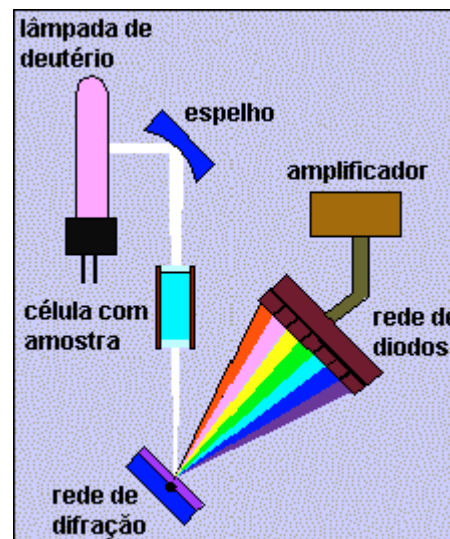


Figura 8- Esquema de um detector de rede de diodos.

Na figura 9 pode-se observar um espectro de absorção, obtido em três dimensões por microcomputador acoplado ao detector de rede de diodos, da eluição de uma mistura de três esteróis, obtido em intervalos de 5 segundos.

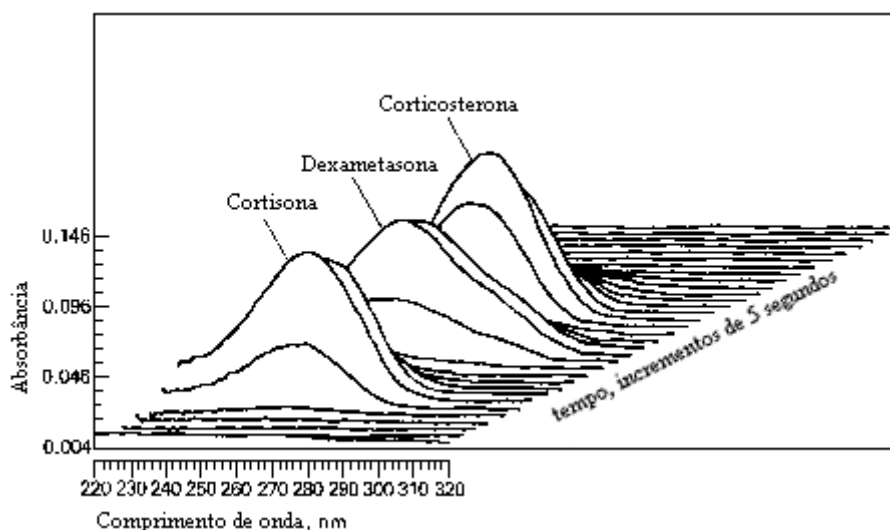


Figura 9 - Espectro de absorção da eluição de uma mistura de três esteróides, varreduras em intervalos de 5 segundos.

#### 7.4.2- DETECTORES POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO

É o segundo detector mais usado na CLAE. Este detector acompanha continuamente a diferença de índice de refração entre a fase móvel pura e o efluente que sai da coluna contendo

os componentes da amostra. Para solutos que não absorvem no UV ou visível e, conseqüentemente, não são detectados por detectores fotométricos, a melhor escolha é o detector por índice de refração. A resposta deste detector é universal e sua sensibilidade é moderada, geralmente da ordem de micrograma ( $10^{-6}$  g). Este nível de concentração corresponde a uma diferença no índice de refração entre a amostra e a fase móvel de aproximadamente  $10^{-7}$  unidades de índice de refração. Para observar esta diferença é necessário um controle de temperatura de aproximadamente 0,001 °C, o que normalmente é conseguido por circulação de água, de uma boa fonte termostaticada, através do refratômetro ou um bom controle da temperatura ambiente. Além deste problema com a temperatura, existem ainda outros: a sensibilidade às variações de vazão e mudanças na composição da fase móvel, que impedem o uso de gradiente por ser difícil encontrar um par de solventes com índices de refração idênticos. Qualquer mudança na composição da mistura mudará o índice de refração da fase móvel, então, o lado da referência terá que mudar, o que é quase impossível. A figura 10 apresenta o esquema de um tipo de detector por índice de refração.

