

R: O corpo docente e a administração da LSU fizeram-me sentir muito bem-vindo. Definitivamente, não é mais a LSU da qual me lembro na infância – essa é uma nova LSU em uma nova era! Somos agora a universidade número um da nação na formação de doutores afro-americanos em química. Formamos dez estudantes no último ano, ao passo que o restante do país formou entre 1960 e 1970. Tudo isso ocorreu desde que cheguei em 1992. À medida que tivemos mais estudantes afro-americanos reconhecendo a LSU como um lugar onde eles

podem se sentir confortáveis, a qualidade dos nossos estudantes foi ao topo! Agora, como vice-chanceler para Iniciativas Estratégicas, estou trabalhando para aumentar o número de estudantes de pós-graduação e membros do corpo docente em toda a universidade. Se podemos fazer isso em química, deveria ser mais simples em outras áreas.

P: Qual é o foco atual de seu trabalho no laboratório?

R: Estamos tentando desenvolver novas técnicas espectroscópicas para servir de sonda para as interações entre hóspede/hospedeiro em drogas quirais, com os novos polímeros quirais desenvolvidos em meu laboratório. A quiralidade é o destro ou o canhoto das moléculas e é muito importante para os sistemas vivos; os aminoácidos são quirais. Os corpos dos organismos vivos são seletivos à quiralidade. Por exemplo, nossos corpos empregam somente a forma L dos aminoácidos e rejeitam a forma D. Com os açúcares, usamos apenas a forma D. Um exemplo é a droga talidomida, na qual ambas as formas L e D estão presentes. Tempos atrás, essa droga foi dada para as mulheres grávidas para combater as náuseas matinais. Uma das formas é benéfica, mas a outra leva os bebês a nascerem sem as pernas ou os braços e com outros problemas muito sérios. Desde aquela época, o Food and Drug Administration reconheceu que as drogas quirais necessitam ser monitoradas com cuidado porque, enquanto uma das formas pode ser benéfica, a outra pode ser perigosa. No meu laboratório, queremos quantificar a quiralidade empregando a anisotropia fluorescente para medir as diferenças nas interações das duas formas diferentes da droga com um reagente quiral. Esse trabalho pode ser diretamente relacionado com a cromatografia que fazemos.

P: Você também está estudando o efeito de pesticidas quirais sobre o meio ambiente?

R: Assim como as drogas, muitos pesticidas e herbicidas são quirais. Quando os pesticidas são sintetizados, ambas as formas são produzidas, mas tipicamente apenas uma forma é útil. Após a aplicação, ambas as formas são lixiviadas para a água. Estamos olhando os produtos de degradação desses compostos em sistemas aquáticos. Se ambas as formas estão nos pestici-

Estou onde estou porque houve mentores importantes olhando por mim e que, a despeito dos livros e equipamentos ultrapassados, me disseram que eu poderia vencer. Eu devo muito a eles, e a forma como eu os pago é trabalhando com as novas gerações que vieram depois de mim

das que são empregados e as formas de vida tendem a interagir de forma seletiva com moléculas quirais, as bactérias comeriam somente uma das formas? E se for a forma boa que elas comem, isso aumentaria a concentração relativa da forma ruim e criaria um problema ambiental?

P: Você também está realizando pesquisa sobre a formação das placas no coração, correto?

R: Eu estou trabalhando juntamente com inúmeros outros químicos

para entender a formação das placas cardíacas. Cada um de nós está trabalhando em diferentes aspectos do problema empregando diferentes ferramentas. Uma coisa que estamos olhando é a química de uma das artérias nativas de paciente com ponte e as artérias das pontes. A artéria nativa reflete a química ao longo da vida da pessoa e a artéria da ponte reflete a química da pessoa desde o implante da ponte. Estamos comparando essas duas químicas. Esperamos aprender se as mudanças da química do corpo que ocorrem tarde na vida causam o desenvolvimento da placa cardíaca. Se conseguirmos descobrir a causa da placa, poderemos encontrar os mecanismos da sua formação.

P: Finalmente, quais são suas idéias como mentor e professor?

R: Eu gosto de ativar as mentes jovens na sala de aula e no laboratório. A pesquisa não é diferente do ensino; é ensinar aos estudantes como criar novos conhecimentos. Se posso ativar uma mente jovem para ir além dos livros-textos, acho isso excitante. Minha esposa diz que sou a única pessoa que ela conhece que absolutamente ama seu trabalho. Eu amo trabalhar com os estudantes e vê-los transformar-se de jovens ingênuos a químicos muito bem treinados com as empresas brigando para empregá-los. Ajudá-los a passar por essa transição me dá uma grande felicidade. Eu sinto que se eu ou outros iguais a mim não estivessem por aqui, muitos deles não conseguiriam isso.

Estou onde estou porque houve mentores importantes olhando por mim e que, a despeito dos livros e equipamentos ultrapassados, me disseram que eu poderia vencer. Eu devo muito a eles, e a forma como eu os pago é trabalhando com as novas gerações que vieram depois de mim. Por causa da alta concentração de estudantes afro-americanos estudando na LSU, tenho sido sempre solicitado para ser o mentor das minorias. Sou um mentor em parte por apenas estar aqui, em parte pelos três ou quatro estudantes afro-americanos que oriento, como também para os outros estudantes do departamento. Quando os estudantes afro-americanos têm problemas, eles vão a minha sala conversar comigo. Apenas por estar aqui e poder relatar minhas experiências os ajudará, com frequência, a vencer seus problemas. ■

CAPÍTULO 29

Métodos Cinéticos de Análise

Os automóveis atuais são equipados com conversores catalíticos de tripla ação para reduzir as emissões de óxido de nitrogênio, hidrocarbonetos não consumidos na combustão e monóxido de carbono para níveis aceitáveis. O conversor deve oxidar o CO e os hidrocarbonetos não consumidos a CO₂ e H₂O e deve reduzir os óxidos de nitrogênio ao gás N₂. Portanto, dois catalisadores diferentes são empregados, um catalisador de oxidação e um de redução. Existem três sistemas conversores de diferentes estilos. Muitos carros empregam o dispositivo com a estrutura em forma de colméia, para maximizar a exposição dos catalisadores ao fluxo de exaustão. Os catalisadores são constituídos de metais como a platina, o ródio ou o paládio.

A quantidade de catalisador pode ser determinada medindo-se quanto a velocidade de uma reação química é afetada. Os métodos catalíticos, que estão entre os mais sensíveis dos métodos analíticos, são empregados para a análise de traços de metais no meio ambiente, de espécies orgânicas em uma variedade de amostras e de enzimas em sistemas biológicos.

Os métodos cinéticos de análise diferem de forma fundamental daqueles de equilíbrio, ou termodinâmicos, que abordamos nos capítulos anteriores. Nos **métodos cinéticos de análise**, as medidas são feitas sob condições dinâmicas nas quais as concentrações dos reagentes e produtos estão mudando em função do tempo. Em contraste, os métodos termodinâmicos são realizados em sistemas que atingiram o equilíbrio ou estado estacionário, de forma que as concentrações são estáticas.

Nos **métodos cinéticos de análise**, as medidas são feitas enquanto as alterações líquidas estão ocorrendo ao longo da reação. Nos **métodos de análise de equilíbrio**, as medidas são feitas nas condições de equilíbrio ou estacionárias.

A distinção entre os dois tipos de métodos é ilustrada na Figura 29-1, que mostra o progresso no tempo da reação



em que A representa o analito, R o reagente e P o produto. Os métodos termodinâmicos operam na região além do tempo t_e quando as concentrações dos reagentes e produtos tornam-se constantes e o sistema químico está em equilíbrio. Em contraste, os métodos cinéticos são realizados durante o intervalo de tempo de 0 a t_e quando as concentrações do reagente e produto estão continuamente se alterando.

A seletividade nos métodos cinéticos é obtida pela seleção de reagentes e condições que produzem diferenças nas velocidades nas quais o analito e as interferências em potencial reagem. A seletividade nos métodos termodinâmicos é obtida pela escolha de reagentes e condições que geram diferenças nas constantes de equilíbrio.

Os métodos cinéticos estendem bastante o número de reações químicas que podem ser utilizadas para finalidades analíticas porque eles permitem o uso de reações que são muito lentas ou bastante incompletas para os procedimentos baseados em métodos termodinâmicos. Os métodos cinéticos podem ser baseados em reações de complexação, reações ácido-base, reações redox e outras. Muitos métodos cinéticos são baseados em reações catalisadas. Em um tipo de método catalítico o analito é o catalisador e este é determinado a partir do seu efeito sobre uma reação indicadora que envolve reagentes ou produtos que podem ser facilmente medidos. Esses métodos estão entre os mais sensíveis do repertório químico. Em outra reação catalisada, o catalisador é introduzido para acelerar a reação entre o analito e o reagente. Essa abordagem é freqüentemente muito seletiva, ou mesmo específica, particularmente quando uma enzima atua como catalisador.

Indubitavelmente, o uso mais difundido dos métodos cinéticos se dá nos laboratórios bioquímicos e clínicos, onde inúmeras análises baseadas em cinética excede àquelas fundamentadas na termodinâmica.¹

29A VELOCIDADE DAS REAÇÕES QUÍMICAS

Esta seção fornece uma breve introdução à cinética química, que é necessária para se entender as bases dos métodos cinéticos de análise.

29A-1 Mecanismos de Reação e Leis de Velocidade

O **mecanismo** de uma reação química consiste em uma série de equações químicas que descrevem as etapas elementares individuais que levam à formação dos produtos a partir dos reagentes. Muito do que os químicos sabem sobre os mecanismos foi adquirido com base em estudos nos quais a velocidade na qual os reagentes são consumidos ou os produtos são formados é medida em função de variáveis como as concentrações dos reagentes e produtos, a temperatura, a pressão, o pH e a força iônica. Esses estudos levam a uma **lei de velocidade** empírica que relaciona a velocidade da reação com a concentração dos reagentes, dos produtos e dos intermediários a qualquer instante. Os mecanismos são derivados postulando-se uma série de etapas elementares que fazem sentido químico e que são consistentes com a lei de velocidade empírica. Frequentemente, esses mecanismos são testados fazendo-se estudos planejados para descobrir e monitorar qualquer espécie transiente intermediária prevista pelo mecanismo.

A **lei de velocidade** para uma reação é uma relação matemática determinada experimentalmente entre a velocidade de uma reação e as concentrações dos reagentes, produtos e quaisquer outras espécies como os catalisadores, ativadores e inibidores.

Termos de Concentração nas Leis de Velocidade

As leis de velocidade são expressões algébricas constituídas por termos de concentração e constantes, as quais geralmente se parecem com as expressões de constantes de equilíbrio (ver Equação 29-2). Contudo, você deve observar que os termos entre colchetes em uma expressão de velocidade representam as concentrações molares *em um instante particular* em vez das concentrações molares de equilíbrio (como nas expressões das constantes de equilíbrio). Esse significado é enfatizado adicionando-se com freqüência um subscrito para indicar o tempo ao qual a concentração se refere. Assim, $[A]_t$, $[A]_0$ e $[A]_\infty$ indicam as concentrações de A no tempo t , tempo zero e infinito, respectivamente. O tempo infinito é tomado como qualquer intervalo de tempo maior que o requerido para atingir o equilíbrio. Isto é, $t_\infty > t_e$ na Figura 29-1.

◀ As concentrações molares são ainda simbolizadas por colchetes. Contudo, no contexto dos métodos cinéticos seus valores numéricos se alteram com o tempo.

¹H. O. Mottola, *Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*. New York: Wiley, 1988.

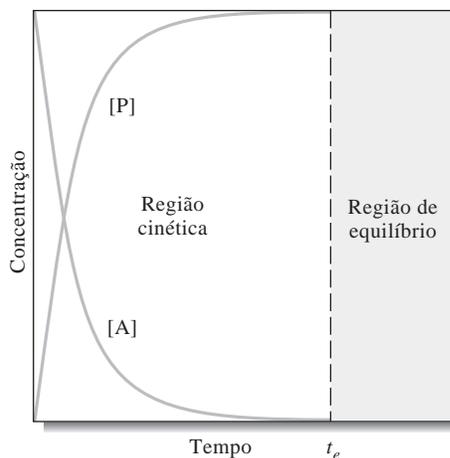


Figura 29-1 Alteração na concentração do analito [A] e do produto [P] em função do tempo. Até o tempo t_e , as concentrações do analito e do produto estão mudando continuamente. Esse é o regime cinético. Após t_e , as concentrações do analito e do produto são estáticas.

Ordem de Reação

Vamos supor que a lei de velocidade empírica para a reação geral mostrada pela Equação 29-1 foi encontrada experimentalmente e tem a forma

$$\text{velocidade} = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[A]^m[R]^n \quad (29-2)$$

na qual a velocidade é a derivada da concentração de A, R ou P com respeito ao tempo. Observe que as duas primeiras velocidades carregam um sinal negativo porque as concentrações de A e R decrescem no decorrer da reação.

► Em decorrência de A e R estarem sendo consumidos, as velocidades de alteração de [A] e [R] com respeito ao tempo são negativas.

Nessa expressão da velocidade, k é a **constante de velocidade**; m , é a **ordem da reação em relação a A**; e n , é a **ordem da reação com respeito a R**. A **ordem global da reação** é $p = m + n$. Assim, se $m = 1$ e $n = 2$, a reação é dita ser de primeira ordem em relação a A, de segunda ordem em relação a R e de terceira ordem global.

Unidades das Constantes de Velocidade

Uma vez que as velocidades das reações são sempre expressas em termos de concentração por unidade de tempo, as unidades da constante de velocidade são determinadas pela ordem global p da reação de acordo com a relação

$$\frac{\text{concentração}}{\text{tempo}} = (\text{unidades de } k)(\text{concentração})^p$$

em que $p = m + n$. Rearranjando obtém-se

$$\text{unidades de } k = (\text{concentração})^{1-p} \times \text{tempo}^{-1}$$

► As unidades da constante de velocidade k para uma reação de primeira ordem são s^{-1} .

Dessa forma, as unidades de uma constante de velocidade de primeira ordem são s^{-1} e as unidades para uma constante de segunda ordem são $\text{mol}^{-1} \text{L s}^{-1}$.

29A-2 A Lei de Velocidade para as Reações de Primeira Ordem

► O decaimento radioativo é um exemplo de uma decomposição espontânea.

O caso mais simples de análise matemática de uma cinética de reação é a da decomposição espontânea e irreversível de uma espécie A:



A reação é de primeira ordem em relação a A e a velocidade é

$$\text{velocidade} = -\frac{d[A]}{dt} = k[A] \quad (29-4)$$

Reações de Pseudoprimeira Ordem

Uma reação de decomposição de primeira ordem geralmente não apresenta nenhuma utilidade em química analítica porque uma análise é ordinariamente baseada em reações que envolvem pelo menos duas espécies, um analito e um reagente.² Contudo, geralmente, a lei de velocidade para uma reação envolvendo duas espécies é tão suficientemente complexa que torna necessárias as simplificações com objetivo analítico. De fato, a maioria dos métodos cinéticos úteis é realizada sob condições que permitem ao químico simplificar as leis complexas de velocidades a uma forma análoga à Equação 29-4. Uma reação de ordem alta que é realizada de forma que essa simplificação seja possível é denominada reação de **pseudoprimeira ordem**. Os métodos de conversão de reações de ordens mais altas para as reações de pseudoprimeira ordem serão mostrados nas próximas seções.

A Matemática para a Descrição do Comportamento de Primeira Ordem

Em virtude de a maioria das determinações cinéticas ser realizada sob condições de pseudoprimeira ordem, é importante examinar em detalhe algumas das características das reações que têm leis de velocidade que se aproximam da Equação 29-4.

Rearranjando-se a Equação 29-4, obtemos

$$\frac{d[A]}{[A]} = -kdt \quad (29-5)$$

A integral dessa equação desde o tempo zero, quando $[A] = [A]_0$ até o tempo t , quando $[A] = [A]_t$, é

$$\int_{[A]_0}^{[A]_t} \frac{d[A]}{[A]} = -k \int_0^t dt$$

A avaliação das integrais fornece

$$\ln \frac{[A]_t}{[A]_0} = -kt \quad (29-6)$$

Finalmente, tomando-se a exponencial de ambos os lados da Equação 29-6, obtemos

$$\frac{[A]_t}{[A]_0} = e^{-kt} \quad \text{ou} \quad [A]_t = [A]_0 e^{-kt} \quad (29-7)$$

Essa forma integrada da lei de velocidade fornece a concentração de A em função da concentração inicial $[A]_0$, da constante de velocidade k e do tempo t . Um gráfico dessa relação está representado na Figura 29-1. O Exemplo 29-1 ilustra o uso dessa equação para se encontrar a concentração de um reagente a um dado instante.

²O decaimento radioativo é uma exceção a essa afirmação. A técnica de análise por ativação neutrônica é baseada na medida do decaimento espontâneo do radionúclídeo gerado por irradiação de uma amostra em um reator nuclear.

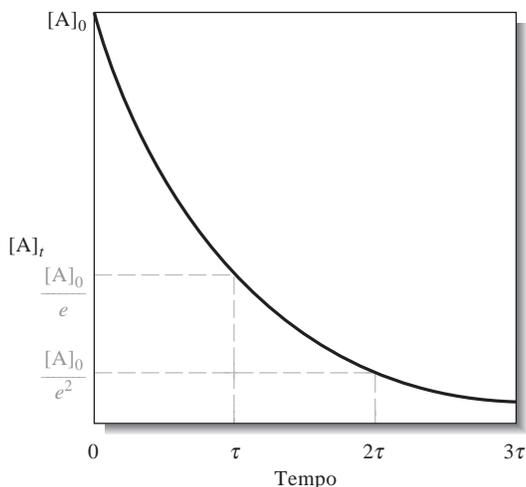


Figura 29-2 Curva de evolução de uma reação de primeira ordem mostrando que os intervalos de tempos iguais produzem reduções de frações idênticas na concentração do analito.

EXEMPLO 29-1

Uma reação de primeira ordem apresenta $k = 0,0370 \text{ s}^{-1}$. Calcule a concentração restante do reagente aos 18,2 s do início da reação se a sua concentração inicial era de $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$.

Substituindo na Equação 29-7 obtém-se

$$[A]_{18,2} = (0,0100 \text{ mol L}^{-1})e^{-(0,0370 \text{ s}^{-1}) \times (18,2 \text{ s})} = 0,00510 \text{ mol L}^{-1}$$

Quando a velocidade de uma reação está sendo acompanhada pela velocidade de aparecimento de um produto P em vez da velocidade de desaparecimento do analito A, é útil modificar a Equação 29-7 para relacionar a concentração de P no tempo t com a concentração inicial do analito $[A]_0$. A concentração de A a qualquer instante é igual à sua concentração original menos a concentração do produto (quando 1 mol do produto forma 1 mol do analito). Assim

$$[A]_t = [A]_0 - [P]_t \quad (29-8)$$

Substituindo essa expressão para $[A]_t$ na Equação 29-7 e rearranjando, obtém-se

$$[P]_t = [A]_0(1 - e^{-kt}) \quad (29-9)$$

Um gráfico dessa relação também é mostrado na Figura 29-1.

A forma das Equações 29-7 e 29-9 é de uma exponencial pura, a qual sempre aparece em ciência e engenharia. Uma exponencial pura nesse caso tem a característica útil de que cada intervalo de tempo idêntico fornece um decréscimo igual na fração da concentração de reagente

► A fração de reagente usada (ou produto formado) em uma reação de primeira ordem é a mesma para qualquer período.

que decresce ou de aumento da concentração do produto. Como exemplo, considere um intervalo de tempo $t = \tau = 1/k$, que substituído na Equação 29-7 fornece

$$[A]_{\tau} = [A]_0 e^{-k\tau} = [A]_0 e^{-k/k} = (1/e)[A]_0$$

e da mesma forma para um período $t = 2\tau = 2/k$,

$$[A]_{2\tau} = (1/e^2)[A]_0$$

e assim por diante para períodos sucessivos, como pode ser visto na Figura 29-2.

O período $\tau = 1/k$ é algumas vezes referido como **tempo de vida natural** das espécies A. Durante o tempo τ , a concentração de A decresce para $1/e$ do seu valor original. Um segundo período, de $t = \tau$ a $t = 2\tau$, produz um decréscimo de uma fração equivalente para $1/e$ do valor no início do segundo intervalo, o qual é $(1/e)^2$ de $[A]_0$. Um exemplo mais familiar dessa propriedade das exponenciais é encontrado na meia-vida de radionuclídeos. No período igual a $t_{1/2}$, metade dos átomos de uma amostra de um elemento radioativo decai para os produtos; um segundo período de $t_{1/2}$ reduz a quantidade do elemento a um quarto do número original, e assim por diante para períodos sucessivos. Independente do intervalo e do tempo escolhidos, tempos iguais produzem reduções de frações iguais na concentração do reagente para um processo de primeira ordem.

◀ DESAFIO: Derive uma expressão para $t_{1/2}$ em termos de τ .

EXEMPLO 29-2

Calcule o tempo necessário para que uma reação de primeira ordem com $k = 0,0500 \text{ s}^{-1}$ se processe até se tornar 99,0% completa.

Para se completar a 99,0%, $[A]_t/[A]_0 = (100 - 99)/100 = 0,010$; a substituição na Equação 29-6 fornece

$$\ln 0,010 = -kt = -(0,0500 \text{ s}^{-1})t$$

$$t = \frac{\ln 0,010}{0,0500 \text{ s}^{-1}} = 92 \text{ s}$$

29A-3 Leis de Velocidade para Reações de Segunda Ordem e de Pseudoprimeira Ordem

Considere uma reação analítica típica na qual 1 mol do analito A reage com 1 mol do reagente B para gerar um único produto P. Por hora, presumimos que a reação seja irreversível e escrevemos



Se a reação ocorre em uma única etapa elementar, a velocidade é proporcional à concentração de cada um dos reagentes, e a lei de velocidade é

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][R] \quad (29-11)$$

A reação é de primeira ordem em relação a cada reagente e de segunda ordem global. Se a concentração de R for selecionada de forma que $[R] \gg [A]$, a concentração de R se altera muito pouco durante o andamento da reação, e podemos escrever $k[R] = \text{constante} = k'$. A Equação 29-11 é então reescrita como

$$-\frac{d[A]}{dt} = k'[A] \quad (29-12)$$

a qual apresenta a forma idêntica à Equação 29-4 para o caso de primeira ordem. Dessa forma, a reação é dita ser de pseudoprimeira ordem em relação a A (ver Exemplo 29-3).

◀ As reações de segunda ordem ou de ordem superior podem, em geral, se tornar reações de pseudoprimeira ordem por controle das condições experimentais.

EXEMPLO 29-3

Para uma reação de pseudoprimeira ordem na qual o reagente está presente com excesso de cerca de 100 vezes, encontre o erro relativo resultante ao se presumir que $k[R]$ é constante quando a reação estiver 40% completa.

A concentração inicial do reagente pode ser expressa como

$$[R]_0 = 100[A]_0$$

A 40% da reação, 60% de A permanece sem reagir. Dessa forma,

$$[A]_{40\%} = 0,60[A]_0$$

$$[R]_{40\%} = [R]_0 - 0,40[A]_0 = 100[A]_0 - 0,40[A]_0 = 99,6[A]_0$$

Pressupondo um comportamento de pseudoprimeira ordem, a velocidade da reação a 40% é

$$-\frac{d[A]_{40\%}}{dt} = k[R]_0[A]_{40\%}$$

A velocidade verdadeira a 40% da reação é $k(99,6[A]_0)(0,60[A]_0)$. Assim, o erro relativo é

$$\frac{k(100[A]_0)(0,60[A]_0) - k(99,6[A]_0)(0,60[A]_0)}{k(99,6[A]_0)(0,60[A]_0)} = 0,004 \quad (\text{ou } 0,4 \%)$$

Como o Exemplo 29-3 mostra, o erro associado com a determinação da velocidade de uma reação de pseudoprimeira ordem com um excesso de 100 vezes de reagente é muito pequeno. Um excesso de 50 vezes de reagente leva a um erro de 1%, o qual é geralmente aceitável em métodos cinéticos. Além disso, o erro é ainda menos significativo quando a reação for menos de 40% completa.

Raramente as reações são inteiramente irreversíveis e uma descrição rigorosa da cinética de uma reação de segunda ordem que ocorra em uma única etapa deve levar em conta a reação reversa. A velocidade da reação é a diferença entre a velocidade da reação direta e a velocidade da reação inversa:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k_1[A][R] - k_{-1}[P]$$

na qual k_1 é a constante de velocidade de segunda ordem para a reação direta e k_{-1} a constante de velocidade de primeira ordem para a reação inversa. Ao derivar essa equação, supomos para simplificação que um único produto seja formado, porém casos mais complexos podem também ser descritos.³ À medida que as condições forem mantidas de forma que k_{-1} ou $[P]$, ou ambos, sejam relativamente pequenos, a velocidade da reação reversa será desprezível e um erro pequeno será introduzido ao pressupor-se o comportamento de pseudoprimeira ordem.

29A-4 Reações Catalisadas

As reações catalisadas, particularmente aquelas nas quais as enzimas servem como catalisador, são amplamente empregadas para a determinação de uma variedade de espécies bioquímicas e biológicas, bem como

³Ver J. H. Esperson, *Chemical Kinetics and Reaction Mechanisms*, 2. ed., p. 49-52. Nova York: McGraw-Hill, 1995.

de inúmeros cátions e ânions inorgânicos. Deveríamos, então, utilizar as reações catalisadas por enzimas para ilustrar as leis de velocidade catalíticas e para mostrar como essas leis de velocidade podem ser reduzidas a expressões algébricas relativamente simples, como a Equação 29-12 de pseudoprimeira ordem. Essas relações simplificadas podem ser utilizadas para as finalidades analíticas.

Reações Catalisadas por Enzimas

As enzimas são moléculas de proteínas com alto peso molecular que catalisam as reações importantes em biologia e biomedicina. O Destaque 29-1 mostra as características básicas das enzimas. As enzimas são particularmente úteis como reagentes analíticos em razão de sua seletividade. Conseqüentemente, elas são amplamente empregadas na determinação de moléculas com as quais elas se combinam quando agem como catalisadores. Essas moléculas são geralmente designadas como **substratos**. Além da determinação de substratos, as reações catalisadas por enzimas são empregadas para a determinação de ativadores, inibidores e, naturalmente, das próprias enzimas.⁴

O comportamento de um grande número de enzimas é consistente com o mecanismo geral



Nesse mecanismo denominado **Michaelis-Menten**, a enzima E reage reversivelmente com o substrato S para formar o complexo enzima-substrato ES. Esse complexo então se decompõe irreversivelmente para formar o(s) produto(s) e regenerar a enzima. A lei de velocidade para esse mecanismo assume uma de duas formas, dependendo das velocidades relativas das duas etapas. No caso mais geral, as velocidades das duas etapas são comparáveis em grandeza. Nesse caso, ES se decompõe tão rapidamente como quando foi formado e a sua concentração pode ser considerada pequena e relativamente constante no decorrer da maior parte da reação.

DESTAQUE 29-1

Enzimas

As enzimas são proteínas que catalisam as reações necessárias à manutenção da vida. Assim como outras proteínas, as enzimas consistem em cadeias de aminoácidos. As fórmulas estruturais de alguns aminoácidos importantes são mostradas na Figura 29D-1. As moléculas formadas pela ligação de dois ou mais aminoácidos são denominadas **peptídeos**. Cada aminoácido em um peptídeo é chamado **resíduo**. As moléculas com muitas ligações de aminoácidos são **polipeptídeos** e aquelas com cadeias longas de po-

lipeptídeos são **proteínas**. As enzimas diferem das outras proteínas pelo fato de que uma área específica das suas estruturas, conhecida como sítio ativo, auxilia na catálise. Como resultado, a catálise enzimática é freqüentemente muito específica, favorecendo um substrato em particular sobre outros compostos similares.

A estrutura da proteína é muito importante para essa função. A **estrutura primária** é a seqüência de aminoácidos da proteína. A **estrutura secundária** é a forma que a cadeia polipeptídica

(continua)

◀ As enzimas são moléculas de alto peso molecular que catalisam as reações em sistemas biológicos. Elas podem servir como reagentes altamente seletivos.

As espécies sobre as quais a enzima atua são chamadas **substratos**. As espécies que aumentam a velocidade de uma reação, mas não tomam parte na reação estequiométrica, são conhecidas como **ativadores**. As espécies que não participam da reação estequiométrica, porém decrescem a sua velocidade, são ditas **inibidores**.

⁴Para uma revisão recente sobre as reações catalisadas para métodos cinéticos, ver S. R. Crouch, A. Scheeline e E. W. Kirkor, *Anal. Chem.*, 2000, v. 72, p. 53R.

assume. Existem dois tipos de estruturas secundárias, a hélice α e a fita β -pregueada (β -pleated sheet). A hélice α , apresentada na Figura 29D-2, é a forma mais comum adotada pelas proteínas animais. Nessa estrutura, a forma helicoidal é mantida pelas ligações de hidrogênio entre os resíduos vizinhos. A estrutura de fita β -pregueada é mostrada na Figura 29D-3. Nessa estrutura,

a cadeia peptídica está quase completamente estendida e as ligações de hidrogênio se dá entre as secções paralelas das cadeias em vez de entre os vizinhos próximos, como na hélice α . A estrutura de fita β -pregueada pode ser encontrada em fibras, como na seda. Muitos outros modelos complexos, como o modelo de encaixe induzido, têm sido propostos.

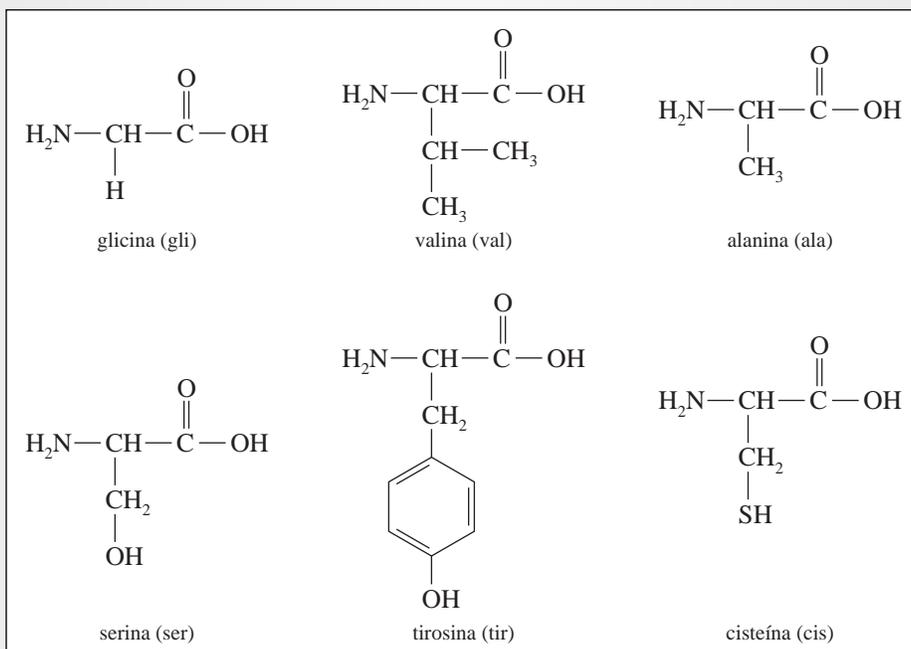


Figura 29D-1 Alguns aminoácidos importantes. Há 20 aminoácidos diferentes encontrados na natureza.

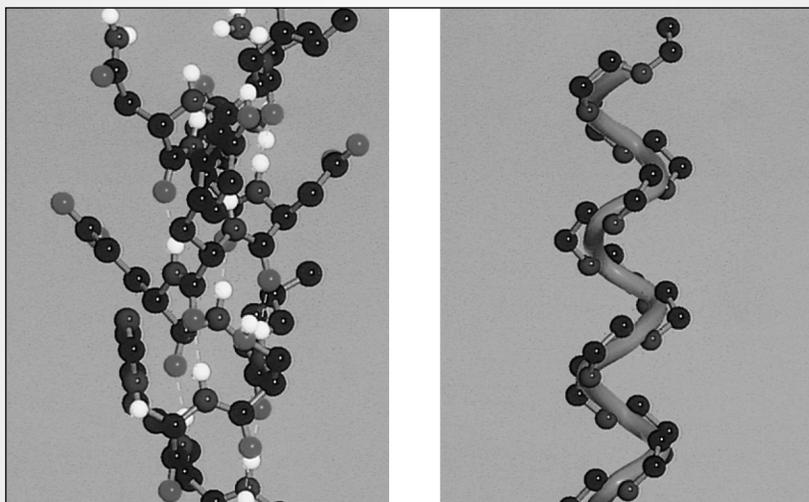


Figura 29D-2 A hélice α . No modelo à esquerda são apresentadas as ligações de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos vizinhos que levam à estrutura helicoidal. No modelo à direita, somente os átomos na cadeia polipeptídica são mostrados para revelar com mais clareza a estrutura helicoidal. (De D. L. Reger, S. R. Goode e E. E. Mercer, *Chemistry: Principles and Practice*. Belmont, CA: Brooks/Cole, 1993.)

A estrutura terciária é a forma global tridimensional na qual a hélice α ou fita β -pregueada se dobra em consequência das interações entre resíduos distantes na estrutura primária. As proteínas podem também apresentar uma estrutura quaternária, a qual descreve como as cadeias de polipeptídeos se juntam em uma proteína que contém mais de uma cadeia.

A efetividade de uma enzima como catalisador é denominada **atividade enzimática**. A atividade está relacionada de perto com o formato tridimensional da proteína, particularmente do seu sítio ativo. Em geral, o sítio ativo é a parte da proteína à qual o substrato se liga. A especificidade da enzima depende em grande parte da

estrutura da região do sítio ativo. Uma explicação do papel do sítio ativo é o modelo “fechadura e chave”. Nesse modelo, o encaixe estereoquímico preciso do substrato no sítio ativo é responsável pela especificidade da catálise.

Um número enorme de enzimas tem sido descoberto, porém apenas uma fração dessas tem sido isolada e purificada. A disponibilidade comercial de algumas das enzimas mais úteis tem impulsionado um grande interesse no seu uso analítico. As enzimas têm sido ligadas covalentemente em suportes sólidos ou têm sido encapsuladas em geis e membranas para tornarem-se reutilizáveis e para reduzir o custo das análises.

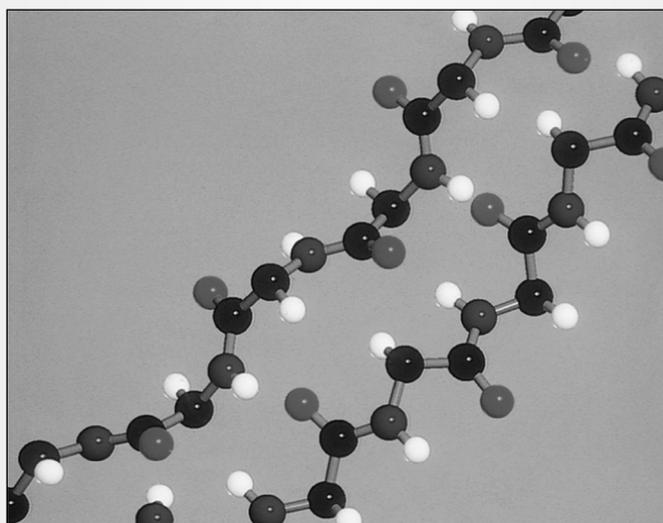


Figura 29D-3 A fita β -pregueada. Observe que as ligações de hidrogênio ocorrem entre diferentes seções da cadeia polipeptídica ou entre as diferentes cadeias, levando a uma estrutura mais estendida. (De D. L. Reger, S. R. Goode e E. E. Mercer, *Chemistry: Principles and Practice*. Belmont, CA: Brooks/Cole, 1993.)

Se a segunda etapa for consideravelmente mais lenta que a primeira (caso 1), os reagentes e ES estarão essencialmente sempre em equilíbrio. Essa situação denominada situação de equilíbrio é prontamente derivada do caso geral. Nas seções que se seguem, mostramos que, em ambos os casos, as condições da reação podem ser arranjadas de modo a produzir relações simples entre a concentração do analito e a velocidade.

Situação de Estado Estacionário

No tratamento mais geral, a lei de velocidade correspondente ao mecanismo da Equação 29-13 é derivado utilizando-se a **aproximação do estado estacionário**. Nessa aproximação, a concentração de ES é considerada pequena e relativamente constante no decorrer da reação. O complexo enzima-substrato forma-se na primeira etapa com uma constante de velocidade k_1 . Ele se decompõe por dois caminhos: pela reversão

da primeira etapa (constante de velocidade k_{-1}) e pela segunda etapa para formar o produto (constante de velocidade k_2). Presumir que $[ES]$ permaneça constante no decorrer da reação é o mesmo que pressupor que a velocidade de alteração da $[ES]$, $d[ES]/dt$, seja igual a zero. Assim, matematicamente a hipótese do estado estacionário é escrita como

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] = 0 \quad (29-14)$$

Na Equação 29-14, as concentrações da enzima $[E]$ e do substrato referem-se às concentrações livres a qualquer instante t . Geralmente, queremos expressar a lei de velocidade em termos da concentração total da enzima, a qual é conhecida ou possível de ser medida. Pelo balanço de massa, a concentração total (inicial) de enzima $[E]_0$ é dada por

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (29-15)$$

A velocidade de formação do produto é dada por

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (29-16)$$

Se resolvermos a Equação 29-14 para $[ES]$, obtemos

$$[ES] = \frac{k_1[E][S]}{k_{-1} + k_2} \quad (29-17)$$

Se agora substituirmos para $[E]$ a expressão dada na Equação 29-15 e resolvermos novamente para $[ES]$, obtemos

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{k_{-1} + k_2 + k_1[S]} \quad (29-18)$$

Substituindo esse valor para $[ES]$ na Equação 29-16 e rearranjando-a leva à lei de velocidade

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_m + [S]} \quad (29-19)$$

na qual o termo $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$ é conhecido como **constante de Michaelis**. A Equação 29-19 é frequentemente denominada **equação de Michaelis-Menten**. A partir da Equação 20-17, pode-se observar que a constante de Michaelis K_m é dada por

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \quad (29-20)$$

A constante de Michaelis é bastante parecida com a constante de equilíbrio para a dissociação do complexo enzima-substrato. Ela é algumas vezes referida como uma **constante de pseudoequilíbrio** uma vez que k_2 no numerador previne que ela seja uma constante de equilíbrio “verdadeira”. A constante de Michaelis é normalmente expressa em unidades de milimols/litro (mmol L^{-1}) e varia de 0,01 a 100 mmol L^{-1} para muitas enzimas, como pode ser visto na Tabela 29-1.

TABELA 29-1

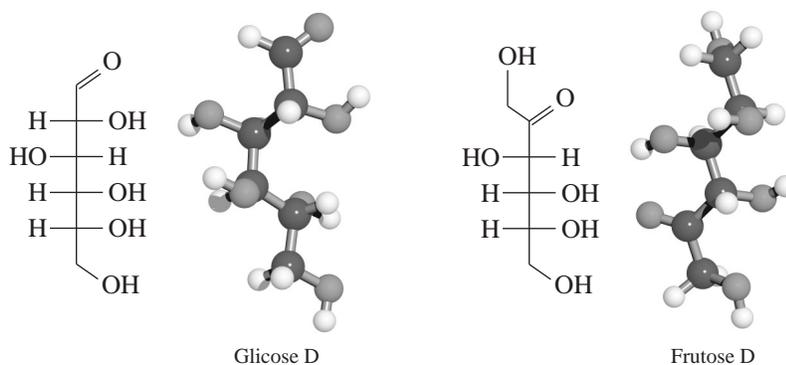
Enzima	Substrato	K_m , mmol L ⁻¹
Fosfatase alcalina	<i>p</i> -Nitrofenilfosfato	0,1
Catalase	H ₂ O ₂	25
Hexoquinase	Glicose	0,15
	Frutose	1,5
Fosfoquinase da creatina	Creatina	19
Anidrase carbônica	HCO ₃ ⁻	9,0
Quimotripsina	<i>n</i> -Benzoiltirosinamida	2,5
	<i>n</i> -Formiltirosinamida	12,0
	<i>n</i> -Acetiltirosinamida	32
	Gliciltirosinamida	122
Glucose oxidase	Glicose saturada com O ₂	0,013
Lactato desidrogenase	Lactato	8,0
	Piruvato	0,125
L-aminoácido oxidase	L-leucina	1,0
Urease	Uréia	2,0
Uricase	Ácido úrico saturado com O ₂	0,0175

A equação de velocidade dada pela Equação 29-19 pode ser simplificada de forma que a velocidade da reação seja proporcional à concentração da enzima ou do substrato. Por exemplo, se a concentração do substrato for grande o suficiente de forma a exceder muito a constante de Michaelis, $[S] \gg K_m$, a Equação 29-19 se reduzirá a

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[E]_0 \quad (29-21)$$

Sob essas condições, quando a velocidade for independente da concentração do substrato, a reação é dita **pseudo-ordem zero** em relação ao substrato e a velocidade é diretamente proporcional à concentração da enzima. Diz-se, então, que a enzima está **saturada** com o substrato.

◀ Para determinar enzimas, a concentração do substrato deve ser grande quando comparada com a constante de Michaelis, $[S] \gg K_m$.



Modelos moleculares para a glicose e frutose. A glicose e a frutose são monossacarídeos importantes. A glicose é um poliidroxialdeído, enquanto a frutose é uma poliidroxicetona. A glicose é o combustível primário para as células biológicas. A frutose é o açúcar predominante nas frutas e vegetais. Os dois açúcares são substratos para uma ou mais enzimas.

Quando as condições são tais que a concentração de S é pequena ou K_m é relativamente grande, então $[S] \ll K_m$ e a Equação 29-19 simplifica-se para

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{k_2}{K_m} [E]_0 [S] = k'[S]$$

em que $k' = k_2[E]_0/K_m$. Portanto, a cinética é de primeira ordem em relação ao substrato. Para se empregar essa equação na determinação de concentrações do analito, é necessário medir-se $d[P]/dt$ no início da reação, no qual $[S] \approx [S]_0$, de forma que

$$\frac{d[P]}{dt} \approx k'[S]_0 \quad (29-22)$$

► Para se determinar os substratos, as condições devem ser arranjadas de forma que a concentração do substrato seja pequena quando comparada com a constante de Michaelis: $[S] \ll K_m$.

As regiões nas quais as Equações 29-21 e 29-22 podem ser aplicadas são ilustradas na Figura 29-3, na qual a velocidade inicial da reação catalisada por uma enzima é colocada em forma de gráfico em função da concentração do substrato. Quando a concentração do substrato é pequena, a Equação 29-22, que é linear em relação à concentração do substrato, rege o formato da curva. E essa região é empregada para se determinar a quantidade de substrato presente.

Se quisermos determinar a quantidade de enzima, a região de alta concentração de substrato é empregada – para a qual se aplica a Equação 29-21 – e a velocidade é independente da concentração do substrato. A velocidade-limite da reação a valores altos de $[S]$ é a velocidade máxima que pode ser obtida a uma dada concentração de enzima, $v_{máx}$, como indicado na figura. Pode ser demonstrado que o valor da concentração do substrato a exatamente $v_{máx}/2$ é igual à constante de Michaelis K_m . O Exemplo 29-4 ilustra o uso da equação de Michaelis-Menten.

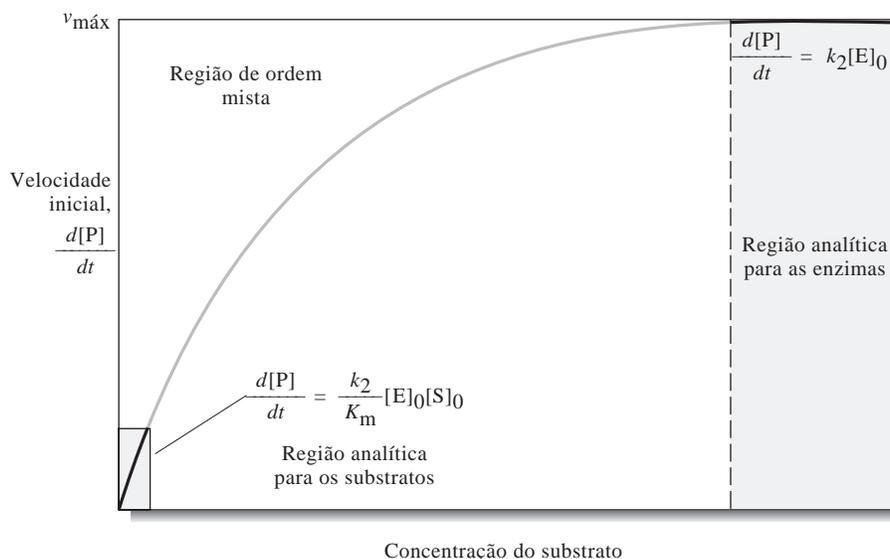


Figura 29-3 Gráfico da velocidade inicial de formação do produto em função da concentração do substrato, mostrando as partes da curva que são úteis para a determinação do substrato e da enzima.