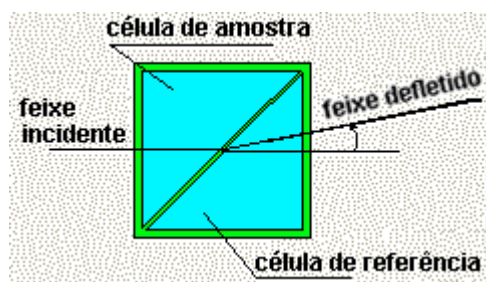


Figura 10- Esquema de um detector refratométrico por deflexão.

### 7.4.3- DETECTORES POR FLUORESCÊNCIA

A espectroscopia de fluorescência é um método de detecção dos mais sensíveis da atualidade, específico para compostos que fluorescem. Em boas condições é possível detectar quantidades da ordem de picogramas ( $10^{-12}$  g), o que é comparável aos detectores por captura de elétrons em CG. Uma alta intensidade de fluorescência é esperada de compostos que sejam conjugados simetricamente ou que não podem produzir estruturas fortemente iônicas.

A fase móvel empregada nos detectores de fluorescência deve ser cuidadosamente selecionada, pois a intensidade de emissão depende do meio em que se encontra a amostra. Isto dificulta algumas de suas aplicações, tais como análise quantitativa e eluição por gradiente, nas quais deve-se selecionar os componentes da fase móvel para não atrapalhar a fluorescência. Os detectores para fluorescência também podem proporcionar espectros de emissão das amostras retidas momentaneamente na sua cela. Desde que uma fonte de UV é necessária em ambos os detectores, por absorvância no UV e por fluorescência, eles podem ser combinados em um só detector.

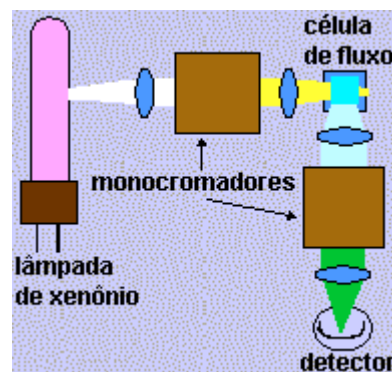


Figura 11- Esquema de um detector por fluorescência

#### **7.4.4- DETECTORES ELETROQUÍMICOS**

Métodos eletroquímicos de detecção oferecem a mais promissora solução para o problema de desenvolvimento de um detector para CLAE suficientemente sensível e não baseado em absorbância de luz. Eles oferecem vantagens de alta seletividade, alta sensibilidade e serem muito bons para as análises de traços. É importante destacar que, neste tipo de detecção, a amostra tem que ser constituída de íons ou compostos que sofram ou oxidação ou redução (detectores polarográficos). Este detector é seletivo, porque detecta somente as espécies que se oxidam (ou reduzem) em um potencial inferior ou igual ao fixado. Os detectores eletroquímicos são bons para as modalidades de cromatografia que usam fases móveis aquosas, tais como a cromatografia por troca iônica, por exclusão ou com fase reversa por pares de íons ou até com fase reversa com compostos oxidáveis na fase água-álcool.

#### **7.4.5- DETECTORES POR ABSORBÂNCIA NO INFRAVERMELHO**

A absorbância no infravermelho pode ser usada como detector universal ou específico. A sensibilidade destes detectores, oferecidos no comércio, é muito pequena para as quantidades de amostra normalmente usadas, mas eles são usados com sistemas de CLAE por exclusão. Usando a técnica de parar a vazão com a amostra na cela e tirar o espectro de infravermelho, dará uma imagem analítica completa da amostra. Este tipo de detector é limitado pela fase móvel que deve ser transparente no comprimento de onda utilizado.

#### **7.4.6- DETECTORES DE RADIOATIVIDADE**

Os detectores de radioatividade são projetados especificamente para detectar solutos radiomarcados conforme são eluídos da coluna. Quase todos os detectores deste tipo não são encontrados comercialmente, com exceção dos que detectam as partículas  $\beta^-$  do  $^{32}\text{P}$  e do  $^{14}\text{C}$ . Para o segundo, que funciona através de cintilação líquida, há necessidade da adição de um coquetel de cintilação. Detectores radioquímicos têm uma grande faixa de resposta, são insensíveis a troca de fases móveis, podendo ser usados com eluição por gradiente. Aplicações cromatográficas com emissores de  $\gamma$  e de  $\beta^-$  forte (tais como  $^{131}\text{I}$ ,  $^{210}\text{Po}$  e  $^{125}\text{Sb}$ ), usando sistemas de cintilação ou mesmo contador Geiger, têm sido publicadas.