EXEMPLO 29-4

A enzima urease, que catalisa a hidrólise da uréia, é muito empregada para a determinação desta substância em sangue. Os detalhes dessa aplicação são fornecidos no Destaque 29-3 nas páginas 896 e 893. A constante de Michaelis para a urease à temperatura ambiente é $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e $k_2 = 2,5 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ em pH 7,5. (a) Calcular a velocidade inicial da reação quando a concentração de uréia for $0,030 \text{ mmol L}^{-1}$ e a concentração de urease for $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (b) encontre $v_{\text{máx}}$.

(a) Da Equação 29-19,

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = \frac{k_2[\text{E}]_0[\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

No início da reação, $[\text{S}] = [\text{S}]_0$ e

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{P}]}{dt} &= \frac{(2,5 \times 10^4 \text{ s}^{-1})(5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1})(0,030 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1})}{2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} + 0,030 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}} \\ &= 1,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1} \end{aligned}$$

(b) A Figura 29-3 revela que $d[\text{P}]/dt = v_{\text{máx}}$ quando a concentração do substrato é alta e a Equação 29-21 pode ser aplicada. Assim,

$$d[\text{P}]/dt = v_{\text{máx}} = k_2[\text{E}]_0 = (2,5 \times 10^4 \text{ s}^{-1})(5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}) = 0,125 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

A Situação de Equilíbrio

O caso de equilíbrio é obtido prontamente do estado estacionário geral discutido. Quando a conversão de ES a produtos é lenta comparada com a primeira etapa reversível da Equação 29-13, a primeira etapa está essencialmente em equilíbrio. Matematicamente, isso ocorre quando k_2 é muito menor que k_{-1} . Sob essas condições, a Equação 29-19 torna-se

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = \frac{k_2[\text{E}]_0[\text{S}]}{\frac{k_{-1}}{k_1} + [\text{S}]} = \frac{k_2[\text{E}]_0[\text{S}]}{K + [\text{S}]} \quad (29-23)$$

em que a constante K é agora a constante de equilíbrio verdadeira dada por $K = k_{-1}/k_1$. Observe que a forma da Equação 29-23 é idêntica à equação de Michaelis-Menten (ver Equação 29-19). Há somente uma diferença sutil nas definições de K_m e de K . Portanto, as concentrações da enzima e do substrato podem ser determinadas da mesma maneira que na situação de estado estacionário para as reações enzimáticas nas quais k_2 é pequena e a condição de equilíbrio pode ser assumida. As concentrações da enzima são determinadas sob condição na qual a concentração do substrato é alta, enquanto as concentrações do substrato são determinadas quando $[\text{S}] \ll K$.

Há muitos outros mecanismos complexos para as reações enzimáticas envolvendo reações reversíveis, múltiplos substratos, ativadores e inibidores. As técnicas para se modelar e analisar esses sistemas estão disponíveis.⁵

⁵Ver, por exemplo, I. H. Segel, *Enzyme Kinetics*. Nova York: Wiley, 1975; C. F. Lam, *Techniques for the Analysis and Modelling of Enzyme Kinetic Mechanisms*. Chichester: Research Studies Press-Wiley, 1981.

Embora nossa discussão até o momento tenha sido voltada para os métodos enzimáticos, um tratamento análogo para as catálises comuns fornece leis de velocidade que são similares na forma às aquelas obtidas para as enzimas. Essas expressões freqüentemente reduzem-se para o caso de primeira ordem para facilitar o tratamento dos dados. Muitos exemplos de métodos catalíticos podem ser encontrados na literatura.⁶

29B DETERMINAÇÃO DA VELOCIDADE DE REAÇÃO

Muitos métodos são empregados para a determinação da velocidade de uma reação. Nesta seção, descrevemos alguns desses métodos e quando eles são empregados no decorrer de uma reação.

29B-1 Métodos Experimentais

O método pelo qual as velocidades das reações são medidas depende de a reação de interesse ser rápida ou lenta. A reação é geralmente considerada rápida se ela se processa até 50% do seu final em 10 s ou menos.

Uma **reação rápida** atinge 50% do seu final em 10 s ou menos.

Os métodos analíticos baseados em reações rápidas geralmente requerem equipamentos especiais que permitem a mistura de reagentes e a coleta dos dados rapidamente, como discutido no Destaque 29-2.

DESTAQUE 29-2

Reações Rápidas e Mistura Seguida por Interrupção de Fluxo

Um dos mais populares e confiáveis métodos para se realizar reações rápidas é a mistura seguida por interrupção de fluxo. Nessa técnica, as correntes de reagente e da amostra são misturadas rapidamente e o fluxo da solução resultante é interrompido abruptamente. O progresso da reação é então monitorado em um local ligeiramente além do ponto de mistura. O aparato mostrado na Figura 29D-4 é projetado para realizar a mistura seguida por interrupção de fluxo.

Para ilustrar a operação desse equipamento, começamos com as seringas cheias com o reagente e a amostra e com as válvulas A, B e C fechadas. A seringa de interrupção está vazia. O mecanismo de propulsão é então ativado de forma a mover rapidamente os êmbolos das seringas para a frente. O reagente e a amostra passam por dentro do misturador, onde são misturados, e imediatamente para dentro da célula de observação, como indicado pelas setas cinzas. A mistura reacional passa então para a seringa de interrupção. Eventualmente, a seringa de interrupção é

preenchida e o seu êmbolo bate contra um bloco fixo. Esse evento interrompe o fluxo quase instantaneamente, e uma porção de solução recém-misturada se encontra na célula de observação. Nesse exemplo, a célula de observação é transparente de forma que um feixe de luz pode passar para que sejam efetuadas as medidas de absorvância. Dessa forma, o progresso da reação pode ser monitorado. Tudo que se requer é que o tempo morto, ou o tempo entre a mistura dos reagentes e a chegada da amostra na célula de observação, seja pequeno em relação ao tempo requerido para que a reação se processe até o seu final. Para sistemas bem projetados, nos quais o fluxo turbulento no misturador permite uma mistura rápida e eficiente, o tempo morto é da ordem de 2 a 4 ms. Assim, as reações de primeira ordem ou de pseudoprimeira ordem com $\tau \approx 25$ ms ($k \approx 40$ s⁻¹) podem ser examinadas empregando-se a técnica de interrupção de fluxo.

Quando a reação se completa, a válvula C é aberta e o êmbolo da seringa de interrupção

⁶Ver D. Perez-Bendito e M. Silva, *Kinetic Methods in Analytical Chemistry*. Nova York: Halsted Press-Wiley, 1988; H. A. Mottola, *Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*. Nova York: Wiley, 1988.

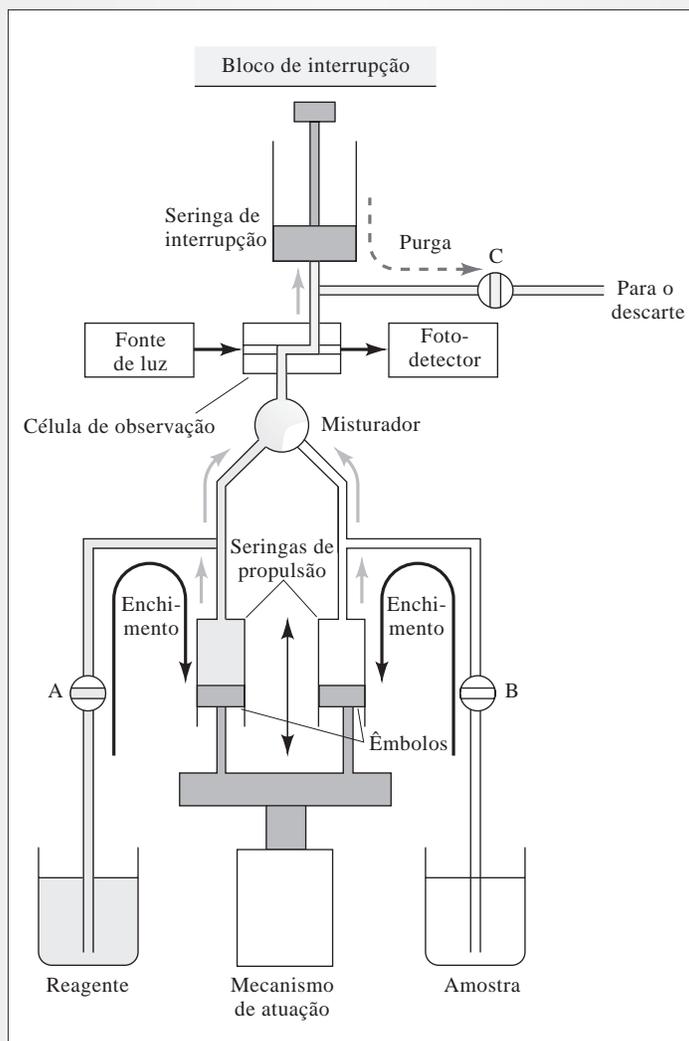


Figura 29D-4 Aparato para mistura seguida por interrupção de fluxo.

é empurrado de volta de forma a purgar essa seringa de seu conteúdo (seta tracejada). A válvula C é fechada e as válvulas A e B são abertas e o mecanismo de propulsão move-se para baixo para encher as seringas com as soluções (setas pretas largas). Nesse ponto, o aparelho está pronto para outro experimento de mistura rápida. Todo o instrumento pode ser controlado por um computador, o qual pode também coletar e analisar os dados da velocidade da reação.

A mistura seguida por interrupção de fluxo tem sido empregada em estudos fundamentais de reações rápidas e para determinações cinéticas rotineiras de analitos envolvidos em reações rápidas. Os princípios da dinâmica dos fluidos que tornam a mistura seguida por interrupção de fluxo possível e a capacidade deste e de dispositivos similares de manipular soluções são empregados em muitos contextos para misturar automaticamente as soluções e medir as concentrações do analito em inúmeros laboratórios industriais e clínicos.

Se uma reação é suficientemente lenta, os métodos convencionais de análise podem ser empregados para determinar a concentração do reagente ou produto em função do tempo. Porém, freqüentemente, a reação de interesse é muito rápida para muitas técnicas estáticas de medida – isto é, as concentrações alteram-se apreciavelmente durante o processo de medida. Sob essas circunstâncias, a reação deve ser interrompida (suprimida), enquanto a medida é feita ou uma técnica instrumental, que monitora as concentrações continuamente à medida que a reação ocorre, deve ser empregada. No primeiro caso, uma alíquota é removida da mistura reacional e é rapidamente suprimida pela adição de um reagente que se combina com um dos reagentes de forma a interromper a reação. Alternativamente, a supressão é obtida por meio de uma redução rápida da temperatura para desacelerar a reação em um nível aceitável para a etapa de medida. Infelizmente, as técnicas de supressão tendem a ser trabalhosas e geralmente demandam tempo e, portanto, não são empregadas com freqüência para as finalidades analíticas.

A forma mais conveniente de se obter dados cinéticos é monitorar o progresso de uma reação continuamente por espectrofotometria, condutimetria, potenciometria ou alguma outra técnica instrumental. Com o advento dos computadores de baixo custo, as leituras instrumentais proporcionais às concentrações dos reagentes ou produtos, ou ambos, puderam ser gravadas diretamente em função do tempo, armazenadas na memória do computador e recuperadas mais tarde para processamento.

Nas seções que se seguem, exploramos algumas estratégias empregadas nos métodos cinéticos de forma a permitir a determinação das concentrações do analito a partir dos gráficos que mostram o progresso da reação.

29-B2 Tipos de Métodos Cinéticos

Os métodos cinéticos são classificados de acordo com o tipo de relação que existe entre a variável medida e a concentração do analito.

O Método Diferencial

No **método diferencial**, as concentrações são computadas a partir das velocidades de reação por meio de uma forma diferencial da expressão da velocidade. As velocidades são determinadas medindo-se a inclinação da curva que relaciona a concentração do analito ou produto com o tempo de reação. Para ilustrar, vamos substituir $[A]_t$ da Equação 29-7 por $[A]$ na Equação 29-4:

$$\text{velocidade} = -\left(\frac{d[A]}{dt}\right) = k[A]_t = k[A]_0 e^{-kt} \quad (29-24)$$

Alternativamente, a velocidade pode ser expressa em termos da concentração do produto. Isto é,

$$\text{velocidade} = \left(\frac{d[P]}{dt}\right) = k[A]_0 e^{-kt} \quad (29-25)$$

As Equações 29-24 e 29-25 mostram a dependência da velocidade com k , t e, mais importante, com $[A]_0$, a concentração inicial do analito. A qualquer tempo fixo t , o fator ke^{-kt} é constante e a velocidade é diretamente proporcional à concentração inicial do analito. O Exemplo 29-5 ilustra o uso do método diferencial para calcular a concentração inicial do analito.

EXEMPLO 29-5

A constante de velocidade para uma reação de pseudoprimeira ordem é $0,156 \text{ s}^{-1}$. Encontre a concentração inicial do reagente se a sua velocidade de consumo após 10,00 s do início da reação for $2,79 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

A constante de proporcionalidade Ke^{-kt} é

$$ke^{-kt} = (0,156 \text{ s}^{-1})e^{-(0,156 \text{ s}^{-1})(10,00 \text{ s})} = 3,28 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$$

Rearranjado-se a Equação 29-24 e substituindo os valores numéricos, temos

$$\begin{aligned} [A]_0 &= \text{velocidade}/ke^{-kt} \\ &= (2,79 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1})/(3,28 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}) \\ &= 8,51 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \end{aligned}$$

A escolha do tempo no qual a velocidade da reação é medida normalmente é baseada em fatores de conveniência, na existência de reações paralelas interferentes e na precisão inerente de se fazer a medida a um tempo em particular. Frequentemente é vantajoso realizar a medida próximo a $t = 0$ porque essa porção da curva exponencial é aproximadamente linear (ver, por exemplo, as partes iniciais das curvas na Figura 29-1) e a inclinação é prontamente estimada da tangente à curva. Além disso, se a reação for de pseudo-primeira ordem, uma pequena quantidade de reagente em excesso é consumida de forma que nenhum erro seja produzido por alterações em k resultantes de alterações na concentração do reagente. Finalmente, o erro relativo na determinação da inclinação é mínimo no início da reação porque ela é máxima nessa região.

A Figura 29-4 ilustra como o método diferencial é empregado para a determinação da concentração de um analito $[A]_0$ a partir dos dados experimentais para a reação mostrada na Equação 29-1. As curvas contínuas na Figura 29-4a são gráficos das concentrações do produto medidas experimentalmente $[P]$ em função do tempo de reação para quatro soluções padrão de A. Essas curvas são empregadas para se preparar a curva analítica diferencial mostrada na Figura 29-4b. Para se obter as velocidades, traçam-se tangentes a cada uma das curvas na Figura 29-4a a um tempo próximo a zero (linhas pontilhadas na parte a). As inclinações das tangentes são colocadas em um gráfico em função de $[A]$, fornecendo a linha reta mostrada na Figura 29-4b. As amostras desconhecidas são tratadas da mesma forma, e as concentrações do analito são determinadas a partir da curva analítica.

Naturalmente, não é necessário que se registre toda a curva de velocidade, como foi feito na Figura 29-4a, uma vez que somente uma pequena parte do gráfico é empregada para se obter a inclinação. Tão logo um número suficiente de pontos tenha sido coletado para se determinar a inclinação inicial com precisão, pode-se economizar tempo e simplificar o processo como um todo. Procedimentos mais sofisticados de manipulação dos dados e de análise numérica permitem a medida da velocidade com precisão mesmo a tempos maiores; sob certas circunstâncias essas medidas são mais exatas e mais precisas do que aquelas feitas próximo a $t = 0$.

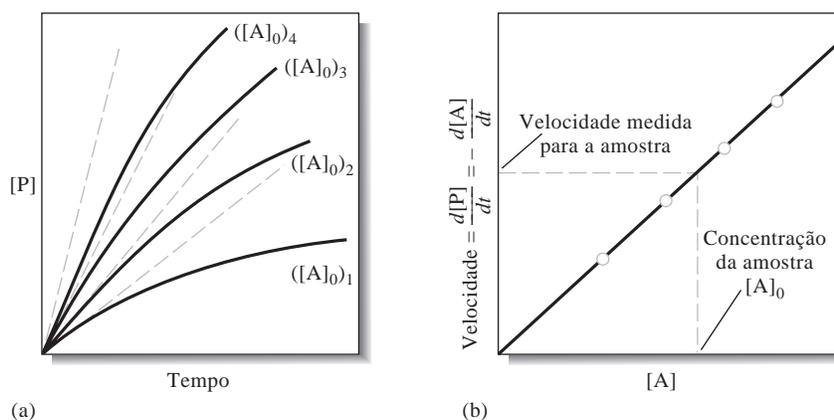


Figura 29-4 Gráfico dos dados de uma determinação de A pelo método diferencial. (a) Linhas contínuas representam os dados experimentais da concentração do produto em função do tempo para quatro concentrações iniciais de A. As linhas interrompidas são as tangentes às curvas a $t \rightarrow 0$. (b) Gráfico das inclinações obtidas a partir das tangentes em (a) em função da concentração do analito.

Métodos Integrais

Contrastando com os métodos diferenciais, os **métodos integrais** aproveitam as formas integradas das leis de velocidade, como aquelas mostradas pelas Equações 29-6, 29-7 e 29-9.

Métodos Gráficos A Equação 29-6 pode ser rearranjada para fornecer

$$\ln [A]_t = -kt + \ln [A]_0 \quad (29-26)$$

Assim, um gráfico do logaritmo natural das concentrações de A (ou P) medidas experimentalmente em função do tempo deveria fornecer uma linha reta com inclinação igual a $-k$ e com intercepto igual a $\ln[A]_0$. O uso desse procedimento para a determinação de nitrometano é ilustrado pelo Exemplo 29-6.

EXEMPLO 29-6

Os dados da primeira coluna da Tabela 29-2 foram registrados para a decomposição de pseudoprimeira ordem do nitrometano na presença de excesso de base. Encontre a concentração inicial de nitrometano e a constante de velocidade de pseudoprimeira ordem da reação.

Os valores computados para o logaritmo natural das concentrações de nitrometano são apresentados na terceira coluna da Tabela 29-2. Os dados dão origem ao gráfico da Figura 29-5. Uma análise de quadrados mínimos dos dados (ver Seção 8C-2) leva a um intercepto b igual a

$$b = \ln[\text{CH}_3\text{NO}_2]_0 = -5,129$$

a qual após exponenciação fornece

$$[\text{CH}_3\text{NO}_2]_0 = 5,92 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$$

TABELA 29-2

Dados para a Decomposição de Nitrometano

Tempo, s	$[\text{CH}_3\text{NO}_2], \text{ mol L}^{-1}$	$\ln[\text{CH}_3\text{NO}_2]$
0,25	$3,86 \times 10^{-3}$	-5,557
0,50	$2,59 \times 10^{-3}$	-5,956
0,75	$1,84 \times 10^{-3}$	-6,298
1,00	$1,21 \times 10^{-3}$	-6,717
1,25	$0,742 \times 10^{-3}$	-7,206

A análise de quadrados mínimos também fornece a inclinação da linha m , a qual nesse caso é

$$m = -1,62 = -k$$

e, assim,

$$k = 1,62 \text{ s}^{-1}$$

Métodos de Tempo Fixo Os métodos de tempo fixo são baseados na Equação 29-7 ou 29-9. A primeira pode ser rearranjada para

$$[A]_0 = \frac{[A]_t}{e^{-kt}} \quad (29-27)$$

A maneira mais simples de se empregar essa relação é realizar uma calibração experimental com uma solução padrão que apresente uma concentração de $[A]_0$ conhecida. Após um tempo de reação cuidadosamente medido t , $[A]_t$ é determinada e utilizada para se avaliar a constante e^{-kt} pela Equação 29-27. As amostras de concentração desconhecidas são então analisadas medindo-se $[A]_t$ após exatamente o mesmo tempo de reação e empregando o valor para e^{-kt} para computar as concentrações do analito.

A Equação 29-27 pode ser facilmente modificada para a situação na qual $[P]$ é medida experimentalmente em vez de $[A]$. A Equação 29-9 pode ser rearranjada para determinar $[A]_0$. Isto é

$$[A]_0 = \frac{[P]_t}{1 - e^{-kt}} \quad (29-28)$$

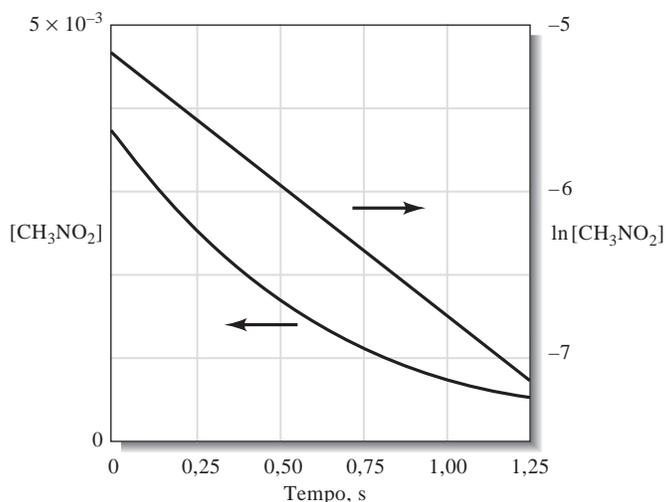


Figura 29-5 Gráfico da concentração de nitrometano e o logaritmo natural da concentração de nitrometano em função do tempo. Os dados são do Exemplo 29-6.

Uma abordagem mais interessante de utilização da Equação 29-27 ou 29-28 está em medir-se $[A]$ ou $[P]$ em dois tempos, t_1 e t_2 . Por exemplo, se a concentração do produto está sendo determinada, podemos escrever

$$[P]_{t_1} = [A]_0 (1 - e^{-kt_1})$$

$$[P]_{t_2} = [A]_0 (1 - e^{-kt_2})$$

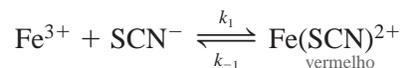
Subtraindo a primeira equação da segunda e rearranjando, obtém-se

$$[A]_0 = \frac{[P]_{t_2} - [P]_{t_1}}{e^{-kt_1} - e^{-kt_2}} = C([P]_{t_2} - [P]_{t_1}) \quad (29-29)$$

A recíproca do denominador, C , é constante para t_1 e t_2 fixados.

O uso da Equação 29-29 tem uma vantagem fundamental comum a muitos métodos cinéticos – isto é, a determinação da concentração ou de uma variável proporcional à concentração é desnecessária. A diferença entre as duas concentrações é proporcional à concentração inicial do analito.

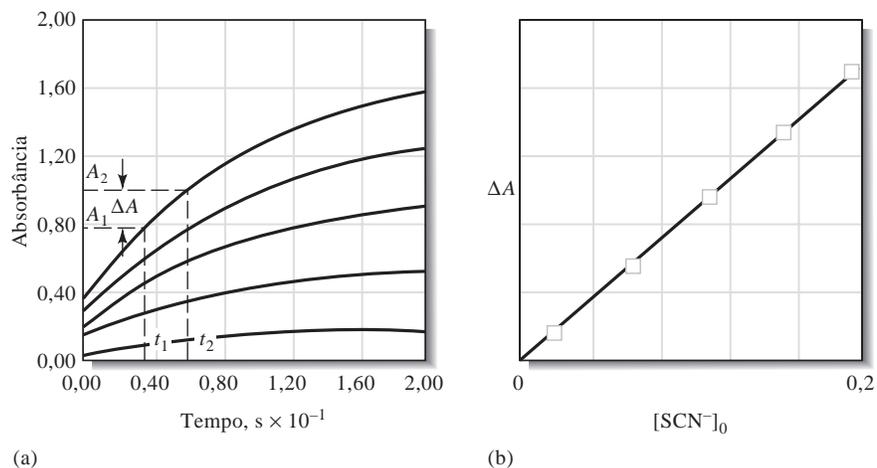
Um exemplo importante de um método não catalisado é a determinação pelo método do tempo fixo do íon tiocianato com base em medidas espectrofotométricas do seu complexo vermelho com ferro(III). A reação nessa aplicação é



Na condição de excesso de Fe^{3+} , a reação é de pseudoprimeira ordem em relação ao SCN^- . As curvas mostradas na Figura 29-6a indicam o aumento da absorbância em virtude do aparecimento do $\text{Fe}(\text{SCN})_{\text{vermelho}}^{2+}$ ao longo do tempo que se segue à mistura rápida de $0,100 \text{ mol L}^{-1}$ de Fe^{3+} com várias concentrações de SCN^- a pH 2. Uma vez que a concentração de $\text{Fe}(\text{SCN})_{\text{vermelho}}^{2+}$ está relacionada com a absorbância pela lei de Beer, os dados experimentais podem ser empregados diretamente sem a conversão para concentração. Assim, a mudança na absorbância ΔA entre os tempos t_1 e t_2 é computada e representada por gráfico contra $[\text{SCN}^-]_0$, como na Figura 29-6b. As concentrações desconhecidas são então determinadas pela avaliação de ΔA sob as mesmas condições experimentais, obtendo-se a concentração do íon tiocianato a partir da curva analítica ou pela equação de quadrados mínimos.

◀ Uma das maiores vantagens dos métodos cinéticos está na sua imunidade a erros resultantes de variações de longo tempo do sistema de medida.

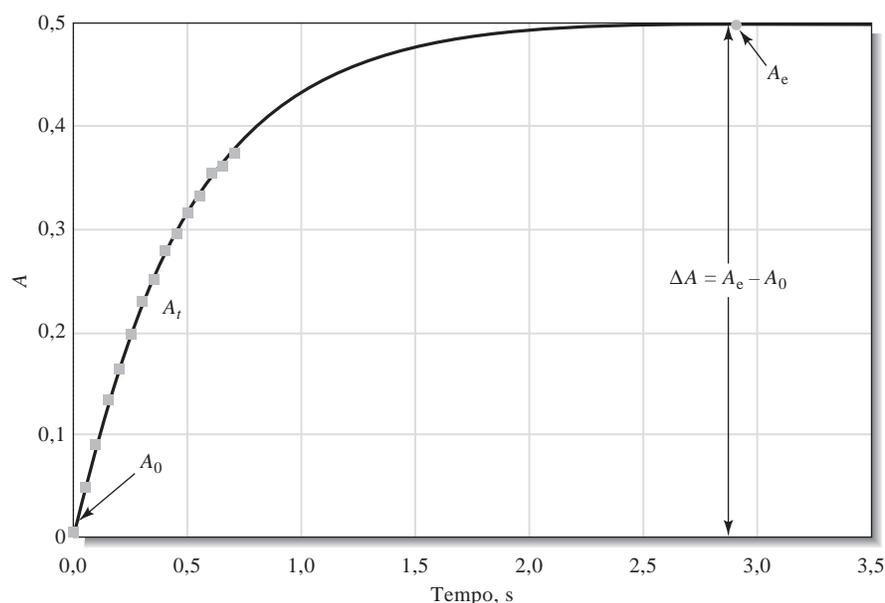
Figura 29-6 (a) Absorbância devida à formação do $\text{Fe}(\text{SCN})^{2+}$ em função do tempo para cinco concentrações de SCN^- . (b) Gráfico da diferença de absorbância ΔA entre os tempos t_1 e t_2 em função da concentração de SCN^- .



Os métodos de tempo fixo são vantajosos porque a quantidade medida é diretamente proporcional à concentração do analito e porque as medidas podem ser feitas *a qualquer instante* durante o progresso das reações de primeira ordem. Quando os métodos instrumentais são empregados para monitorar as reações por meio de procedimentos de tempo fixo, a precisão dos resultados analíticos se aproxima da precisão do instrumento utilizado.

Métodos de Ajuste de Curvas Com os computadores conectados aos instrumentos, o ajuste de um modelo matemático para a curva do sinal ou concentração *versus* tempo é muito fácil. Essas técnicas computam os valores dos parâmetros do modelo, incluindo a concentração inicial do analito, que “melhor” se ajusta aos dados. Dentre esses, o método mais sofisticado emprega os parâmetros do modelo para estimar a resposta no estado estacionário ou de equilíbrio. Esses métodos podem fornecer uma compensação de erros porque a posição de equilíbrio é menos sensível às variáveis experimentais como a temperatura, pH e concentrações de reagentes. A Figura 29-7 ilustra o uso dessa abordagem para prever a absorbância de equilíbrio a partir dos dados obtidos durante o regime cinético da curva de resposta. A absorbância no equilíbrio é então relacionada à concentração do analito da forma usual.

Figura 29-7 A abordagem preditiva nos métodos cinéticos. Um modelo matemático, apresentado pelos símbolos na forma de pequenos quadrados, é empregado no ajuste da resposta, apontado pela linha contínua, durante o regime cinético da reação. O modelo é então utilizado para prever o valor da concentração de equilíbrio do sinal, A_e , o qual está relacionado com a concentração do analito. No exemplo mostrado a absorbância é plotada *versus* o tempo e dados anteriores ao equilíbrio são empregados para prever A_e , o valor de equilíbrio, exposto na forma de círculo. (Reproduzido com permissão de G. L. Mieling e H. L. Pardue, *Anal. Chem.*, 1978, v. 50, p. 1611. Copyright da American Chemical Society.)



O computador habilita a implementação de muitas técnicas inovadoras junto aos métodos cinéticos. Alguns dos métodos recentes de compensação de erros não requerem o conhecimento *a priori* da ordem da reação para o sistema, empregando um modelo generalizado. Ainda, outros métodos calculam os parâmetros do modelo à medida que os dados são coletados em vez de empregar os métodos de processamento em batelada.

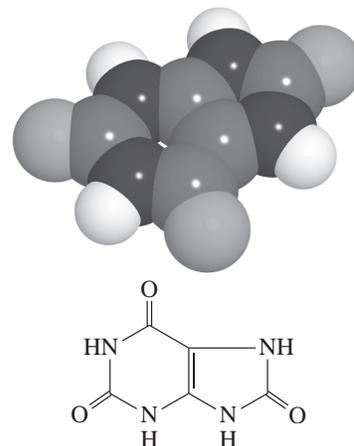
29C APLICAÇÕES DOS MÉTODOS CINÉTICOS

As reações utilizadas nos métodos cinéticos se distribuem em duas categorias: **catalisadas e não-catalisadas**. Como observado anteriormente, as reações catalisadas são as mais amplamente empregadas por causa da sua maior sensibilidade e seletividade. As reações não-catalisadas são empregadas com vantagem quando as medidas automáticas de alta velocidade são requeridas ou quando a sensibilidade do método de detecção é alta.⁷

29C-1 Métodos Catalíticos

Determinação de Espécies Inorgânicas

Muitos cátions e ânions catalisam reações indicadoras – isto é, reações cujas velocidades são medidas por métodos instrumentais, como a espectrofotometria de absorção, a espectrometria de fluorescência ou eletroquímica. As condições são empregadas de forma que a velocidade seja proporcional à concentração do catalisador e, a partir dos dados sobre a velocidade, a concentração do catalisador é determinada. Esses métodos catalíticos freqüentemente permitem a detecção extremamente sensível da concentração do catalisador. Os métodos cinéticos baseados em catálise por analitos inorgânicos são amplamente aplicados. Por exemplo, a literatura nessa área lista mais de 40 cátions e 15 ânions que têm sido determinados por uma variedade de reações indicadoras.⁸ A Tabela 29-3 fornece os métodos catalíticos para várias espécies inorgânicas juntamente com as reações indicadoras empregadas, o método de detecção e o limite de detecção.



Modelo molecular do ácido úrico. O ácido úrico é essencial ao processo digestivo. Contudo, se o corpo produz muito ácido úrico ou se ele não for excretado o suficiente, os altos níveis no sangue podem levar à concentração de cristais de urato de sódio nas juntas e tendões. Isso causa inflamação, pressão e dores agudas associadas com a artrite ou gota.

TABELA 29-3

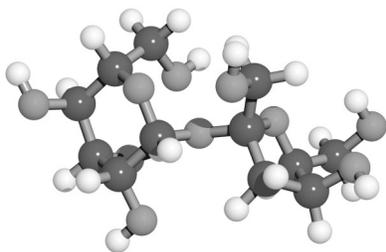
Métodos Catalíticos para Espécies Inorgânicas

Analito	Reação Indicadora	Método de Detecção	Limite de Detecção ng/mL
Cobalto	Catecol + H ₂ O ₂	Espectrofotometria	3
Cobre	Hidroquinona + H ₂ O ₂	Espectrofotometria	0,2
Ferro	H ₂ O ₂ + I ⁻	Potenciometria	50
Mercúrio	Fe(CN) ₆ ⁴⁻ + C ₆ H ₅ NO	Espectrofotometria	60
Molibdênio	H ₂ O ₂ + I ⁻	Espectrofotometria	10
Brometo	Decomposição do BrO ₃ ⁻	Espectrofotometria	3
Cloreto	Fe ²⁺ + ClO ₃ ⁻	Espectrofotometria	100
Cianeto	Redução do <i>o</i> -dinitrobenzeno	Espectrofotometria	100
Iodeto	Ce(IV) + As(III)	Potenciometria	0,2

⁷Para uma revisão sobre as aplicações dos métodos cinéticos, ver H. O. Mottola, *Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*, p. 88-121. Nova York: Wiley, 1988; D. Perez-Bendito e M. Silva, *Kinetic Methods in Analytical Chemistry*, p. 31-189. Nova York: Halsted Press-Wiley, 1988.

⁸M. Kapanica e V. Stara, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, G. Svehla, (Ed.) vol. XVIII, p. 11-227. Nova York: Elsevier, 1983.

Determinação de Espécies Orgânicas



Modelo molecular da sacarose. A sacarose é um dissacarídeo e consiste em duas unidades de monossacarídeos ligadas. Uma das unidades da sacarose é um anel de glicose (seis membros) e o outro é um anel de frutose (cinco membros). A sacarose é o açúcar comum.

Sem sombra de dúvida, as aplicações mais importantes das reações catalisadas em análises orgânicas envolvem o uso de enzimas como catalisadores. Esses métodos têm sido empregados para a determinação tanto de enzimas como de substratos e servem de base para muitos testes de rotina automáticos realizados em milhares de laboratórios ao redor do mundo. Muitos tipos de substratos enzimáticos têm sido determinados com o uso de reações catalisadas por enzimas. A Tabela 29-4 mostra alguns substratos que são determinados em diversas aplicações.⁹ Uma aplicação importante é a determinação da quantidade de uréia no sangue, chamada teste de nitrogênio uréico sanguíneo (NUS). Uma descrição dessa determinação é fornecida no Destaque 29-3.

TABELA 29-4

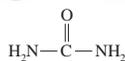
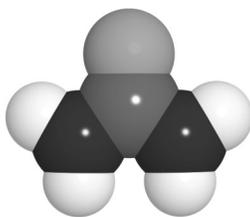
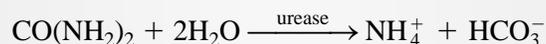
Substratos Importantes

Substrato	Enzima	Aplicação
Etanol	Álcool desidrogenase	Forense, alcoolismo
Galactose	Galactose oxidase	Diagnóstico da galactosemia
Glicose	Glicose oxidase	Diagnóstico da diabetes
Lactose	Lactase	Produtos alimentícios
Maltose	α -Glicosidase	Produtos alimentícios
Penicilina	Penicilinase	Preparações farmacêuticas
Fenol	Tirosinase	Água e efluentes
Sacarose	Invertase	Produtos alimentícios
Uréia	Urease	Diagnóstico de doenças do fígado e rins
Ácido úrico	Uricase	Diagnóstico da gota, leucemia e linfoma

DESTAQUE 29-3

Determinação Enzimática de Uréia

A determinação de uréia em sangue e urina é feita freqüentemente pela medida da velocidade de hidrólise da uréia $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ na presença da enzima urease. A equação para a reação é



Modelo molecular da uréia. A uréia é a diamida do ácido carbônico. Ela é excretada pelos mamíferos como produto do metabolismo das proteínas.

Como sugerido pelo Exemplo 29-4, a uréia pode ser determinada pela medida da velocidade inicial da formação dos produtos dessa reação. A alta seletividade da enzima permite o uso de métodos de detecção não-seletivos, como a condutividade elétrica, para a medida da velocidade inicial. Existem instrumentos comerciais que operam com base nesse princípio. A amostra é misturada com uma pequena quantidade de solução tamponada contendo a enzima em uma célula de condutividade. A velocidade máxima de aumento da condutância é medida após 10 s da mistura e a concentração de uréia é estabelecida a partir de uma curva analítica que consiste em um gráfico da velocidade máxima inicial em função da concen-

⁹Para mais informações, ver G. G. Guilbault, *Analytical Uses of Immobilized Enzymes*. Nova York: Dekker, 1984; P. W. Carr e L. D. Bowers, *Immobilized Enzymes in Analytical Chemistry*. Nova York: Wiley, 1980.

tração de uréia. A precisão do instrumento é da ordem de 2% a 5% para as concentrações na faixa fisiológica de 2 a 10 mmol L⁻¹.

Outro método de acompanhamento da velocidade de hidrólise da uréia está baseado no uso de um eletrodo específico aos íons amônio (ver Seção 21D). Nesse caso, a produção de NH₄⁺ é monitorada potenciométricamente e utilizada para se obter a velocidade da reação. Ainda em outra abordagem, a urease pode ser imobilizada sobre a superfície de um eletrodo de pH e a velocidade de alteração do pH é monitorada. Muitas enzimas têm sido imobilizadas sobre suportes como géis, membranas, paredes de tubos, pequenas esferas de vidro, polímeros e filmes finos. As **enzimas imobilizadas** mostram com frequência um aumento de estabilidade sobre a forma em solução. Além disso, elas podem ser reutilizadas, frequentemente por centenas ou milhares de análises.

◀ As enzimas podem ser imobilizadas por incorporação em um gel, por adsorção sobre um suporte sólido ou por ligações covalentes com um sólido.

Inúmeras espécies inorgânicas também podem ser determinadas por reações catalisadas por enzimas. Essas espécies incluem a amônia, o peróxido de hidrogênio, o dióxido de carbono e a hidroxilamina, bem como os íons nitrato, fosfato e pirofosfato.

Métodos cinéticos têm sido descritos visando à determinação quantitativa de centenas de enzimas. Algumas das enzimas que são importantes para o diagnóstico de doenças hepáticas são a transaminase glutâmica-oxaloacética presente no soro (TGOS), glutamato piruvato transaminase no soro (GPTS) e a lactato desidrogenase (LDH). Níveis elevados de TGOS, GPTS e LDH podem ocorrer também após os ataques cardíacos. Essas enzimas e a creatina fosfoquinase frequentemente diagnosticam o infarto do miocárdio. Outras enzimas de interesse para diagnósticos incluem as hidrolase, amilase, lipase e fosfatase alcalina, fosfo-hexose isomerase e aldolase.

Além disso, sabe-se que cerca de duas dúzias de cátions e ânions desconhecidos inorgânicos diminuem a velocidade de certas reações indicadoras catalisadas por enzimas. Esses *inibidores* podem ser determinados a partir do decréscimo da velocidade causado pela sua presença.

Os ativadores enzimáticos são substâncias, geralmente íons inorgânicos, que são necessários para que certas enzimas se tornem catalisadores ativos. Os ativadores podem ser determinados pelo seu efeito nas velocidades das reações catalisadas por enzimas. Por exemplo, foi relatado que concentrações de magnésio tão baixas como 10 ppb podem ser determinadas em plasma sanguíneo com base na ativação da enzima desidrogenase isocítrica por esse íon.

◀ Os métodos cinéticos são necessários para se determinar as atividades das enzimas, uma vez que a enzima é um catalisador e afeta somente a velocidade da reação.

◀ As enzimas podem ser empregadas na determinação de ativadores e inibidores. Os ativadores aumentam a velocidade da reação, enquanto os inibidores a diminuem.

29C-2 Reações Não-catalisadas

Como observado anteriormente, os métodos cinéticos baseados em reações não-catalisadas não são tão empregados como aqueles nos quais um catalisador esteja envolvido. Já descrevemos dois desses métodos (páginas 891, 892 e 893).

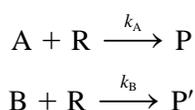
Geralmente as reações não-catalisadas são úteis quando reagentes seletivos são empregados conjuntamente com métodos de detecção sensíveis. Por exemplo, a seletividade dos agentes complexantes pode ser controlada ajustando-se o pH do meio na determinação de íons metálicos, como discutido na Seção 17D-8. A sensibilidade pode ser obtida pelo uso de detecção espectrofotométrica para monitorar reagentes que formam complexos com altas absorvidades molares. A determinação de Cu²⁺, apresentada no Problema 29-13, é um exemplo. Uma alternativa altamente sensível é selecionar complexos que fluorescem de forma

que a velocidade de alteração da fluorescência possa ser utilizada como medida da concentração do analito (ver Problema 29-14).

A precisão dos métodos cinéticos catalíticos e não-catalíticos depende das condições experimentais como o pH, força iônica e temperatura. Com o controle cuidadoso dessas variáveis, desvios padrão relativos de 1% a 10% são típicos. A automação dos métodos cinéticos e a análise computadorizada dos dados podem com frequência levar à precisão relativa para 1% ou melhor.

29C-3 Determinação Cinética de Componentes em Misturas

Uma aplicação importante dos métodos cinéticos está na determinação de espécies muito semelhantes entre si em misturas, como os cátions de metais alcalinos terrosos ou os compostos inorgânicos com mesmos grupos funcionais. Por exemplo, suponha que duas espécies A e B reajam com um reagente comum em excesso para formar produtos sob condições de pseudoprimeira ordem:



Em geral, k_A e k_B diferem uma da outra. Assim, se $k_A > k_B$, A é consumido antes que B. É possível mostrar que se a razão k_A/k_B for maior que cerca de 500, o consumo de A estará completo a 99% antes que 1% de B tenha sido gasto. Dessa forma, é possível a determinação diferencial de A sem a interferência significativa de B desde que a velocidade seja medida logo após a mistura.

Quando a razão das duas constantes for pequena, a determinação das duas espécies ainda é possível por meio de métodos mais complexos de tratamento de dados. Muitos desses métodos empregam técnicas quimiométricas multivariadas similares àquelas descritas no Destaque 8-3. Os detalhes sobre os **métodos cinéticos multicomponentes** estão além do escopo deste livro.¹⁰

EXERCÍCIOS NA WEB

Vá ao endereço <http://www.thomsonlearning.com.br>. A partir do menu das Chapter Resources, escolha *Web Works*. Localize a seção referente ao Capítulo 29 e você encontrará *links* para diversos fabricantes de instrumentos que produzem os analisadores de glicose baseados em reações enzimáticas. Encontre uma companhia que produza um analisador espectrofotométrico e uma que produza um analisador eletroquímico. Compare e contraponha as características dos dois instrumentos.

www.thomsonlearning.com.br

QUESTÕES E PROBLEMAS

29-1. Defina os seguintes termos na forma como são empregados nos métodos cinéticos de análise.

*(a) ordem de uma reação.

(b) pseudoprimeira ordem.

*(c) enzima.

(d) substrato.

*(e) constante de Michaelis.

(f) método diferencial.

*(g) método integral.

(h) reação indicadora.

¹⁰Para algumas aplicações de métodos cinéticos a misturas multicomponentes veja H. O. Mottola, *Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*, p. 122-148. Nova York: Wiley, 1988; D. Perez-Bendito e M. Silva, *Kinetic Methods in Analytical Chemistry*, p. 172-189. Nova York: Halsted Press-Wiley, 1988.

- 29-2. A análise de uma mistura multicomponente por métodos cinéticos é, algumas vezes, referida como “separação cinética”. Explique o significado desse termo.
- *29-3. Explique por que as condições de pseudo-primeira ordem são empregadas nos métodos cinéticos.
- 29-4. Liste três vantagens dos métodos cinéticos. Você pode estabelecer duas possíveis limitações dos métodos cinéticos quando comparados com os métodos de equilíbrio?
- *29-5. Desenvolva uma expressão para a meia-vida do reagente em um processo de primeira ordem em termos da constante de velocidade k .
- 29-6. Encontre o tempo de vida natural em segundos para as reações de primeira ordem correspondentes a
- *(a) $k = 0,351$.
 (b) $k = 6,62$.
 *(c) $[A]_0 = 1,06 \text{ mol L}^{-1}$ e $[A]_t = 0,150 \text{ mol L}^{-1}$ a $t = 4,125 \text{ s}$.
 (d) $[P]_\infty = 0,176 \text{ mol L}^{-1}$ e $[P]_t = 0,0423 \text{ mol L}^{-1}$ a $t = 9,62 \text{ s}$. (Suponha que 1 mol do produto seja formado para cada mol do analito que reage.)
 *(e) meia-vida $t_{1/2} = 15,8 \text{ anos}$.
 (f) $t_{1/2} = 0,478 \text{ s}$.
- 29-7. Encontre a constante de primeira ordem para uma reação que se completa em 55,8% após
- *(a) 0,0100 s.
 (b) 0,100 s.
 *(c) 1,00 s.
 (d) 5,280 s.
 *(e) 26,8 μs .
 (f) 8,86 ns.
- 29-8. Calcule o número de tempos de vidas τ necessários para que uma reação de pseudo-primeira ordem atinja os seguintes níveis de finalização:
- (a) 10%.
 (b) 50%.
 (c) 90%.
 (d) 99%.
 (e) 99,9%.
 (f) 99,99%.
- 29-9. Encontre o número de meias-vidas necessário para se atingir os níveis de finalização da reação listados no Problema 29-8.
- 29-10. Encontre o erro relativo associado com a hipótese de que k' não varia no decorrer de uma reação de pseudo-primeira ordem sob as seguintes condições.

	Extensão da Reação, %	Excesso de Reagente
*(a)	1	5×
(b)	1	10×
*(c)	1	50×
(d)	1	100×
*(e)	5	5×
(f)	5	10×
*(g)	5	100×
(h)	63,2	5×
*(i)	63,2	10×
(j)	63,2	50×
*(k)	63,2	100×

- 29-11. Mostre que para uma reação enzimática que obedece à Equação 29-19, a concentração do substrato para a velocidade $v_{\text{máx}}/2$ é igual a K_m .

- *29-12. A Equação 29-19 pode ser rearranjada para produzir a equação

$$\frac{1}{d[P]/dt} = \frac{K_m}{v_{\text{máx}}[S]} + \frac{1}{v_{\text{máx}}}$$

em que $v_{\text{máx}} = k_2[E]_0$, a velocidade máxima quando $[S]$ é grande.

- (a) Sugira uma forma de empregar essa equação na construção de uma curva analítica (de trabalho) para a determinação enzimática do substrato.
 (b) Descreva como a curva de trabalho resultante pode ser empregada para se determinar K_m e $v_{\text{máx}}$.

- *29-13. O cobre(II) forma um complexo 1:1 com o agente complexante R em meio ácido. A formação do complexo pode ser monitorada por espectrofotometria a 480 nm. Use os seguintes dados coletados sob condições de pseudo-primeira ordem para construir uma curva analítica da velocidade *versus* a concentração de R. Encontre a concentração de cobre(II) em uma amostra cuja velocidade sob as mesmas condições seja $7,0 \times 10^{-3} \text{ A s}^{-1}$.

$c_{\text{Cu}^{2+}}$, ppm	Velocidade, A s^{-1}
3,0	$3,6 \times 10^{-3}$
5,0	$5,4 \times 10^{-3}$
7,0	$7,9 \times 10^{-3}$
9,0	$1,03 \times 10^{-2}$

- 29-14. O alumínio forma um complexo 1:1 com 2-hidroxi-1-naftaldeído-*p*-metoxibenzoil-hidroxonal que exibe emissão fluorescente a 475 nm. Sob condições de pseudo-primeira ordem, um gráfico da velocidade inicial da reação (unidades de emissão por

segundo) *versus* a concentração de alumínio (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) fornece a reta descrita pela equação

$$\text{velocidade} = 1,74c_{\text{Al}} - 0,225$$

Encontre a concentração de alumínio em uma solução que exibe uma velocidade de 0,76 unidades de emissão por segundo sob as mesmas condições experimentais.

- *29-15. A enzima monoamina oxidase catalisa a oxidação de aminas a aldeídos. Para a triptamina, o K_m para a enzima é $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $v_{\text{máx}} = k_2[E]_0 = 1,6 \times 10^{-3} \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ a pH 8. Encontre a concentração de uma solução de triptamina que reage a uma velocidade de $0,22 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ na presença de monoamina oxidase sob essas condições. Assuma que $[\text{triptamina}] \ll K_m$.

- 29-16. Os seguintes dados representam a concentração do produto *versus* o tempo durante os estágios iniciais de reações de pseudo-primeira ordem para concentrações iniciais do analito $[A]_0$ diferentes.

t, s	[P] M				
0	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
10	0,00004	0,00018	0,00027	0,00037	0,00014
20	0,00007	0,00037	0,00055	0,00073	0,00029
50	0,00018	0,00091	0,00137	0,00183	0,00072
100	0,00036	0,00181	0,00272	0,00362	0,00144

$[A]_0, \text{mol L}^{-1}$ 0,01000 0,05000 0,07500 0,10000 desconhecido

Para cada concentração do analito, encontre a velocidade inicial média para as cinco janelas de tempo fornecidas. Faça um gráfico da velocidade inicial *versus* a concentração do analito. Obtenha a inclinação e intercepto por quadrados mínimos e determine a concentração desconhecida.

Dica: Uma boa forma de se calcular a velocidade inicial para uma dada concentração consiste em encontrar $\Delta[P]/\Delta t$ para o intervalo de 0 a 10 s, para 10 a 20 s, para 20 a 50 s e para 50 a 100 s; e então fazer uma média dos quatro valores obtidos. Alternativamente, a inclinação obtida por quadrados mínimos de um gráfico de $[P]$ *versus* t para o intervalo de 0 a 100 s pode ser utilizada.

- *29-17. Empregue o Excel para calcular as concentrações do produto *versus* tempo para uma reação de pseudoprimeira ordem com $k' = 0,015 \text{ s}^{-1}$ e $[A]_0 = 0,005 \text{ mol L}^{-1}$. Use tempos de 0,000 s; 0,001 s; 0,01 s; 0,1 s; 0,2 s; 0,5 s; 1,0 s; 2,0 s; 5,0 s; 10,0 s; 20,0 s; 50,0 s; 100,0 s; 200,0 s; 500,0 s e 1.000,0 s. A partir dos dois primeiros valores de

tempo, encontre a velocidade inicial “verdadeira” da reação. Determine aproximadamente qual é a porcentagem de finalização da reação que ocorre antes que a velocidade inicial caia a (a) 99% e (b) 95% do seu valor verdadeiro.

- 29-18. **Problema Desafiador.** A hidrólise do *N*-glutaril-*L*-fenilalanina-*p*-nitroanilida (GFNA) pela enzima α -quimotripsina (QT) para formar a *p*-nitroanilina e *N*-glutaril-*L*-fenilalanina segue o mecanismo de Michaelis-Menten nos seus estágios iniciais.

(a) Mostre que a Equação 29-19 pode ser manipulada para fornecer a seguinte transformação:

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m}{v_{\text{máx}}[S]_0} + \frac{1}{v_{\text{máx}}}$$

em que v_i corresponde à velocidade inicial, $(d[P]/dt)$, $v_{\text{máx}}$ é igual a $k_2[E]_0$ e $[S]_0$ se refere à concentração inicial de GFNA. Essa equação é freqüentemente denominada equação de Lineweaver-Burke. Um gráfico de $1/v_i$ *versus* $1/[S]_0$ é chamado gráfico de Lineweaver-Burke.

(b) Para $[QT] = 4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, empregue os seguintes resultados e o gráfico de Lineweaver-Burke para determinar K_m , $v_{\text{máx}}$ e k_2 .

$[GPNA]_0, \text{mmol L}^{-1}$	$v_i, \mu\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$
0,250	0,037
0,500	0,063
10,0	0,098
15,0	0,118

(c) Mostre que a equação de Michaelis-Menten para a velocidade inicial pode ser transformada para fornecer a equação de Hanes-Woolf:

$$\frac{[S]}{v_i} = \frac{[S]_0}{v_{\text{máx}}} + \frac{K_m}{v_{\text{máx}}}$$

Use um gráfico de Hanes-Woolf dos dados da parte (b) para determinar K_m , $v_{\text{máx}}$ e k_2 .

(d) Mostre que a equação de Michaelis-Menten para a velocidade inicial pode ser transformada para fornecer a equação de Eadie-Hofster:

$$v_i = -\frac{K_m v_i}{[S]_0} + v_{\text{máx}}$$

Empregue um gráfico de Eadie-Hofster com os dados da parte (b) para determinar K_m , $v_{\text{máx}}$ e k_2 .

- (e) Comente sobre qual desses gráficos deve ser mais exato para a determinação de K_m e $v_{m\acute{a}x}$, sob as circunstâncias fornecidas. Justifique.
- (f) O substrato GFNA deve ser determinado em uma amostra biológica empregando-se os dados da parte (b) na cons-

trução de uma curva analítica. Três amostras foram analisadas sob as mesmas condições da parte (b) e forneceram velocidades iniciais de 0,069; 0,102; e 0,049 $\mu\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$. Quais eram as concentrações de GFNA nessas amostras?

CAPÍTULO 30

Introdução às Separações Analíticas

As separações são extremamente importantes em síntese, na química industrial, nas ciências biomédicas e nas análises químicas. Por exemplo, a primeira etapa no processo de refino do petróleo é separá-lo em duas frações com base no ponto de ebulição em grandes torres de destilação. O petróleo é enviado a um grande destilador e a mistura, aquecida. Os materiais com os menores pontos de ebulição vaporizam-se primeiro. O vapor move-se para cima na torre ou coluna de destilação onde se recondensa na forma de um líquido muito mais puro. Controlando-se as temperaturas da caldeira e da coluna, pode-se controlar a faixa de ponto de ebulição da fração condensada.

As separações analíticas ocorrem em uma escala de laboratório muito menor que na escala industrial. Os métodos de separação introduzidos neste capítulo incluem a precipitação, a destilação, a extração, a troca iônica e várias outras técnicas cromatográficas.

Poucas técnicas de medidas empregadas na análise química são específicas para uma única espécie química; em consequência, uma parte importante da maioria das análises lida com as espécies concomitantes que ou atenuam o sinal do analito ou produzem um sinal que é indistinguível daquele do analito. A substância que afeta o sinal analítico ou o sinal de fundo é denominada **interferência** ou **interferente**.

Um **interferente** é uma espécie química que produz um erro sistemático em uma análise pelo aumento ou atenuação do sinal analítico ou do sinal de fundo.

Muitos métodos podem ser empregados para se lidar com as interferências nos procedimentos analíticos, como discutido na Seção 8C-3. As **separações** isolam o analito dos constituintes potencialmente interferentes. Além disso, as técnicas como a de modificação de matriz, o mascaramento, a diluição e a saturação são freqüentemente empregadas para compensar ou reduzir o efeito de interferentes. Neste capítulo, focalizaremos os métodos de separação, os quais constituem os métodos mais empregados e poderosos de tratamento de interferências.

Os princípios básicos de uma separação são apresentados na Figura 30-1.¹ Como exibido, as separações podem ser completas ou parciais. O processo de separação envolve o transporte do material e a redistribuição espacial dos seus componentes. Nota-se que uma separação requer sempre energia, porque o processo reverso de mistura, a volume constante, é espontâneo, sendo acompanhado de um aumento de entropia. As separações podem ser preparativas ou analíticas. Focalizaremos aqui as separações analíticas, embora muitos dos princípios estejam também envolvidos nas separações preparativas.

¹ Veja J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, p. 1-7. Nova York: Wiley, 1991.

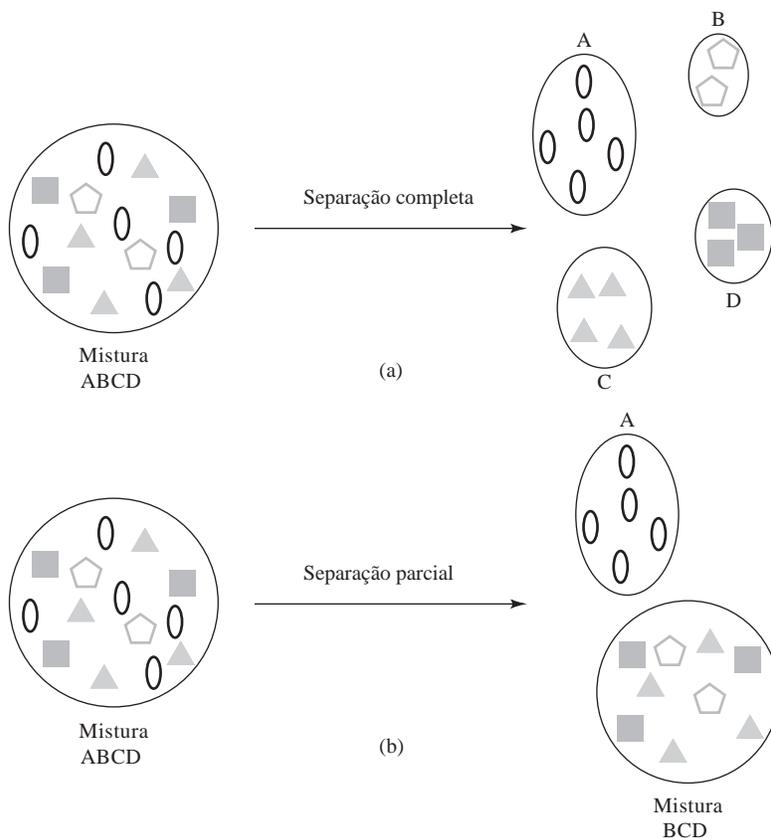


Figura 30-1 Princípios de uma separação. Em (a), uma mistura de quatro componentes é separada completamente de forma que cada componente ocupa uma região do espaço diferente. Em (b) uma separação parcial é mostrada. Nesse caso, a espécie A é isolada do restante da mistura de B, C e D. O inverso dos processos de separação apresentados é a mistura a volume constante.

Os objetivos de uma separação analítica são geralmente a eliminação ou redução de interferentes de forma que a informação analítica quantitativa sobre uma mistura complexa possa ser obtida. As separações também podem permitir a identificação dos constituintes separados se as correlações apropriadas forem feitas ou se uma técnica de medida sensível à estrutura, como espectrometria de massas, for empregada. Em técnicas como a cromatografia, a informação quantitativa é obtida quase simultaneamente com a separação. Em outros procedimentos, a etapa de separação é distinta e bastante independente da etapa de medida posterior.

A Tabela 30-1 lista vários métodos de separação que são de uso comum, incluindo (1) a precipitação química ou eletrolítica, (2) a destilação, (3) a extração por solventes, (4) a troca iônica, (5) a cromatografia, (6) a eletroforese e (7) o fracionamento por campo e fluxo. Os quatro primeiros são discutidos da Seção 30A até a 30E deste capítulo. Uma introdução à cromatografia é apresentada na Seção 30F. Os Capítulos 31 e 32 abordam a cromatografia gasosa e líquida, respectivamente, enquanto o Capítulo 33 aborda a eletroforese, fracionamento por campo e fluxo e outros métodos de separação.

30A SEPARAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO

As separações por precipitação requerem uma alta diferença de solubilidade entre o analito e os potenciais interferentes. A viabilidade teórica desse tipo de separação pode ser determinada por meio de cálculos de solubilidade, tais como aqueles mostrados na Seção 11C. Infelizmente, muitos outros fatores podem impedir o uso da precipitação para produzir uma separação. Por exemplo, os vários fenômenos de coprecipitação descritos na Seção 12A-5 podem causar uma contaminação extensiva do precipitado por um componente indesejado, mesmo que o produto de solubilidade do contaminante não tenha sido excedido.

TABELA 30-1

Métodos de Separação	
Método	Base do Método
Separação mecânica de fases	
Precipitação e filtração	Diferenças na solubilidade dos compostos formados
Destilação	Diferenças na volatilidade dos compostos
Extração	Diferenças na solubilidade em dois líquidos imiscíveis
Troca iônica	Diferenças na interação de reagentes com uma resina de troca iônica
Cromatografia	Diferenças na velocidade de movimentação de solutos passando por uma fase estacionária
Eletroforese	Diferenças na velocidade de migração de espécies com carga em um campo elétrico
Fracionamento por campo e fluxo	Diferenças na interação com um campo ou gradiente aplicado perpendicularmente à direção de transporte

De forma distinta, a velocidade de uma precipitação pode ser tão lenta que impeça o seu uso em uma separação. Finalmente, quando os precipitados formam-se como suspensões coloidais, a coagulação pode ser difícil ou lenta, particularmente quando se pretende isolar uma pequena quantidade de fase sólida.

Muitos agentes precipitantes têm sido empregados para separações inorgânicas quantitativas. Alguns daqueles mais úteis são descritos nas seções que seguem.

30A-1 Separações Baseadas no Controle da Acidez

Existem diferenças enormes nas solubilidades dos hidróxidos, óxidos hidratados e ácidos de vários elementos. Além disso, a concentração de íons hidrogênio ou hidróxidos pode ser variada de um fator de 10^{15} ou mais em uma solução e pode ser prontamente controlada por meio do emprego de tampões. Em consequência, muitas separações baseadas no controle do pH estão, em teoria, disponíveis para os químicos. Na prática, essas separações podem ser agrupadas em três categorias: (1) aquelas feitas em soluções relativamente concentradas de ácidos fortes, (2) aquelas feitas em soluções tamponadas em valores intermediários de pH, e (3) aquelas feitas em soluções concentradas de hidróxido de potássio ou sódio. A Tabela 30-2 lista algumas separações comuns que podem ser feitas pelo controle de acidez.

30A-2 Separações de Sulfetos

Com exceção dos metais alcalinos e alcalinos terrosos, a maioria dos cátions formam sulfetos muito pouco solúveis cujas solubilidades diferem grandemente entre si. Em virtude do fato de que é relativamente fácil controlar-se a concentração de íons sulfeto em uma solução aquosa de H_2S pelo ajuste do pH (ver Seção 11C-2), as separações baseadas na formação de sulfetos encontraram uso extensivo. Os sulfetos podem ser convenientemente precipitados a partir de uma solução homogênea, com o ânion sendo gerado pela hidrólise da tioacetamida (ver Tabela 12-1).

► Lembre-se da Equação

$$11-42, [S^{2-}] = \frac{1,2 \times 10^{-22}}{[H_3O^+]^2}$$

TABELA 30-2

Separações Baseadas no Controle de Acidez		
Reagente	Espécies de Precipitados Formados	Espécies que Não Precipitam
HNO_3 concentrado e a quente	Óxidos de W(VI), Ta(V), Nb(V), Si(IV), Sn(IV), Sb(V)	A maioria dos íons metálicos
Tampão NH_3/NH_4Cl	Fe(III), Cr(III), Al(III)	Metais alcalinos e alcalinos terrosos, Mn(II), Cu(II), Zn(II), Ni(II), Co(II)
Tampão HOAc/ NH_4OAc	Fe(III), Cr(III), Al(III)	Cd(II), Co(II), Cu(II), Fe(II), Mg(II), Sn(II), Zn(II)
NaOH/ Na_2O_2	Fe(III), a maioria dos íons +2, terras raras	Zn(II), Al(III), Cr(VI), V(V), U(VI)

Os equilíbrios iônicos que influenciam a solubilidade dos precipitados de sulfeto foram considerados na Seção 11C-2. Contudo, esses tratamentos podem não fornecer conclusões realísticas sobre a viabilidade das separações quando se considera a co-precipitação e a velocidade lenta com a qual alguns sulfetos se formam. Por essas razões, os químicos frequentemente valem-se de resultados prévios e de observações empíricas para indicar se uma dada separação é possível de ser conseguida com sucesso.

A Tabela 30-3 mostra algumas separações comuns que podem ser obtidas com o sulfeto de hidrogênio por meio do controle do pH.

30A-3 Separações por Outros Precipitantes Inorgânicos

De forma geral, não há outros íons inorgânicos que sejam úteis para separações como os íons hidróxido e sulfeto. Os íons fosfato, carbonato e oxalato são frequentemente empregados como precipitantes para cátions, porém seu comportamento não é seletivo; portanto, as separações prévias devem ser realizadas antes do seu uso.

O cloreto e o sulfato são úteis em razão de seu comportamento altamente seletivo. O primeiro é empregado para separar a prata de muitos outros metais, e o último, geralmente para isolar um grupo de metais que inclui o chumbo, o bário e o estrôncio.

30A-4 Separações por Precipitantes Orgânicos

Os reagentes orgânicos selecionados para isolar diversos íons inorgânicos foram discutidos na Seção 12D-3. Alguns desses precipitantes orgânicos, como a dimetilglioxima, são úteis por causa de sua seletividade notável ao formar precipitados com poucos íons. Outros, como a 8-hidroxiquinolina, formam compostos muito pouco solúveis com uma série de cátions. A seletividade desse tipo de reagente é consequência da alta faixa de solubilidade entre seus produtos de reação e também em decorrência de o reagente precipitante ser, ordinariamente, um ânion que é a base conjugada de um ácido fraco. Dessa forma, as separações baseadas em controle de pH podem ser realizadas, assim como com o sulfeto de hidrogênio.

30A-5 Separação de Espécies Presentes em Níveis de Traços por Precipitação

Um problema frequentemente encontrado na análise de traços é o isolamento de espécies de interesse, que podem estar presentes em quantidades de microgramas, de componentes majoritários da amostra. Embora essa separação seja algumas vezes baseada em precipitação, a técnica requerida difere daquelas empregadas quando o analito está presente em grandes quantidades.

Diversos problemas acompanham a separação quantitativa de elementos-traço por precipitação, mesmo quando as perdas por solubilidade não são importantes. A supersaturação com frequência atrasa a formação do precipitado e a coagulação de pequenas quantidades de uma substância coloidal dispersa é sempre difícil. Além disso, é provável que uma fração do precipitado sólido seja perdida durante a transferência e a filtração. Para minimizar essas dificuldades, uma certa quantidade de algum outro íon, que também forma um precipitado com o reagente, é frequentemente adicionada à solução. O precipitado do íon adicionado é denominado

TABELA 30-3

Precipitação de Sulfetos		
Elementos	Condições para Precipitação*	Condições para a Não Precipitação*
Hg(II), Cu(II), Ag(I)	1, 2, 3, 4	
As(V), As(III), Sb(V), Sb(III)	1, 2, 3	4
Bi(III), Cd(II), Pb(II), Sn(II)	2, 3, 4	1
Sn(IV)	2, 3	1, 4
Zn(II), Co(II), Ni(II)	3, 4	1, 2
Fe(II), Mn(II)	4	1, 2, 3

*1 = 3 mol L⁻¹ HCl; 2 = 0,3 mol L⁻¹ HCl; 3 = tamponado a pH 6 com acetato; 4 = tamponado a pH 9 com NH₃/(NH₄)₂S.

Um **coletor** é empregado para remover constituintes-traço de uma solução.

coletor e remove a espécie desejada presente em menor quantidade da solução. Por exemplo, para isolar o manganês como o seu dióxido muito pouco solúvel, uma pequena quantidade de ferro(III) é geralmente adicionada à solução do analito antes da introdução da amônia como agente precipitante. O óxido básico de ferro(III) remove mesmo o menor traço de dióxido de manganês. Outros exemplos incluem o uso de óxido básico de alumínio como coletor de quantidades-traço de titânio e o uso de sulfeto de cádmio para a coleta de traços de zinco e chumbo. Muitos outros coletores são descritos por Sandell e Onishi.²

Um coletor pode remover um constituinte como resultado de similaridades nas suas solubilidades. Outros coletores funcionam por co-precipitação, na qual o componente de menor concentração é adsorvido ou incorporado no precipitado coletor como resultado da formação de cristais mistos. É claro que um coletor não deve interferir com o método selecionado para determinar o componente-traço.

30A-6 Separação por Precipitação Eletrolítica

A precipitação eletrolítica é um método muito útil para efetuar separações. Nesse processo, a espécie mais facilmente reduzida, seja o componente desejado ou o não-desejado, é isolada como uma fase em separado. Esse método torna-se particularmente efetivo quando o potencial do eletrodo de trabalho é controlado a um nível predeterminado (ver Seção 22B).

O cátodo de mercúrio (página 648) tem encontrado ampla aplicação na remoção de muitos íons metálicos antes da análise da solução residual. Em geral, os metais reduzíveis mais facilmente que o zinco são convenientemente depositados em mercúrio, deixando íons como alumínio, berílio, metais alcalinos terrosos e metais alcalinos em solução. O potencial requerido para diminuir a concentração do íon metálico a qualquer nível que se queira é calculado diretamente a partir de dados polarográficos.

30A-7 Precipitação de Proteínas Induzida por Sais

Uma forma comum de separar as proteínas é pela adição de altas concentrações de sais. Esse procedimento é chamado *salting out* da proteína. A solubilidade das moléculas de proteínas mostra uma dependência complexa em relação ao pH, temperatura, natureza da proteína e a concentração do sal empregada. Para concentrações baixas de sal, a solubilidade geralmente aumenta com a concentração salina. Esse efeito *salting in* é explicado pela teoria de Debye-Hückel. Os contra-íons do sal envolvem a proteína e o efeito resultante é um decréscimo na atração eletrostática entre as moléculas de proteína. Isso, por sua vez, leva a um aumento de solubilidade com o aumento da força iônica.

A altas concentrações de sal, contudo, o efeito repulsivo de cargas iguais é reduzido, assim como são as forças que levam à solvatação da proteína. Quando essas forças são reduzidas o suficiente, a proteína precipita e o *salting out* é observado. O sulfato de amônio é um sal de baixo custo, amplamente empregado em razão de sua efetividade e alta solubilidade inerentes.

A altas concentrações, a solubilidade de uma proteína, S , é dada pela seguinte equação empírica:

$$\log S = C - K\mu \quad (30-1)$$

em que C é uma constante que é função do pH, da temperatura e da proteína; K , a constante de *salting out* que é função da proteína e do sal empregado; e μ , a força iônica.

As proteínas comumente são menos solúveis nos seus pontos isoeletrônicos. Dessa forma, a combinação de uma alta concentração salina com o controle do pH é empregada para efetuar o *salting out*. As misturas de proteínas podem ser separadas aumentando-se a força iônica em etapas. Deve-se tomar cuidado com algumas proteínas, pois o sulfato de amônio pode desnaturá-las. Os solventes alcoólicos são algumas vezes utilizados no lugar de sais. Eles reduzem a constante dielétrica e subsequentemente reduzem a solubilidade por meio da diminuição das interações entre a proteína e o solvente.

²E. B. Sandell e H. Onishi, *Colorimetric Determination of Traces of Metals*, 4. ed., p. 709-721. Nova York: Interscience, 1978.

30B SEPARAÇÕES DE ESPÉCIES POR DESTILAÇÃO

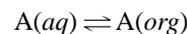
As destilações são amplamente empregadas para separar os compostos voláteis de interferentes não-voláteis. Um exemplo comum é a separação de analitos de nitrogênio de muitas outras espécies pela conversão do nitrogênio à amônia, a qual é então destilada a partir de uma solução alcalina. Outros exemplos incluem a separação do carbono como dióxido de carbono e enxofre como dióxido de enxofre.

30C SEPARAÇÃO POR EXTRAÇÃO

A extensão segundo a qual os solutos, quer inorgânicos quer orgânicos, distribuem-se entre duas fases líquidas imiscíveis difere significativamente e essas diferenças têm sido empregadas por décadas para realizar as separações de espécies químicas. Essa seção considera as aplicações do fenômeno de distribuição nas separações analíticas.

30C-1 Princípios

A partição de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis é um fenômeno de equilíbrio governado pela **lei de distribuição**. Se o soluto da espécie A distribui-se entre a água e uma fase orgânica, o equilíbrio resultante pode ser escrito como



em que as letras entre parênteses referem-se às fases aquosa e orgânica, respectivamente. Idealmente, a razão das atividades para A nas duas fases será uma constante e independente da quantidade total de A; isto é, a uma dada temperatura,

$$K = \frac{(a_A)_{org}}{(a_A)_{aq}} \approx \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}} \quad (30-2)$$

em que $(a_A)_{org}$ e $(a_A)_{aq}$ são as atividades de A em cada fase e os termos entre colchetes são as concentrações em mol L⁻¹ de A. A constante de equilíbrio K é conhecida como **constante de distribuição**. Como em muitos equilíbrios, sob muitas circunstâncias, as concentrações molares podem substituir as atividades sem que se cause um erro significativo. Geralmente, o valor numérico de K aproxima-se da razão entre a solubilidade de A em cada um dos solventes.

As constantes de distribuição são úteis porque nos permitem calcular a concentração do analito que permanece em solução após um número i de extrações. Também fornecem orientação sobre a forma mais eficiente de se realizar uma separação extrativa. Assim, podemos mostrar (ver Destaque 30-1) que para o sistema simples, descrito pela Equação 30-2, a concentração de A que permanece na fase aquosa após i extrações com um solvente orgânico ($[A]_i$) é dada pela equação

$$[A]_i = \left(\frac{V_{aq}}{V_{org}K + V_{aq}} \right)^i [A]_0 \quad (30-3)$$

em que $[A]_i$ é a concentração de A que permanece na solução aquosa após V_{aq} mL da solução de concentração original de $[A]_0$ com i porções do solvente orgânico, cada uma com volume de V_{org} . O Exemplo 30-1 ilustra como essa equação pode ser empregada para decidir sobre a forma mais eficiente de se realizar uma extração.

◀ É sempre melhor empregar pequenas porções do solvente para se extrair uma amostra do que extrair com uma única porção de maior volume.

EXEMPLO 30-1

A constante de distribuição do iodo entre um solvente orgânico e H_2O é 85. Encontre a concentração de I_2 que permanece na camada aquosa após a extração de 50,0 mL de $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de iodo com as seguintes quantidades de solvente orgânico: (a) 50,0 mL; (b) duas porções de 25,0 mL; (c) cinco porções de 10,0 mL.

Substituindo-se na Equação 30-3, obtém-se

$$(a) [\text{I}_2]_1 = \left(\frac{50,0}{(50,0 \times 85) + 50,0} \right)^1 \times 1,00 \times 10^{-3} = 1,16 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

$$(b) [\text{I}_2]_2 = \left(\frac{50,0}{(25,0 \times 85) + 50,0} \right)^2 \times 1,00 \times 10^{-3} = 5,28 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$$

$$(c) [\text{I}_2]_5 = \left(\frac{50,0}{(10,0 \times 85) + 50,0} \right)^5 \times 1,00 \times 10^{-3} = 5,29 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$$

Note o aumento das eficiências de extração que resulta da divisão do volume original de 50 mL do solvente em duas porções de 25 mL ou cinco de 10 mL.

A Figura 30-2 mostra que a melhoria da eficiência de múltiplas extrações cai rapidamente à medida que o volume total é subdividido em menores e menores porções. De forma clara, ganha-se pouco ao dividir o solvente extrator em mais do que cinco ou seis porções.

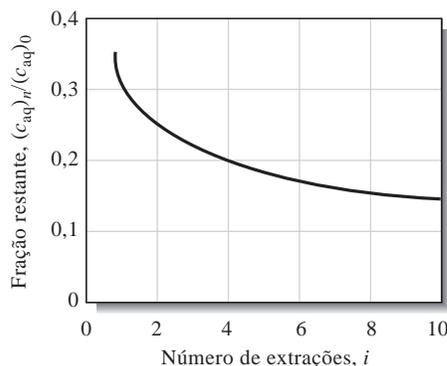


Figura 30-2 Gráfico da Equação 30-3 presumindo que $K = 2$ e $V_{\text{aq}} = 100 \text{ mL}$. O volume total de solvente orgânico foi pressuposto como 100 mL, de forma que $V_{\text{org}} = 100/n_i$.

DESTAQUE 30-1

Derivação da Equação 30-3

Considere um sistema simples, descrito pela Equação 30-2. Suponha n_0 mmol do soluto A em V_{aq} mL de uma solução aquosa, extraído com V_{org} mL de um solvente orgânico imiscível. No equilíbrio, n_1 mmol de A vai restar na fase aquosa e $(n_0 - n_1)$ mmols serão transferidos para a fase orgânica. As concentrações de A nas duas fases serão então

$$[\text{A}]_1 = \frac{n_1}{V_{\text{aq}}}$$

e

$$[\text{A}]_{\text{org}} = \frac{(n_0 - n_1)}{V_{\text{org}}}$$

A substituição dessas quantidades na Equação 30-2 e após os rearranjos resulta

$$n_1 = \left(\frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{org}}K + V_{\text{aq}}} \right) n_0$$

De maneira similar, o número de milimols, n_2 , restantes após a segunda extração com o mesmo volume de solvente será

$$n_2 = \left(\frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{org}}K + V_{\text{aq}}} \right) n_1$$

A substituição da equação anterior nessa expressão fornece

$$n_2 = \left(\frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{org}}K + V_{\text{aq}}} \right)^2 n_0$$

Pelo mesmo argumento, o número de milimols, n_i , que resta após i extrações é dado pela expressão

$$n_i = \left(\frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{org}}K + V_{\text{aq}}} \right)^i n_0$$

Finalmente, essa equação pode ser escrita em termos das concentrações iniciais e finais de A na fase aquosa pela substituição das relações

$$n_i = [A]_i V_{\text{aq}} \quad \text{e} \quad n_0 = [A]_0 V_{\text{aq}}$$

Assim,

$$[A]_i = \left(\frac{V_{\text{aq}}}{V_{\text{org}}K + V_{\text{aq}}} \right)^i [A]_0$$

que é a Equação 30-3.

30C-2 Extração de Espécies Inorgânicas

Uma extração é freqüentemente mais atraente que um método de precipitação para a separação de espécies inorgânicas. Os processos de equilíbrio e separação de fases em um funil de separação são menos tediosos e demandam menor tempo que a precipitação convencional, a filtração e a lavagem.

Separação de Metais como Quelatos

Muitos agentes quelantes são constituídos de ácidos fracos que reagem com os íons metálicos para formar complexos neutros altamente solúveis em solventes orgânicos, tais como éteres, hidrocarbonetos, cetonas e espécies cloradas (incluindo o clorofórmio e o tetracloreto de carbono).³ A maioria dos quelatos metálicos não-carregados, contudo, é praticamente insolúvel em água. De forma similar, os agentes quelantes por si mesmos são freqüentemente bastante solúveis em solventes orgânicos, mas apresentam solubilidade limitada em água.

A Figura 30-3 mostra o equilíbrio que se desenvolve quando uma solução aquosa de um cátion divalente, tal como o zinco(II), é extraído com uma solução orgânica contendo um grande excesso de

³ O uso de solventes clorados está diminuindo por causa da preocupação com seus efeitos sobre a saúde humana e por causa do seu possível papel na depleção da camada de ozônio.

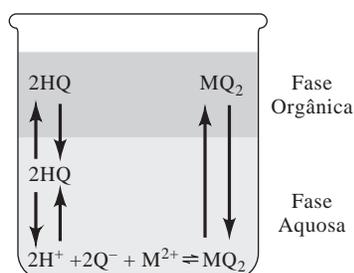
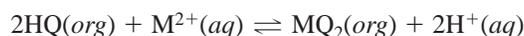


Figura 30-3 Equilíbrios na extração de um cátion metálico M^{2+} em um solvente orgânico imiscível contendo 8-hidroxiquinolina.

8-hidroxiquinolina (ver a Seção 12D-3 para a estrutura e reações desse agente quelante). Quatro equilíbrios são mostrados. O primeiro envolve a distribuição da 8-hidroxiquinolina, HQ, entre as camadas orgânica e aquosa. O segundo é a dissociação ácida da HQ para formar os íons H^+ e Q^- na fase aquosa. O terceiro equilíbrio refere-se à reação de formação do complexo gerando MQ_2 . O quarto corresponde à distribuição do quelato entre os dois solventes. Se não fosse pelo quarto equilíbrio, MQ_2 iria precipitar da solução aquosa. O equilíbrio total é a soma dessas quatro reações, ou



A constante de equilíbrio para essa reação é

$$K' = \frac{[MQ_2]_{org} [H^+]_{aq}^2}{[HQ]_{org}^2 [M^{2+}]_{aq}}$$

De forma usual, HQ está presente na fase orgânica em grande excesso em relação a M^{2+} na fase aquosa de forma que $[HQ]_{org}$ permanece essencialmente constante durante a extração. A expressão da constante de equilíbrio pode ser então simplificada para

$$K' [HQ]_{org}^2 = K = \frac{[MQ_2]_{org} [H^+]_{aq}^2}{[M^{2+}]_{aq}}$$

ou

$$\frac{[MQ_2]_{org}}{[M^{2+}]_{aq}} = \frac{K}{[H^+]_{aq}^2}$$

Assim, vemos que a razão de concentração das espécies metálicas nas duas fases é inversamente proporcional ao quadrado da concentração de íons hidrogênio na fase aquosa. As constantes de equilíbrio K variam amplamente de um íon metálico para outro; essas diferenças frequentemente tornam possível extrair-se seletivamente um cátion de uma mistura com outro pelo tamponamento da solução aquosa em um nível no qual um dos cátions é extraído quase completamente, enquanto o segundo permanece na fase aquosa também quase completamente.

Muitas separações extrativas úteis com 8-hidroxiquinolina têm sido desenvolvidas. Além disso, numerosos agentes quelantes, que se comportam de forma similar, são descritos na literatura.⁴ Em consequência, as extrações controladas por pH provêm um método poderoso de separação de íons metálicos.

Extração de Cloretos e Nitratos de Metais

Inúmeras espécies inorgânicas podem ser separadas por meio de extração com solventes adequados. Por exemplo, uma extração simples em éter de uma solução 6 mol L^{-1} de ácido clorídrico vai proporcionar a transferência de mais de 50% de diversos íons para a fase orgânica; incluindo entre esses o ferro(III), o antimônio(V), o titânio(III), o ouro(III), o molibdênio(VI) e o estanho(IV). Outros íons, tais como o alumínio(III) e os cátions divalentes do cobalto, chumbo, manganês e níquel, não são extraídos.

O urânio(VI) pode ser separado de elementos como o chumbo e o tório pela extração com éter de uma solução que seja $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido nítrico e saturada com nitrato de amônio. O bismuto e o ferro(III) são também extraídos em alguma extensão nesse meio.

⁴ Por exemplo, ver J. A. Dean, in *Analytical Chemistry Handbook*. Nova York: McGraw-Hill, 1995, p. 2.24.

30C-3 Extração em Fase Sólida

Existem diversas limitações nas extrações líquido-líquido. Com as extrações a partir de soluções aquosas, os solventes que podem ser empregados devem ser imiscíveis com a água e não devem formar emulsões. Outra dificuldade é que as extrações líquido-líquido usam volumes de solventes relativamente grandes, o que causa problemas com o descarte de resíduos. Também, muitas dessas extrações são realizadas manualmente e, como tal, são demoradas e tediosas.

A **extração em fase sólida**, ou extração líquido-sólido, pode contornar muitos desses problemas.⁵ As técnicas de extração em fase sólida empregam membranas, pequenas colunas descartáveis na forma de seringas ou cartuchos. Um composto orgânico hidrofóbico recobre ou está quimicamente ligado à sílica granulada formando a fase sólida extratora. Os compostos podem ser não-polares, moderadamente polares ou polares. Por exemplo, um octadecil (C_{18}) ligado à sílica (ODS) é uma fase sólida comum. Os grupos funcionais ligados à fase sólida atraem os compostos hidrofóbicos presentes na amostra por meio de interações de van der Waals e os extraem da solução aquosa.

Um sistema típico de cartucho para as extrações em fase sólida é apresentado na Figura 30-4. A amostra é colocada no cartucho e aplica-se pressão através de uma seringa ou por uma linha de ar ou nitrogênio. Alternativamente, vácuo pode ser empregado para passar a amostra pelo extrator. As moléculas orgânicas são extraídas da amostra e concentradas na fase sólida. Estas podem ser posteriormente desalojadas da fase sólida por um solvente como o metanol. Os componentes podem ser concentrados através da extração de um grande volume de água e posterior remoção com um pequeno volume de solvente. Os métodos de pré-concentração são freqüentemente necessários para os métodos analíticos de traços. Por exemplo, as extrações em fase sólida são utilizadas para a determinação de constituintes orgânicos em água potável por meio de métodos aprovados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) – Environmental Protection Agency. Em alguns procedimentos de extração, as impurezas são extraídas pela fase sólida, enquanto os compostos de interesse passam sem ser retidos.

Além dos cartuchos recheados, a extração em fase sólida pode ser feita pelo uso de pequenas membranas ou discos de extração. Estes apresentam as vantagens de reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente. A extração em fase sólida pode ser feita em sistemas de fluxo, o que pode automatizar o processo de pré-concentração.

Uma técnica correlata, denominada **microextração em fase sólida**, emprega uma fibra de sílica fundida recoberta com um polímero não-volátil para extrair os analitos orgânicos diretamente de amostras aquosas ou do espaço livre (*headspace*) sobre as amostras.⁶ O analito distribui-se entre a fibra e a fase líquida. Os analitos são posteriormente desorvidos termicamente na cabeça de um injetor de um cromatógrafo a gás (ver Capítulo 31). A fibra extratora é montada em um suporte que se parece com uma seringa comum. Essa técnica combina a amostragem e a pré-concentração em uma única etapa.

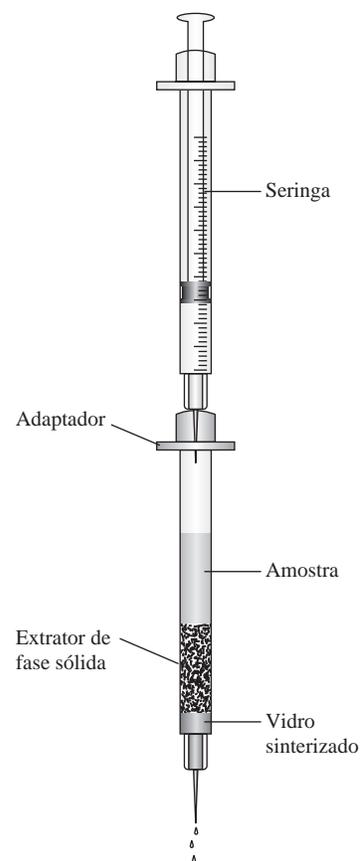


Figura 30-4 Extração em fase sólida realizada em um pequeno cartucho. A amostra é colocada no cartucho e aplica-se pressão por meio do êmbolo da seringa. Alternativamente, vácuo pode ser empregado para aspirar a amostra através do agente extrator.

⁵ Para mais informações, ver *Solid-Phase Extractions: Principles, Techniques and Applications*, N. J. K. Simpson, Ed. Nova York: Dekker, 2000; J. S. Fritz, *Analytical Solid-Phase Extraction*. Nova York: Wiley, 1999; E. M. Thurman e M. S. Mills, *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. Nova York: Wiley, 1998.

⁶ Para mais informações, ver *Solid-Phase Microextraction: A Practical Guide*, S. A. S. Wercinski, Ed. Nova York: Dekker, 1999; *Applications of Solid Phase Microextraction*, J. Pawliszyn, Ed. Londres: Royal Society of Chemistry, 1999.

30D SEPARAÇÃO DE ÍONS POR TROCA IÔNICA

A troca iônica é um processo pelo qual os íons presos em um sólido poroso e essencialmente insolúvel são trocados por íons presentes em uma solução que é levada ao contato com o sólido. As propriedades de troca iônica de argilas e zeólitas têm sido reconhecidas e estudadas por mais de um século. As resinas sintéticas trocadoras de íons foram inicialmente produzidas em 1935 e desde essa época encontraram ampla aplicação no amolecimento de água, na desionização de água, na purificação de soluções e na separação de íons.

► No processo de troca iônica, os íons presos sobre uma resina trocadora de íons são trocados por íons da solução que é colocada em contato com a resina.

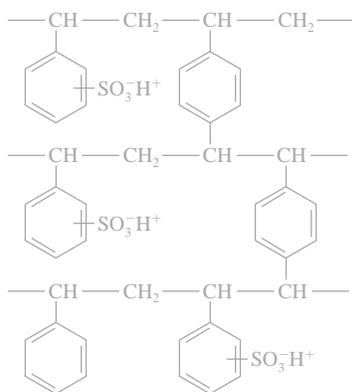
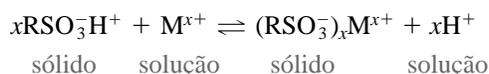


Figura 30-5 Estrutura de uma resina trocadora de íons de poliestireno com ligações cruzadas. Resinas similares apresentam a substituição dos grupos $-\text{SO}_3^-\text{H}^+$ por grupos $-\text{COO}^-\text{H}^+$, $-\text{NH}_3^+\text{OH}^-$ e $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$.

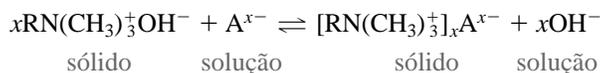
30D-1 Resinas Trocadoras de Íons

As resinas sintéticas trocadoras de íons são polímeros de alto peso molecular que contêm um grande número de grupos funcionais iônicos por molécula. As resinas trocadoras de cátions contêm grupos ácidos, enquanto as resinas trocadoras de ânions possuem grupos básicos. Os trocadores do tipo ácido forte apresentam grupos ácidos sulfônicos ($-\text{SO}_3^-\text{H}^+$) ligados à matriz polimérica (Figura 30-5) e têm aplicação mais ampla que os trocadores tipo ácido fraco, os quais devem sua ação a grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$). De forma similar, os trocadores de ânions tipo base forte possuem grupos amínicos quaternários [$-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{OH}^-$], enquanto os do tipo base fraca contêm aminas secundárias ou terciárias.

A troca de cátion é ilustrada pelo equilíbrio

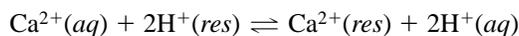


em que M^{x+} representa um cátion e R, a parte da molécula da resina que contém um grupo ácido sulfônico. O equilíbrio análogo envolvendo um trocador de ânion tipo base forte e o ânion A^{x-} é



30D-2 Equilíbrio de Troca Iônica

O equilíbrio de troca iônica pode ser tratado pela lei da ação das massas. Por exemplo, quando uma solução diluída contendo íons cálcio passa através de uma coluna recheada com uma resina ácida sulfônica, o seguinte equilíbrio é estabelecido:



para o qual uma constante de equilíbrio K' é dada por

$$K' = \frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{res}} [\text{H}^+]_{\text{aq}}^2}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{aq}} [\text{H}^+]_{\text{res}}^2} \quad (30-4)$$

Como usual, os termos entre colchetes representam as concentrações em mol L^{-1} (estritamente, as atividades) das espécies nas duas fases. Note que $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{res}}$ e $[\text{H}^+]_{\text{res}}$ são as concentrações molares dos dois íons na fase sólida. Em contraste com muitos sólidos, no entanto, essas concentrações podem variar de zero a algum valor máximo quando todos os sítios negativos na resina são ocupados por somente uma espécie.