#### **7.4.7- DETECTORES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Os espectrômetros de massas são um tipo de detector para CLAE que pode combinar sensibilidade, versatilidade e universalidade e seu potencial de utilização é muito grande. A maior dificuldade na utilização destes detectores é o interfaceamento com o sistema de CLAE e o seu alto custo quando comparado aos outros detectores mais usados.

#### **7.4.8- OUTROS DETECTORES**

Detectores baseados em outras propriedades do soluto (como, constante dielétrica, densidade, pressão de vapor, viscosidade etc.) têm sido apresentados para serem usados na CLAE. Vários destes detectores são baseados em propriedades que dependem da temperatura, fazendo sua resposta depender da variação térmica.

## 8- APLICAÇÕES

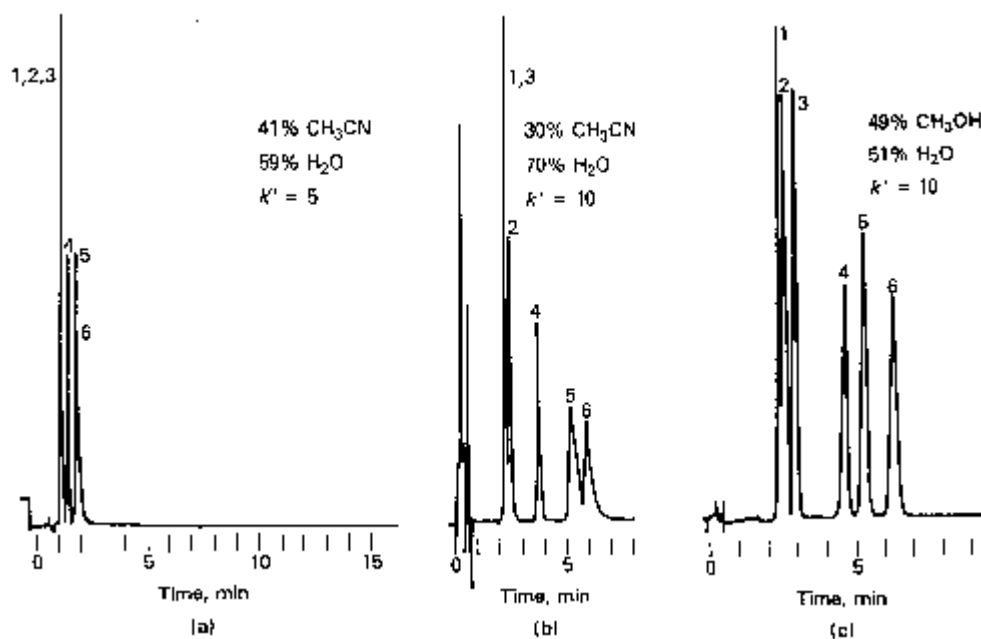


Figura 12 - Os cromatogramas acima são uma mistura de seis esteróides: (1) predinisona, (2) cortisona, (3) hidrocortisona, (4) dexametasona, (5) corticosterona, (6) corticoxolona. A coluna é de 150 mm por 4 mm de diâmetro interno, recheada com fase reversa C<sub>8</sub>.