As separações por troca iônica são realizadas ordinariamente sob condições nas quais um íon predomina em *ambas* as fases. Assim, na remoção de íons cálcio de uma solução diluída e um pouco ácida, a concentração do íon cálcio será muito menor que aquela do íon hidrogênio em ambas as fases aquosa e da resina; isto é

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{res}} \ll [\text{H}^+]_{\text{res}}$$

e

$$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{aq}} \ll [\text{H}^+]_{\text{aq}}$$

Como conseqüência, a concentração de íon hidrogênio é essencialmente constante em ambas as fases e a Equação 30-4 pode ser rearranjada para

$$\frac{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{res}}}{[\text{Ca}^{2+}]_{\text{aq}}} = K' \frac{[\text{H}^+]_{\text{res}}^2}{[\text{H}^+]_{\text{aq}}^2} = K \quad (30-5)$$

em que K é uma constante de distribuição análoga àquela que governa um equilíbrio de extração (ver Equação 30-2). Observe que K na Equação 30-5 representa a afinidade da resina pelo íon cálcio em relação a outro íon (no caso o H^+). De forma geral, sempre que K para um íon for grande, existe uma forte tendência de a fase de resina reter aquele íon; quando K for pequeno, o oposto é verdadeiro. A seleção de um íon comum como referência (tal como o H^+) permite uma comparação das constantes de distribuição para vários íons em relação a um dado tipo de resina. Esses experimentos revelam que os íons polivalentes são muito mais fortemente retidos do que as espécies monocarregadas. Dentro de um dado grupo, as diferenças existentes entre os valores de K parecem estar relacionadas com o tamanho do íon hidratado, bem como com outras propriedades. Assim, para uma resina sulfonada típica trocadora de cátion, os valores de K para íons univalentes decrescem segundo a ordem $\text{Ag}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+$. Para cátions bivalentes, a ordem é $\text{Ba}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{UO}_2^{2+}$.

30D-3 Aplicações dos Métodos de Troca Iônica

As resinas trocadoras de íons são empregadas para eliminar os íons que, de outra forma, causariam interferência nas análises. Por exemplo, o ferro(III), o alumínio(III) e muitos outros cátions tendem a co-precipitar com o sulfato de bário durante a determinação de íon sulfato. A passagem da solução contendo sulfato por uma resina trocadora de cátions resulta na retenção destes e na liberação de um número de mols equivalente de íons hidrogênio. Os íons sulfato passam livremente através da coluna e podem ser precipitados como sulfato de bário a partir do efluente.

Outra aplicação importante das resinas trocadoras de íons envolve a concentração de íons de soluções diluídas. Assim, traços de elementos metálicos em grandes volumes de águas naturais podem ser coletados em uma coluna trocadora de cátions e subseqüentemente liberado da resina por tratamento com um pequeno volume de uma solução ácida; o resultado é uma solução consideravelmente mais concentrada para a análise por absorção atômica ou espectrometria de emissão em plasma (ver Capítulo 28).

O conteúdo salino total de uma amostra pode ser determinado pela titulação do íon hidrogênio liberado quando uma alíquota da amostra passa através de um trocador de cátion na sua forma ácida. De maneira similar, uma solução padrão de ácido clorídrico pode ser preparada pela diluição a um volume conhecido do efluente resultante do tratamento de uma resina trocadora de cátions com uma massa conhecida de cloreto de sódio. A substituição por uma resina trocadora de ânions em sua forma básica permitirá a preparação de uma solução padrão de base. As resinas trocadoras de íons são empregadas também de forma ampla nos equipamentos de tratamento de água domésticos, como discutido no Destaque 30-2.

Como mostrado na Seção 32D, as resinas trocadoras de íons são particularmente úteis para as separações cromatográficas de espécies inorgânicas e orgânicas.

DESTAQUE 30-2

Tratamento de Água de Uso Doméstico

A água dura é aquela rica em sais de cálcio, magnésio e ferro. Os cátions da água dura combinam-se com os ânions dos ácidos graxos do sabão para formar sais insolúveis conhecidos como **coalho** ou **coalho de sabão**. Em áreas nas quais a água é particularmente dura, esses precipitados podem ser observados como anéis cinza ao redor das banheiras e pias.

Um método de resolver o problema da água dura nas casas consiste em trocar os íons de cálcio, de magnésio e de ferro por íons de sódio que formam sais solúveis de ácidos graxos. Um amolecedor comercial de água é composto por um tanque que contém uma resina de troca iônica, um reservatório de armazenamento para o cloreto de sódio e várias válvulas e reguladores para controlar o fluxo de água, como mostrado na Figura 30D-1. Durante a recarga ou ciclo de regeneração, a água contendo uma alta concentração de sal presente no reservatório é dirigida através da resina de troca iônica, de forma que os sítios da resina sejam ocupados pelos íons Na^+ .

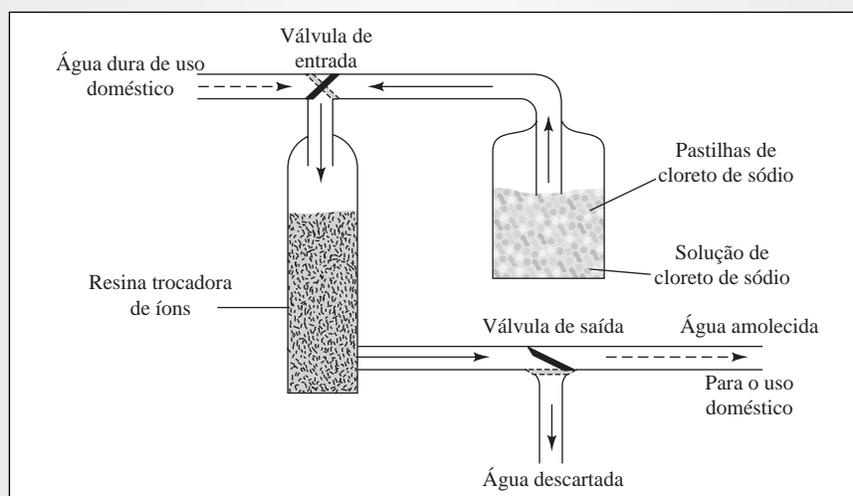
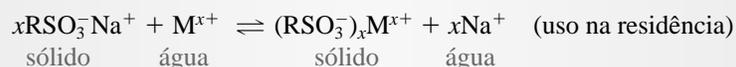


Figura 30D-1 Esquema de um amolecedor de água de uso doméstico. Durante o ciclo de recarga as válvulas estão nas posições mostradas. A água contendo sal do reservatório passa através da resina trocadora de íons e é descartada. Os íons sódio da água salgada são trocados com os íons presentes na resina deixando-a na forma sódica. Durante o uso da água, as válvulas são acionadas e a água dura passa através da resina na qual os cátions de cálcio, de magnésio e de ferro substituem os íons de sódio ligados à resina.

Os cátions M^{x+} (cálcio, magnésio ou ferro) liberados são dirigidos para o descarte durante esse ciclo.

Após o ciclo de regeneração, as válvulas que controlam o acesso à resina trocadora e à saída dela são alteradas de forma que a água do encanamento da residência passa pela resina e daí para as torneiras da casa. Quando a água dura passa através da resina, os cátions M^{x+} são trocados por íons Na^+ e a água é amolecida.



Com o uso, a resina trocadora de íons acumula gradualmente os cátions da água dura. Portanto, o sistema deve ser periodicamente regenerado através da passagem de água salgada, desviando os íons da água dura para o esgoto. Após o amolecimento, os sabões são muito mais efetivos porque se mantêm dispersos na água e não formam o coalho de sabão. O cloreto de potássio é também empregado no lugar do cloreto de sódio e é particularmente vantajoso para pessoas que se encontram em dieta com restrição de ingestão de sódio. Os amolecedores baseados em cloreto de potássio são, contudo, mais caros do que com base em cloreto de sódio.

30E SEPARAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

A cromatografia é um método empregado de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Nenhum outro método de separação é tão poderoso e de aplicação tão generalizada como a cromatografia.⁷ O restante deste capítulo é dedicado aos princípios gerais que se aplicam a todos os tipos de cromatografia. Os Capítulos 31 a 33 abordam algumas aplicações da cromatografia e de métodos correlatos.

Cromatografia é uma técnica na qual os componentes de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidade nas quais são transportados através de uma fase fixa estacionária por uma fase móvel líquida ou gasosa.

30E-1 Descrição Geral da Cromatografia

O termo **cromatografia** é difícil de ser definido rigorosamente porque o nome tem sido aplicado a diversos sistemas e técnicas. Todos esses métodos, contudo, apresentam em comum o uso de uma **fase estacionária** e de uma **fase móvel**. Os componentes de uma mistura são transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel e as separações ocorrem com base nas diferenças de velocidade de migração entre os componentes da fase móvel.

A **fase estacionária** em cromatografia é imobilizada em uma coluna ou sobre uma superfície plana.

A **fase móvel** em cromatografia movimenta-se através da fase estacionária transportando a mistura dos analitos. A fase móvel pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico.

30E-2 Classificação dos Métodos Cromatográficos

Os métodos cromatográficos são de dois tipos básicos. Na **cromatografia em coluna**, a fase estacionária é mantida em um tubo estreito e a fase móvel, forçada através do tubo sob pressão ou por gravidade. Na **cromatografia planar**, a fase estacionária é suportada sobre uma placa plana ou nos poros de um papel. Nesse caso, a fase móvel desloca-se através da fase estacionária por ação da capilaridade ou sob a influência da gravidade. Abordaremos aqui somente a cromatografia em coluna.

◀ A **cromatografia planar** e a **cromatografia em coluna** são baseadas nos mesmos tipos de equilíbrios.

◀ A cromatografia gasosa e a cromatografia com fluido supercrítico requerem o uso de uma coluna. Somente as fases móveis líquidas podem ser empregadas em superfícies planas.

Como mostrado na primeira coluna da Tabela 30-4, os métodos cromatográficos dividem-se em três categorias baseadas na natureza da fase móvel: líquida, gasosa e fluido supercrítico. A segunda coluna da tabela revela que há cinco tipos de cromatografia líquida e dois tipos de cromatografia gasosa que diferem na natureza da fase estacionária e nos tipos de equilíbrios entre as fases.

TABELA 30-4

Classificação dos Métodos Cromatográficos em Coluna			
Classificação Geral	Método Específico	Fase Estacionária	Tipo de Equilíbrio
Cromatografia gasosa (CG)	Gás-líquido (CGL)	Líquido adsorvido ou ligado à superfície de um sólido	Partição entre o gás e o líquido
	Gás-sólido	Sólido	Adsorção
Cromatografia líquida (CL)	Líquido-líquido ou partição	Líquido adsorvido ou ligado à superfície de um sólido	Partição entre líquidos imiscíveis
	Líquido-sólido ou adsorção	Sólido	Adsorção
	Troca iônica	Resina trocadora de íons	Troca iônica
	Exclusão por tamanho	Líquido nos interstícios de um sólido polimérico	Partição/penetração
	Afinidade	Líquido específico para determinado grupo ligado a uma superfície sólida	Partição entre líquido superficial e o líquido
móvel			
Cromatografia supercrítica (CS) (fase móvel é um fluido supercrítico)		Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Partição entre o fluido supercrítico e a fase ligada

⁷ As referências gerais sobre cromatografia incluem P. Sewell e B. Clarke, *Chromatographic Separations*. Nova York: Wiley, 1988; *Chromatographic Theory and Basic Principles*, J. A. Jonsson, Ed. Nova York: Marcel Dekker, 1987; A. Braithwaite e F. J. Smith, *Chromatographic Methods*, 5. ed. Londres: Blackie, 1996.

30E-3 Eluição em Cromatografia em Coluna

A Figura 30-6 revela como dois componentes de uma amostra, A e B, são resolvidos por **eluição** em uma coluna recheada. A coluna consiste em um tubo estreito recheado com um sólido inerte finamente dividido que retém a fase estacionária na sua superfície. A fase móvel ocupa os espaços entre as partículas do recheio. Inicialmente, a solução da amostra contendo a mistura de A e B na fase móvel é introduzida na cabeça da coluna como uma zona estreita, como mostrado na Figura 30-6 no tempo t_0 . Os dois componentes distribuem-se entre a fase móvel e a fase estacionária. A eluição ocorre forçando os componentes da amostra através da coluna, introduzindo-se a fase móvel continuamente.

A **eluição** é um processo no qual os solutos são lavados através da fase estacionária pelo movimento de uma fase móvel. A fase móvel que deixa a coluna é denominada **eluato**.

Um **eluente** é um solvente empregado para transportar os componentes de uma mistura através de uma fase estacionária.

Com a primeira introdução da fase móvel nova, o **eluente** – a porção da amostra contida na fase móvel – desloca-se através da coluna, e uma partição adicional entre a fase móvel recém-introduzida e a fase estacionária vai ocorrer (tempo t_1). A partição entre a fase nova recém-introduzida e a fase estacionária ocorre simultaneamente no local da amostra original.

Outras adições do solvente transportam as moléculas do soluto através da coluna em uma série contínua de transferências entre as duas fases. Em virtude do fato de que o movimento do soluto pode ocorrer somente na fase móvel, a velocidade *média* com a qual o soluto migra *depende da fração de tempo que permanece nessa fase*. Essa fração é pequena para os solutos que são fortemente retidos pela fase estacionária (componente B na Figura 30-6, por exemplo) e maior quando a retenção na fase móvel for mais provável (componente A). Idealmente, as diferenças resultantes nas velocidades levam os componentes da mistura a se separar em **bandas** ou **zonas** ao longo do comprimento da coluna (ver Figura 30-7). O isolamento das espécies separadas pode ser conseguido passando-se uma quantidade suficiente de fase móvel através da coluna de forma a transportar as bandas individuais para além do final da coluna (para ser *eluídas* da coluna), onde elas possam ser coletadas ou detectadas (tempos t_3 e t_4 na Figura 30-6).

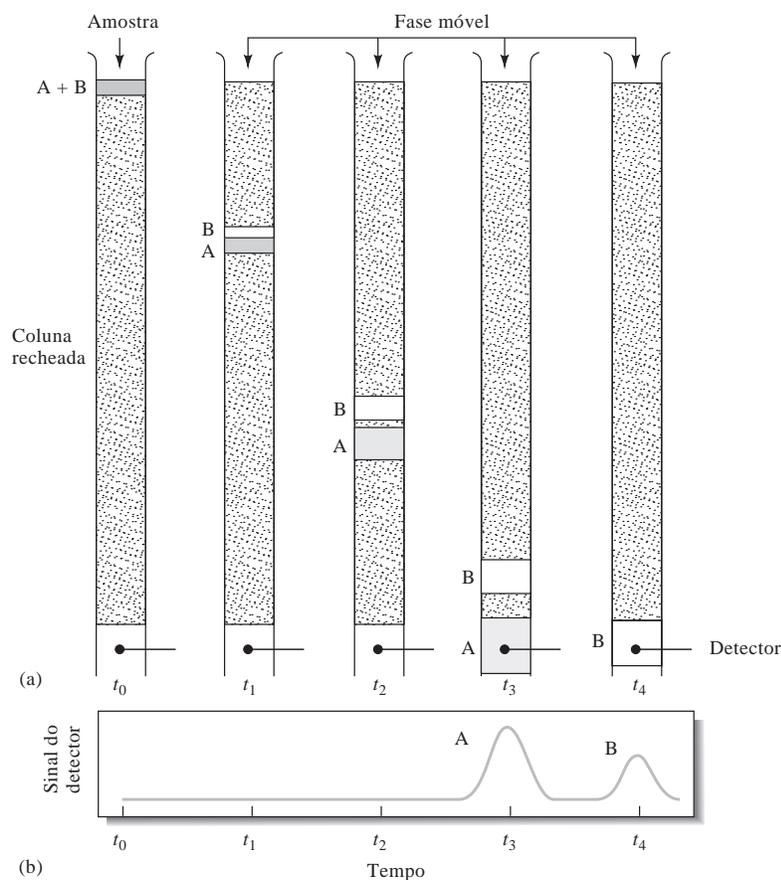


Figura 30-6 (a) Diagrama descrevendo a separação de uma mistura dos componentes A e B por eluição em cromatografia em coluna. (b) O sinal do detector em vários estágios da eluição mostrados em (a).

Cromatogramas

Se um detector que responde à concentração do soluto for posicionado no final da coluna durante a eluição e seu sinal for registrado em função do tempo (ou do volume de fase móvel), uma série de picos será obtida, como mostrado na parte de baixo da Figura 30-6. Esse gráfico, chamado **cromatograma**, é útil para análises qualitativas e quantitativas. As posições dos picos no eixo do tempo podem ser empregadas para identificar os componentes da amostra; as áreas sob os picos provêm uma medida quantitativa da quantidade de cada uma das espécies.

Um **cromatograma** é um gráfico de alguma função da concentração do soluto *versus* o tempo de eluição ou volume de eluição.

Métodos de Melhoria do Desempenho da Coluna

A Figura 30-7 mostra os perfis de concentração para as bandas que contêm os solutos A e B na coluna da Figura 30-6 no tempo t_1 e mais tarde no tempo t_2 .⁸ Uma vez que B é mais fortemente retido pela fase estacionária que A, B se atrasa durante a migração. Claramente, a distância entre os dois aumenta à medida que eles se movem pela coluna. Contudo, ao mesmo tempo, ocorre o alargamento de ambas as bandas, o que diminui a eficiência da coluna, considerada como um dispositivo de separação. Enquanto o alargamento da banda é inevitável, as condições para que isso ocorra de forma mais lenta que a separação das bandas podem ser freqüentemente determinadas. Assim, como exposto na Figura 30-7, uma separação total das espécies é possível se a coluna for suficientemente longa.

Muitas variáveis físicas e químicas influenciam as velocidades de separação das bandas e o seu alargamento. Como conseqüência, melhores separações podem ser geralmente obtidas pelo controle das variáveis que aumentam a velocidade de separação das bandas ou diminuem a velocidade de alargamento delas. Essas alternativas estão ilustradas na Figura 30-8.

◀ A cromatografia foi inventada pelo botânico russo Mikhail Tswett logo após a virada do século XX. Ele empregou a técnica para separar vários pigmentos de plantas, como as clorofilas e xantofilas, passando soluções dessas espécies através de colunas de vidro recheadas com carbonato de cálcio finamente dividido. As espécies separadas apareceram como bandas coloridas na cluna, o que explica o nome que ele escolheu para o método (do grego *chroma*, que significa “cor”, e *graphein*, que significa “escrever”).

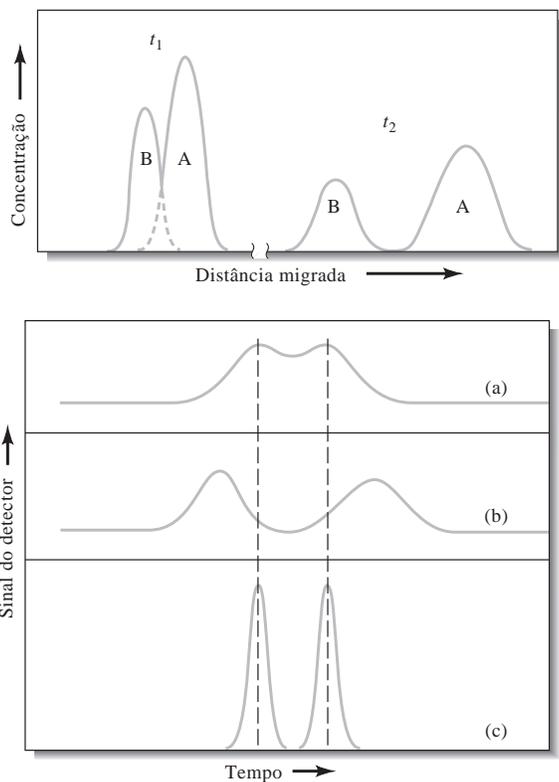


Figura 30-7 Perfis de concentração das bandas dos solutos A e B em dois diferentes momentos durante sua migração através da coluna, mostrada na Figura 30-6. Os tempos t_1 e t_2 são indicados na Figura 30-6.

Figura 30-8 Cromatograma de dois componentes ilustrando dois métodos de melhorar a separação: (a) cromatograma original com picos sobrepostos; (b) melhoria proporcionada pelo aumento da separação das bandas; (c) melhoria proporcionada pela diminuição das larguras.

⁸ Observe que as posições relativas das bandas para A e B no perfil de concentração da Figura 30-7 parecem estar invertidas em relação às suas posições na parte de baixo da Figura 30-6. A diferença é que a abscissa representa a distância ao longo da coluna na Figura 30-7, mas na Figura 30-6 ela corresponde ao tempo. Assim, na Figura 30-6, a parte *frontal* do pico está à esquerda e a *cauda* à direita; na Figura 30-7 o inverso é verdadeiro.

As variáveis que influenciam as velocidades relativas nas quais os solutos migram através da fase estacionária são descritas na próxima seção. Após essa discussão, voltaremos aos fatores que exercem um papel relevante no alargamento das zonas.

30E-4 Velocidades de Migração dos Solutos

A eficiência de uma coluna cromatográfica em separar dois solutos depende em parte das velocidades relativas segundo as quais as duas espécies são eluídas. Essas velocidades, por sua vez, são determinadas pelas razões das concentrações dos solutos em cada uma das fases.

Constantes de Distribuição

Todas as separações cromatográficas estão baseadas em diferenças de extensão na qual os solutos são distribuídos entre as fases móvel e estacionária. Para o soluto de espécie A, o equilíbrio envolvido é descrito pela equação



A constante de distribuição para um soluto em cromatografia é igual à razão da sua concentração na fase estacionária e à sua concentração na fase móvel.

A constante de equilíbrio K_c para essa reação é denominada **constante de distribuição**, a qual é definida como

$$K_c = \frac{(a_A)_E}{(a_A)_M} \quad (30-7)$$

em que $(a_A)_E$ é a atividade do soluto na fase estacionária e $(a_A)_M$, a atividade na fase móvel. Frequentemente substituímos $(a_A)_E$ pela concentração analítica molar do soluto na fase estacionária, c_E e $(a_A)_M$ por sua concentração analítica molar na fase móvel, c_M . Dessa forma, escrevemos a Equação 30-7 como

$$K_c = \frac{c_E}{c_M} \quad (30-8)$$

Idealmente, a constante de distribuição permanece invariável sobre uma faixa ampla de concentração do soluto; isto é, c_E é diretamente proporcional a c_M .

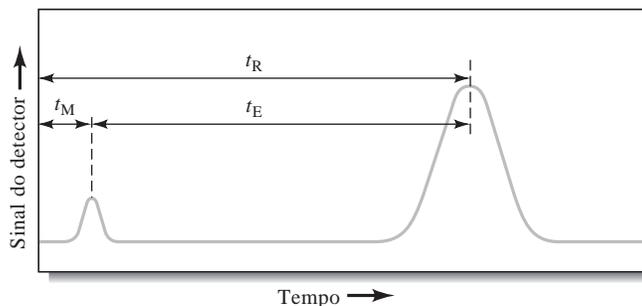
O tempo morto (tempo de retenção da fase móvel) t_M é o tempo necessário para que um soluto não retido passe através de uma coluna cromatográfica. Todos os componentes permanecem por esse intervalo de tempo na fase móvel. As separações são baseadas nos tempos distintos t_E que os componentes permanecem na fase estacionária.

Tempos de Retenção

A Figura 30-9 é um cromatograma simples constituído de somente dois picos. O pico pequeno à esquerda é devido às espécies que *não* são retidas pela fase estacionária. O tempo t_M entre a injeção da amostra e o aparecimento desse pico é denominado, algumas vezes, **tempo morto** ou **tempo de retenção da fase móvel**. O tempo morto fornece uma medida da velocidade média de migração da fase móvel e constitui-se em um parâmetro importante na identificação dos picos dos analitos. Todos os componentes permanecem na fase móvel por um tempo t_M .

Para auxiliar na medida de t_M , uma espécie não retida pode ser adicionada se não estiver já presente na amostra ou na fase móvel. O pico maior à direita na Figura 30-9 é o do analito. O tempo requerido para

Figura 30-9 Um cromatograma típico para uma mistura de dois componentes. O pico pequeno à esquerda representa um soluto que não é retido na coluna e, portanto, atinge o detector quase imediatamente após o início da eluição. Assim, seu tempo de retenção t_M é aproximadamente igual ao tempo requerido por uma molécula da fase móvel para passar pela coluna.



que essa zona atinja o detector após a injeção da amostra é chamado **tempo de retenção**, sendo representado pelo símbolo t_R . O analito foi retido porque permanece por um tempo t_E na fase estacionária. O tempo de retenção é então

$$t_R = t_E + t_M \quad (30-9)$$

O **tempo de retenção** t_R é o tempo decorrido entre a injeção da amostra e o aparecimento do pico do soluto no detector de uma coluna cromatográfica.

A velocidade de migração linear média do soluto, \bar{v} (geralmente em cm s^{-1}), é

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (30-10)$$

em que L é o comprimento do recheio da coluna. De forma semelhante, a velocidade média linear, u , das moléculas da fase móvel é

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (30-11)$$

A Relação entre a Vazão Volumétrica e a Velocidade Linear

Experimentalmente, em cromatografia o fluxo de fase móvel é caracterizado pela sua vazão volumétrica, F ($\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$), na saída da coluna. Para uma coluna de tubo aberto, F está relacionada com a velocidade linear na saída da coluna u_o

$$F = u_o A = u_o \times \pi r^2 \quad (30-12)$$

em que A é a área transversal do tubo (πr^2). Para uma coluna recheada, o volume total da coluna não está disponível para o líquido e, portanto, a Equação 30-12 deve ser modificada para

$$F = \pi r^2 u_o \varepsilon \quad (30-13)$$

em que ε é a fração do volume total disponível para o líquido (porosidade da coluna).

A Relação entre a Velocidade de Migração e a Constante de Distribuição

Para relacionar a velocidade de migração do soluto com a sua constante de distribuição, expressamos a velocidade como uma fração da velocidade na fase móvel:

$$\bar{v} = u \times \text{fração de tempo que o soluto permanece na fase móvel}$$

Contudo, essa fração é igual ao número de mols médio do soluto na fase móvel a qualquer instante dividido pelo número de mols total do soluto na coluna:

$$\bar{v} = u \times \frac{\text{mols do soluto na fase móvel}}{\text{número de mols total do soluto}}$$

O número de mols total do soluto na fase móvel é igual à concentração molar, c_M , do soluto naquela fase multiplicado pelo seu volume, V_M . De forma semelhante, o número de mols do soluto na fase estacionária é dado pelo produto da concentração c_E do soluto na fase estacionária o seu volume, V_E . Portanto,

$$\bar{v} = u \times \frac{c_M V_M}{c_M V_M + c_E V_E} = u \times \frac{1}{1 + c_E V_E / c_M V_M}$$

A substituição da Equação 30-8 nesta equação fornece uma expressão para a velocidade de migração do soluto em função da sua constante de distribuição, bem como em função dos volumes das fases estacionária e móvel:

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + K_c V_E/V_M} \quad (30-14)$$

Os dois volumes podem ser estimados pelo método de preparação da coluna.

O Fator de Retenção, k

O fator de retenção é um parâmetro experimental importante amplamente empregado na comparação das velocidades de migração de solutos em colunas.⁹ Para o soluto A, o fator de retenção k_A é definido como

$$k_A = \frac{K_A V_E}{V_M} \quad (30-15)$$

em que K_A é a constante de distribuição para o soluto A. A substituição da Equação 30-15 na Equação 30-14 fornece

$$\bar{v} = u \times \frac{1}{1 + k_A} \quad (30-16)$$

Para mostrar como k_A pode ser derivado a partir de um cromatograma, substituímos as Equações 30-10 e 30-11 na Equação 30-16:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1 + k_A} \quad (30-17)$$

Essa equação rearranja-se para

$$k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_E}{t_M} \quad (30-18)$$

O fator de retenção k_A para o soluto A está relacionado à velocidade com a qual A migra através da coluna. É o intervalo de tempo que um soluto permanece na fase estacionária relativo ao tempo que este permanece na fase móvel.

► Idealmente, os fatores de retenção para os analitos em uma amostra situam-se entre 1 e 5.

Os fatores de retenção em cromatografia gasosa podem ser variados alterando-se a temperatura e o recheio da coluna, como discutido no Capítulo 31. Na cromatografia líquida, os fatores de retenção podem ser manipulados para fornecer melhores separações por meio da variação da composição das fases móvel e estacionária, como ilustrado no Capítulo 32.

Como mostrado na Figura 30-9, t_R e t_M são prontamente obtidos de um cromatograma. Um fator de retenção próximo à unidade significa que aquele soluto emerge da coluna em um tempo próximo daquele de retenção da fase móvel (tempo morto). Quando o fator de retenção é maior que, digamos, 20 ou 30, os tempos de eluição tornam-se muito longos. Idealmente, as separações são realizadas sob condições nas quais os fatores de retenção para os solutos na mistura situam-se na faixa de 1 a 5.

O Fator de Seletividade

O fator de seletividade α para os solutos A e B é definido como a razão entre a constante de distribuição do soluto mais retido (B) e a constante de distribuição para o soluto menos retido (A).

O fator de seletividade α (ou fator de separação) de uma coluna para dois solutos A e B é definido como

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (30-19)$$

⁹ Na literatura antiga, essa constante era chamada fator de capacidade e recebia o símbolo k' . Em 1993, contudo, o comitê da IUPAC sobre nomenclatura analítica recomendou que essa constante fosse denominada *fator de retenção* e simbolizada por k .

em que K_B é a constante de distribuição para a espécie mais fortemente retida B e K_A , a constante para a espécie menos retida A, que é eluída mais rapidamente. De acordo com essa definição, α é sempre maior que a unidade.

A substituição da Equação 30-15 e da equação análoga para o soluto B na Equação 30-19 fornece uma relação entre o fator de seletividade para os dois solutos e seus fatores de retenção:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad (30-20)$$

em que k_B e k_A são os fatores de retenção para B e para A, respectivamente. A substituição da Equação 30-18 para os dois solutos na Equação 30-20 fornece uma expressão que permite a determinação de α a partir de um cromatograma experimental:

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (30-21)$$

Na Seção 30E-7, mostramos como se emprega o fator de retenção para calcular o poder de resolução de uma coluna.

30E-5 Alargamento de Banda e Eficiência da Coluna

A eficiência de uma coluna cromatográfica é afetada pela grandeza do alargamento de banda que ocorre quando o composto passa pela coluna. Antes de definir a eficiência de uma coluna em termos mais quantitativos, vamos examinar as razões pelas quais as bandas tornam-se largas à medida que se movem através da coluna.

A Teoria do Não-equilíbrio (Rate Theory) da Cromatografia

A **teoria do não-equilíbrio (rate theory) da cromatografia** descreve os formatos e larguras das bandas de eluição em termos quantitativos com base em um mecanismo de movimentação aleatória de migração das moléculas através da coluna. Uma discussão detalhada dessa teoria está além do escopo deste texto. Podemos, contudo, fornecer uma visão qualitativa do porquê as bandas se alargam e quais variáveis melhoram a eficiência de uma coluna.¹⁰

Se examinarmos os cromatogramas mostrados neste e no próximo capítulo, você verá que os picos de eluição parecem muito com uma curva gaussiana normal de erros encontrada nos Capítulos 6 e 7. Como mostrado na Seção 6A-2, as curvas normais de erro são racionalizadas presumindo-se que a incerteza associada com qualquer medida seja a soma de um grande número de incertezas individualmente indetectáveis e aleatórias. Cada uma delas tem probabilidade igual de assumir um valor positivo ou negativo. De forma semelhante, o formato típico gaussiano do pico cromatográfico pode ser atribuído à combinação aditiva de movimentos aleatórios das várias moléculas à medida que elas se deslocam através da coluna. Pressupomos, na discussão que se segue, que uma zona estreita contendo o analito fora introduzida de forma que a largura da injeção não seja um fator determinante para a largura total da banda eluída. É importante observar que as larguras das bandas eluídas nunca podem ser menores que a largura da zona de injeção.

É instrutivo considerar-se uma única molécula do soluto à medida que esta sofre milhares de transferências entre as fases estacionária e móvel durante a eluição. O tempo de residência em qualquer uma das fases é altamente irregular. A transferência de uma fase para a outra requer energia e a molécula deve adquiri-la de sua vizinhança. Assim, o tempo de residência em uma dada fase pode ser curto após algumas transferências e relativamente longo após outras. Recorde-se de que o deslocamento através da coluna pode ocorrer *somente quando a molécula está na fase móvel*. Em conseqüência, certas partículas movem-se ra-

◀ O fator de seletividade para dois analitos em uma coluna fornece uma medida de quão bem a coluna vai separá-los.

¹⁰ Para mais informações, ver J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, p. 94-96, Nova York: Wiley, 1991.

pidamente em virtude da sua inclusão accidental na fase móvel na maior parte do tempo, enquanto outras se atrasam porque aconteceu de elas serem incorporadas na fase estacionária à maior parte do tempo. O resultado desses processos individuais é um espalhamento simétrico de velocidades ao redor de um valor médio, o qual representa o comportamento médio da molécula do analito.

Como mostrado na Figura 30-10, alguns picos cromatográficos não são ideais e exibem uma **cauda** ou **alargamento frontal**. No primeiro caso, a cauda do pico, que aparece à direita no cromatograma, se estende bastante, enquanto a parte frontal do pico é bem abrupta. No alargamento frontal o inverso é verdadeiro. Uma causa comum de ocorrência de caudas e alargamentos frontais é a variação da constante de distribuição com a concentração. O alargamento frontal também surge quando a quantidade de amostra introduzida na coluna é muito grande. As distorções desse tipo são indesejáveis porque levam a uma separação mais pobre e a tempos de eluição menos reproduzíveis. Na discussão que se segue, presume-se que os efeitos de cauda e frontal sejam mínimos.

Descrição Quantitativa da Eficiência da Coluna

Dois termos relacionados são empregados amplamente para as medidas quantitativas da eficiência da coluna cromatográfica: (1) **altura de prato H** e (2) **contagem de pratos** ou **número de pratos teóricos N** . As duas estão relacionadas pela equação

$$N = \frac{L}{H} \quad (30-22)$$

em que L é o comprimento (geralmente em cm) do recheio da coluna. A eficiência cromatográfica aumenta à medida que o número de pratos se torna maior, conforme a altura do prato H torna-se menor. Enormes diferenças em eficiência são encontradas entre as colunas em virtude das diferenças no tipo da coluna e nas fases estacionárias e móveis. As eficiências, em termos do número de pratos, podem variar de algumas centenas até várias centenas de milhares. As alturas de prato entre alguns décimos até um milésimo de centímetro ou menores não são incomuns.

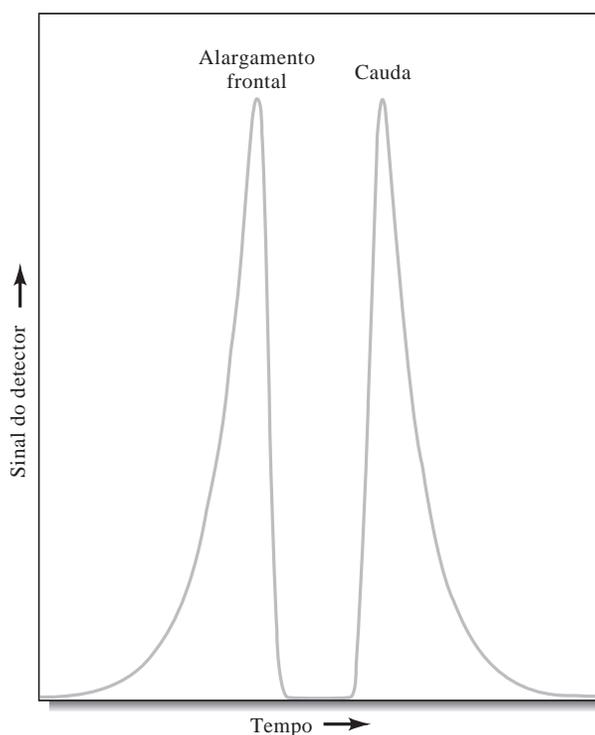


Figura 30-10 Ilustração dos efeitos de cauda e alargamento frontal em picos cromatográficos.

Na Seção 6B-2 apontamos para a largura de uma curva gaussiana, descrita pelo desvio padrão σ e pela variância σ^2 . Visto que as bandas cromatográficas são normalmente gaussianas e uma vez que a eficiência da coluna é refletida na largura dos picos cromatográficos, a variância por unidade de comprimento da coluna é empregada pelos cromatografistas como uma medida da eficiência da coluna. Isto é, a eficiência da coluna H é definida como

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (30-23)$$

Essa definição da eficiência de uma coluna é ilustrada na Figura 30-11a, que mostra uma coluna que apresenta um comprimento de recheio de L cm. Acima desse esquema (Figura 30-11b) está um gráfico mostrando a distribuição das moléculas ao longo do comprimento da coluna no momento que o pico do analito atinge o final do recheio (isto é, no tempo igual ao tempo de retenção). A curva é gaussiana e as regiões $L + 1\sigma$ e $L - 1\sigma$ são indicadas por linhas verticais interrompidas. Observe que L tem unidades de centímetros e σ^2 , de centímetros ao quadrado; assim, H representa também uma distância linear em centímetros (ver Equação 30-23). De fato, a altura de prato pode ser pensada como o comprimento de coluna que contém uma fração do analito que está entre L e $L - \sigma$. Uma vez que a área sob a curva normal de erro limitada por $\pm\sigma$ é de cerca de 68% da área total (página 113), a altura de prato, como definida, contém 34% do analito.

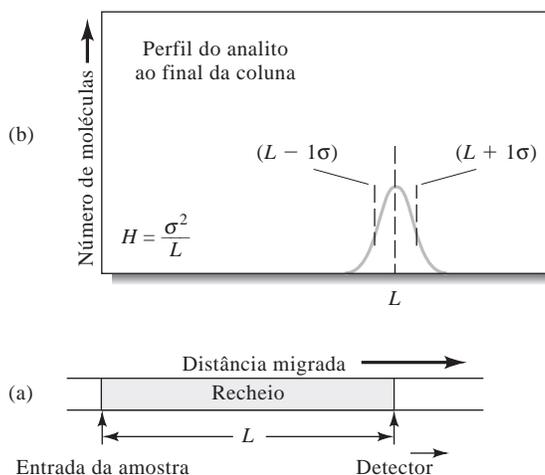


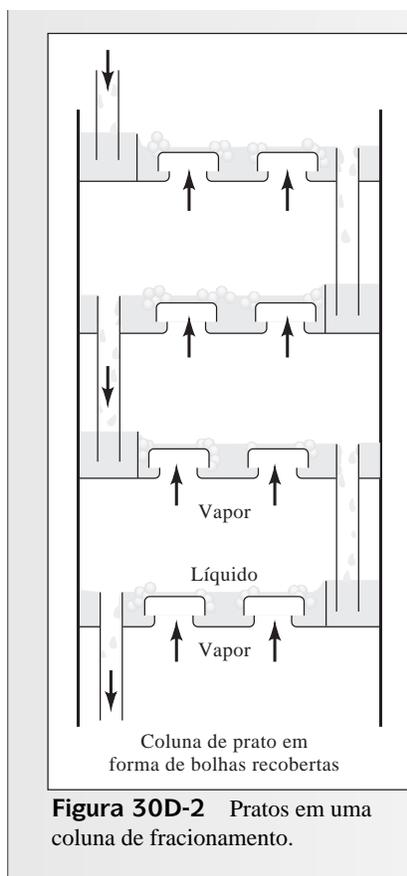
Figura 30-11 Definição da altura de prato, $H = \sigma^2/L$. Em (a), o comprimento da coluna é mostrado como a distância do ponto de injeção até o detector. Em (b), a distribuição gaussiana das moléculas é exibida.

DESTAQUE 30-3

Qual é a Origem dos Termos **Prato** e **Altura de Prato**?

Em 1952 o Prêmio Nobel foi ganho por dois ingleses, A. J. P. Martin e R. L. M. Synge, pelo seu trabalho no desenvolvimento da cromatografia moderna. Nos seus estudos teóricos, eles adaptaram um modelo que foi originalmente desenvolvido nos anos 1920 para descrever as separações ou fracionamentos em colunas de destilação. As colunas de fracionamento, as quais foram empregadas inicialmente pela indústria petrolífera para separar hidrocarbonetos similares, consistiam em pratos tipo bolha recoberta interconectados (ver Figura 30D-2) nos quais o equilíbrio líquido-vapor era alcançado quando a coluna operava sob regime de refluxo.

(continua)



Martin e Synge trataram a coluna cromatográfica como se fosse feita de uma série de pratos nos quais as condições de equilíbrio sempre prevaleciam. Esse modelo de pratos é bem-sucedido ao explicar o formato gaussiano dos picos cromatográficos, bem como os fatores que influenciam as diferenças nas velocidades de migração dos solutos. Contudo, o modelo de pratos não é bem-sucedido ao tentar explicar o alargamento das zonas por causa da suposição básica de que as condições de equilíbrio prevalecem através da coluna durante a eluição. Essa suposição nunca poderia ser válida nas condições dinâmicas que existem em uma coluna cromatográfica, nas quais as fases estão se movendo passando uma sobre a outra em um ritmo que não oferece tempo suficiente para que o estado de equilíbrio seja obtido.

Uma vez que o modelo de pratos não constitui uma representação muito boa de uma coluna cromatográfica, sugerimos que você (1) evite atribuir qualquer significado aos termos *prato* e *altura de prato* e (2) veja esses termos como designadores da eficiência da coluna que são mantidos por razões históricas somente e não porque apresentem qualquer significado físico. Infelizmente, esses termos estão tão enraizados na literatura cromatográfica que a sua substituição por designações mais apropriadas parece improvável, pelo menos no futuro próximo.

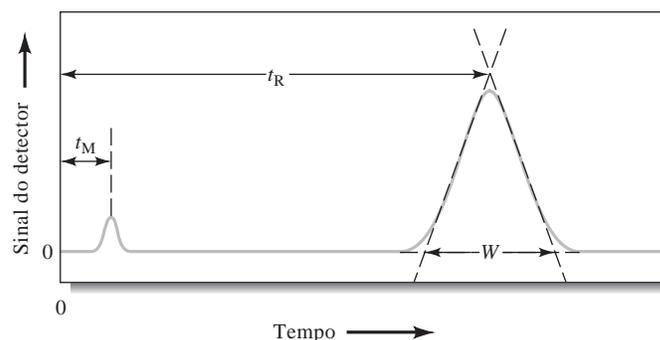
Determinação Experimental do Número de Pratos em uma Coluna

O número de pratos teóricos, N , e a altura de prato, H , são amplamente utilizados na literatura e pelos fabricantes de instrumentos como uma medida do desempenho da coluna. A Figura 30-12 indica como N pode ser determinado a partir de um cromatograma. Nesse caso, o tempo de retenção do pico t_R e a largura do pico na sua base W (em unidades de tempo) são medidos. Pode-se mostrar (ver Destaque 30-4) que o número de pratos pode ser calculado pela relação simples

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (30-24)^{11}$$

Para se obter H , o comprimento da coluna é medido e a Equação 30-23 é aplicada.

Figura 30-12 Determinação do número de pratos, $N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$.



¹¹ Muitos sistemas de dados cromatográficos empregam a largura à meia-altura, $W_{1/2}$, nesse caso $N = 5,54(t_R/W_{1/2})^2$.

DESTAQUE 30-4

Derivação da Equação 30-24

A variância do pico mostrado na Figura 30-12 apresenta unidades de segundos ao quadrado porque a abscissa é o tempo em segundos (ou algumas vezes em minutos). Essa variância em base de tempo é designada geralmente como τ^2 para se distinguir de σ^2 , a qual tem unidades de centímetros ao quadrado. Os dois desvios padrão τ e σ estão relacionados por

$$\tau = \frac{\sigma}{L/t_R} \quad (30-25)$$

em que L/t_R é a velocidade linear média de um soluto em centímetros por segundo.

A Figura 30-12 ilustra uma forma simples de se obter o valor aproximado de τ a partir de um cromatograma experimental. As tangentes nos pontos de inflexão em ambos os lados do pico cromatográfico são extrapoladas de modo a formar um triângulo com a linha de base. Pode-se mostrar que a área sob esse triângulo é aproximadamente 96% da área total sob o pico. Na Seção 6B-2, pôde-se observar que cerca de 96% da área sob um pico gaussiano está incluída entre mais ou menos dois desvios padrão ($\pm 2\sigma$) do seu máximo. Assim, os interceptos mostrados na Figura 30-12 ocorrem a aproximadamente $\pm 2\tau$ do máximo e $W = 4\tau$, em que W é a grandeza da base do triângulo. Substituindo essas relações na Equação 30-25 e rearranjando-a obtém-se

$$\sigma = \frac{LW}{4t_R}$$

Substituindo σ desta equação na Equação 30-23, temos

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2} \quad (30-26)$$

Para se obter N , substituímos na Equação 30-22 e rearranjamos para obter

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Assim, N pode ser calculado a partir de duas medidas de tempo, t_R e W ; para obter H , o comprimento do recheio da coluna L deve ser conhecido também.

Para se obter H , mede-se o comprimento da coluna L e aplica-se a Equação 30-23.

30E-6 Variáveis que Afetam a Eficiência da Coluna

O alargamento de banda reflete a perda de eficiência de uma coluna. Quanto mais lentos forem os processos de transferência de massa que ocorrem quando o soluto migra através da coluna, mais larga será a banda na saída da coluna. Algumas das variáveis que afetam as velocidades de transferência de massa podem ser controladas e exploradas para melhorar as separações. A Tabela 30-5 lista as variáveis mais importantes.

O Efeito da Vazão da Fase Móvel

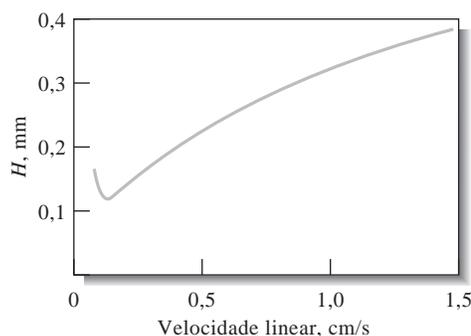
A extensão do alargamento de uma banda depende do tempo que a fase móvel esteja em contato com a fase estacionária, o qual por sua vez depende da vazão da fase móvel. Por essa razão, os estudos sobre

A **velocidade linear** e a **vazão** são duas quantidades diferentes, porém relacionadas. A velocidade linear é relacionada com a vazão através da área da seção transversal e da porosidade (coluna recheada) da coluna (ver as Equações 30-12 e 30-13).

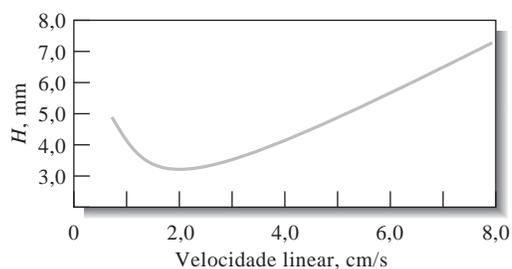
eficiência têm sido normalmente feitos determinando-se H (pela Equação 30-26) como uma função da velocidade da fase móvel. Os gráficos para as cromatografias líquida e gasosa representados na Figura 30-13 são típicos dos resultados obtidos nesses estudos. Enquanto ambos mostram um mínimo para H (ou um máximo em eficiência) a baixas velocidades lineares, o mínimo para cromatografia líquida geralmente ocorre a vazões que estão bem abaixo daquelas para a cromatografia gasosa. Frequentemente essas vazões são tão baixas que o mínimo valor

de H não é obtido em cromatografia líquida sob condições normais de operação.

Geralmente os cromatogramas líquidos são obtidos a menores velocidades lineares que os cromatogramas gasosos. Além disso, como exposto na Figura 30-13, as alturas de pratos em colunas para a cromatografia líquida são pelo menos uma ordem de grandeza menor que aqueles encontrados em colunas para a cromatografia gasosa. Contra essa vantagem está o fato de que é impraticável empregar-se colunas para a cromatografia líquida mais longas que 25 ou 50 cm em decorrência da alta queda de pressão. Por outro lado, as colunas para a cromatografia gasosa podem apresentar comprimentos de 50 m ou superior. Conseqüentemente, o número total de pratos, e assim a eficiência global da coluna, é em geral superior para as colunas empregadas em cromatografia gasosa.



(a) Cromatografia líquida



(b) Cromatografia gás-líquido

Figura 30-13 O efeito da vazão da fase móvel sobre a altura de prato para (a) cromatografia líquida e (b) para cromatografia gasosa.

TABELA 30-5

Variáveis que Influenciam a Eficiência de uma Coluna

Variável	Símbolo	Unidades Usuais
Velocidade linear da fase móvel	u	cm s^{-1}
Coefficiente de difusão na fase móvel*	D_M	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Coefficiente de difusão na fase estacionária*	D_E	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Fator de retenção (ver Equação 30-18)	k	sem unidade
Diâmetro das partículas do recheio	d_p	cm
Espessura da camada de líquido que recobre a fase estacionária	d_f	cm

*Aumenta com a elevação da temperatura e com o decréscimo da viscosidade.

Teoria do Alargamento de Banda

Nos últimos 40 anos, uma quantidade enorme de trabalhos experimentais e teóricos têm sido dedicados ao desenvolvimento de relações quantitativas que descrevam os efeitos das variáveis experimentais listadas na Tabela 30-5 sobre a altura de prato para os vários tipos de colunas. Talvez uma dúzia de equações ou mais tenha sido divulgada e aplicada com vários graus de sucesso para se calcular a altura de prato. Nenhuma delas é inteiramente adequada para explicar as interações físicas e os efeitos que levam ao alargamento de zona e assim a baixas eficiências das colunas. Contudo, algumas dessas equações, embora imperfeitas, têm sido empregadas com frequência para mostrar uma direção para a melhoria do desempenho das colunas. Uma delas é apresentada aqui.

A eficiência de uma coluna para cromatografia capilar e colunas recheadas operando a baixas vazões pode ser aproximada pela expressão

$$H = \frac{B}{u} + C_E u + C_M u \quad (30-27)$$

em que H é a altura de prato em centímetros e u , a velocidade linear da fase móvel em centímetros por segundo.¹² A quantidade B é o **coeficiente de difusão longitudinal** e C_E e C_M são os **coeficientes de transferência de massa** para a fase estacionária e móvel, respectivamente.

A velocidades altas em colunas recheadas, nas quais os efeitos de fluxo predominam sobre a difusão, a eficiência pode ser aproximada por

$$H = A + \frac{B}{u} + C_E u \quad (30-28)$$

em que A é um coeficiente que descreve os efeitos dos múltiplos caminhos, como será discutido mais tarde. A Equação 30-28 é equivalente à bem conhecida **equação de van Deemter**, a qual, com frequência, é empregada para descrever a eficiência cromatográfica.

O Termo de Difusão Longitudinal B/u A difusão é um processo no qual as espécies migram de uma região mais concentrada de um meio para uma mais diluída. A velocidade de migração é proporcional à diferença de concentração entre as regiões e ao **coeficiente de difusão** D_M das espécies. Esse último, que constitui uma medida da mobilidade da substância em um dado meio, é uma constante para uma dada espécie e igual à velocidade de migração sob um gradiente unitário de concentração.

Em cromatografia, a difusão longitudinal resulta na migração do soluto do centro da banda (na qual a concentração é maior) para as regiões mais diluídas de qualquer lado (isto é, na direção do fluxo e na direção oposta do fluxo). A difusão é uma fonte comum de alargamento de banda em cromatografia gasosa, na qual a velocidade de difusão das moléculas é alta. O fenômeno é de pequena importância em cromatografia líquida, na qual as velocidades de difusão são muito menores. A grandeza do termo B na Equação 30-27 é predominantemente determinado pelo coeficiente de difusão D_M do analito na fase móvel e é diretamente proporcional a essa constante.

Como mostrado pela Equação 30-27, a contribuição da difusão longitudinal na altura do prato é inversamente proporcional à velocidade linear do eluente. Essa relação não é surpreendente, uma vez que o analito permanece na coluna por um período mais breve quando a vazão é alta. Assim, a difusão a partir do centro da banda para as duas laterais tem menos tempo para ocorrer.

Os estudos teóricos sobre o alargamento de zona realizados em 1950 por engenheiros químicos holandeses levaram à **equação de van Deemter**, a qual pode ser escrita na forma

$$H = A + B/u + C u$$

em que as constantes A , B e C são os coeficientes do efeito de múltiplos caminhos, da difusão longitudinal e de transferência de massa, respectivamente. Hoje, consideramos a equação de van Deemter apropriada somente para colunas recheadas operando a altas vazões. Para os outros casos, a Equação 30-27 fornece geralmente melhor descrição.

¹²S. J. Hawkes, *J. Chem. Educ.*, 1983, n. 60, p. 393.

Os decréscimos iniciais em H mostrados em ambas as curvas na Figura 30-13 são consequência direta da difusão longitudinal. Observe que o efeito é muito menos pronunciado em cromatografia líquida em razão das velocidades de difusão muito menores em uma fase móvel líquida. A diferença marcante nas alturas de prato indicadas pelas duas curvas na Figura 30-13 pode ser explicada também

► Os coeficientes de difusão em gases são normalmente cerca de 1.000 vezes maiores que os coeficientes de difusão em líquidos.

considerando-se as velocidades relativas de difusão longitudinal nas duas fases móveis. Isto é, os coeficientes de difusão em um meio gasoso são de ordens de grandeza superiores que em um meio líquido. Dessa forma, o alargamento de banda ocorre em uma extensão muito maior em cromatografia gasosa que em cromatografia líquida.

O Termo de Transferência de Massa na Fase Estacionária $C_E u$ Quando a fase estacionária é um líquido imobilizado, o coeficiente de transferência de massa é diretamente proporcional ao quadrado da espessura do filme sobre as partículas, d_f^2 , e inversamente proporcional ao coeficiente de difusão, D_E , do soluto no filme. Esses efeitos podem ser compreendidos considerando-se que ambos reduzem a frequência média na qual as moléculas do analito atingem a interface onde a transferência para a fase móvel pode ocorrer. Isto é, com filmes mais espessos, as moléculas devem, em média, deslocar-se mais para atingir a superfície e, com coeficientes de difusão menores, elas se deslocam mais lentamente. O resultado é uma velocidade de transferência de massa lenta, ocasionando um aumento na altura de prato.

Quando a fase estacionária é uma superfície sólida, o coeficiente de transferência de massa C_E é diretamente proporcional ao tempo requerido para as espécies serem adsorvidas ou desorvidas, o que, por sua vez, é inversamente proporcional à constante de primeira ordem para os processos.

O Termo de Transferência de Massa na Fase Móvel $C_M u$ Os processos de transferência de massa que ocorrem na fase móvel são suficientemente complexos para que não tenhamos ainda uma descrição quantitativa completa. Contudo, temos uma boa compreensão qualitativa das variáveis que afetam o alargamento de zona por causa deles e essa compreensão tem levado a melhorias em todos os tipos de colunas cromatográficas.

O coeficiente de transferência de massa na fase móvel C_M é inversamente proporcional ao coeficiente de difusão do analito na fase móvel, D_M . Para as colunas recheadas, C_M é proporcional ao quadrado do diâmetro das partículas do material de recheio, d_p^2 . Para as colunas capilares, C_M é proporcional ao quadrado do diâmetro da coluna d_c^2 e é uma função da vazão.

A contribuição da transferência de massa na fase móvel para a altura de prato é o produto do coeficiente de transferência de massa C_M (o qual é função da velocidade do solvente), bem como da velocidade do solvente por si mesmo. Desse modo, a contribuição líquida de $C_M u$ para a altura de prato não é linear em u (ver a curva indicada por $C_M u$ na Figura 30-15), mas carrega uma dependência complexa em relação à velocidade do solvente.

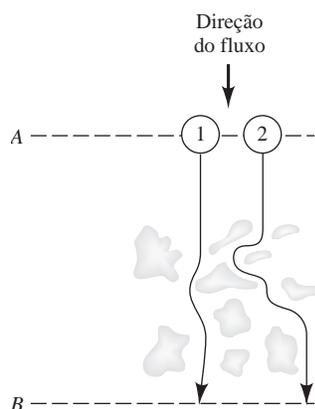


Figura 30-14 Caminhos típicos que duas moléculas percorrem durante a eluição. Observe que a distância percorrida pela molécula 2 é maior que aquela percorrida pela molécula 1. Assim, a molécula 2 vai chegar em B mais tarde que a molécula 1.

O alargamento de zona na fase móvel é decorrente em parte de uma quantidade enorme de caminhos, os quais uma molécula (ou íon) pode percorrer para encontrar a sua saída de uma coluna recheada. Como mostrado na Figura 30-14, as extensões desses caminhos podem diferir significativamente; assim, os tempos de residência na coluna para moléculas da mesma espécie são também variáveis. As moléculas do soluto atingem o final da coluna após um certo intervalo de tempo, o que leva a um alargamento de banda. Esse efeito dos múltiplos caminhos, que às vezes é denominado *eddy diffusion*, deveria ser independente da velocidade do solvente se este não fosse parcialmente afetado pela difusão ordinária, a qual leva as moléculas a ser transferidas de uma corrente que segue um determinado caminho para outra que percorre outra rota. Se a velocidade de fluxo é muito baixa, um grande número dessas transferências vai ocorrer e cada molécula vai experimentar numerosos caminhos ao se deslocar pela coluna, permanecendo um breve intervalo de tempo em cada um deles. Em consequência, a velocidade com a qual cada molécula se move através da coluna tende a se aproximar da velocidade média.

Dessa maneira, a velocidades baixas da fase móvel, as moléculas não são significativamente dispersas pelo efeito dos múltiplos caminhos. A velocidades moderadas ou altas, contudo, não há tempo suficiente para a média por difusão ocorrer e o alargamento de banda em razão dos diferentes caminhos é observado. A velocidades suficientemente altas, o efeito dos caminhos múltiplos torna-se independente da vazão.

◀ Os caminhos da fase móvel através da coluna são numerosos e têm diferentes comprimentos.

Superposto ao efeito dos múltiplos caminhos está aquele devido às regiões estagnadas da fase móvel, retida na fase estacionária. Assim, quando um sólido serve como fase estacionária, seus poros são preenchidos com volumes *estáticos* de fase móvel. As moléculas do soluto devem então difundir-se através dessas regiões estagnadas antes que a transferência entre a fase móvel *em movimento* e a fase estacionária possa ocorrer. Essa situação não ocorre somente com as fases sólidas estacionárias, mas também com as fases líquidas imobilizadas sobre os sólidos porosos porque o líquido imobilizado não preenche completamente os poros.

A presença de regiões estagnadas de fase móvel reduz a velocidade do processo de troca e resulta em uma contribuição para a altura de prato que é diretamente proporcional à velocidade da fase móvel e inversamente proporcional ao coeficiente de difusão para o soluto na fase móvel. Um acréscimo no volume interno acompanha então um aumento no tamanho da partícula.

◀ As regiões estagnadas de solvente contribuem para o aumento de H .

O Efeito da Velocidade da Fase Móvel nos Termos da Equação 30-27 A Figura 30-15 mostra a variação dos três termos na Equação 30-27 em função da velocidade da fase móvel. A curva acima é a soma desses vários efeitos. Observe que existe uma vazão ótima na qual a altura do prato é mínima e a eficiência de separação é máxima.

Sumário dos Métodos de Redução do Alargamento de Banda Para as colunas recheadas, uma variável que afeta a eficiência da coluna é o diâmetro das partículas que constituem o recheio. Para as colunas capilares, o diâmetro da coluna por si mesmo é uma variável importante. O efeito do diâmetro de partícula é demonstrado pelos dados apresentados na Figura 30-16 para a cromatografia gasosa. Um gráfico semelhante para a cromatografia líquida é mostrado na Figura 32-1. Para obter vantagem do efeito do diâmetro da coluna, colunas cada vez mais finas têm sido empregadas ultimamente.

◀ Para as colunas recheadas, o alargamento de banda é minimizado pelo diâmetro pequeno das partículas. Para as colunas capilares, diâmetros pequenos da própria coluna reduzem o alargamento de banda.

Em fases móveis gasosas, a velocidade de difusão longitudinal pode ser reduzida apreciavelmente pela redução da temperatura e assim do coeficiente de difusão. A consequência é uma altura de prato significativamente menor a baixas temperaturas. Esse efeito não é em geral observado em cromatografia líquida porque a difusão é lenta, de forma que o termo de difusão longitudinal exerce um pequeno efeito sobre a altura de prato global.

Em fases estacionárias líquidas, a espessura da camada líquida adsorvida deve ser minimizada uma vez que C_E na Equação 30-27 é proporcional ao quadrado dessa variável.

◀ O coeficiente de difusão D_M exerce um efeito maior em cromatografia gasosa que em cromatografia líquida.

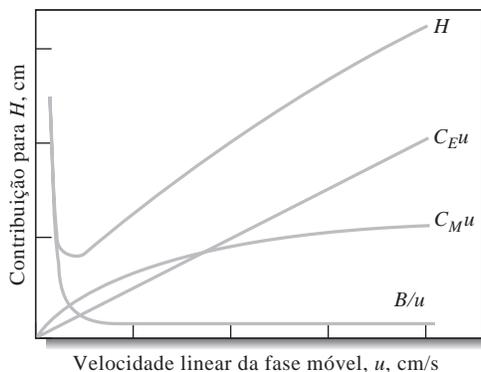
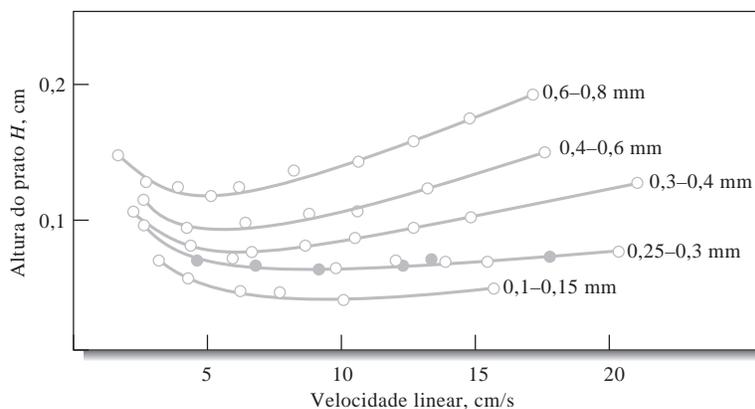


Figura 30-15 Contribuição dos vários termos de transferência de massa para a altura de prato. $C_E u$ surge da velocidade de transferência de massa para e da fase estacionária; $C_M u$ vem da limitação na velocidade de transferência de massa na fase móvel; e B/u está associado com a difusão longitudinal.

Figura 30-16 O efeito do tamanho de partícula na altura de prato para colunas recheadas para a cromatografia gasosa. Os números à direita de cada curva são os diâmetros das partículas. (De J. Boheman e J. H. Purnell, in *Gas Chromatography 1958*, D. H. Desty, Ed. Nova York: Academic Press, 1958.)



30E-7 Resolução de uma Coluna

A **resolução** de uma coluna cromatográfica é uma medida quantitativa da sua habilidade em separar os analitos A e B.

A **resolução** R_s de uma coluna nos diz quanto duas bandas se distanciam uma em relação a outra em comparação com as suas larguras. A resolução fornece uma medida quantitativa da habilidade da coluna em separar dois analitos. O significado desse termo é ilustrado na Figura

30-17, que consiste em cromatogramas para as espécies A e B em três colunas com diferente poder de resolução. A resolução de cada coluna é definida como

$$R_s = \frac{\Delta Z}{\frac{W_A}{2} + \frac{W_B}{2}} = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (30-29)$$

em que os termos do lado direito são definidos na figura.

É evidente, a partir da Figura 30-17, que uma resolução de 1,5 fornece uma separação essencialmente completa de A e B, enquanto uma resolução de 0,75 não o faz. A uma resolução de 1,0, a zona de A contém aproximadamente 4% de B e a zona de B, aproximadamente 4% de A. A uma resolução de 1,5, a sobreposição é aproximadamente de 0,3%. A resolução para uma dada fase estacionária pode ser melhorada aumentando-se o comprimento da coluna e, dessa forma, o número de pratos. Uma consequência adversa do aumento no número de pratos, contudo, é o acréscimo no tempo requerido para a separação dos componentes.

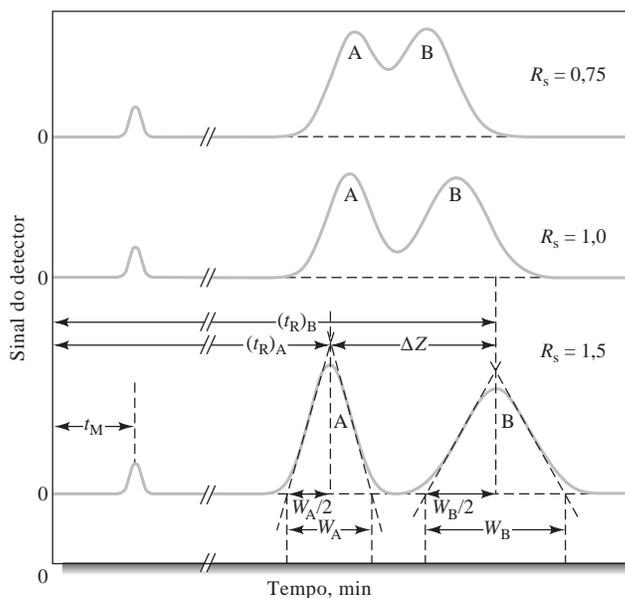


Figura 30-17 Separação a três valores de resolução: $R_s = 2\Delta Z/(W_A + W_B)$.

O Efeito do Fator de Retenção e do Fator de Seletividade sobre a Resolução

Uma equação útil pode ser prontamente derivada para relacionar a resolução de uma coluna com o número de pratos que ela contém, bem como com os fatores de retenção e de seletividade de um par de solutos na coluna. Assim, pode ser demonstrado¹³ que, para os dois solutos A e B na Figura 30-17, a resolução é dada pela equação

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad (30-30)$$

em que k_B é o fator de retenção da espécie que se move mais lentamente e α , o fator de seletividade. Essa equação pode ser rearranjada para fornecer o número de pratos necessários para se obter uma dada resolução:

$$N = 16R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_B}{k_B} \right)^2 \quad (30-31)$$

O Efeito da Resolução no Tempo de Retenção

Como mencionado anteriormente, a meta em cromatografia é obter-se a maior resolução possível no menor intervalo de tempo possível. Infelizmente, essas metas tendem a ser incompatíveis e um compromisso entre as duas é geralmente necessário. O tempo $(t_R)_B$ requerido para a eluição dos dois componentes na Figura 30-17 com uma resolução de R_s é dado por

$$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k_B)^3}{(k_B)^2} \quad (30-32)$$

em que u é a velocidade linear da fase móvel.

EXEMPLO 30-2

As substâncias A e B apresentam tempo de retenção de 16,40 e 17,63 min, respectivamente, em uma coluna de 30,0 cm. Uma espécie não retida passa através da coluna em 1,30 min. As larguras de pico (na base) para A e B são 1,11 e 1,21 min, respectivamente. Calcule (a) a resolução da coluna, (b) o número médio de pratos na coluna, (c) a altura de prato, (d) o comprimento da coluna necessário para se obter uma resolução de 1,5 e (e) o tempo necessário para se eluir a substância B da coluna com R_s igual a 1,5.

(a) Empregando-se a Equação 30-29, encontramos

$$R_s = \frac{2(17,63 - 16,40)}{1,11 + 1,21} = 1,06$$

(b) A Equação 30-24 permite o cálculo de N

$$N = 16 \left(\frac{16,40}{1,11} \right)^2 = 3.493 \quad \text{e} \quad N = 16 \left(\frac{17,63}{1,21} \right)^2 = 3.397$$

$$N_{\text{avg}} = \frac{3.493 + 3.397}{2} = 3.445$$

(c) $H = \frac{L}{N} = \frac{30,0}{3.445} = 8,7 \times 10^{-3} \text{ cm}$

(continua)

¹³ Ver D. A. Skoog, F. J. Holler e T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 5.ed., p. 689. Belmont, CA: Brooks/Cole, 1998.

(d) k e α não se alteram muito com o aumento de N e L . Assim, substituindo N_1 e N_2 na Equação 30-30 e dividindo uma das equações resultantes pela outra, obtém-se

$$\frac{(R_s)_1}{(R_s)_2} = \frac{\sqrt{N_1}}{\sqrt{N_2}}$$

em que os subscritos 1 e 2 referem-se à coluna original e à mais longa, respectivamente. Substituindo os valores apropriados para N_1 , $(R_s)_1$ e $(R_s)_2$, têm-se

$$\frac{1,06}{1,5} = \frac{\sqrt{3.445}}{\sqrt{N_2}}$$

$$N_2 = 3.445 \left(\frac{1,5}{1,06} \right)^2 = 6,9 \times 10^3$$

Mas

$$L = NH = 6,9 \times 10^3 \times 8,7 \times 10^{-3} = 60 \text{ cm}$$

(e) Substituindo $(R_s)_1$ e $(R_s)_2$ na Equação 30-32 e dividindo, temos

$$\frac{(t_R)_1}{(t_R)_2} = \frac{(R_s)_1^2}{(R_s)_2^2} = \frac{17,63}{(t_R)_2} = \frac{(1,06)^2}{(1,5)^2}$$

$$(t_R)_2 = 35 \text{ min}$$

Portanto, para se obter uma resolução melhor, o comprimento da coluna e, conseqüentemente, o tempo necessário para a separação devem ser dobrados.

Técnicas de Otimização

As Equações 30-30 e 30-32 servem como guias para a escolha das condições que levam a um grau de resolução desejado com o mínimo gasto de tempo. Um exame dessas equações revela que cada uma delas é constituída por três partes. A primeira descreve a eficiência da coluna em termos de \sqrt{N} ou H . A segunda, que é um quociente que contém α , é um termo de seletividade que depende das propriedades dos dois solutos. A terceira parte é o termo do fator de retenção, o qual é um quociente contendo k_B ; o termo depende das propriedades de ambos, o soluto e a coluna.

Varição na Altura de Prato Como mostrado pela Equação 30-30, a resolução de uma coluna aumenta com a raiz quadrada do acréscimo do número de pratos que ela contém. Contudo, o Exemplo 30-2e revela que o aumento do número de pratos eleva o tempo de separação, a menos que o aumento possa ser feito pela redução da altura de prato e não pelo aumento do comprimento da coluna.

Os métodos de minimização da altura de prato, discutidos na Seção 30E-6, incluem a redução do tamanho de partícula do material de recheio, do diâmetro da coluna e da espessura do filme líquido. A otimização da vazão da fase móvel também é útil.

Varição no Fator de Retenção Frequentemente, uma separação pode ser melhorada significativamente por meio da manipulação do fator de retenção k_B . O aumento de k_B geralmente eleva a resolução (mas à custa do tempo de eluição). Para determinar a faixa ótima de valores para k_B é conveniente que se escreva a Equação 30-30 na forma

$$R_s = Q \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right)$$

e a Equação 30-32 como

$$(t_R)_B = Q' \left(\frac{(1 + k_B)^3}{(k_B)^2} \right)$$

em que Q e Q' contêm o restante dos termos nas duas equações. A Figura 30-18 mostra um gráfico de R_s/Q e $(t_R)_B/Q'$ em função de k_B , assumindo que Q e Q' permanecem aproximadamente constantes. É evidente que os valores de k_B maiores que cerca de 10 devem ser evitados porque fornecem um pequeno aumento na resolução elevando significativamente o tempo requerido para a separação. O mínimo na curva de eluição-tempo ocorre a $k_B \approx 2$. Em geral, então, o valor ótimo de k_B encontra-se entre 1 e 5.

Normalmente, a maneira mais fácil de melhorar a resolução é pela otimização de k . Para as fases móveis gasosas, k pode ser freqüentemente melhorado com a alteração da temperatura. Para as fases móveis líquidas, a alteração na composição do solvente, com freqüência, permite a manipulação de k para se obter melhores separações. Um exemplo de efeito drástico que uma alteração relativamente simples na composição do solvente pode ocasionar está demonstrado na Figura 30-19. Nesse exemplo, pequenas variações na razão entre metanol e água convertem os cromatogramas insatisfatórios (a e b) em outros que apresentam picos bem separados para cada componente (c e d). Para a maioria dos casos, o cromatograma mostrado em (c) é o melhor, uma vez que este mostra uma resolução adequada em um tempo menor. O fator de retenção é influenciado também pela espessura do filme da fase estacionária.

Variação do Fator de Seletividade A otimização de k e o aumento de N não são suficientes para fornecer uma separação satisfatória de dois solutos em um tempo razoável quando α se aproxima da unidade. Deve-se, então, buscar uma forma de aumentar α , mantendo-se k na faixa de 1 a 10. Muitas opções estão disponíveis. Da mais para a menos desejável, considerando o que se pode conseguir e a conveniência, as opções são (1) alteração da composição da fase móvel, (2) alteração da temperatura da coluna, (3) alteração na composição da fase estacionária e (4) utilização de efeitos químicos especiais.

Um exemplo do uso da opção 1 foi relatada para a separação de anisol ($C_6H_5OCH_3$) e benzeno.¹⁴ Com uma fase móvel constituída por uma mistura de 50% de água e metanol, k era igual a 4,5 para o anisol e 4,7 para o benzeno, enquanto α era igual a 1,04. A substituição da fase móvel aquosa contendo 37% de tetra-hidrofurano forneceu valores de k iguais a 3,9 e 4,7 e um valor de α de 1,20. A sobreposição dos picos era significativa com o primeiro sistema solvente e desprezível com o segundo.

Uma forma menos conveniente, mas em geral altamente efetiva de se melhorar α , mantendo-se os valores de k na sua faixa ótima, é alterar a composição da fase estacionária. Para tirar vantagem dessa opção, a maioria dos laboratórios que realizam separações cromatográficas geralmente mantêm diversas colunas que podem ser facilmente trocadas.

A elevação da temperatura causa normalmente um aumento de k , contudo, tem pouco efeito sobre os valores de α em cromatografia líquido-líquido e líquido-sólido. Em contraste, na cromatografia por troca iônica, os efeitos da temperatura podem ser grandes o suficiente para que valha a pena explorar essa opção antes de se buscar a troca do material de recheio da coluna.

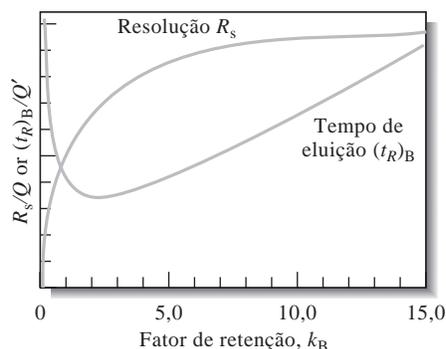


Figura 30-18 Efeito do fator de retenção k_B sobre a resolução R_s e o tempo de eluição $(t_R)_B$. Presume-se que Q e Q' permanecem constantes com variações em k_B .

¹⁴L. R. Snyder e J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2.ed., p. 75. Nova York: Wiley, 1979.

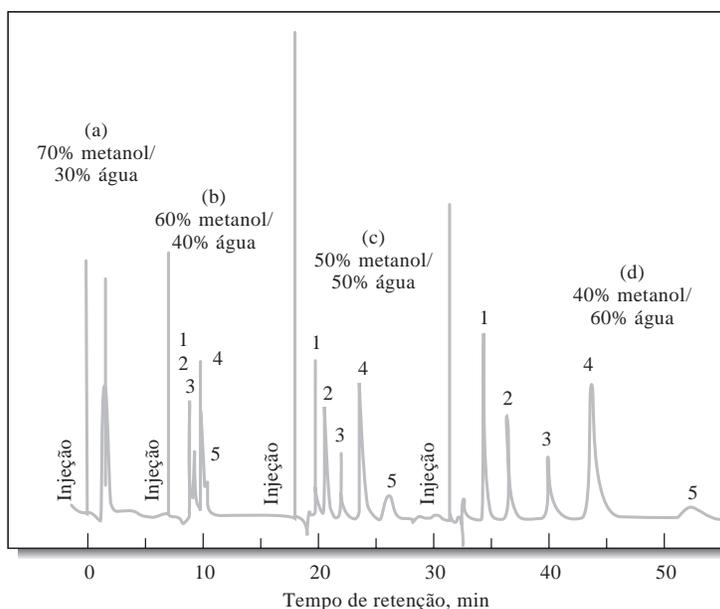
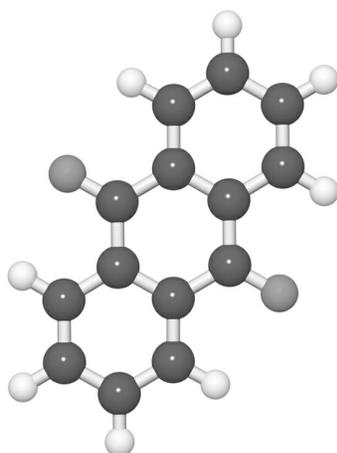


Figura 30-19 O efeito da alteração do solvente nos cromatogramas. Analitos: (1) 9,10-antraquinona; (2) 2-metil-9,10-antraquinona; (3) 2-etil-9,10-antraquinona; (4) 1,4-dimetil-9,10-antraquinona; (5) 2-*t*-butil-9,10-antraquinona.



Modelo molecular da 9,10-antraquinona.

Um último método para melhorar a resolução consiste em incorporar à fase estacionária espécies que complexam ou interagem com um ou mais componentes da amostra. Um exemplo bem conhecido do uso dessa opção ocorre quando um adsorvente impregnado com sal de prata é empregado para melhorar a separação de olefinas. A melhoria é consequência da formação de complexos entre os íons prata e os compostos orgânicos insaturados.

O Problema Geral da Eluição

A Figura 30-20 mostra alguns cromatogramas hipotéticos para uma mistura de seis componentes constituída por três pares de componentes com ampla diferença de constantes de distribuição e, dessa forma, com fatores de retenção também bastante diferentes. No cromatograma (a), as condições foram ajustadas de forma que os fatores de retenção para os componentes 1 e 2 (k_1 e k_2) estejam na faixa ótima de 1 a 5. Contudo,

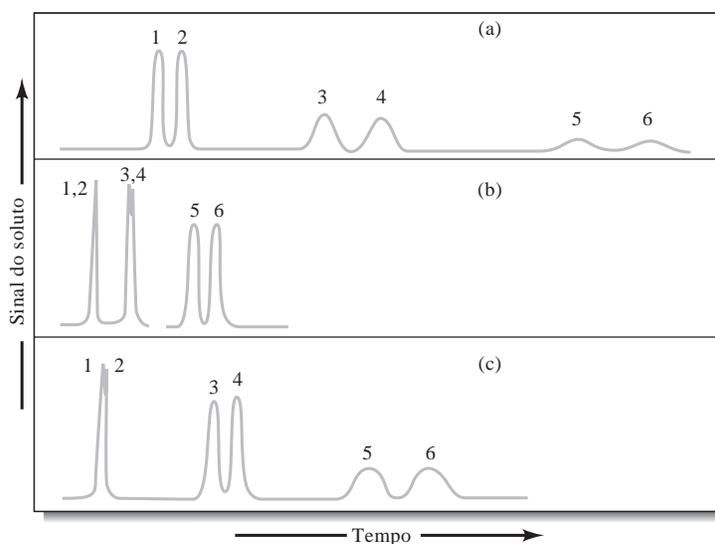


Figura 30-20 O problema geral da eluição em cromatografia.

os fatores para os outros componentes estão longe do ótimo. Assim, as bandas correspondentes aos componentes 5 e 6 aparecem somente após um longo intervalo de tempo; além disso, as bandas são tão largas que torna difícil a sua identificação de forma inequívoca.

Como mostrado no cromatograma (b), a alteração das condições para se otimizar a separação dos componentes 5 e 6 aproxima os picos dos quatro primeiros componentes de forma que sua resolução não seja satisfatória. No entanto, o tempo de eluição é ideal.

O fenômeno ilustrado na Figura 30-20 é encontrado com frequência o suficiente para receber um nome: o **problema geral de eluição**. Uma solução comum para esse problema está na alteração das condições que determinam os valores de k à medida que a separação se processa. Essas alterações podem ser realizadas em batelada ou de forma contínua. Assim, para a mistura exibida na Figura 30-20, as condições de saída podem ser aquelas que produzem o cromatograma (a). Imediatamente após a eluição dos componentes 1 e 2, as condições podem ser alteradas para aquelas que melhor separam os componentes 3 e 4 (como no cromatograma (c)). Com o aparecimento dos picos para esses componentes, a eluição pode ser finalizada sob condições empregadas para produzir o cromatograma (b). Frequentemente, esse procedimento leva a uma separação satisfatória de todos os componentes da mistura em um tempo mínimo.

Em cromatografia líquida, as alterações em k são produzidas pela variação da composição da fase móvel durante a eluição. Esse procedimento é denominado **eluição por gradiente** ou **programação de solvente**. A eluição sob condição de composição constante da fase móvel é chamada **eluição isocrática**. Em cromatografia gasosa, a temperatura pode ser alterada em uma forma conhecida para modificar os valores de k . Esse modo de **programação de temperatura** pode auxiliar a encontrar as condições ótimas para muitas separações.

30E-8 Aplicações da Cromatografia

A cromatografia é uma ferramenta versátil e poderosa para separar espécies químicas semelhantes. Além disso, ela pode ser empregada para a identificação qualitativa e determinação quantitativa das espécies separadas. Exemplos de aplicações dos vários tipos de cromatografia são dados nos Capítulos 31 e 32.

EXERCÍCIOS NA WEB

Utilize o programa Google para realizar uma busca sobre cauda de picos em cromatografia líquida de fase reversa. Descreva o fenômeno e discuta as formas pelas quais a cauda pode ser minimizada. Faça, também, uma busca sobre os efeitos da temperatura em cromatografia líquida. Descreva como a temperatura influencia as separações cromatográficas. Com base no que você aprendeu, a programação de temperatura poderia ser de algum valor para auxiliar na separação em cromatografia líquida? Por que sim ou por que não?

XXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXX

QUESTÕES E PROBLEMAS

- *30-1. O que é um agente mascarante e como ele funciona?
- 30-2. Quais são os dois eventos que acompanham o processo de separação?
- *30-3. Identifique três métodos baseados na separação mecânica de fase.
- 30-4. Qual é a diferença entre as estruturas de uma resina trocadora de íons ácida forte e uma fraca?

- 30-5. Defina
- *(a) eluição.
 - (b) fase móvel.
 - *(c) fase estacionária.
 - (d) razão de partição.
 - *(e) tempo de retenção.
 - (f) fator de retenção.
 - *(g) fator de seletividade.
 - (h) altura de prato.

- 30-6. Liste as variáveis que levam ao alargamento de zona em cromatografia.
- *30-7. Qual é a diferença entre as cromatografias gás-líquido e líquido-líquido?
- 30-8. Qual é a diferença entre as cromatografias líquido-líquido e líquido-sólido?
- *30-9. Descreva um método de determinação do número de pratos em uma coluna.
- 30-10. Identifique dois métodos gerais para melhorar a resolução de duas substâncias em uma coluna cromatográfica.
- *30-11. A constante de distribuição para X entre *n*-hexano e água é 9,6. Calcule a concentração de X que resta na fase aquosa, após 50,0 mL de uma solução 0,150 mol L⁻¹ de X terem sido extraídos com as seguintes quantidades de *n*-hexano:
- uma porção de 40,0 mL.
 - duas porções de 20,0 mL.
 - quatro porções de 10,0 mL.
 - oito porções de 5,00 mL.
- 30-12. O coeficiente de distribuição de Z entre *n*-hexano e água é 6,25. Calcular a porcentagem de Z que resta em 25,0 mL de água que era originalmente 0,0600 mol L⁻¹ em Z, após a extração com os seguintes volumes de *n*-hexano:
- uma porção de 25,0 mL.
 - duas porções de 12,5 mL.
 - cinco porções de 5,00 mL.
 - dez porções de 2,50 mL.
- *30-13. Qual é o volume de *n*-hexano necessário para reduzir a concentração de X no Problema 30-11 a $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ se 25,0 mL de uma solução 0,0500 mol L⁻¹ de X forem extraídos com
- porções de 25,0 mL?
 - porções de 10,0 mL?
 - porções de 2,0 mL?
- 30-14. Qual é o volume de *n*-hexano necessário para reduzir a concentração de Z no Problema 30-12 a $1,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ se 40,0 mL de uma solução 0,0200 mol L⁻¹ de Z forem extraídos com
- porções de 50,0 mL de *n*-hexano?
 - porções de 25,0 mL?
 - porções de 10,0 mL?
- *30-15. Qual é o valor mínimo do coeficiente de distribuição que permite a remoção de 99% de um soluto de 50,0 mL de água com
- duas extrações com 25,0 mL de tolueno?
 - cinco extrações com 10,0 mL de tolueno?
- 30-16. Se 30,0 mL de água contendo 0,0500 mol L⁻¹ de Q são extraídos com quatro porções de 10,0 mL de um solvente orgânico imiscível, qual é o valor mínimo do coeficiente de distribuição que permite a transferência do soluto para a camada orgânica restando:
- $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹
 - $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹
 - $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹
- *30-17. Uma solução aquosa de 0,150 mol L⁻¹ de um ácido fraco HA foi preparada a partir do composto puro e três alíquotas de 50,0 mL foram transferidas para balões volumétricos de 100,0 mL. A solução 1 foi diluída a 100,0 mL com 1,0 mol L⁻¹ de HClO₄; a solução 2, com 1,0 mol L⁻¹ de NaOH; e a solução 3, com água. Uma alíquota de 25,0 mL de cada uma das soluções foram extraídas com 25,0 mL de *n*-hexano. O extrato da solução 2 não continha nenhum traço detectável de espécies com A, indicando que a espécie A⁻ não é solúvel no solvente orgânico. O extrato da solução 1 não continha nenhum ClO₄⁻ ou HClO₄, mas tinha 0,0454 mol L⁻¹ de HA (encontrado por re-extração com NaOH padrão e titulação de retorno com HCl padrão). O extrato da solução 3 continha 0,0225 mol L⁻¹ de HA. Pressuponha que o HA não se dissocie ou se associe no solvente orgânico e calcule
- a razão de distribuição para o HA entre os dois solventes.
 - a concentração das espécies HA e A⁻ na solução aquosa 3 após a extração.
 - a constante de dissociação de HA em água.
- 30-18. Para determinar a constante de equilíbrio para a reação
- $$\text{I}_2 + 2\text{SCN}^- \rightleftharpoons \text{I}(\text{SCN})_2^- + \text{I}^-$$
- 25,0 mL de uma solução aquosa 0,0100 mol L⁻¹ de I₂ foi extraída com 10,0 mL de CHCl₃. Após a extração, as medidas espectrofotométricas revelaram que a concentração de I₂ na camada aquosa era igual a $1,12 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Uma solução aquosa que era 0,0100 mol L⁻¹ em I₂ e 0,100 mol L⁻¹ em KSCN foi preparada. Depois da extração de 25,0 mL dessa solução com 10,0 mL de CHCl₃, a concentração de I₂ na camada de CHCl₃ foi determinada por medidas espectrofotométricas como $1,02 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.
- Qual é a constante de distribuição do I₂ entre CHCl₃ e H₂O?
 - Qual é a constante de formação do I(SCN)₂⁻?

***30-19.** O conteúdo total de cátions em águas naturais é freqüentemente determinado pela troca dos cátions por íons hidrogênio, empregando-se uma resina trocadora de íons fortemente ácida; 25,0 mL de uma amostra de água natural foram diluídos a 100 mL com água destilada e 2,0 g de uma resina trocadora de cátions, adicionados. Após agitação, a mistura foi filtrada e o sólido retido no papel-filtro foi lavado com três porções de 15,0 mL de água. O filtrado e as águas de lavagem requereram 15,3 mL de uma solução 0,0202 mol L⁻¹ de NaOH para obter o ponto final com verde de bromocresol.

(a) Calcular o número de miliequivalentes de cátions presentes em exatamente 1,00 L da amostra. (Aqui, a massa equivalente de um cátion é a sua fórmula-grama, dividida pela sua carga.)

(b) Expresse os resultados em termos de miligramas de CaCO₃ por litro.

30-20. Um ácido orgânico foi isolado e purificado por recristalização do seu sal de bário. Para determinar o equivalente-grama do ácido, uma amostra de 0,393 g do sal foi dissolvido em cerca de 100 mL de água. A solução foi passada através de uma resina trocadora de íons fortemente ácida e a coluna, lavada com água; o eluato e as lavagens foram titulados com 18,1 mL de uma solução 0,1006 mol L⁻¹ de NaOH até o ponto final da fenolftaleína.

(a) Calcular o equivalente-grama do ácido orgânico.

(b) Uma curva de titulação potenciométrica da solução-resultante quando uma segunda amostra foi tratada da mesma forma revelou dois pontos finais: um a pH = 5 e o outro a pH = 9. Qual é a massa molar do ácido?

***30-21.** Descreva a preparação de exatamente 2,00 L de uma solução de HCl 0,1500 mol L⁻¹ a partir de NaCl com grau de padrão primário utilizando uma resina trocadora de íons.

30-22. Uma solução aquosa contendo MgCl₂ e HCl foi analisada primeiramente titulando-se uma alíquota de 25,00 mL até o ponto final do verde de bromocresol com 18,96 mL de uma solução 0,02762 mol L⁻¹ de NaOH. Uma alíquota de 10,00 mL foi diluída a 50,00 mL com água destilada e passada através de uma resina trocadora de íons fortemente ácida. O eluato e as lavagens requereram 36,54 mL da solução de NaOH para atingir o mesmo ponto final. Determine as concentrações molares de HCl e MgCl₂ na amostra.

***30-23.** Uma coluna tubular empregada em cromatografia gasosa tinha um diâmetro interno de 0,25 mm. Uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ foi empregada. Encontre a velocidade linear em cm s⁻¹ na saída da coluna.

30-24. Uma coluna recheada de cromatografia gasosa tinha um diâmetro interno de 5,0 mm. A vazão medida na saída da coluna era de 50 mL min⁻¹. Se a porosidade da coluna era de 0,45, qual era a velocidade de fluxo linear em cm s⁻¹.