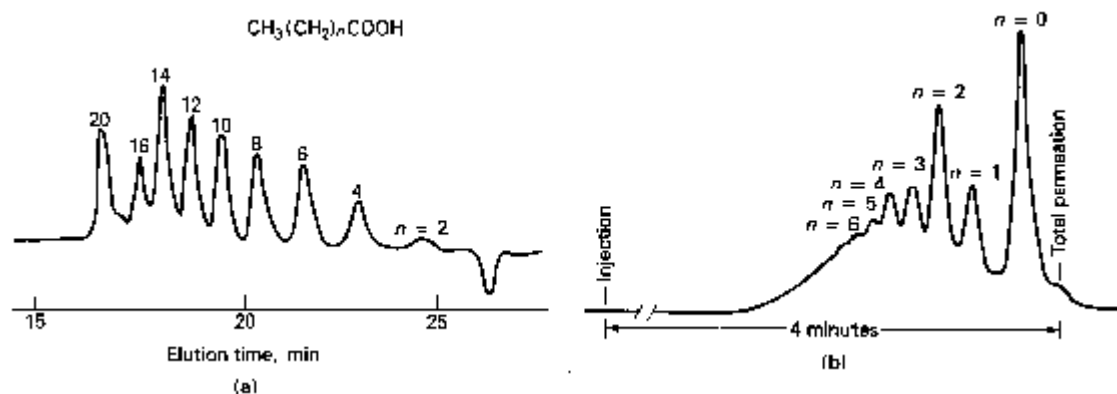


Figura 13 - Aplicação de cromatografia de exclusão. (a) Separação de ácidos graxos. Coluna a base de poliestireno, 7,5 cm x 600 nm, com limite de exclusão de  $10^3$ . Tetrahydrofurano como fase móvel, numa vazão de 1,2 mL/min. Detector de índice de refração. (b) Análise de resina epóxi comercial ( $n = n^\circ$  de unidades monoméricas no polímero). Coluna de sílica porosa 6,2 x 250 mm. Fase móvel de tetrahydrofurano, numa vazão de 1,3 mL/min. Detector de UV.

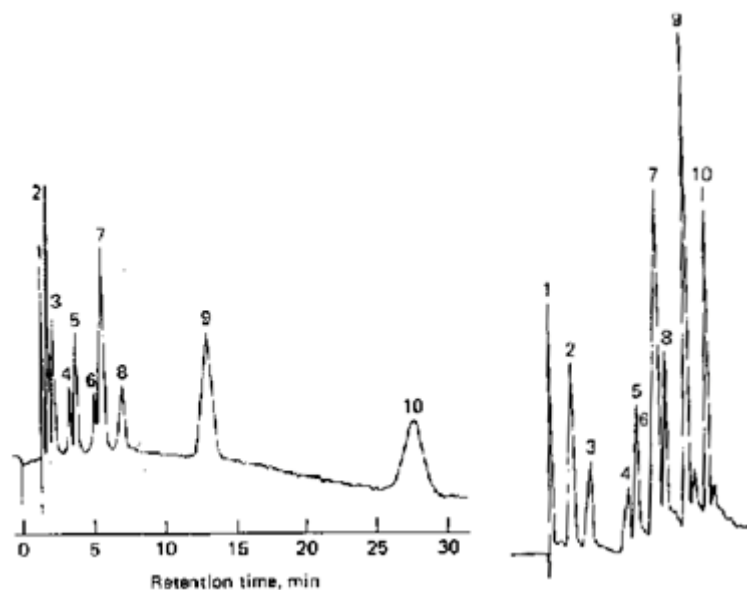


Figura 14 - Os cromatogramas são de uma mistura de benzeno e clorobenzenos. No primeiro caso, a eluição foi de modo isocrático, com uma mistura de metanol/água 50/50. No segundo caso, a eluição foi por gradiente, partindo de metanol/água 40/60 e aumentando o teor de metanol em 8%/minuto. A coluna foi de 25 cm × 4,1 mm de diâmetro interno, com fase reversa C<sub>18</sub>. Sabe-se que os compostos analisados são (1) benzeno, (2) clorobenzeno, (3) o-diclorobenzeno, (4) 1,2,3-triclorobenzeno, (5) 1,3,5-triclorobenzeno, (6) 1,2,4-triclorobenzeno, (7) 1,2,3,4-tetraclorobenzeno, (8) 1,2,3,5-tetraclorobenzeno, (9) pentaclorobenzeno e (10) hexaclorobenzeno.