***30-25.** Os seguintes dados são para uma coluna de cromatografia líquida:

Comprimento do recheio	24,7 cm
Vazão	0,313 mL min ⁻¹
V _M	1,37 mL
V _E	0,164 mL

O cromatograma de uma mistura das espécies A, B, C e D forneceu os seguintes dados:

	Tempo de Retenção, min	Largura do Pico na Base (W), min
Não retido	3,1	—
A	5,4	0,41
B	13,3	1,07
C	14,1	1,16
D	21,6	1,72

Calcular

(a) o número de pratos de cada pico.
 (b) a média e o desvio padrão para *N*.
 (c) a altura de prato para a coluna.

30-26. A partir dos dados do Problema 30-25, calcule para A, B, C e D

(a) o fator de retenção.
 (b) a constante de distribuição.

***30-27.** A partir dos dados do Problema 30-25, calcule para as espécies B e C

(a) a resolução.
 (b) o fator de seletividade.
 (c) o comprimento da coluna necessário para separar as duas espécies com uma resolução de 1,5.
 (d) o tempo necessário para separar as duas espécies na coluna na parte (c).

30-28. A partir dos dados do Problema 30-25, calcule para as espécies C e D

(a) a resolução.
 (b) o comprimento da coluna necessário para separar as duas espécies com uma resolução de 1,5.

- *30-29. Os seguintes dados foram obtidos para a cromatografia gás-líquido em uma coluna recheada de 40 cm:

Composto	t_R , min	W , min
Ar	1,9	—
Metilciclo-hexano	10,0	0,76
Metilciclo-hexeno	10,9	0,82
Tolueno	13,4	1,06

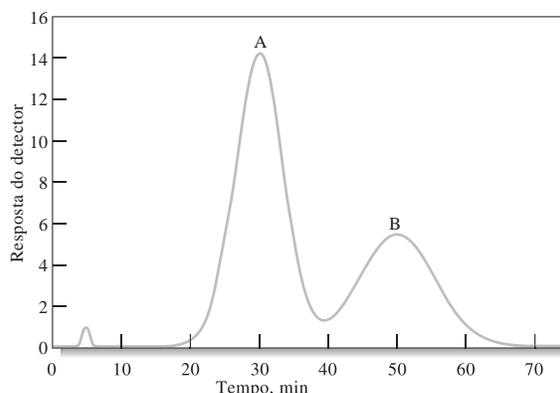
Calcular

- (a) o número médio de pratos a partir dos dados.
 (b) o desvio padrão para a média em (a).
 (c) a altura média de prato da coluna.
- 30-30. Com relação ao Problema 30-29, calcular a resolução para
 (a) metilciclo-hexeno e metilciclo-hexano.
 (b) metilciclo-hexeno e tolueno.
 (c) metilciclo-hexano e tolueno.
- *30-31. Se a resolução de 1,5 for desejada na separação de metilciclo-hexano e metilciclo-hexeno no Problema 30-29
 (a) quantos pratos são necessários?
 (b) qual é o comprimento da coluna se o mesmo recheio for empregado?
 (c) qual é o tempo de retenção para o metilciclo-hexeno na coluna na parte (b)?
- 30-32. Se V_E e V_M para a coluna no Problema 30-29 são 19,6 e 62,6 mL, respectivamente, e o pico do ar não-retido aparece após 1,9 min, calcular:
 (a) o fator de retenção para cada composto.
 (b) a constante de distribuição para cada composto.
 (c) o fator de seletividade para o metilciclo-hexano e metilciclo-hexeno.
- *30-33. A partir de estudos de distribuição, as espécies M e N mostram as constantes de distribuição água/hexano de 5,93 e 6,11, respectivamente ($K = [M]_{aq}/[M]_{hex}$). As duas espécies devem ser separadas por eluição com o hexano em uma coluna recheada com sílica gel contendo água adsorvida. A razão V_E/V_M para o recheio é 0,398.
 (a) Calcular o fator de retenção para cada soluto.
 (b) Calcular o fator de seletividade.
 (c) Quantos pratos são necessários para se obter uma resolução de 1,5?
 (d) Qual deve ser o comprimento da coluna se a altura de prato do recheio é $1,9 \times 10^{-3}$ cm?

- (e) Se uma velocidade linear de 6,50 cm min^{-1} for empregada quanto tempo vai demorar para se eluir as duas espécies?

- 30-34. Repita os cálculos do Problema 30-33 presumindo que $K_M = 5,81$ e $K_N = 6,20$.

- 30-35. **Problema Desafiador.** Um cromatograma de uma mistura de dois componentes obtido em uma coluna de cromatografia líquida de 25 cm é mostrado na figura. A vazão foi de 0,40 mL min^{-1} .



- (a) Encontre os tempos nos quais os componentes A e B permanecem na fase estacionária.
 (b) Encontre os tempos de retenção para A e B.
 (c) Determine os fatores de retenção para os dois componentes.
 (d) Encontre as larguras de cada pico e aquelas a meia-altura para cada pico.
 (e) Ache a resolução para os dois picos.
 (f) Encontre o número médio de pratos para a coluna.
 (g) Ache a altura média do prato.
 (h) Qual comprimento de coluna seria necessário para se obter uma resolução de 1,75?
 (i) Qual o tempo seria necessário para se obter a resolução da parte (h)?
 (j) Suponha que o comprimento da coluna seja estabelecido em 25 cm e que o material de recheio seja fixo. Quais medidas você poderia tomar para aumentar a resolução de forma a obter uma separação ao nível da linha-base?
 (k) Existem algumas medidas que você poderia tomar para obter melhor separação em um período de tempo mais curto com a mesma coluna da parte (j)?

CAPÍTULO 31

Cromatografia Gasosa

A cromatografia gasosa é uma das técnicas mais empregadas em análises qualitativas e quantitativas. Colunas capilares são utilizadas em determinações por cromatografia gasosa a temperaturas que excedem 400 °C. Aplicações a essas altas temperaturas requerem fases estacionárias especiais e tubos que não se decompõem. Assim os tubos de muitas colunas são os feitos de aço inoxidável.

Este capítulo considera a cromatografia gasosa em detalhe, inclusive as colunas e as fases estacionárias que são mais amplamente utilizadas. Embora este capítulo esteja primariamente voltado para a cromatografia gás-líquido, ele contém uma breve discussão sobre cromatografia gás-sólido.

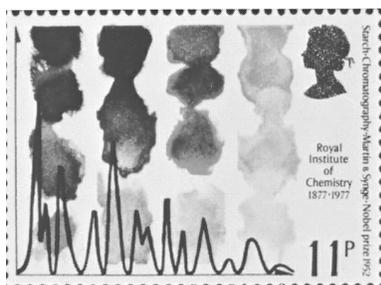
Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna.¹ Ao realizar-se uma separação por cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste, com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito; sua única função é transportar o analito através da coluna.

Dois tipos de cromatografia gasosa são encontrados: **cromatografia gás-líquido** (CGL) e **cromatografia gás-sólido** (CGS). A cromatografia gás-líquido encontra amplo uso em todas as áreas da ciência; seu nome é geralmente abreviado para **cromatografia gasosa** (CG). A cromatografia gás-sólido é baseada em uma fase estacionária sólida na qual a retenção dos analitos ocorre por adsorção. A cromatografia gás-sólido tem aplicação limitada em virtude da retenção semipermanente de moléculas polares ativas e efeito de cauda severo nos picos de eluição (como consequência da natureza não-linear do processo de adsorção). Assim, essa técnica não encontrou ampla aplicação exceto na separação de certas espécies gasosas de baixo peso molecular; discutiremos esse método brevemente na Seção 31D.

Na **cromatografia gás-líquido**, a fase móvel é um gás, enquanto a fase estacionária é um líquido retido na superfície de um sólido inerte por adsorção ou ligação química.

Na **cromatografia gás-sólido**, a fase móvel é um gás, ao passo que a fase estacionária é um sólido que retém os analitos por adsorção física. A cromatografia gás-sólido permite a separação de gases de baixa massa molecular, como os componentes do ar, sulfeto de hidrogênio, monóxido de carbono e óxido de nitrogênio.

¹ Para um tratamento detalhado da CG, ver J. Willet, *Gas Chromatography*. Nova York: Wiley, 1987; R. L. Grob, Ed. *Modern Practice of Gas Chromatography*, 3. ed. Nova York: Wiley, 1995; R. P. W. Scott, *Introduction to Analytical Gas Chromatography*, 2. ed. Nova York: Marcel Dekker, 1997; H. M. McNair e J. M. Miller, *Basic Gas Chromatography*. Nova York: Wiley, 1998.



Selo postal honrando os bioquímicos Archer J. P. Martin (1910–2002) e Richard L. M. Synge (1914–1994), que ganharam o Prêmio Nobel de Química de 1952 pelas suas contribuições ao desenvolvimento da cromatografia moderna.

A cromatografia gás-líquido é baseada na partição do analito entre a fase móvel gasosa e uma fase líquida imobilizada na superfície de um material sólido inerte de recheio ou nas paredes de um tubo capilar. O conceito de cromatografia gás-líquido foi enunciado pela primeira vez em 1941 por Martin e Synge, que foram também responsáveis pelo desenvolvimento da cromatografia de partição líquido-líquido. Contudo, mais de uma década se passou antes que o valor da cromatografia gás-líquido fosse demonstrado experimentalmente e que essa técnica passasse a ser empregada como uma ferramenta rotineira no laboratório. Em 1955, o primeiro instrumento comercial para a cromatografia gás-líquido surgiu no mercado. Desde essa época, o crescimento nas aplicações dessa técnica tem sido fenomenal. Atualmente, muitas centenas de milhares de cromatógrafos a gás estão em uso em todo o mundo.

31A INSTRUMENTOS PARA A CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDO

Muitas alterações e melhorias nos instrumentos para a cromatografia gasosa apareceram no mercado desde o seu lançamento comercial. Nos anos 1970, os integradores eletrônicos e os processadores de dados baseados em computadores tornaram-se comuns. Os anos 1980 e 90 testemunharam o uso dos computadores para o controle automático da maioria dos parâmetros instrumentais, como a temperatura da coluna, vazões e a injeção da amostra; o desenvolvimento de instrumentos de alto desempenho a custos moderados e, talvez o mais importante, o desenvolvimento das colunas tubulares abertas que são capazes de separar os componentes de misturas complexas de forma relativamente rápida. Hoje, cerca de 50 fabricantes de instrumentos oferecem cerca de 150 modelos diferentes de equipamentos cromatográficos a gás a preços que variam de US\$ 1.000 até mais de US\$ 50.000. Os componentes básicos de um instrumento típico que permite realizar a cromatografia gasosa são mostrados na Figura 31-1 e são brevemente descritos nesta seção.

31A-1 Sistema de Gás de Arraste

A fase móvel em cromatografia gasosa é denominada **gás de arraste** e deve ser quimicamente inerte. O hélio é a fase móvel gasosa mais comum, embora o argônio, o nitrogênio e o hidrogênio sejam também empregados. Esses gases estão disponíveis em cilindros pressurizados. Reguladores de pressão, manômetros e medidores de vazão são necessários para se controlar a vazão do gás.

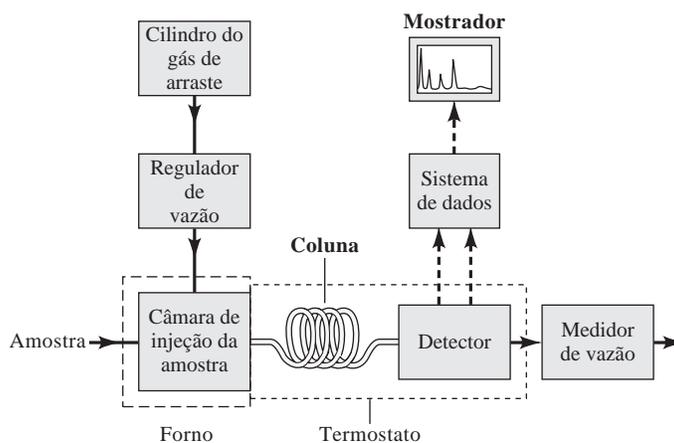


Figura 31-1 Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico.

As vazões são normalmente controladas por um regulador de pressão de dois estágios no cilindro do gás e algum tipo de regulador de pressão ou regulador de fluxo montado no cromatógrafo. As pressões de entrada situam-se na faixa de 10 a 50 psi (libras/polegada²) acima da pressão ambiente, o que produz vazões de 25 a 150 mL min⁻¹ em colunas recheadas e de 1 a 25 mL min⁻¹ para as colunas capilares de tubo aberto. Geralmente, admite-se que as vazões serão constantes se a pressão de entrada permanecer constante. As vazões podem ser estabelecidas por meio de um rotâmetro colocado na cabeça da coluna; esse dispositivo não é tão exato como um medidor de bolhas simples. Normalmente, o medidor de vazão está localizado no final da coluna, como indicado na Figura 30-1. Um filme de sabão é formado no caminho do gás quando um bulbo de borracha contendo uma solução aquosa de sabão ou detergente é pressionado; o tempo necessário para que esse filme se mova entre duas graduações em uma bureta é medido e convertido em vazão volumétrica. Note que as vazões e as velocidades lineares de fluxo são relacionadas pela Equação 30-12 ou pela Equação 30-13.

31A-2 Sistema de Injeção da Amostra

A eficiência da coluna requer que a amostra seja de tamanho adequado e introduzida como uma zona “estreita” de vapor; a injeção lenta ou de amostras muito volumosas causa o espalhamento das bandas e uma resolução pobre. Seringas calibradas, são empregadas para a injeção de amostras líquidas por meio de diafragmas ou septos de silicone em uma porta de admissão da amostra aquecida localizada na cabeça da coluna. A porta de admissão da amostra (Figura 31-2) ordinariamente é mantida a cerca de 50 °C acima do ponto de ebulição do componente menos volátil da amostra. Para as colunas analíticas recheadas normais, o tamanho da amostra pode variar de poucos décimos de microlitro até 20 μL . As colunas capilares necessitam de amostras menores por um fator de 100 ou maior. Um divisor de amostra é freqüentemente necessário com colunas capilares para desviar para a coluna uma pequena fração conhecida (1:100 a 1:500) do volume injetado, enviando o restante para o descarte. Os cromatógrafos a gás comerciais desenhados para empregar colunas capilares incorporam esses divisores; também permitem a injeção sem divisão de fluxo quando colunas recheadas são empregadas.

Para o trabalho quantitativo, volumes de amostra mais reproduzíveis para ambos, líquidos e gases, são obtidos por uma válvula de amostragem, como aquela exibida na Figura 31-3. Esses dispositivos possibilitam uma reprodutibilidade relativa do volume injetado da amostra melhor que 0,5%. As amostras sólidas são introduzidas como soluções ou, alternativamente, são seladas em *vials* de parede fina que podem ser inseridos na cabeça da coluna e perfurados ou quebrados externamente.

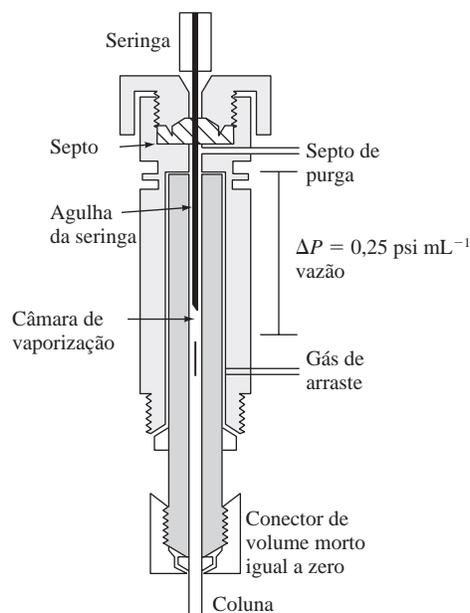


Figura 31-2 Vista da seção transversal de um injetador vaporizador direto tipo *microflash*.

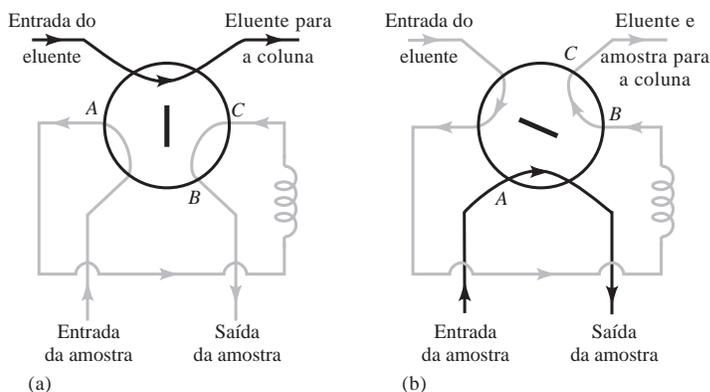


Figura 31-3 Válvula de amostragem tipo rotatória: A válvula permanece na posição (a) para que a alça ACB seja preenchida com a amostra; na posição (b) a amostra é introduzida na coluna.

31A-3 Configurações de Colunas e Fornos para as Colunas

Dois tipos gerais de colunas são encontrados em cromatografia gasosa: **colunas recheadas** e **colunas tubulares abertas**, ou **colunas capilares**. No passado, a ampla maioria das análises cromatográficas empregava as colunas recheadas. Para a maioria das aplicações atuais, as colunas recheadas têm sido substituídas pelas colunas tubulares abertas, mais eficientes e mais rápidas.

As colunas cromatográficas variam em comprimento desde menos que 2 m até 50 m ou mais. São construídas de aço inoxidável, vidro, sílica fundida ou Teflon. Para serem inseridas nos fornos para termostatização, as colunas são geralmente enroladas em bobinas com diâmetro de 10 a 30 cm (Figura 31-6). Uma discussão detalhada sobre as colunas, recheios de colunas e fases estacionárias pode ser encontrada na Seção 31B.

A temperatura da coluna é uma variável importante que deve ser controlada dentro de poucos décimos de grau para se obter boa precisão. Assim, a coluna é normalmente abrigada em um forno termostaticado. A temperatura ótima da coluna depende do ponto de ebulição da amostra e do grau de separação requerido. Grosseiramente, uma temperatura igual ou ligeiramente superior ao ponto de ebulição médio da amostra proporciona tempos de eluição razoáveis (2 a 30 min). Para as amostras com uma ampla faixa de ponto de ebulição, é freqüentemente desejável que se empregue uma **programação de temperatura**, pela qual a temperatura da coluna é aumentada, quer seja continuamente quer em etapas, à medida que a separação se processa. A Figura 31-4 mostra a melhoria que se consegue em um cromatograma por meio da programação de temperatura.

A **programação de temperatura** em cromatografia gasosa envolve o aumento da temperatura da coluna continuamente ou em etapas durante a eluição.

Geralmente, a resolução ótima está associada com uma temperatura mínima; o preço de se reduzir a temperatura, contudo, é um aumento no tempo de eluição e, portanto, no tempo necessário para se completar a análise. As Figuras 31-4a e 31-4b ilustram esse princípio.

31A-4 Sistemas de Detecção

Dezenas de detectores têm sido investigados e empregados em separações cromatográficas a gás. Descreveremos primeiramente as características que são as mais desejáveis para um detector em cromatografia gasosa e então discutiremos os sistemas de detecção mais amplamente utilizados.

Características de um Detector Ideal

O detector ideal para a cromatografia gasosa apresenta as seguintes características:

1. Sensibilidade adequada. Em geral, as sensibilidades nos detectores atuais situam-se na faixa de 10^{-8} a 10^{-15} g do soluto/s.
2. Boa estabilidade e reprodutibilidade.
3. Resposta linear aos solutos que se estenda a várias ordens de grandeza.

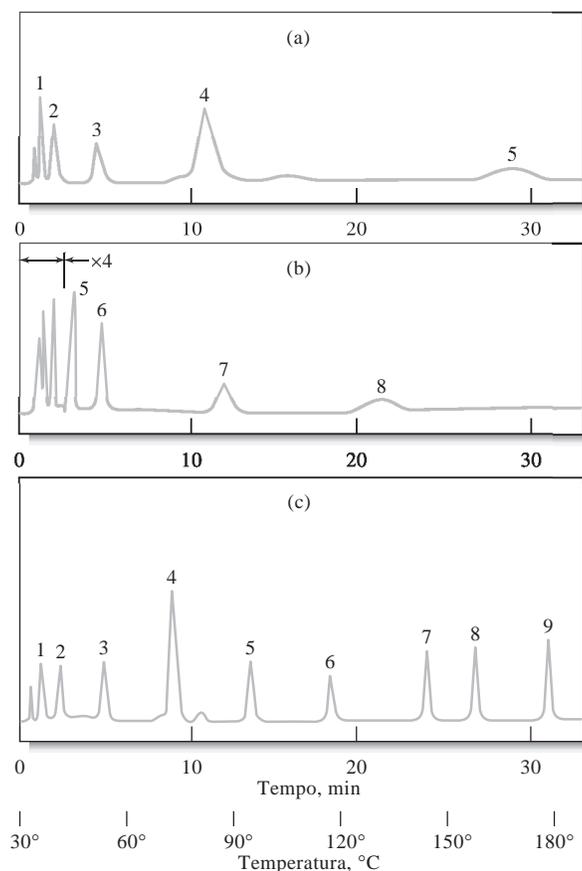


Figura 31-4 Efeito da temperatura nos cromatogramas a gás. (a) Isotérmico a 45 °C; (b) isotérmico a 145 °C; (c) programado de 30 °C a 180 °C. (De W. E. Harris e H. W. Habgood, *Programmed Temperature Gas Chromatography*, p. 10. Nova York: Wiley, 1996. Reproduzido com permissão do autor.)

4. Faixa de temperatura desde a ambiente até pelo menos 400 °C.
5. Um tempo de resposta curto e independente da vazão.
6. Uma alta confiabilidade e facilidade de uso. O detector deve, na medida do possível, tolerar a ação de operadores inexperientes.
7. Similaridade de resposta a todos os solutos ou, alternativamente, uma resposta altamente previsível e seletiva a uma ou mais classes de solutos.
8. Não deve destruir a amostra.

É desnecessário dizer que nenhum detector existente atualmente exibe todas essas características. Alguns dos detectores mais comuns são listados na Tabela 31-1. Quatro dos detectores mais utilizados são descritos nos parágrafos a seguir.

TABELA 31-1

Detectores para a Cromatografia Gasosa		
Tipo	Amostras a que são Aplicáveis	Limite de Detecção Típico
Ionização em chama	Hidrocarbonetos	0,2 pg s ⁻¹
Condutividade térmica	Detector universal	500 pg/ mL ⁻¹
Captura de elétrons	Compostos halogenados	5 fg s ⁻¹
Espectrômetro de massas	Ajustável a qualquer espécie	0,25–100 pg
Termiônico	Compostos de nitrogênio e fósforo	0,1 pg s ⁻¹ (P) 1 pg s ⁻¹ (N)
Condutividade eletrolítica (Hall)	Compostos contendo halogênios enxofre ou nitrogênio	0,5 pg s ⁻¹ Cl 2 pg s ⁻¹ S 4 pg s ⁻¹ N
Fotoionização	Compostos ionizáveis pela radiação UV	2 pg s ⁻¹ C
Infravermelho com transformada de Fourier	Compostos orgânicos	0,2 – 40 ng

Detetores de Ionização em Chama

O detector de ionização em chama (DIC) é o mais empregado em aplicações da cromatografia gasosa em geral. Em um detector como aquele ilustrado na Figura 31-5, o efluente da coluna é dirigido para uma pequena chama de ar/hidrogênio. A maioria dos compostos orgânicos produz íons e elétrons quando pirolizados à temperatura de uma chama ar/hidrogênio. A detecção envolve o monitoramento da corrente produzida pela coleta desses portadores de carga. Poucas centenas de volts são aplicadas entre a ponta do queimador e um eletrodo, localizado acima da chama, serve para coletar os íons e elétrons. A corrente resultante ($\sim 10^{-12}$ A) é medida com um picoamperímetro.

A ionização de compostos de carbono na chama é um processo ainda pouco compreendido, embora tenha sido observado que o número de íons produzidos é grosseiramente proporcional ao número de átomos de carbono *reduzidos* na chama. Uma vez que o detector de ionização em chama responde ao número de átomos de carbono que entram no detector por unidade de tempo, ele é um dispositivo *sensível à massa* em vez da concentração. Em conseqüência, esse detector apresenta a vantagem de que a alteração da vazão da fase móvel exerce um pequeno efeito sobre a sua resposta.

Grupos funcionais como carbonila, álcool, halogênicos e amínicos produzem poucos ou nenhum íon na chama. Além disso, o detector é insensível para gases não combustíveis como H_2O , CO_2 , SO_2 e NO_x . Essas propriedades tornam o detector de ionização em chama muito mais útil para a análise de amostras orgânicas, incluindo aquelas contaminadas com água e com óxidos de nitrogênio e enxofre.

O detector de ionização exibe uma sensibilidade alta ($\sim 10^{-13}$ g s^{-1}), larga faixa linear de resposta ($\sim 10^7$) e baixo ruído. Geralmente é robusto e fácil de se usar. Uma desvantagem do detector de ionização em chama é que ele destrói a amostra durante a etapa de combustão.

Detetores de Condutividade Térmica

O **detector de condutividade térmica (DCT)**, que foi um dos primeiros detectores para cromatografia gasosa, ainda encontra ampla aplicação. Esse dispositivo consiste em uma fonte aquecida eletricamente cuja temperatura à potência elétrica constante depende da condutividade térmica do gás que a envolve. O elemento aquecido pode ser um fio fino de platina, ouro ou tungstênio (Figura 31-6a) ou, alternativamente, um pequeno termistor. A resistência elétrica desse elemento depende da condutividade térmica do gás. Os detectores geminados são geralmente empregados, um deles está localizado acima da câmara de injeção da amostra e o outro imediatamente após a coluna; alternativamente, a corrente de gás pode ser dividida.

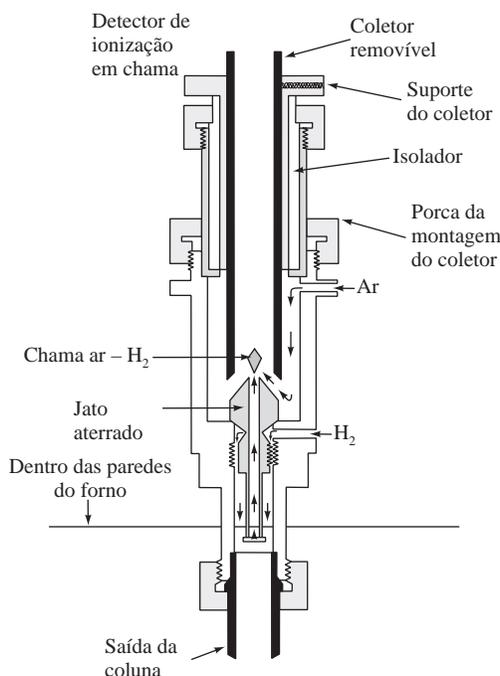


Figura 31-5 Um detector de ionização em chama típico. (Cortesia da Agilent Technologies, Palo Alto, CA.)

Os detectores são incorporados a dois braços de um circuito de ponte (ver Figura 31-6) de forma que a condutividade térmica do gás de arraste seja cancelada. Além disso, os efeitos de variação na temperatura, pressão e alimentação elétrica são minimizados. As condutividades térmicas do hélio e hidrogênio são aproximadamente de seis a dez vezes maiores que aquelas da maioria dos compostos orgânicos. Assim, mesmo pequenas quantidades de espécies orgânicas proporcionam um decréscimo relativamente grande na condutividade térmica do efluente da coluna, o que resulta em um aumento apreciável da temperatura do detector. A detecção por condutividade térmica é menos satisfatória quando se emprega gases cujas condutividades se aproximam muito daquelas dos componentes da amostra.

As vantagens do detector de condutividade térmica estão na sua simplicidade, na sua ampla faixa dinâmica linear (cerca de cinco ordens de grandeza), na sua resposta abrangente a espécies orgânicas e inorgânicas e na sua característica não-destrutiva, que permite que os solutos sejam coletados após a detecção. A principal limitação dos detectores de condutividade térmica está na sua sensibilidade relativamente baixa. Outros tipos de detectores excedem essa sensibilidade por fatores de 10^4 a 10^7 .

Detectores de Captura de Elétrons

O **detector de captura de elétrons** (DCE) tornou-se um dos mais amplamente empregados para as amostras ambientais em virtude de ele responder seletivamente aos compostos orgânicos contendo halogênios, como pesticidas e bifenilas policloradas. Nesse detector, a amostra eluída de uma coluna passa sobre uma fonte radiativa emissora β , geralmente níquel-63. Um elétron do emissor causa a ionização do gás carregador (frequentemente nitrogênio) e a produção de uma rajada de elétrons. Na ausência de espécies orgânicas, produz-se uma corrente constante entre um par de eletrodos em decorrência desse processo de ionização. Contudo, a corrente decresce significativamente na presença de moléculas orgânicas que contêm grupos funcionais eletronegativos que tendem a capturar elétrons. Os compostos halogenados, peróxidos, quinonas e grupos nitro são detectados com alta sensibilidade. O detector é insensível a grupos funcionais como aminas, alcoóis e hidrocarbonetos.

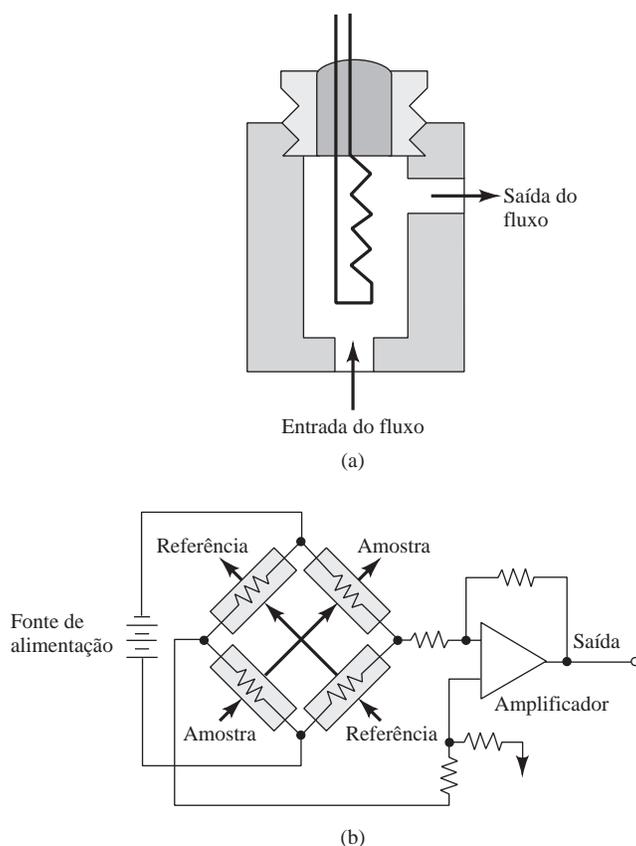


Figura 31-6 Esquema de (a) uma cela de um detector de condutividade térmica e (b) de um arranjo de duas celas de detecção da amostra e duas celas de referência (de J. Hinshaw, *LC-GC*, 1990, n. 8, p. 298. Com permissão.)

Os detectores de captura de elétrons são altamente sensíveis e apresentam a vantagem de não alterar a amostra significativamente (em contraste com o detector de ionização em chama, que consome a amostra). Contudo, a resposta linear do detector é limitada a cerca de duas ordens de grandeza.

Espectrometria de Massas

Um dos detectores mais poderosos para a cromatografia gasosa é o espectrômetro de massas. A combinação da cromatografia a gás e a espectrometria de massas é conhecida como CG-MS² (do português cromatografia gasosa e do inglês *mass spectrometry*). Como discutido no Capítulo 28, um espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) de íons que são produzidos pela amostra. A maioria dos íons produzidos apresenta uma carga unitária ($z = 1$), de forma que a maioria dos espectrometristas de massas refere-se à medida de massa dos íons quando, na verdade, a razão massa/carga é que é medida.

Um diagrama de blocos de um espectrômetro de massas moleculares é mostrado na Figura 31-7. As moléculas da amostra entram no espectrômetro de massas pelo sistema de entrada. No caso de um CG, a amostra está na forma de vapor e a entrada deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de CG e a baixa pressão (10^{-5} a 10^{-8}) do sistema do espectrômetro de massas. Um sistema complexo de vácuo é necessário para manter a pressão baixa. No espectrômetro de massas, as moléculas da amostra entram em uma fonte de ionização que ioniza a amostra. As fontes de ionização para a espectrometria de massas moleculares são energéticas o suficiente para quebrar as ligações químicas das moléculas da amostra, mas não suficientemente energéticas para decompor as moléculas da amostra em seus átomos constituintes, assim como acontece em espectrometria atômica (ver Capítulo 28).

As fontes de ionização em CG/MS produzem fragmentos, os quais podem também ser ionizados. Portanto, os íons das moléculas da amostra, denominados **íons moleculares**, íons de fragmentos e moléculas não-ionizadas, saem da fonte de ionização. As moléculas não-carregadas e os fragmentos são normalmente extraídos da fonte de íons através de bombas de vácuo empregadas para produzir o ambiente de baixa pressão. A próxima seção do espectrômetro de massas é o estágio analisador. O analisador serve para selecionar os íons de acordo com seus valores m/z , assim como na espectrometria de massas atômicas (ver Seção 28F-2). Os íons separados são então detectados e um gráfico contendo a intensidade do sinal gerado pelo íon *versus* m/z é produzido pelo sistema de dados.

O espectro de massas de uma molécula simples, CO₂, é representado na Figura 31-8. Observe que muitos íons de fragmentos estão presentes. Quebrando-se uma ligação C—O no íon molecular leva a formar CO⁺ ($m/z = 28$) e O⁺ ($m/z = 16$). A perda de dois átomos de oxigênio leva a C⁺ ($m/z = 12$). Somente íons positivos estão presentes nesse exemplo. Os íons negativos também podem ser produzidos e detectados.

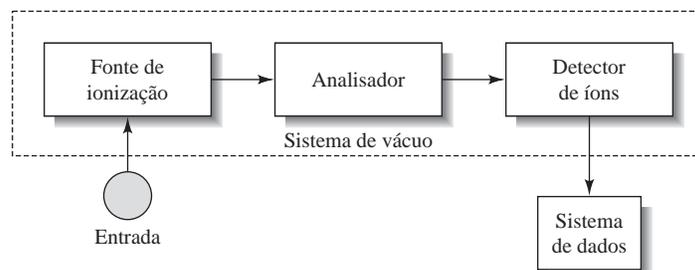


Figura 31-7 Diagrama de blocos de um espectrômetro de massas. A amostra entra na fonte de ionização através de um sistema de entrada. As moléculas da amostra são convertidas a íons e freqüentemente fragmentadas na fonte de ionização. Então, os íons passam para o analisador no qual são separados de acordo com a suas razões massa/carga. A seguir, os íons separados atingem um detector de íons no qual produzem um sinal elétrico que é registrado e representado na forma de gráfico pelo sistema de dados.

² Ver M. McMaster e C. McMaster, *GC/MS: A Practical User's Guide*. Nova York: Wiley-VCH, 1998.

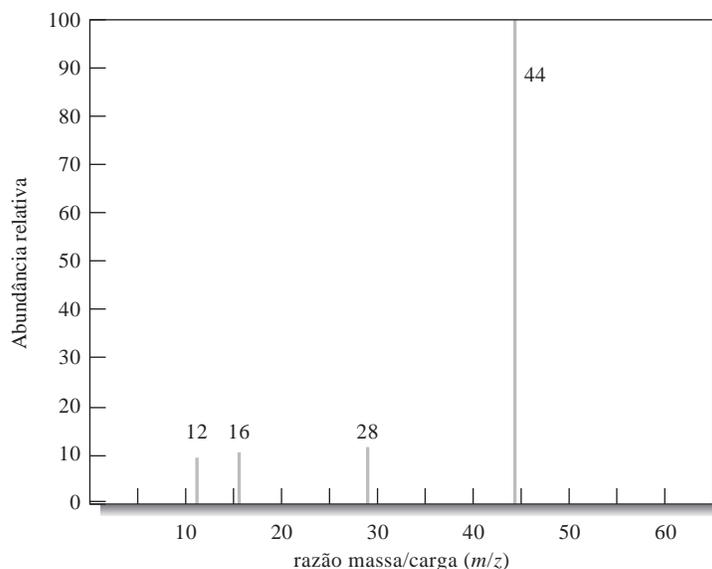


Figura 31-8 Espectro de massas do CO₂. Observe que o íon molecular aparece na razão $m/z = 44$ (C = 12, O = 16). Os íons de fragmentos aparecem a valores de $m/z = 28, 16$ e 12 . Estes correspondem ao CO⁺, O⁺ e C⁺, respectivamente.

TABELA 31-2

Fonte de Ionização para Espectrometria de Massas Moleculares			
Tipo Básico	Nome e Abreviatura	Método de Ionização	Tipo de Espectro
Fase gasosa	Impacto de elétrons (IE) Ionização química (IQ)	Elétrons energéticos Íons reagentes gasosos	Padrão de fragmentação Adultos de prótons, poucos fragmentos
Desorção	Bombardeamento com átomos rápidos (BAR)	Feixe atômico energético	Íons moleculares e fragmentos
	Desorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI)	Fótons de alta energia	Íons moleculares, íons com cargas múltiplas
	Ionização por <i>electrospray</i> (IES)	Campo elétrico produz aerossol carregado que se desolvata	Íons com cargas múltiplas moleculares

Sistemas de Entrada Além das entradas de CG, as amostras podem ser introduzidas em um espectrômetro de massas moleculares de diversas formas. Os sólidos podem ser colocados na ponta de um bastão, inseridos na câmara de vácuo e evaporados ou sublimados por aquecimento. Os líquidos podem ser introduzidos através de entradas com fluxo controlado ou podem ser desorvidos de uma superfície sobre a qual foram colocados, formando um filme fino. Geralmente, as amostras para espectrometria de massas devem ser puras porque a fragmentação que ocorre leva a uma interpretação muito difícil de espectros de misturas. A cromatografia gasosa constitui uma forma ideal de introduzir misturas, pois os seus componentes são separados pela CG antes da sua introdução no espectrômetro de massas.

Fontes de Ionização Muitos tipos diferentes de fontes de ionização estão disponíveis para a espectrometria de massas moleculares. As fontes empregadas com maior frequência são listadas na Tabela 31-2.³ Uma das mais comuns é aquela de impacto de elétrons (IE). Nessa fonte, as moléculas são bombardeadas com um feixe de elétrons de alta energia. Isso produz íons positivos, íons negativos e espécies neutras. Os íons positivos são dirigidos para o analisador por repulsão eletrostática.

Em IE, o feixe de elétrons é tão energético que muitos fragmentos são produzidos. Esses fragmentos, contudo, são muito úteis na identificação das espécies moleculares que entram no espectrômetro de massas. Somente o impacto de elétrons e a ionização química são empregados junto à CG-MS.

³ Para uma tabela mais extensiva de fontes de ionização, ver D. A. Skoog, F. J. Holler e T. A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 5. ed., p. 500. Belmont, CA: Brooks/Cole, 1998.

Analisadores O analisador de massas separa os íons de acordo com os valores de m/z . Os analisadores mais comuns são listados na Tabela 31-3.⁴ Os analisadores mais comuns para CG-EM são os filtros de massa tipo quadrupolo e os que empregam armadilha de íons (*ion trap*). Os espectrômetros de massas de alta resolução utilizam o analisador de duplo foco, o analisador de ressonância ciclotrônica ou o analisador de tempo de voo.

Detectores de íons Em muitos espectrômetros, os íons são detectados após colidirem com a superfície de um detector. As colisões causam a emissão de elétrons, fótons ou outros íons. Estes podem ser medidos por detectores de carga ou radiação. Por exemplo, um detector comum é o **multiplicador de elétrons**, que foi descrito na Seção 28F-3. No detector de ressonância ciclotrônica de íons, estes induzem um sinal cujas frequências são inversamente relacionadas aos valores de m/z . As frequências são decodificadas por técnicas de transformada de Fourier.

O Instrumento Completo de CG-MS O esquema de um sistema completo de CG-MS é mostrado na Figura 31-9. A amostra é injetada no capilar da CG (ver Seção 31B-1) e o efluente penetra em uma entrada de um espectrômetro de massas tipo quadrupolo. As moléculas são fragmentadas e ionizadas pela fonte e analisadas e detectadas pelo multiplicador de elétrons.

TABELA 31-3

Analisadores de Massas Comuns para a Espectrometria de Massas	
Tipo Básico	Princípio da Análise
Setor magnético	Deflexão dos íons em um campo magnético. As trajetórias dos íons dependem do valor de m/z .
Dupla focalização	Focalização eletrostática seguida de deflexão por campo magnético. As trajetórias dependem do valor de m/z .
Quadrupolo	Movimentação do íon em campos cc e de radiofrequência. Somente certos valores de m/z passam.
Armadilha de íons (<i>ion trap</i>)	Retenção de íons no espaço definido por eletrodos anelares e casquete. O campo elétrico ejeta seqüencialmente os íons de valores crescentes de m/z .
Ressonância ciclotrônica de íons	Retenção de íons em uma cela cúbica sob influência da voltagem e do campo magnético. A frequência orbital está relacionada ao inverso do valor de m/z .
Tempo de voo	Íons com energia cinética iguais entram em um tubo onde se movem livremente. A velocidade e assim o tempo de chegada ao detector dependem da massa.

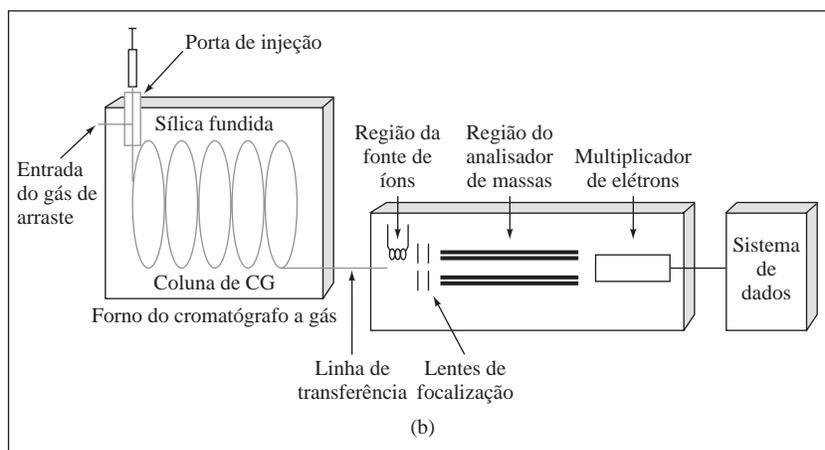


Figura 31-9 Esquema de um instrumento CG-MS típico capilar. O efluente do CG passa para a entrada do espectrômetro de massas, no qual as moléculas de gás presentes são fragmentadas, ionizadas, analisadas e detectadas.

⁴ Para uma discussão mais extensiva sobre os analisadores de massas, ver referência 3, p. 514-518.

Em CG-MS, o espectrômetro de massas varre as massas repetidamente durante o experimento cromatográfico. Se o cromatograma ocorre em dez minutos, por exemplo, e uma varredura é obtida a cada segundo, 600 espectros de massas serão registrados. Os dados podem ser analisados pelo sistema de dados de diversas formas. Primeira, a abundância dos íons em cada espectro pode ser somada e colocada em um gráfico em função do tempo para fornecer um **cromatograma do total de íons**. Esse gráfico é similar a um cromatograma convencional. Pode-se também mostrar o espectro de massas em um tempo particular durante o cromatograma para identificar-se as espécies que estão eluindo naquele momento. Finalmente, pode-se selecionar um valor único de m/z e monitorá-lo durante o experimento cromatográfico, uma técnica que é denominada **monitoramento de íon selecionado**.

Outros Tipos de Detectores

Outros detectores importantes para CG incluem o detector termiônico, o detector de condutividade eletrolítica ou de efeito Hall e o detector de fotoionização. O detector termiônico apresenta uma construção similar ao DIC. No detector termiônico, os compostos contendo nitrogênio e fósforo produzem um aumento da corrente em chamas nas quais um sal de metal alcalino é vaporizado. O detector termiônico é amplamente empregado para pesticidas organofosforados e compostos farmacêuticos.

Nos detectores de condutividade eletrolítica, os compostos contendo halogênios, enxofre ou nitrogênio são misturados com um gás reagente em um pequeno tubo de reação. Os produtos são então dissolvidos em um líquido, o qual produz uma solução condutora. A alteração na condutividade resultante da presença de um composto ativo é medida. No detector de fotoionização, as moléculas são fotoionizadas por radiação ultravioleta. Os íons e elétrons produzidos são coletados com um par de eletrodos polarizados e a corrente resultante é medida. O detector é freqüentemente usado para as moléculas aromáticas ou outras moléculas que são facilmente fotoionizáveis.

A cromatografia gasosa é geralmente acoplada a técnicas seletivas da espectroscopia ou eletroquímica. Discutimos CG-MS, porém a cromatografia gasosa pode ser combinada também com muitas outras técnicas, como a espectroscopia no infravermelho e espectroscopia de ressonância magnética nuclear, suprimindo o químico de ferramentas poderosas de identificação de componentes de misturas complexas. Essas técnicas combinadas são muitas vezes chamadas **métodos hifenados**.⁵

Nos primeiros métodos hifenados, os eluatos da coluna cromatográfica eram coletados como frações separadas em um coletor resfriado e um detector não-destrutivo e não-seletivo era empregado para indicar seu aparecimento. A composição da fração era investigada por ressonância magnética nuclear, espectrometria no infravermelho ou de massas ou medidas eletroanalíticas. Uma limitação séria a essa abordagem era a quantidade muito pequena (normalmente micromols) de soluto presente em uma fração.