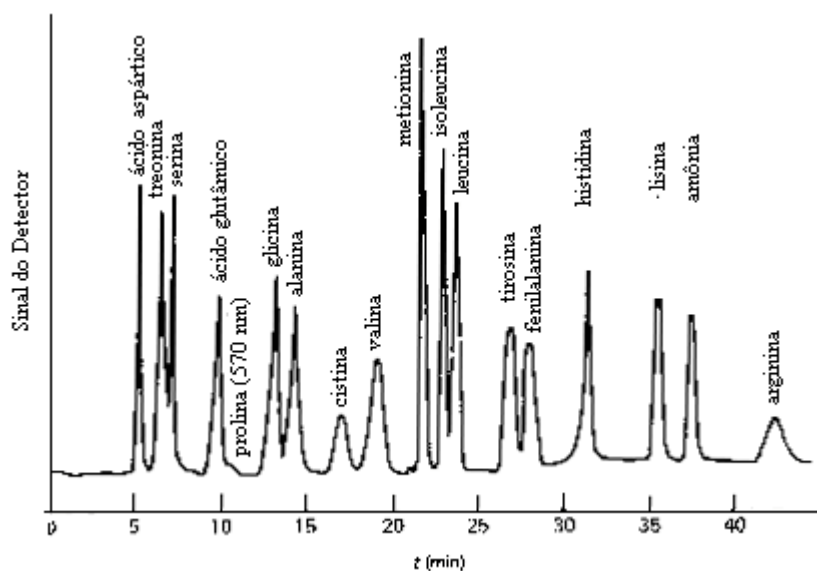


Figura 15 - Separação de aminoácidos em coluna de troca iônica. Empacotamento: troca catiônica com partículas de 8 µm de diâmetro.

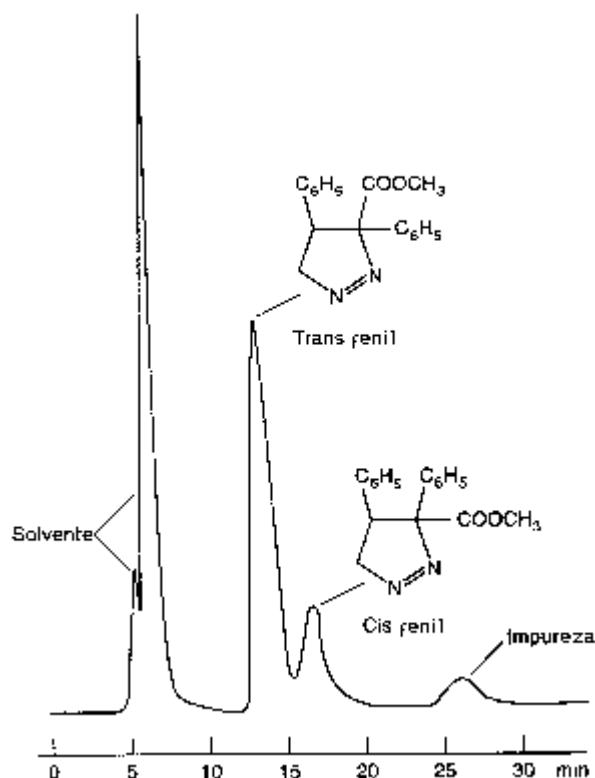


Figura 16 - Uma aplicação típica de cromatografia de adsorção: separação de *cis*- e *trans*-pirazolina. Coluna 10 x 0,3 cm de sílica pelicular. Fase móvel 50/50 diclorometano/isooctano, temperatura ambiente e vazão de 0,25 mL/min. Detector UV 254 nm.

## 9- BIBLIOGRAFIA

COLLINS, C. H. & GUIMARÃES, L. F. L., Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Collins, C. H. & Braga, G. L.; Introdução a Métodos Cromatográficos, 3. ed., Ed. UNICAMP, São Paulo, 1988, p 179 - 243.

MACRAE, R.; HPLC in Food Analysis, , Academic Press Inc., London, 1982, 341p.

FALLON, A.; BOOTH, R. F. G. & BELL, L D., Aplications of HPLC in biochemistry, 3. ed, Elsevier Science Publishers, London, 1993, 338p.

CIOLA, R., Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho, , ed. Edgard Blücher Ltda., São Paulo, 1998

LEON, R., El Libro Basico para Cromatografia de Líquidos, ed. Milton Roy Company, Flórida, 1982.

SKOOG, D. A. & LEARY, J. J., High-Performance liquid Chromatography In: Principles of Instrumental Analysis, 4 ed., Harcourt Brace College Publishers, Flórida, 1992, p 628 - 669.

SNYDER, L. R. & KIRKLAND, J. J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2 ed., John Wiley & Sons, New York, 1979.