A maioria dos métodos hifenados modernos monitora o efluente da coluna cromatográfica continuamente por meio de métodos espectroscópicos. A combinação de duas técnicas baseadas em diferentes princípios pode levar a uma alta seletividade. Os instrumentos atuais de CG baseados no uso de computadores incorporam grandes bases de dados para a comparação de espectros e identificação de compostos.

Os **métodos hifenados** acoplam a capacidade de separação da cromatografia com a capacidade de detecção qualitativa e quantitativa dos métodos espectrais.

31B

COLUNAS E FASES ESTACIONÁRIAS PARA A CROMATOGRAFIA GASOSA

Os estudos pioneiros em cromatografia gasosa foram realizados, no início dos anos 1950, em colunas recheadas, nas quais a fase estacionária era constituída de um filme fino de líquido retido por adsorção na superfície de um suporte sólido inerte finamente dividido. A partir de estudos teóricos feitos durante esse período inicial, tornou-se aparente que as colunas não recheadas com diâmetro de poucos décimos de

⁵ Para revisões sobre métodos hifenados, ver C. L. Wilkins, *Science*, 1983, n. 222, p. 251; *Anal. Chem.*, 1989, n. 59, p. 571A.

milímetro poderiam proporcionar separações superiores do que aquelas obtidas em colunas recheadas quanto à velocidade e à eficiência da coluna. Nessas **colunas capilares**, a fase estacionária é constituída por um filme de líquido de espessura igual a poucos décimos de micrômetro recobrimdo uniformemente o interior do tubo capilar. Nos anos 1950, essas colunas tubulares abertas foram construídas; as características do desempenho previsto foram confirmadas experimentalmente em vários laboratórios, com colunas tubulares abertas contendo 300.000 pratos ou mais tendo sido descritas.⁶

A despeito dessas características espetaculares de desempenho, as colunas capilares não ganharam ampla aceitação e uso até mais de duas décadas após a sua invenção. As razões para esse atraso foram muitas, incluindo a pequena capacidade de amostra, fragilidade das colunas, problemas mecânicos associados com a introdução da amostra e com a conexão da coluna com o detector, dificuldades de recobrimento da coluna de forma reprodutível, a vida curta de colunas preparadas de forma ineficiente, a tendência das colunas de entupirem e as patentes, que restringiram o desenvolvimento comercial a um único fabricante. (A patente original expirou em 1977.) No final dos anos 1970 esses problemas tornaram-se contornáveis e muitas companhias de instrumentos começaram a oferecer colunas tubulares abertas a um custo razoável. Em conseqüência, temos visto um crescimento importante no uso de colunas capilares desde essa época.

31B-1 Colunas Capilares ou Tubulares Abertas

As colunas tubulares abertas ou capilares são de dois tipos básicos: **coluna tubular aberta de parede recoberta** (TAPR) – WCOT, do inglês *wall-coated open tubular* – e **colunas tubulares abertas revestidas com suporte** (TARS) – SCOT, do inglês *support-coated open tubular*.⁷ As colunas de parede recoberta são simplesmente tubos capilares recobertos com uma fina camada de fase estacionária. Nas colunas revestidas com suporte, a superfície interna do capilar é revestida com um filme fino ($\sim 30 \mu\text{m}$) de um material de suporte, com terra diatomácea. Esse tipo de coluna retém uma quantidade de fase estacionária muitas vezes maior que uma coluna de parede recoberta e assim apresenta maior capacidade de amostra. Geralmente, a eficiência de uma coluna TARS é menor que uma coluna TAPR, mas significativamente maior que a de uma coluna recheada.

As primeiras colunas TAPR foram construídas de aço inoxidável, alumínio, cobre ou plástico. Posteriormente, o vidro foi utilizado. Frequentemente, o vidro é corroído com ácido clorídrico gasoso, soluções aquosas fortes de ácido clorídrico ou hidrogeno fluoreto de potássio, o que proporciona uma superfície rugosa que retém a fase estacionária mais firmemente. As colunas capilares mais empregadas são as **colunas tubulares abertas de sílica fundida** (CTAS) – FSOT, do inglês *fused-silica open tubular*. Os capilares de sílica fundida são puxados a partir de sílica purificada especial que contém quantidades mínimas de óxidos metálicos. Esses capilares apresentam paredes muito mais finas que os de vidro. Os tubos têm sua resistência reforçada por meio do recobrimento externo de proteção de poliimida, o qual é aplicado à medida que o tubo capilar é puxado. As colunas resultantes são bastante flexíveis e podem ser enroladas em bobinas com diâmetros de poucas polegadas. Essas colunas

► As **colunas tubulares abertas de sílica fundida (colunas CTAS ou, em inglês, FSOT)** são correntemente as colunas mais amplamente utilizadas em CG.

estão disponíveis comercialmente e oferecem muitas vantagens importantes como resistência física, reatividade muito menor em relação aos componentes da amostra e flexibilidade. Para a maioria das aplicações, elas têm substituído as colunas de vidro antigas do tipo TAPR.

⁶ Em 1987, o recorde mundial de comprimento para uma coluna aberta e de número de pratos teóricos foi estabelecido, como atestado no *Livro Guinness dos Recordes Mundiais*, pela Chrompack International Corporation da Holanda. A coluna era de sílica fundida puxada em uma única peça com diâmetro interno de 0,32 mm e comprimento de 2.100 m ou 1,3 milhas. A coluna era recoberta com um filme de polidimetil siloxano de 0,1 m. Uma seção de 1.300 m dessa coluna continha mais de 2 milhões de pratos.

⁷ Para uma descrição detalhada das colunas tubulares abertas, ver M. L. Lee, F. J. Yang e K. D. Bartle, *Open Tubular Column Gas Chromatography: Theory and Practice*. Nova York: Wiley, 1984.

TABELA 31-4

	Tipo de Coluna			
	CTAS* (FSOT)	TAPR† (WCOT)	TARS‡ (SCOT)	Recheada
Comprimento, m	10–100	10–100	10–100	1–6
Diâmetro interno, mm	0,1–0,3	0,25–0,75	0,5	2–4
Eficiência, prato/m	2.000–4.000	1.000–4.000	600–1.200	500–1.000
Tamanho da amostra, ng	10–75	10–1000	10–1000	10–10 ⁶
Pressão relativa	Baixa	Baixa	Baixa	Alta
Velocidade relativa	Rápida	Rápida	Rápida	Lenta
É flexível?	Sim	Não	Não	Não
Estabilidade química	Melhor	→		Pior

*Coluna tubular aberta de sílica fundida.

†Coluna tubular aberta de parede recoberta.

‡Coluna tubular aberta revestida com suporte (também chamada coluna tubular aberta com camada porosa (TACP – PLOT, do inglês *porous layer open tubular*)).

As colunas tubulares abertas de sílica mais amplamente empregadas apresentam diâmetros de 0,32 e 0,25 mm. As colunas de alta resolução são vendidas com diâmetros de 0,20 e 0,15 mm. Essas colunas são de uso mais complexo e são mais restritivas com relação aos sistemas de injeção e detecção. Assim, um divisor de amostra deve ser empregado para reduzir o tamanho da amostra injetada na coluna e um sistema de detecção mais sensível com baixo tempo de resposta é necessário.

Recentemente, capilares de 530 μm , algumas vezes denominados **colunas megabore**, têm surgido no mercado. Essas colunas toleram amostras de tamanho similar àqueles para as colunas recheadas. As características de desempenho das colunas tubulares abertas *megabore* são tão boas como aquelas de diâmetros menores, porém são significativamente melhores que aquelas das colunas recheadas.

A Tabela 31-4 compara as características de desempenho de colunas capilares de sílica fundida com outros tipos de colunas de parede recoberta, bem como com as de colunas com suporte revestido e recheadas.

31B-2 Colunas Recheadas

As colunas recheadas são atualmente fabricadas de tubos de vidro ou metal; elas apresentam um comprimento típico entre 2 e 3 m e diâmetro interno de 2 a 4 mm. Esses tubos são densamente recheados com um material uniforme e finamente dividido, ou suporte sólido, que é recoberto com uma camada fina (0,05 a 1 μm) de fase estacionária líquida. Os tubos são enrolados na forma de bobinas com diâmetros aproximados de 15 cm para possibilitar uma termostatização conveniente no forno.

Materiais Sólidos de Suporte

O recheio, ou suporte sólido em uma coluna recheada, serve para fixar a fase estacionária líquida de forma que a maior área superficial possível esteja exposta à fase móvel. O suporte ideal consiste em pequenas partículas uniformes e esféricas com boa resistência mecânica e com uma área superficial de pelo menos 1 m²/g. Além disso, o material deve ser inerte a temperaturas elevadas e deve ser molhado uniformemente pela fase líquida. Nenhuma substância que preencha perfeitamente todos esses critérios se encontra disponível.

Os recheios empregados inicialmente, e ainda os mais amplamente utilizados, para a cromatografia gasosa eram preparados com terra diatomácea de ocorrência natural, a qual consiste em esqueletos de milhares de espécies de plantas unicelulares que habitaram os antigos lagos e mares. Esses materiais de suporte são freqüentemente tratados quimicamente com dimetilclorosilano, o qual produz uma camada de grupos metila. Esse tratamento reduz a tendência de o recheio absorver moléculas polares.

Tamanho de Partículas dos Suportes

Como mostrado na Figura 30-16 (página 934), a eficiência de uma coluna cromatográfica aumenta rapidamente com a diminuição do diâmetro de partícula do recheio. Contudo, a diferença de pressão requerida para manter uma vazão aceitável do gás de arraste varia de forma inversa com o quadrado do diâmetro de partícula; essa última relação tem estabelecido os limites sobre o tamanho de partículas utilizado em cromatografia, porque não é conveniente empregar-se diferenças de pressão maiores que cerca de 50 psi. Como resultado, as partículas de suporte usuais são de 60 a 80 mesh (250 a 170 μm) ou de 80 a 100 mesh (170 a 149 μm).

31B-3 Fases Estacionárias Líquidas

As propriedades desejáveis de uma fase líquida imobilizada em uma coluna cromatográfica gás-líquido incluem (1) *baixa volatilidade* (idealmente, o ponto de ebulição do líquido deve ser pelo menos 100 °C maior que a temperatura máxima de operação da coluna); (2) *estabilidade térmica*; (3) *inércia química* e (4) *características de solvente* apropriadas para que os valores de k e α (ver Seção 30E-4) para os solutos a serem resolvidos caiam dentro de uma faixa adequada.

Muitos líquidos têm sido propostos como fases estacionárias no desenvolvimento da cromatografia gás-líquido. Atualmente menos de uma dúzia são de uso comum. A escolha apropriada de uma fase estacionária é freqüentemente crucial para o sucesso de uma separação. Existem orientações qualitativas para efetuar-se essa escolha, porém, no final, a melhor fase estacionária somente pode ser determinada de forma experimental no laboratório.

O tempo de retenção para um analito na coluna depende da sua constante de distribuição que, por sua vez, está relacionada com a natureza química da fase estacionária. Para separar os vários componentes de uma amostra, suas constantes de distribuição devem ser suficientemente diferentes para possibilitar uma separação bem definida. Ao mesmo tempo, essas constantes não devem ser extremamente grandes ou extremamente pequenas porque: o primeiro caso leva os tempos de retenção a valores proibitivos e, o segundo, resulta em tempos de retenção tão curtos que as separações são incompletas.

Para se obter um tempo de residência razoável na coluna, um analito deve mostrar algum grau de compatibilidade (solubilidade) com a fase estacionária. Nesse caso, o princípio segundo o qual “igual dissolve igual” se aplica, onde “igual” refere-se à polaridade do analito e à do líquido imobilizado. A polaridade é o efeito de campo elétrico na vizinhança imediata da molécula e é medido pelo momento de dipolo das espécies. As fases estacionárias polares contêm grupos como —CN, —CO e —OH. As fases estacionárias do tipo hidrocarbonetos e os dialquil siloxanos são não-polares, enquanto as fases de poliésteres são altamente polares. Os analitos polares incluem os alcoóis, ácidos e aminas; os solutos de polaridade média englobam os éteres, as cetonas e os aldeídos. Os hidrocarbonetos saturados são não-polares. Geralmente, a polaridade da fase estacionária deve igualar-se à dos componentes da amostra. Quando se tem uma boa igualdade, a ordem de eluição é determinada pelo ponto de ebulição dos eluentes.

► As polaridades de grupos funcionais orgânicos na ordem crescente são: hidrocarbonetos alifáticos < olefinas < hidrocarbonetos aromáticos < haletos < sulfetos < éteres < compostos nitro < ésteres, aldeídos, cetonas < alcoóis, aminas < sulfonas < sulfóxidos < amidas < ácidos carboxílicos < água.

Algumas Fases Estacionárias Comuns

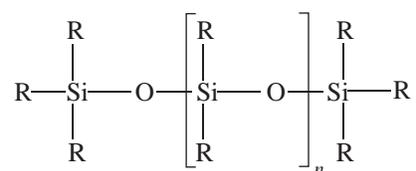
A Tabela 31-5 lista as fases estacionárias mais empregadas em colunas recheadas e colunas tubulares abertas de cromatografia gasosa na ordem crescente de polaridade. Esses seis líquidos provavelmente podem prover separações satisfatórias para 90% ou mais das amostras encontradas pelos cientistas.

TABELA 31-5

Algumas Fases Líquidas Estacionárias para a Cromatografia Gás-Líquido

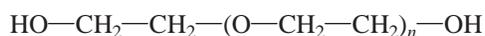
Fase Estacionária	Nome Comercial Comum	Temperatura Máxima, °C	Aplicações Comuns
Polidimetilsiloxano	OV-1, SE-30	350	Fase não-polar de uso geral, hidrocarbonetos aromáticos, polinucleares, esteróides, PCBs
5% fenil-polidimetilsiloxano	OV-3, SE-52	350	Éteres metílicos de ácidos graxos, alcalóides, drogas, compostos halogenados
50% fenil-polidimetilsiloxano	OV-17	250	Drogas, esteróides, pesticidas, glicóis
50% trifluorpropil polidimetilsiloxano	OV-210	200	Aeromáticos clorados, nitroaromáticos, benzenos alquil substituídos
Polietileno glicol	Carbowax 20M	250	Ácidos livres, alcoóis, éteres, óleos essenciais, glicóis
50% cianopropil-polidimetilsiloxano	OV-275	240	Ácidos gaxos poliinsaturados, ácidos rosíneos, ácidos livres, alcoóis

Cinco dos líquidos listados na Tabela 31-5 são polidimetilsiloxanos que apresentam a estrutura geral



No primeiro deles, polidimetilsiloxano, os grupos —R são todos —CH₃, definindo um líquido que é relativamente não-polar. Nos outros polisiloxanos mostrados na tabela, uma fração dos grupos metílico é substituída por grupos funcionais como fenil (—C₆H₅), cianopropil(—C₃H₆CN) e trifluoropropil (—C₃H₆CF₃). As porcentagens em cada caso referem-se à quantidade de substituição de grupos metílico pelo grupo indicado no nome na cadeia do polisiloxano. Assim, por exemplo, o 5% fenil-polidimetilsiloxano apresenta um anel fenílico ligado a 5% do número de átomos de silício no polímero. Essas substituições aumentam a polaridade dos líquidos em vários graus.

A quinta entrada na Tabela 31-5 é um polietileno glicol com estrutura



Esse composto encontra amplo uso na separação de espécies polares.

Fases Estacionárias Ligadas e Com Ligações Entrecruzadas

As colunas comerciais são anunciadas como constituídas de fases estacionárias ligadas, com ligações entrecruzadas, ou ambos. O propósito da ligação e do entrecruzamento é a obtenção de maior durabilidade da fase estacionária, que pode ser lixiviada pelo solvente quando o filme se torna contaminado. Com o uso, colunas não tratadas perdem lentamente suas fases estacionárias devido ao “sangramento”, no qual uma pequena quantidade de líquido imobilizado é arrastada para fora da coluna durante o processo de eluição. O sangramento é acentuado quando a coluna precisa ser lavada com um solvente para remover os contaminantes. A ligação química e as ligações entrecruzadas inibem o sangramento.

A ligação envolve anexar uma camada monomolecular da fase estacionária à superfície de sílica da coluna por meio de uma ligação química. Para as colunas comerciais, a natureza da reação é uma propriedade industrial.

As ligações entrecruzadas são feitas *in situ* após a coluna ter sido recoberta com um dos polímeros listados na Tabela 31-5. Uma forma de se obter as ligações entrecruzadas baseia-se na incorporação de um peróxido no líquido original. Quando o filme é aquecido, uma reação entre os grupos metálicos das cadeias do polímero é iniciada por um mecanismo radicalar livre. As moléculas do polímero são então ligadas entre si por ligações carbono-carbono. Os filmes resultantes são mais difíceis de serem extraídos e apresentam maior estabilidade térmica que os filmes não tratados. As ligações entrecruzadas podem ser iniciadas também por exposição das colunas recobertas à radiação gama.

Espessura do Filme

As colunas comerciais contendo fases estacionárias cujas espessuras variam de 0,1 a 5 μm estão disponíveis. A espessura do filme afeta primariamente o caráter da retenção e a capacidade da coluna, como discutido na Seção 30E-6. Os filmes espessos são empregados com compostos altamente voláteis, porque esses filmes retêm os solutos por um tempo mais longo, provendo assim maior intervalo de tempo para que a separação ocorra. Os filmes finos são úteis para separar as espécies de baixa volatilidade em um tempo razoável. Para muitas aplicações de colunas de 0,25 ou 0,32 mm, uma espessura de filme de 0,25 μm é recomendada. Nas colunas *megabore*, são geralmente empregados filmes de 1 a 1,5 μm . Atualmente colunas com filmes de 8 μm de espessura estão sendo comercializadas.

31C APLICAÇÕES DA CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDO

A cromatografia gás-líquido pode ser aplicada às espécies relativamente voláteis e termicamente estáveis a temperaturas de até poucas centenas de graus Celsius. Um grande número de compostos de interesse possui essas qualidades. Conseqüentemente, a cromatografia gasosa tem sido amplamente aplicada na separação e determinação de componentes em variados tipos de amostras. A Figura 31-14 mostra os cromatogramas para algumas dessas aplicações.

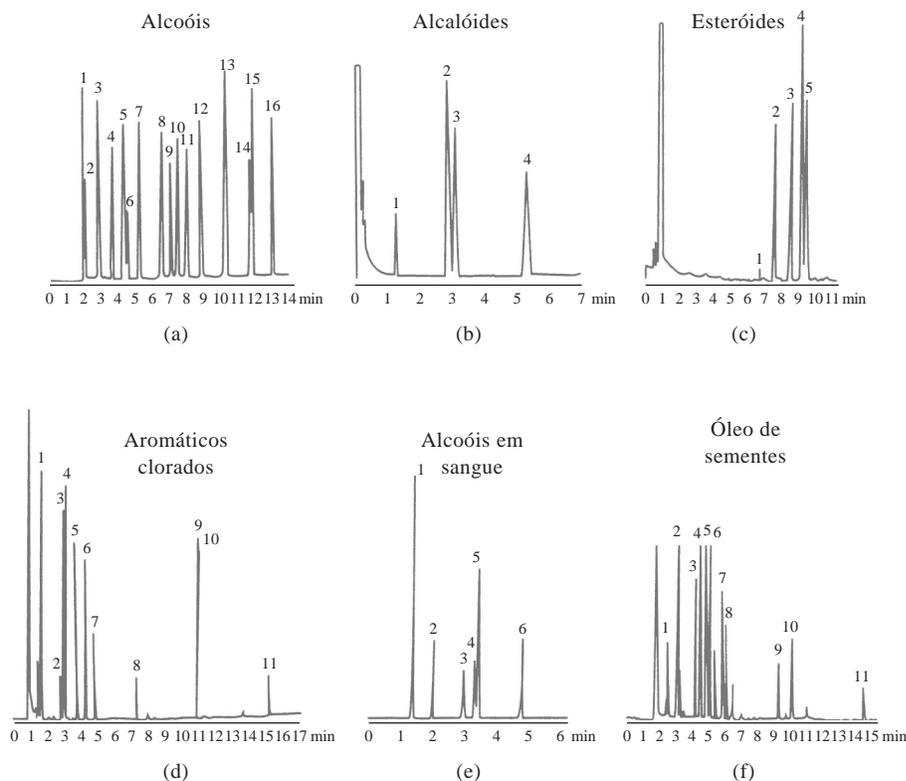


Figura 31-10

Cromatogramas típicos obtidos em colunas tubulares abertas recobertas com (a) polidimetilsiloxano, (b) 5% (fenil-polidimetilsiloxano), (c) 50% (fenil-polimetilsiloxano), (d) 50% (trifluorpropil-polidimetilsiloxano), (e) polietileno glicol e (f) 50% (cianopropil-polidimetilsiloxano). (Cortesia de J & W Scientific.)

31C-1 Análise Qualitativa

Os cromatogramas obtidos por CG são amplamente utilizados para se estabelecer a pureza de compostos orgânicos. Os contaminantes, se presentes, são revelados pelo aparecimento de picos adicionais; as áreas sob esses picos fornecem estimativas grosseiras da extensão da contaminação. A técnica é também útil para se avaliar a eficiência dos processos de purificação.

Em teoria, os tempos de retenção em CG deveriam ser úteis para identificar-se os componentes em misturas. Na verdade, contudo, a aplicabilidade desses dados é limitada pelo número de variáveis que devem ser controladas para se obter resultados reprodutíveis. Contudo, a cromatografia gasosa provê um meio excelente de confirmação da presença ou ausência de compostos suspeitos em uma mistura, supondo que uma amostra autêntica da substância esteja disponível. Nenhum outro pico deve aparecer no cromatograma da mistura em adição ao do composto conhecido e o aumento de intensidade de um pico previamente existente deve ser observado. A evidência é particularmente convincente se o efeito puder ser duplicado em colunas diferentes e a diferentes temperaturas. Por outro lado, porque um cromatograma fornece uma informação única sobre cada espécie da mistura (o tempo de retenção), a aplicação da técnica na análise qualitativa de amostras complexas de composição desconhecida é limitada.

Essa limitação tem sido contornada em sua maior parte pela ligação das colunas cromatográficas diretamente a espectrômetros ultravioleta, infravermelho e de massas. Os instrumentos hifenados resultantes constituem ferramentas poderosas para a identificação de componentes de misturas complexas (ver Seção 31A-4). Um exemplo do uso da espectrometria de massas combinada com a cromatografia gasosa para a identificação de constituintes do sangue é dado no Destaque 31-1.

Embora um cromatograma possa não levar a uma identificação positiva das espécies presentes em uma amostra, este freqüentemente provê uma evidência segura da *ausência* de uma espécie. Assim, se a amostra falha em produzir um pico com o mesmo tempo de retenção que um padrão obtido sob condições idênticas, isso é uma evidência forte de que o composto em questão está ausente (ou presente em concentração abaixo do limite de detecção do procedimento).

31C-2 Análise Quantitativa

A cromatografia gasosa deve seu enorme crescimento em parte à sua velocidade, simplicidade, custo relativamente baixo e ampla aplicabilidade a separações. É duvidoso, contudo, que a CG poderia ter se tornado tão amplamente utilizada, se não fosse capaz de fornecer informações quantitativas sobre as espécies separadas.

A CG quantitativa está baseada na comparação da altura ou da área de um pico analítico com aquele de um ou mais padrões. Se as condições são controladas adequadamente, ambos os parâmetros variam linearmente com a concentração. A área de um pico é independente dos efeitos de alargamento discutidos anteriormente. Portanto, considerando esse fato, a área é um parâmetro analítico mais satisfatório que a altura do pico. Contudo, as alturas de pico são medidas de forma mais fácil e, para os picos estreitos, mais exata. A maioria dos instrumentos cromatográficos modernos é equipada com computadores que fornecem medidas de áreas relativas. Se esse equipamento não está disponível, uma estimativa manual deve ser feita. Um método simples que funciona bem para os picos simétricos de largura razoável consiste em multiplicar a altura do pico pela sua largura medida na metade da sua altura.

Calibração com Padrões

O método mais direto de análise cromatográfica gasosa quantitativa envolve a preparação de uma série de soluções padrão cuja composição se aproxima daquela da amostra (método do padrão externo). Os cromatogramas para os padrões são obtidos e as alturas dos picos ou suas áreas são empregadas em um gráfico em função da concentração para se obter uma curva analítica. Um gráfico dos dados deve fornecer uma linha reta passando pela origem; as análises quantitativas são baseadas nesse gráfico. A calibração deve ser freqüente para maior exatidão.

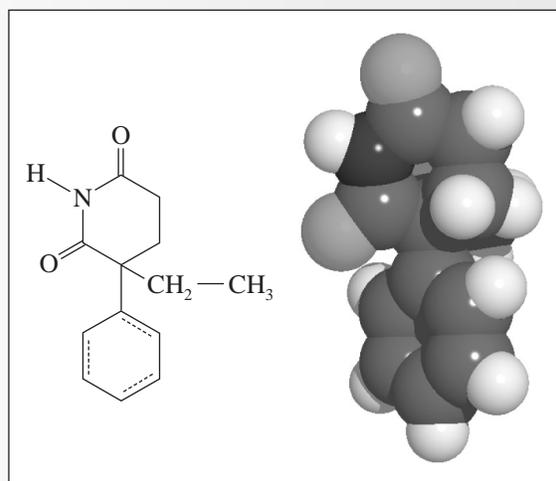
DESTAQUE 31-1

Uso da CG-MS na Identificação de um Metabólito de um Medicamento no Sangue⁸

Um paciente em coma estava sob suspeita de ter ingerido uma dose excessiva de um medicamento, a glutetimida (Doriden), tendo em vista um frasco vazio do medicamento encontrado próximo a ele. Um cromatograma a gás foi obtido de um extrato de plasma do seu sangue e dois picos foram encontrados, como mostrado na Figura 31D-1. O tempo de retenção para o pico 1 correspondeu ao da glutetimida, mas o composto responsável pelo pico 2 não era conhecido. A possibilidade de que o paciente tivesse ingerido outra droga foi considerada. Contudo, o tempo de retenção para o pico 2 sob as condições empregadas não correspondia a nenhum outro medicamento acessível ao paciente nem a qualquer droga ilícita. Portanto, uma cromatografia acoplada à espectrometria de massas foi utilizada para se estabelecer a identidade do pico 2 e para confirmar a identidade do pico 1 antes de se submeter o paciente a qualquer tratamento.

O extrato de plasma foi submetido a uma análise por CG-MS e o espectro de massas apresentado na Figura 31D-2a confirmou que o pico 1 era devido à glutetimida. Um pico no espectro de massas com razão massa-carga de 217 representa a razão correta para o íon molecular da glutetimida e o espectro de massas mostrou-se igual àquele de uma amostra conhecida de glutetimida. O espectro de massas do pico 2, contudo, mostrou uma massa para o íon molecular na razão massa-carga de 233, como pode ser visto na Figura 31D-2b. Isso difere da massa molecular do íon da glutetimida por 16 unidades de massa. Vários outros picos no espectro de massas do pico 2 diferem daqueles da glutetimida por 16 unidades de massa, indicando a incorporação de oxigênio na molécula de glutetimida. Isso levou os cientistas a acreditar que o pico 2 era devido a um metabólito 4-hidroxi da droga original (droga pai).

timida. O espectro de massas do pico 2, contudo, mostrou uma massa para o íon molecular na razão massa-carga de 233, como pode ser visto na Figura 31D-2b. Isso difere da massa molecular do íon da glutetimida por 16 unidades de massa. Vários outros picos no espectro de massas do pico 2 diferem daqueles da glutetimida por 16 unidades de massa, indicando a incorporação de oxigênio na molécula de glutetimida. Isso levou os cientistas a acreditar que o pico 2 era devido a um metabólito 4-hidroxi da droga original (droga pai).



Estrutura e modelo molecular da glutetimida.

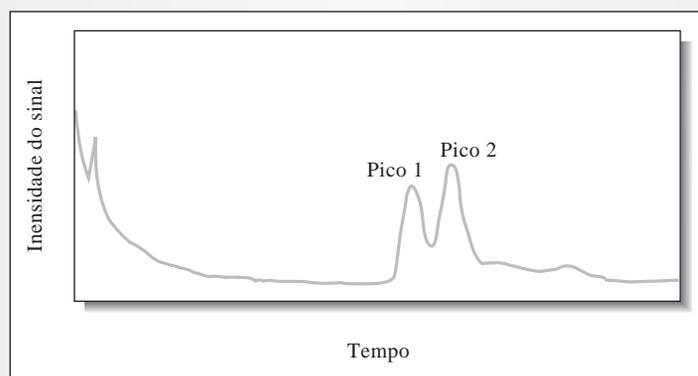
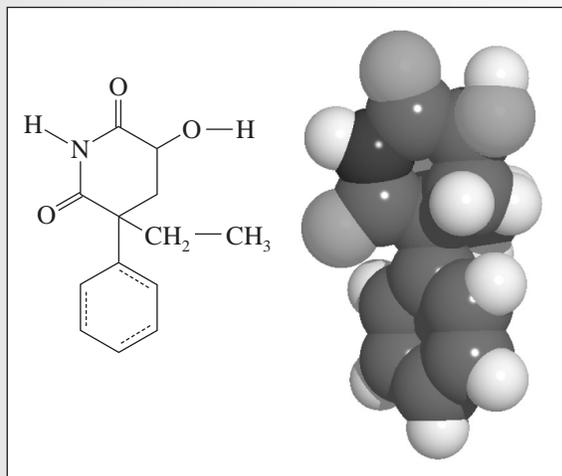
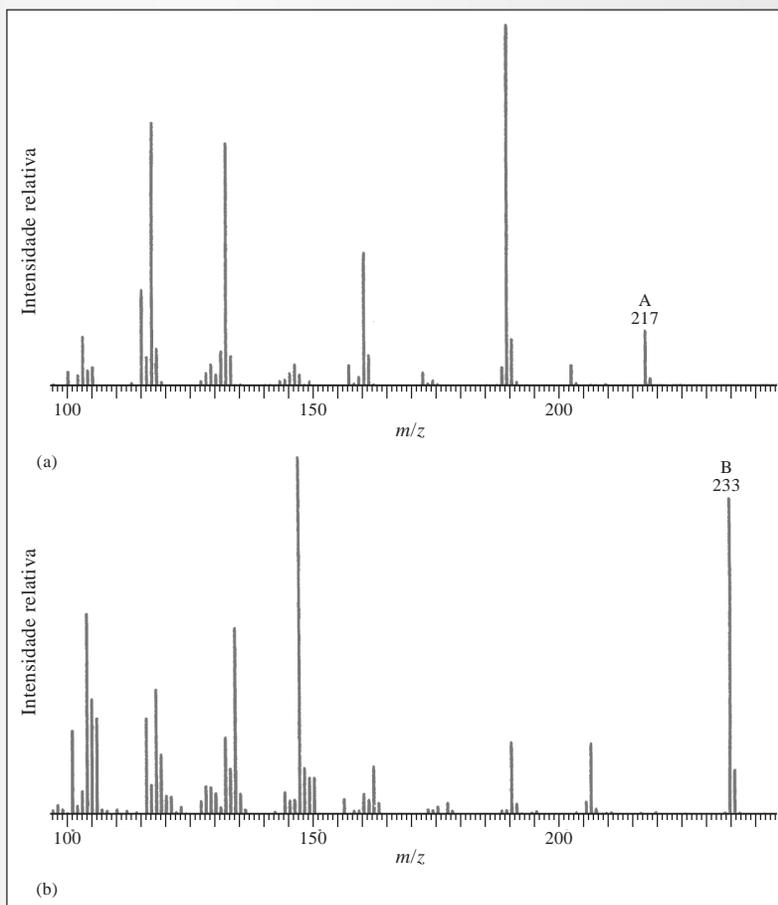


Figura 31D-1 Cromatograma a gás de um extrato de plasma sanguíneo de uma vítima de superdosagem de medicamento. O pico 1 ocorreu a um tempo de retenção apropriado para ser identificado como a glutetimida, porém, o composto responsável pelo pico 2 era desconhecido até que foi feita uma CG-MS.

(continua)

⁸ De J. T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3. ed., p. 22-25. Nova York: Lippincott-Raven, 1997.

Figura 31D-2 (a) Espectro de massas obtido durante a eluição do pico 1 do cromatograma de CG da Figura 31D-1. Esse espectro de massas é idêntico àquele da glutetimida. (b) Espectro de massas obtido durante a eluição do pico 2 do cromatograma mostrado na Figura 31D-1. A fragmentação dos dois compostos produz íons que são separados no espectrômetro de massas. Cada pico do espectro de massas aparece a uma razão massa-carga (m/z) correspondente à massa do fragmento para íons de carga única. O pico A em $m/z = 217$ no espectro de cima (a) corresponde à massa molar da glutetimida e o espectro de massas é idêntico àquele de uma amostra pura do composto. Dessa forma, o espectro de massas identifica conclusivamente o composto suspeito como glutetimida. O pico B no espectro de baixo (b) aparece a uma $m/z = 233$, exatamente 16 unidades de massa a mais que a glutetimida. Essa evidência sugere a presença de um átomo extra de oxigênio na molécula, que corresponde ao metabólito 4-hidroxi apresentado a seguir. (De J. T. Watson, *Introduction to Mass Spectrometry*, 3. ed., p. 24. Filadélfia: Lippincott-Raven, 1997. Com permissão.)



Estrutura e modelo molecular do metabólito 4-hidroxi.

Um derivado anidrídeo acético do material do pico 2 foi então preparado e descobriu-se que este era idêntico ao acetato derivado do 4-hidroxi-2-etil-2-fenilglutarimida, o metabólito mostrado ao lado. Esse metabólito é conhecido por exibir efeitos tóxicos em animais. O paciente foi então submetido a uma hemodiálise, que removeu o metabólito polar mais rapidamente que a droga menos polar que o originou. Rapidamente, o paciente recobrou a consciência.

O Método do Padrão Interno

A maior precisão em CG quantitativa é obtida empregando-se padrões internos porque as incertezas introduzidas pela injeção da amostra, vazão e variações nas condições da coluna são minimizadas. Nesse procedimento, uma quantidade cuidadosamente medida de um padrão interno é introduzida em cada padrão de calibração e na amostra (ver Seção 8C-3) e a razão entre área do pico do analito (ou sua altura de pico) e a área do pico do padrão interno (ou sua altura) é utilizada como parâmetro analítico (ver Exemplo 31-1). Para que esse método seja bem-sucedido, é necessário que o pico do padrão interno seja bem separado dos picos dos outros componentes da amostra. Contudo, deve aparecer próximo ao pico do analito. Naturalmente, o padrão interno deve estar ausente na amostra a ser analisada. Empregando-se um padrão interno adequado, precisões relativas de 0,5% a 1% têm sido relatadas.

EXEMPLO 31-1

Os picos cromatográficos podem ser influenciados por uma variedade de fatores instrumentais. Podemos frequentemente compensar as variações nesses fatores empregando o método do padrão interno. Nesse caso, adicionamos a mesma quantidade de padrão interno às misturas contendo quantidades conhecidas do analito e as amostras de concentração desconhecida do analito. Calculamos então a razão entre a altura do pico (ou área) para o analito e aquela do padrão interno.

Os dados mostrados na tabela foram obtidos durante a determinação de um hidrocarboneto C_7 com um composto semelhante adicionado a cada padrão e à amostra como padrão interno.

Porcentagem do Analito	Altura do Pico para o Analito	Altura do Pico para o Padrão Interno
0,05	18,8	50,0
0,10	48,1	64,1
0,15	63,4	55,1
0,20	63,2	42,7
0,25	93,6	53,8
Amostra	58,9	49,4

Elabore uma planilha de cálculo para determinar as razões das alturas dos picos do analito e do padrão interno e faça um gráfico dessas razões *versus* a concentração do analito. Determine a concentração na amostra e o seu desvio padrão.

A planilha é exposta na Figura 31-11. Os dados são inseridos nas colunas de A a C, como mostrado. Nas células D4 a D9, as razões das alturas dos picos são calculadas pela fórmula apresentada na célula de documentação A22. Um gráfico da curva de calibração também é exibido na figura. A estatística da regressão linear é calculada nas células B11 a B20 usando a mesma abordagem descrita na Seção 8C-2. Os resultados estatísticos são calculados pelas fórmulas nas células de documentação A23 a A31. A porcentagem de analito na amostra foi determinada como $(0,163 \pm 0,008)\%$.

	A	B	C	D	E	F	G
1	CG quantitativa empregando o método do padrão interno						
2							
3	Porcentagem do analito	Altura do pico para o analito	Altura do pico para o padrão interno	Razão das alturas dos picos do analito/padrão interno			
4	0,050	18,8	50,0	0,38			
5	0,100	48,1	64,1	0,75			
6	0,150	63,4	55,1	1,15			
7	0,200	63,2	42,7	1,48			
8	0,250	93,6	53,8	1,74			
9	Amostra	58,9	49,4	1,19			
10	Equação de regressão						
11	Inclinação	6,914515					
12	Intercepto	0,062202					
13	Concentração da amostra	0,163440					
14	Análise de erro						
15	Erro padrão em Y	0,049960					
16	N	5					
17	S _{xx}	0,025					
18	y (razão média)	1,1					
19	M	1					
20	Desvio padrão em c	0,007939					
21	Documentação da Planilha						
22	Célula D4=B4/C4						
23	Célula B11=INCLINAÇÃO(D4:48,A4:A8)						
24	Célula B12=INTERCEPTO(D4:D8,A4:A8)						
25	Célula B13=(D9-B12)/B11						
26	Célula B15=STEYX(D4:D8,A4:A8)						
27	Célula B16=COUNT(A4:A8)						
28	Célula B17=B16*VARP(A4:A8)						
29	Célula B18=MÉDIA(D4:D8)						
30	Célula B19=insira o número de replicatas						
31	Célula B20=B15/B11*SQRT(B19+B16+(D19-B18)^2)/((B11^2*B17))						

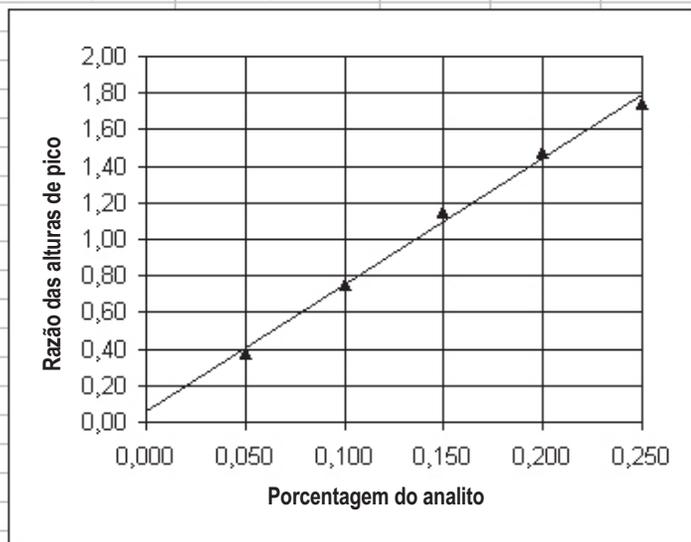


Figura 31-11 Planilha para ilustrar o método do padrão interno para a determinação de um hidrocarboneto C₇ através de CG.

DESTAQUE 31-2

Cromatografia Gasosa de Alta Velocidade⁹

A cromatografia gasosa tem sempre focalizado a obtenção de resoluções cada vez maiores de forma a separar misturas cada vez mais complexas. Em muitas separações, as condições são alteradas para separar o par de componentes de separação mais difícil, denominado **par crítico**. Muitos dos componentes de interesse, sob essas condições, são separados muito mais que o necessário. A idéia básica da CG de alta velocidade é que, para muitas

separações de interesse, uma alta velocidade pode ser obtida, embora em detrimento da seletividade e da resolução.

A fim de visualizar como arranjar as condições para as separações de alta velocidade, podemos escrever a Equação 30-17 como

$$\frac{L}{t_R} = u \times \frac{1}{1 + k_n} \quad (31-1)$$

(continua)

⁹ Para uma revisão, ver R. Sacks, H. Smith e M. Nowak, *Anal. Chem.*, 1998, v. 70, p. 29A.

em que k_n é o fator de retenção para o último componente de interesse no cromatograma. Se rearranjarmos a Equação 31-1 e resolvermos para o tempo de retenção do último componente de interesse, obtemos

$$t_R = \frac{L}{u} \times (1 + k_n) \quad (31-2)$$

A Equação 31-2 nos diz que podemos obter uma separação mais rápida empregando uma coluna mais curta, vazões do gás de arraste maiores que as usuais e fatores de retenção pequenos. O preço a ser pago é a redução no poder de resolução, causada pelo aumento na largura da banda, e na capacidade de pico reduzida (isto é, o número de picos que pode ser incluído em um cromatograma).

Sacks e co-autores, na Universidade de Michigan,¹⁰ têm desenvolvido a instrumentação e avaliado as condições cromatográficas para otimizar a velocidade de separação a um custo mínimo em termos de resolução e capacidade de pico. Eles desenvolveram sistemas para produzir colunas sintonizáveis e para realizar uma programação de temperatura de alta velocidade. Uma coluna sintonizável é uma combinação serial de uma coluna

polar e uma não-polar. A Figura 31D-3 mostra a separação de 12 compostos antes do início da rampa programada de temperatura e de 19 compostos após o início da programação de temperatura. O tempo total necessário foi de 140 s. Esses pesquisadores também têm utilizado a CG de alta velocidade com detecção com espectrometria de massas, incluindo a detecção por tempo de voo.¹¹

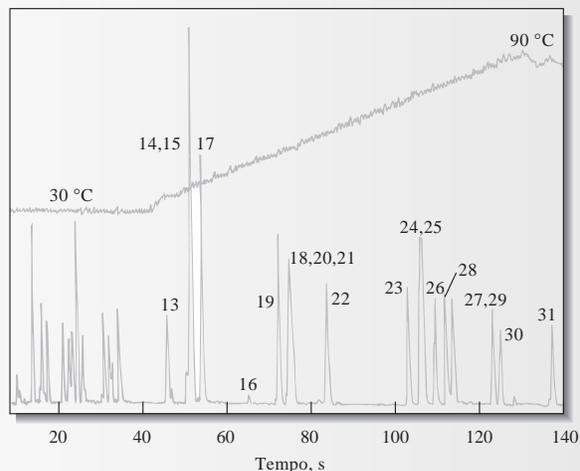


Figura 31D-3 Cromatograma de alta velocidade obtido em operação isotérmica (30 °C) por 37 s seguida de uma rampa de temperatura de 35 °C/min até 90 °C. (Reproduzida com permissão de H. Smith e R. D. Sacks, *Anal. Chem.*, 1998, v. 70, p. 4960. Copyright da American Chemical Society).

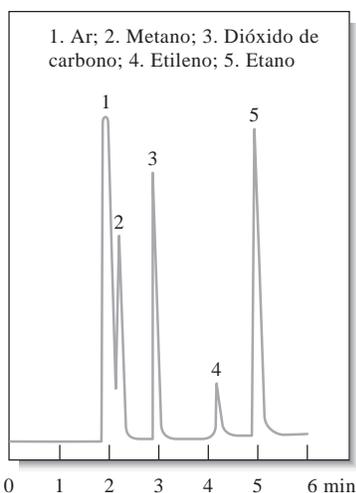


Figura 31-12 Cromatograma típico gás-sólido empregando uma coluna TACP.

31D

CROMATOGRAFIA GÁS-SÓLIDO

A cromatografia gás-sólido é baseada na adsorção das substâncias gasosas sobre as superfícies sólidas. Os coeficientes de distribuição geralmente são muito maiores que aqueles para a cromatografia gás-líquido. Conseqüentemente, a cromatografia gás-sólido é útil para a separação de espécies que não são retidas pelas colunas gás-líquido, como os componentes do ar, sulfeto de hidrogênio, dissulfeto de carbono, óxidos de nitrogênio, monóxido de carbono e gases raros.

A cromatografia gás-sólido é realizada com colunas recheadas ou tubulares abertas. Para essa última, uma camada fina do adsorvente é fixada às paredes internas do capilar. Essas colunas são denominadas algumas vezes **colunas tubulares abertas com camada porosa**, ou colunas TACP (PLOT, em inglês, *porous-layer open tubular*). A Figura 31-12 mostra uma aplicação típica de uma coluna TACP.

¹⁰ H. Smith e R. D. Sacks, *Anal. Chem.*, 1998, v. 70, p. 1960.

¹¹ C. Leonard e R. Sacks, *Anal. Chem.*, 1999, v. 71, p. 5177.

EXERCÍCIOS NA WEB

Dirija seu navegador para o endereço <http://chemistry.brookscole.com/skoogfac/>. A partir do menu do Chapter Resources, selecione *Web Works*. Localize a seção do Capítulo 31 e você vai encontrar várias conexões com os fabricantes de instrumentos para a cromatografia gasosa. Clique em uma dessas conexões e investigue as características de um instrumento tipo *premium* de CG e de um instrumento de rotina. Compare e mostre as diferenças dessas características. Preste muita atenção, em sua comparação, ao tamanho do forno, à incerteza na temperatura do forno, à capacidade da unidade em realizar a programação de temperatura, aos tipos de detectores disponíveis e aos tipos de sistemas de análise de dados.

XXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXX

QUESTÕES E PROBLEMAS

- *31-1.** Quais são as diferenças entre a cromatografia gás-líquido e gás-sólido?
- 31-2.** Quais tipos de misturas são separados por cromatografia gás-sólido?
- *31-3.** Por que a cromatografia gás-sólido não é extensivamente utilizada como a cromatografia gás-líquido?
- 31-4.** Como funciona um medidor de vazão de bolha de sabão?
- *31-5.** O que é um cromatograma?
- 31-6.** O que significa programação de temperatura em cromatografia gás-líquido?
- *31-7.** Descreva as diferenças físicas entre as colunas tubulares e as recheadas. Quais são as vantagens e desvantagens de cada uma delas?
- 31-8.** Quais variáveis devem ser controladas para se obter dados quantitativos satisfatórios de um cromatograma?
- *31-9.** Qual é o material de recheio empregado na maioria das colunas para cromatografia gasosa?
- 31-10.** Descreva o princípio no qual cada um dos seguintes detectores para cromatografia gasosa está baseado: (a) condutividade térmica, (b) ionização em chama, (c) captura de elétrons, (d) termiônico e (e) fotoionização.
- *31-11.** Quais são as principais vantagens e as principais limitações dos detectores listados no Problema 31-10?
- 31-12.** O que são métodos cromatográficos *hifenados*? Descreva brevemente três métodos hifenados.
- *31-13.** O que são colunas tubulares abertas tipo *megabore*? Por que elas são empregadas?
- 31-14.** Quais são as diferenças entre as seguintes colunas tubulares abertas?
(a) colunas TACP.
(b) colunas TAPR.
(c) colunas TARS.
- 31-15.** Quais propriedades uma fase líquida estacionária deve apresentar para ser utilizada em cromatografia gasosa?
- 31-16.** Quais são as vantagens das colunas capilares de sílica fundida quando comparadas às colunas de vidro ou metal?
- *31-17.** Qual é o efeito da espessura da fase estacionária nos cromatogramas a gás?
- 31-18.** Por que as fases estacionárias para cromatografia gasosa são frequentemente ligadas e interligadas (ligadas de forma entre cruzada)? O que significam esses termos?
- *31-19.** Liste as variáveis que levam a (a) alargamento de banda e (b) separação de bandas em cromatografia gás-líquido.
- 31-20.** Um método de determinação quantitativa da concentração de constituintes de uma amostra analisada por cromatografia gasosa é a normalização de área. Nesse procedimento, a eluição completa de todos os constituintes da amostra é necessária. A área de cada pico é medida e corrigida para a resposta do detector para os diferentes eluatos. Essa correção envolve a divisão da área por um fator de correção empiricamente determinado. A concen-

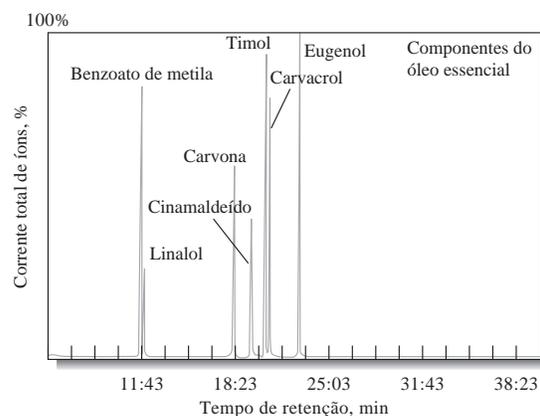
tração do analito é encontrada a partir da razão entre a sua área corrigida e a área total corrigida de todos os picos. Para um cromatograma contendo três picos, as áreas relativas foram determinadas como 16,4; 45,2; e 30,2, na ordem do aumento do tempo de retenção. Calcule a porcentagem de cada composto se as respostas relativas do detector forem 0,60, 0,78 e 0,88, respectivamente.

- *31-21. As áreas sob os picos e as respostas relativas do detector são empregadas para determinar as concentrações de cinco espécies em uma amostra. O método da normalização de área descrito no Problema 31-20 é utilizado. As áreas relativas para os cinco picos cromatográficos são dadas na tabela. Também são mostradas as respostas relativas do detector. Calcule a porcentagem de cada componente na mistura.

Composto	Área Relativa do Pico	Resposta Relativa do Detector
A	32,5	0,70
B	20,7	0,72
C	60,1	0,75
D	30,2	0,73
E	18,3	0,78

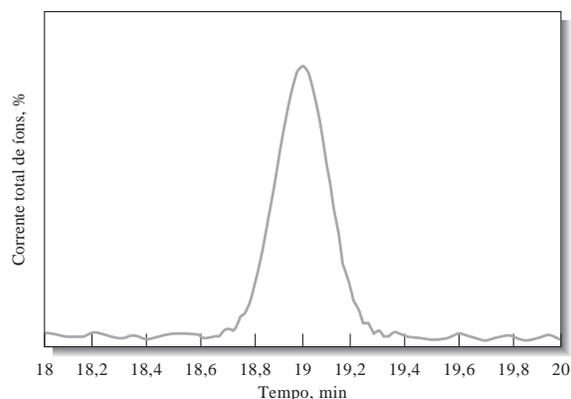
- 31-22. Para os dados fornecidos no Exemplo 31-1, compare o método dos padrões externos com o método do padrão interno. Faça um gráfico da altura do pico do analito *versus* a porcentagem do analito e determine a sua quantidade na amostra empregando os resultados para o padrão interno. Seus resultados são mais precisos quando o método do padrão interno é utilizado? Se forem, forneça algumas possíveis razões para isso.

- 31-23. **Problema Desafiador.** O cinamaldeído é o componente responsável pelo aroma de canela. Também é um potente composto antimicrobico presente nos óleos essenciais (ver M. Friedman, N. Kozukue e L. A. Harden, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, v. 48, p. 5702). A resposta de CG de uma mistura artificial contendo seis componentes de óleo essencial e benzoato de metila como padrão interno é mostrada na figura.



Cromatograma a gás. (Reproduzido com permissão de M. Friedman, N. Kozukuc e L. A. Harden; *J. Agric. Fed. Chem.*, 2000, v. 48, p. 570. Copyright da American Chemical Society.)

- (a) A seguinte figura é uma ampliação idealizada de uma região próxima ao pico do cinamaldeído.



Cromatograma ampliado.

- Determine o tempo de retenção para o cinamaldeído.
- (b) A partir da figura na parte (a), determine o número de pratos teóricos para a coluna.
- (c) A coluna de sílica fundida apresentava um diâmetro de 0,25 mm por um comprimento de 30 cm com um filme de 0,25 μm de espessura. Determine a altura equivalente de prato teórico a partir dos dados das partes (a) e (b).
- (d) Os dados quantitativos foram obtidos empregando-se o benzoato de metila como padrão interno. Os seguintes resultados foram obtidos para as curvas de calibração de cinamaldeído, eugenol e timol. Os valores abaixo de cada componente representam a área do pico do componente dividida pela área do pico do padrão interno.

Concentração, mg da amostra/ 200 μL	Cinamaldeído	Eugenol	Timol
0,50		0,4	
0,65			1,8
0,75	1,0	0,8	
1,10		1,2	
1,25	2,0		
1,30			3,0
1,50		1,5	
1,90	3,1	2,0	4,6
2,50	4,0		5,8

Determine as equações das curvas de calibração para cada componente. Inclua os valores de R^2 .

- (e) A partir dos dados da parte (d) determine qual dos componentes apresenta a maior sensibilidade para a curva de calibração. Qual apresenta a menor?
- (f) Uma amostra contendo os três óleos essenciais da parte (d) fornece as áreas de pico relativas à área do padrão interno: cinamaldeído, 2,6; eugenol, 0,9; timol, 3,8. Determine as concentrações de cada um dos óleos essenciais na amostra e os desvios padrão na concentração.
- (g) Um estudo foi feito sobre a decomposição do cinamaldeído em óleo de canela. O óleo foi aquecido por diversos períodos a diferentes temperaturas. Os dados a seguir foram obtidos.

Temp, °C	Tempo, min	% Cinamaldeído
25, inicial		90,9
40	20	87,7
	40	88,2
	60	87,9
60	20	72,2
	40	63,1
	60	69,1
100	20	66,1
	40	57,6
	60	63,1
140	20	64,4
	40	53,7
	60	57,1
180	20	62,3
	40	63,1
	60	52,2
200	20	63,1
	40	64,5
	60	63,3
210	20	74,9
	40	73,4
	60	77,4

Utilize a ANOVA para determinar se a temperatura exerce algum efeito sobre a decomposição do cinamaldeído. Da mesma forma, estipule se o tempo de aquecimento tem algum efeito.

- (h) Com os dados da parte (g), presuma que a decomposição se inicie a 60 °C. Teste a hipótese de que não há nenhum efeito da temperatura ou do tempo.

CAPÍTULO 32

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tornou-se uma ferramenta analítica indispensável. Os laboratórios criminais e os programas de televisão policiais e forenses, como CSI, CSI Miami, Crossing Jordan e Law and Order, freqüentemente empregam a CLAE no processo de obtenção de evidências criminais.

Este capítulo aborda a teoria e a prática da CLAE, incluindo as cromatografias por adsorção, por troca iônica, por exclusão, por afinidade e cromatografia quiral. A CLAE encontra aplicações não apenas em química forense, como também em bioquímica, ciências ambientais, ciências dos alimentos, química farmacológica e em toxicologia.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição. Essa técnica é utilizada pelos químicos para separar e determinar espécies em uma grande variedade de materiais orgânicos, inorgânicos e biológicos. Na cromatografia líquida, a fase móvel é um solvente líquido, o qual contém a amostra na forma de uma mistura de solutos. O tipo de cromatografia líquida de alta eficiência é geralmente definido pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária. Estes incluem (1) **partição** ou **cromatografia líquido-líquido**; (2) **adsorção** ou **cromatografia líquido-sólido**; (3) **troca iônica** ou **cromatografia de íons**; (4) **cromatografia por exclusão**; (5) **cromatografia por afinidade**; e (6) **cromatografia quiral**.

Inicialmente, a cromatografia líquida era realizada em colunas de vidro com diâmetro interno de talvez 10 a 50 mm. As colunas eram recheadas com partículas sólidas recobertas com um líquido adsorvido, que formava a fase estacionária. Para assegurar vazões razoáveis através desse tipo de fase estacionária, o tamanho das partículas sólidas era mantido acima de 150 a 200 μm ; mesmo assim, as vazões eram de poucos décimos de mililitro por minuto, na melhor das hipóteses. As tentativas de acelerar esse procedimento clássico por meio da aplicação de vácuo ou pressão não foram efetivas porque o aumento na vazão era acompanhado pela elevação na altura de prato e pela redução da eficiência da coluna.

Bem cedo, durante o desenvolvimento da teoria da cromatografia líquida, foi reconhecido que uma diminuição significativa das alturas de prato poderia ser obtida se o tamanho das partículas do recheio pudesse ser reduzido. Esse efeito é apontado pelos dados na Figura 32-1. Observe que o mínimo mostrado na Figura 30-13a (página 930) não é atingido em quaisquer dessas curvas. A razão para essa diferença é que a difusão em líquidos é muito mais lenta que em gases; conseqüentemente, seu efeito na altura de prato somente é observado a vazões muito pequenas.

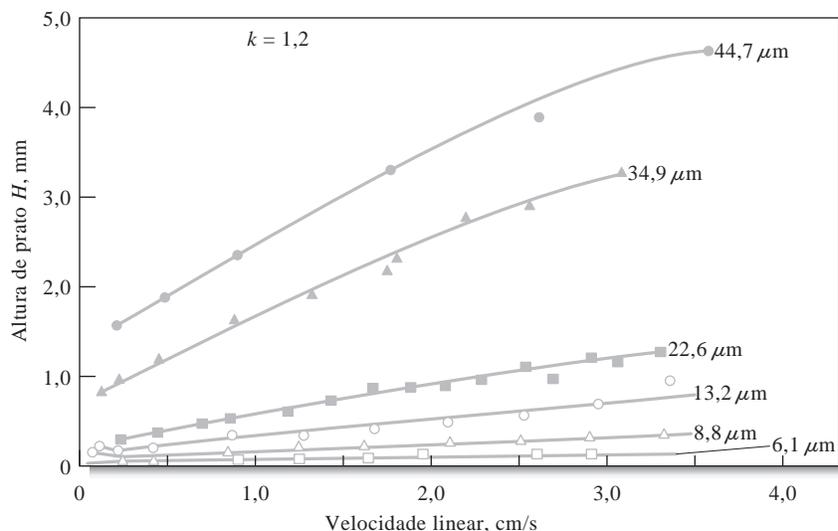


Figura 32-1 O efeito do tamanho de partícula do recheio e da vazão sobre a altura de prato em cromatografia líquida. (De R. E. Majors, *J. Chromatogr. Sci.*, 1973, v. 11, p. 92. Reproduzido do *Journal of Chromatographic Science* com permissão da Preston Publications, uma divisão da Preston Industries, Inc.)

Não foi antes do final dos anos 1960 que se desenvolveu a tecnologia para produzir e utilizar recheios com diâmetros de partículas tão pequenos como 3 a 10 μm . Essa tecnologia necessitou de instrumentos capazes de fornecer pressões de bombeamento muito mais altas que os dispositivos simples que os precederam. Simultaneamente, os detectores foram desenvolvidos para permitir o monitoramento contínuo dos efluentes das colunas. O termo cromatografia líquida de alta eficiência é sempre empregado para distinguir essa tecnologia dos procedimentos cromatográficos realizados em colunas simples que os precederam.¹ A cromatografia de coluna simples, contudo, ainda encontra considerável uso para propósitos preparativos.

As aplicações dos tipos mais comuns de CLAE para várias espécies de analitos são mostradas na Figura 32-2. Observe que os vários tipos de cromatografia líquida tendem a ser complementares do ponto de vista das aplicações. Por exemplo, para os analitos com massas molares maiores que 10.000, um dos dois tipos de métodos de exclusão por tamanho é freqüentemente empregado: permeação em gel para as espécies não-polares e filtração em gel para os compostos polares ou iônicos. Para as espécies iônicas de baixa massa molar, a cromatografia por troca iônica é geralmente o método selecionado. As espécies pequenas polares, mas não-iônicas, são separadas com melhor eficiência pelos métodos por partição.

A cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE, é um tipo de cromatografia que emprega uma fase móvel líquida e uma fase estacionária muito finamente dividida. Para se obter vazões satisfatórias, o líquido deve ser pressurizado a muitas centenas de libras por polegada quadrada.

32A INSTRUMENTAÇÃO

Pressões de bombeamento de muitas atmosferas são requeridas para se obter vazões razoáveis com recheios na faixa de tamanho de 3 a 10 μm , que é comum na cromatografia líquida moderna. Em consequência dessas altas pressões, o equipamento para a cromatografia líquida de alta eficiência tende a ser consideravelmente mais complexo e caro do que aquele encontrado em outros tipos de cromatografia. A Figura 32-3 apresenta um diagrama especificando os componentes importantes de um instrumento típico de CLAE.

¹ Para uma discussão detalhada sobre os sistemas CLAE, ver L. R. Snyder e J. J. Kirkland, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3. ed. Nova York: Wiley, 1996; S. Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography*. Nova York: Wiley, 1992; R. P. W. Scott, *Liquid Chromatography for the Analyst*. Nova York: Marcel Dekker, 1995.

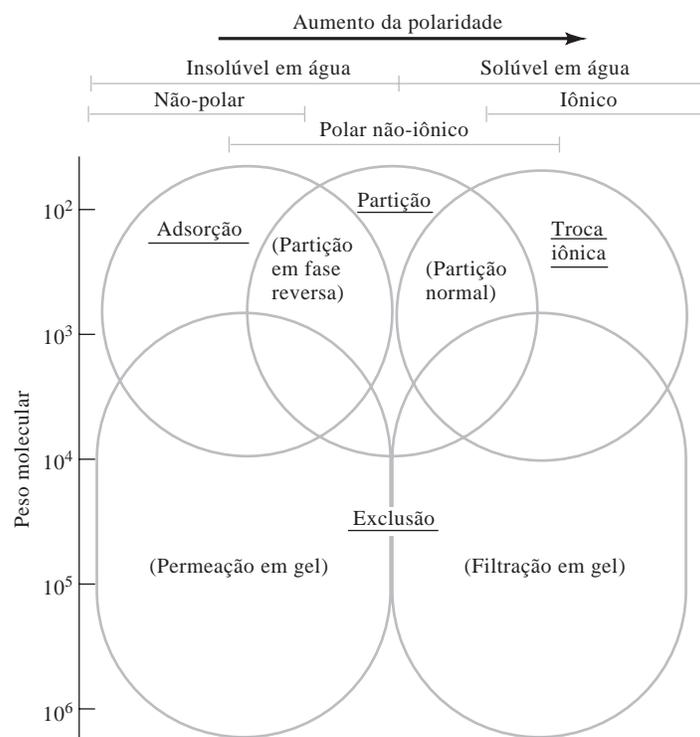


Figura 32-2 Aplicações da cromatografia líquida. Observe que os tipos de cromatografia à direita do diagrama são mais adequados para os compostos polares. As técnicas na parte de baixo do diagrama são mais adequadas para as espécies de alta massa molecular. (De D. L. Saunders, in *Chromatography*, 3. ed., E. Heftmann, Ed., p. 81. Nova York: Van Nostrand Reinhold, 1975.)

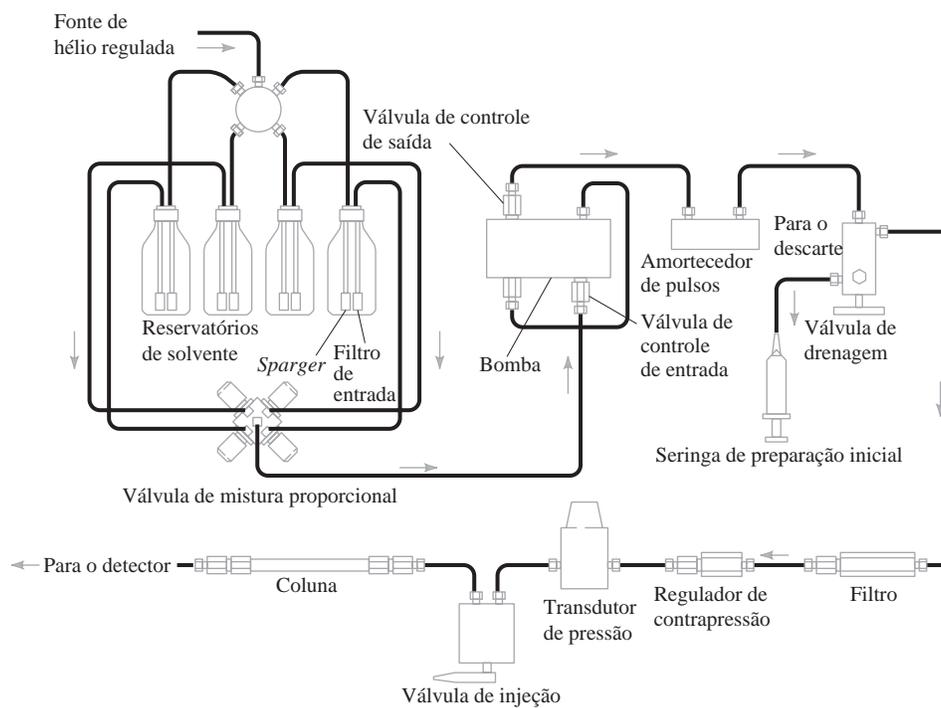


Figura 32-3 Diagrama de blocos mostrando os componentes típicos de um sistema para CLAE. (Cortesia da Perkin Elmer Corp. Norwalk, CT.)

32A-1 Reservatórios de Fase Móvel e Sistemas de Tratamento de Solventes

Um instrumento moderno de CLAE é equipado com um ou mais reservatórios de vidro, cada um deles tendo 500 mL ou mais de um solvente. Frequentemente são tomadas medidas para a remoção de gases dissolvidos e de partículas presentes nos líquidos. Os primeiros produzem bolhas na coluna causando, assim, um alargamento de banda; além disso, as bolhas e os particulados interferem no desempenho da maioria dos detectores. Os desgaseificadores podem ser constituídos por sistemas de aplicação de vácuo, sistemas de destilação, um dispositivo de aquecimento e agitação ou, como mostrado na Figura 32-3, um sistema de *sparging*, no qual os gases dissolvidos são arrastados para fora da solução por pequenas bolhas de um gás inerte que não é solúvel na fase móvel.

Uma eluição com um único solvente ou com uma mistura de solventes de composição constante é **isocrática**. Na **eluição por gradiente**, dois (e às vezes mais) sistemas solventes que diferem significativamente em polaridade são empregados. A razão entre os dois solventes varia em uma forma pré-programada durante a separação, algumas vezes de forma contínua e por vezes em etapas. Como exposto na Figura 32-4, a eluição por gradiente geralmente melhora a eficiência da separação, da mesma forma que a programação de temperatura o faz na cromatografia gasosa. Os instrumentos modernos de CLAE são equipados com válvulas que introduzem líquidos a partir de dois ou mais reservatórios em proporções que podem ser variadas continuamente (ver Figura 32-3).

Sparging é o processo pelo qual os gases dissolvidos são arrastados para fora de um solvente por pequenas bolhas de um gás inerte e insolúvel.

Uma **eluição isocrática** em CLAE é aquela na qual a composição do solvente permanece constante.

Uma **eluição por gradiente** em CLAE é aquela na qual a composição do solvente é alterada continuamente ou em uma série de etapas.

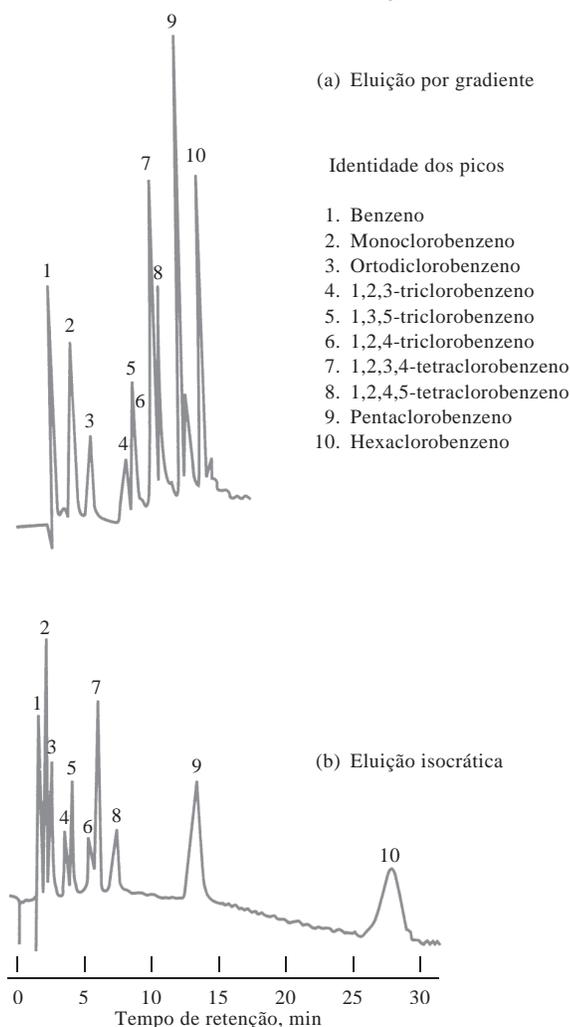


Figura 32-4 Melhoria na eficiência de separação por eluição por gradiente. (De J. J. Kirkland, Ed., *Modern Practice of Liquid Chromatography*, p. 88. Nova York: Interscience, 1971.)

32A-2 Sistemas de Bombeamento

Os requisitos para as bombas de cromatografia líquida incluem (1) habilidade de gerar pressões de até 6.000 psi (libras/polegadas quadradas), (2) saída livre de pulsação, (3) vazões na faixa de 0,1 a 10 mL/min, (4) reprodutibilidade relativa da vazão de 0,5% ou melhor e (5) resistência à corrosão por uma grande variedade de solventes. As altas pressões geradas pelas bombas de cromatografia líquida não representam risco de explosão porque os líquidos não são muito compressíveis. Assim, a ruptura de um componente resulta somente em vazamento do solvente. Contudo, esse vazamento pode constituir um risco de incêndio ou para o ambiente, dependendo do tipo de solvente.

Há três tipos principais de bomba: a de seringa acionada por rosca, a bomba recíproca e a bomba pneumática de pressão constante. As bombas de seringa produzem uma saída livre de pulsação cuja vazão pode ser controlada facilmente; no entanto, elas apresentam pequena capacidade (~250 mL) e se tornam inconvenientes quando é preciso trocar o solvente. A Figura 32-5 exibe o tipo de bomba mais amplamente empregado, a bomba recíproca. Esse dispositivo consiste em uma câmara pequena cilíndrica que é preenchida e esvaziada pela movimentação de ida e vinda de um pistão. O movimento da bomba produz um fluxo pulsado que deve ser atenuado posteriormente. As vantagens das bombas recíprocas incluem o volume interno pequeno, alta pressão de saída (até 10.000 psi), pronta adaptação à eluição por gradiente e vazões constantes, as quais são bastante independentes da queda de pressão imposta pela coluna e da viscosidade do solvente. A maioria dos cromatógrafos comerciais modernos emprega bombas recíprocas.

Alguns instrumentos usam bombas pneumáticas, que, na sua forma mais simples, consistem em um reservatório maleável de solvente inserido em um vaso que pode ser pressurizado por um gás comprimido. As bombas desse tipo são simples, de baixo custo e livres de pulsação; porém, elas apresentam capacidade e pressão de saída limitadas e as vazões são dependentes da viscosidade do solvente. Além disso, elas não podem ser adaptadas para eluição por gradiente.

32A-3 Sistema de Injeção da Amostra

O método mais empregado de introdução da amostra em cromatografia líquida é baseado em um sistema com alça de amostragem como aquele mostrado na Figura 32-6. Esses dispositivos são partes integradas de alguns equipamentos de cromatografia líquida. Frequentemente as alças intercambiáveis estão disponíveis para permitir a escolha do volume da amostra de 5 a 500 μL . A repetibilidade relativa das injeções com uma alça de amostragem é de poucos décimos por cento. Muitos instrumentos de CLAE incorporam auto-amostradores que operam em conjunto com injetores automáticos. Esses dispositivos podem injetar volumes variáveis.

32A-4 Colunas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As colunas cromatográficas são geralmente construídas de tubos de aço inoxidável, embora tubos de vidro ou Tygon sejam algumas vezes empregados em aplicações de baixa pressão (< 600 psi). A maioria das

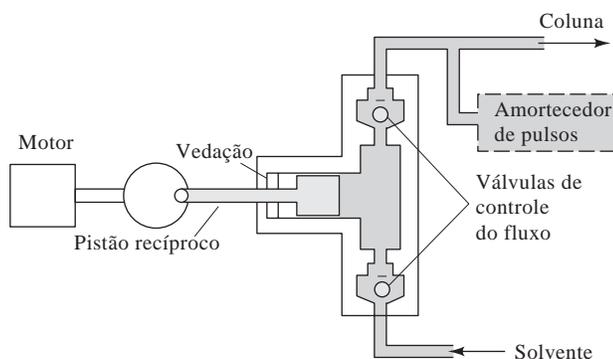


Figura 32-5 Uma bomba recíproca para CLAE.

colunas apresenta comprimento na faixa de 10 a 30 cm e possuem diâmetros internos entre 2 e 5 mm. Os recheios das colunas tipicamente apresentam partículas de diâmetros entre 3 e 10 μm . As colunas desse tipo fornecem entre 40.000 e 60.000 pratos m^{-1} . Recentemente, as microcolunas tornaram-se disponíveis com diâmetros internos de 1 a 4,6 mm e comprimentos de 3 a 7,5 cm. Essas colunas, as quais são recheadas com partículas de 3 a 5 μm , contêm cerca de 100.000 pratos m^{-1} e apresentam vantagens quanto à velocidade e consumo mínimo de solventes. Essa última vantagem é de importância significativa, pois os solventes de altíssima pureza necessários à cromatografia líquida custam muito caro, tanto para ser adquiridos como para ser descartados após o uso. A Figura 32-7 ilustra a velocidade com a qual a separação pode ser realizada nesse tipo de coluna. Nesse caso, oito componentes de diversos tipos são separados em cerca de 15 s. A coluna é de 4 cm de comprimento e possui um diâmetro interno de 4 mm, sendo recheada com partículas de 3 μm .

O tipo mais comum de recheio para a cromatografia líquida é preparado a partir de partículas de sílica, as quais são sintetizadas aglomerando-se partículas de sílica de tamanho submicrométrico sob condições que levam à formação de partículas maiores com diâmetros altamente uniformes. As partículas resultantes são geralmente recobertas com filmes orgânicos, os quais são quimicamente ou fisicamente ligados à superfície. Outros materiais de recheio incluem as partículas de alumina, de polímeros porosos e resinas de troca iônica.

Colunas de Proteção ou de Guarda

Com freqüência, uma coluna curta de proteção é posicionada à frente da coluna analítica com a finalidade de aumentar a vida útil desta última, removendo o material particulado e os contaminantes dos solventes. Além disso, em cromatografia líquida, a coluna de proteção serve para saturar a fase móvel com a fase estacionária de forma que as perdas de fase estacionária na coluna analítica sejam minimizadas. A composição da coluna de proteção deve ser similar àquela da coluna analítica; o tamanho de partícula, contudo, é normalmente maior para minimizar a queda de pressão.

Termostato para Colunas

Para muitas aplicações, um controle rigoroso da temperatura não é necessário e as colunas operam à temperatura ambiente. Freqüentemente, contudo, obtêm-se melhores cromatogramas mantendo-se a coluna à temperatura constante dentro de poucos décimos de graus Celsius. A maioria dos instrumentos comerciais está equipada com aquecedores que controlam a temperatura da coluna com tolerância de poucos décimos

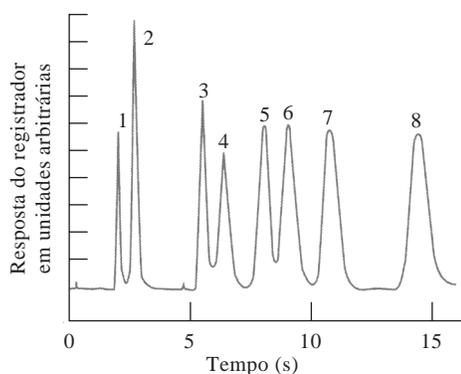


Figura 32-7 Separação isocrática de alta velocidade. Dimensões da coluna: comprimento de 4 cm, diâmetro interno de 0,4 cm; recheio: *spherisorb* 3 μm ; fase móvel: 4,1 % de acetato de etila em *n*-hexano. Compostos: (1) *p*-xileno, (2) anisol, (3) acetato de benzila, (4) ftalato de dioctila, (5) ftalato de dipentila, (6) ftalato de dibutila, (7) ftalato de dipropila, (8) ftalato de dietila. (De R. P. W. Scott, *Small Bore Liquid Chromatography Columns: Their Properties and Uses*, p. 156. Nova York: Wiley, 1984. Material utilizado com permissão de Wiley-Liss, Inc., uma subsidiária da John Wiley & Sons, Inc.)

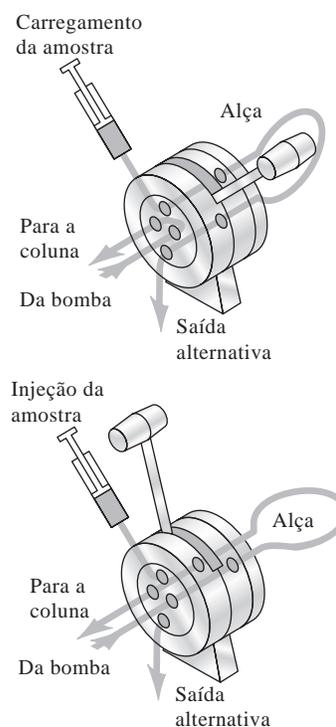
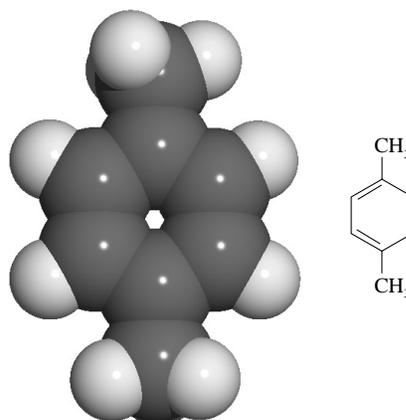


Figura 32-6 Sistema com alça de amostragem para a cromatografia líquida. (Cortesia da Beckman Coulter, Fullerton, CA.)

de graus desde a temperatura próxima à ambiente até 150 °C. As colunas podem também ser munidas de uma camisa de termostatização pela qual flui a água de um banho termostático de forma a promover um controle preciso da temperatura.

Modelo molecular do *p*-xileno. Existem três isômeros do xileno: orto, meta e para. O paraxileno é utilizado na produção de fibras artificiais. O xilol é uma mistura dos três isômeros e é empregado como solvente.



32A-5 Detectores

Os detectores em CLAE devem apresentar um volume morto pequeno de forma a minimizar o alargamento de banda extra coluna. O detector deve ser pequeno e compatível com a vazão de líquido. Nenhum sistema de detecção universal de alta sensibilidade, como aqueles encontrados para a cromatografia gasosa, está disponível para a cromatografia líquida de alta eficiência. Assim, o detector a ser empregado vai depender da natureza da amostra. A Tabela 32-1 lista alguns dos detectores comuns e suas propriedades.

Os detectores mais amplamente empregados em cromatografia líquida são baseados na absorção da radiação ultravioleta ou visível (Figura 32-8). Os fotômetros e os espectrofotômetros projetados especificamente para uso com colunas cromatográficas estão disponíveis comercialmente. O primeiro geralmente faz uso das linhas a 254 nm e 280 nm de uma fonte de mercúrio, porque muitos grupos funcionais orgânicos absorvem nessa região. As fontes de deutério ou de filamento de tungstênio com fil-

TABELA 32-1

Desempenho dos Detectores para CLAE*			
Detector para CLAE	Disponível Comercialmente	LD [†] em Massa (típico)	Faixa Linear [‡] (décadas)
Absorbância	Sim	10 pg	3-4
Fluorescência	Sim	10 fg	5
Eletroquímico	Sim	100 pg	4-5
Índice de refração	Sim	1 ng	3
Condutividade	Sim	100 pg-1 ng	5
Espectrometria de massas	Sim	<1 pg	5
FTIR	Sim	1 μg	3
Espalhamento de luz	Sim	1 μg	5
Atividade óptica	Não	1 ng	4
Seletivo a elementos	Não	1 ng	4-5
Fotoionização	Não	<1 pg	4

*Do manual do fabricante, *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, F. Settle, Ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall, 1997; E. S. Yeung and R. E. Synovec, *Anal. Chem.*, 1986, v. 58, p. 1237A.

[†]Limites de detecção (LD) expressos em massa são dependentes do composto, instrumento e condições da CLAE; os valores fornecidos são típicos de sistemas comerciais, quando disponíveis.

[‡]Valores típicos extraídos da fonte citada.

tros de interferência fornecem um meio simples de detectar as espécies absorventes. Alguns dos instrumentos modernos são equipados com discos que contêm vários filtros de interferência, os quais podem ser rapidamente trocados. Os detectores espectrofotométricos são consideravelmente mais versáteis que os fotômetros e são amplamente empregados nos instrumentos de alto desempenho. Os instrumentos modernos usam arranjos lineares de fotodiodos que podem adquirir um espectro completo à medida que o analito deixa a coluna. O uso de uma combinação de CLAE com detector de espectrometria de massas está atualmente tornando-se bastante popular. Esses sistemas de cromatografia líquida/espectrometria de massas podem identificar os analitos que deixam a coluna de CLAE,² como discutido no Destaque 32-1.

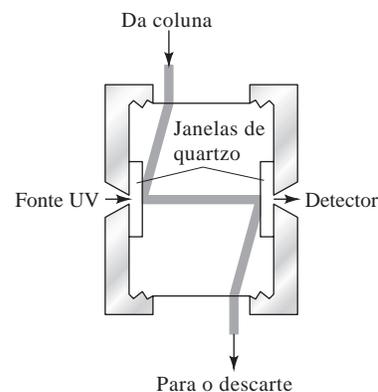


Figura 32-8 Um detector UV-visível para CLAE.

DESTAQUE 32-1

Cromatografia Líquida (CL)/Espectrometria de Massas (MS) e CL-MS-EM

A combinação da cromatografia líquida com a espectrometria de massas poderia ser vista como a fusão ideal entre a separação e a detecção. Assim como na cromatografia gasosa, o espectrômetro de massas poderia identificar as espécies à medida que elas fossem eluídas da coluna cromatográfica. Contudo, existem dois problemas principais no acoplamento dessas duas técnicas. Uma amostra no estado gasoso é necessária para a espectrometria de massas, enquanto a saída de uma coluna de CL é constituída por um soluto dissolvido em um solvente. Em uma primeira etapa, o solvente deve ser evaporado. Quando vaporizado, contudo, o solvente da CL produz um volume de vapor que é cerca de 10 a 1.000 vezes maior que o volume do gás de arraste em cromatografia gasosa. Portanto, a maior parte do solvente deve também ser removida. Diversos dispositivos têm sido desenvolvidos para resolver esse problema de remoção do solvente e para o interfaceamento da coluna de CL. Hoje em dia, a abordagem mais popular é usar a técnica de ionização à pressão atmosférica de baixa vazão. O diagrama de blocos de um sistema típico CL-MS (ou LC-MS, do inglês *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) é mostrado na Figura 32D-1. O sistema de CLAE é tipicamente um sistema capilar de CL em nanoescala com vazões na faixa de $\mu\text{L}/\text{min}$. Alternativamente, algumas interfaces permitem vazões tão altas como de 1 a 2

mL/min, as quais são típicas da CLAE convencional. As fontes de ionização mais comuns são a ionização por *eletrospray* e a ionização química à pressão atmosférica (ver Seção 31A-4). A combinação de CLAE e espectrometria de massas proporciona uma alta seletividade, uma vez que picos não-resolvidos podem ser isolados monitorando-se somente um valor de massa selecionado. A técnica de CL-MS pode fornecer uma impressão digital de um eluato em particular em vez de recorrer ao tempo de eluição, como na CLAE convencional. A combinação também pode fornecer a massa molar e informação estrutural e uma análise quantitativa exata.³

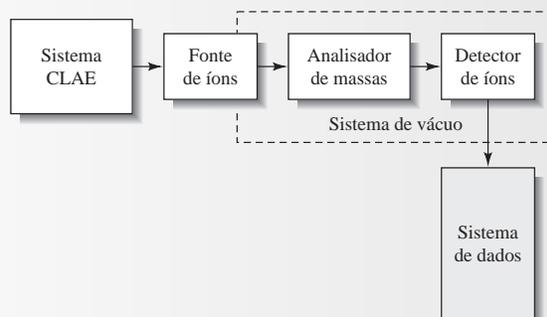


Figura 32D-1 Diagrama de blocos de um sistema CL-MS. O efluente da coluna de CL é introduzido em uma fonte de ionização à pressão atmosférica como um sistema de *eletrospray* ou ionização química. Os íons produzidos são selecionados pelo analisador de massas e detectados pelo detector de íons.

(continua)

² Ver R. Willoughby, E. Sheehan, S. Mitrovich, *A Global View of LC/MS*. Pittsburgh: Global View Publishing, 1998; W. M. A. Niessen, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, 2 ed. Nova York: Dekker, 1999.

³ Para uma revisão sobre os sistemas comerciais CL/MS, ver B. E. Erickson, *Anal. Chem.*, 2000, v. 72, p. 711A.

Para algumas misturas complexas, a combinação da CL com MS não fornece uma resolução suficiente. Nos anos mais recentes, tornou-se factível o acoplamento de dois ou mais analisadores de massas em conjunto em uma técnica conhecida como espectrometria de massas tandem.⁴ Quando se combina a CL com a espectrometria de massas tandem, o instrumento recebe o nome de CL-MS-MS (ou LC-MS-MS).⁵ Os espectrômetros de massas tandem são do tipo de triplo quadrupolo (a célula de colisão também é um quadrupolo) ou espectrômetros com quadrupolo e armadilha de íons. Um sistema de triplo quadrupolo de espectrometria de massas é mostrado na Figura 32D-2. Nesse caso, o primeiro quadrupolo age como um filtro de massas selecionando o íon de interesse. Esse íon é então fragmentado por colisão com um gás inerte em uma célula de colisão. O sistema quadrupolo final analisa os fragmentos produzidos. O sistema de triplo quadrupolo pode operar em outros modos. Por exemplo, se o primeiro quadrupolo for operado como um filtro largo de

massas de forma a transmitir ampla faixa de íons e se nenhum gás de colisão estiver presente na célula de colisão, o instrumento está operando como um sistema CL-MS. O instrumento pode ser operado, varrendo-se um ou ambos os quadrupolos para produzir espectros de massas dos fragmentos dos íons selecionados pelo primeiro quadrupolo à medida que aquele quadrupolo é varrido.

Para se obter maior resolução que a que poderia ser obtida com um quadrupolo, o analisador de massas final em um sistema MS tandem pode ser um espectrômetro de massas de tempo de voo. Os espectrômetros de massas de setor também podem ser combinados para gerar sistemas tandem. A ressonância ciclotrônica de íons e os espectrômetros com armadilha de íons podem ser operados de forma a prover não somente dois estágios, mas n estágios de análise de massa. Esses sistemas MS^n promovem as etapas de análise sequencialmente com um único analisador de massas. Esses têm sido combinados com sistemas CL em instrumentos CL- MS^n .

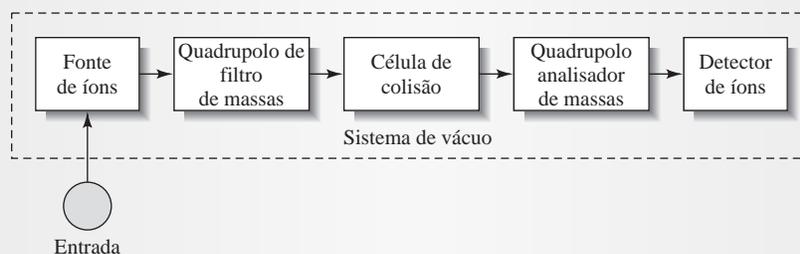


Figura 32D-2 Um sistema de espectrometria de massas tandem. Os íons produzidos na fonte são filtrados no primeiro quadrupolo de forma que somente o íon selecionado passe para a célula de colisão. Um gás de colisão promove a fragmentação do íon selecionado. Os fragmentos são selecionados pelo quadrupolo analisador de massas e detectados. Geralmente, a célula de colisão também é um quadrupolo operado de forma que os fragmentos de íons sejam dirigidos para o analisador de massas.

Outro tipo de detector, que tem encontrado uma considerável aplicação, é baseado na mudança de índice de refração do solvente causada pelas moléculas do analito. Em contraste com a maioria dos outros detectores listados na Tabela 32-1, o detector de índice de refração é de uso geral em vez de seletivo e responde à presença de todos os solutos. A desvantagem desse detector está em sua sensibilidade limitada. Muitos detectores eletroquímicos baseados em medidas potenciométricas, condutimétricas e voltamétricas foram também desenvolvidos. Um exemplo de detector amperométrico encontra-se na Figura 32-9.

⁴ Para uma descrição de espectrômetros de massas tandem comerciais, ver D. Noble, *Anal. Chem.*, 1995, v. 67, p. 265A.

⁵ Para desenvolvimentos recentes em CL/MS/MS, ver R. Thomas, *Spectroscopy*, 2001, v. 16, p. 28.

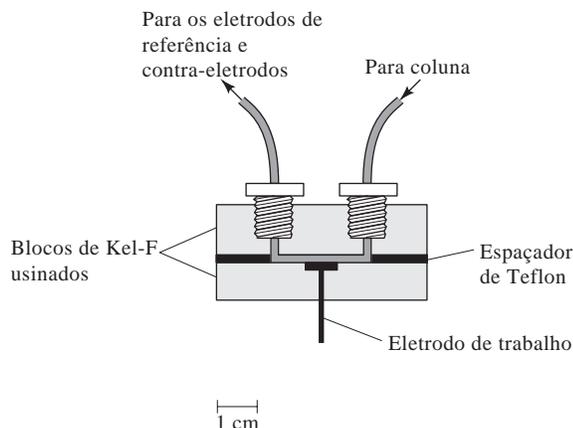


Figura 32-9 Célula amperométrica de camada fina para CLAE.

32B

CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA POR PARTIÇÃO

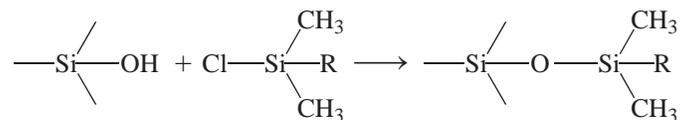
O tipo de CLAE mais utilizado é a **cromatografia por partição**, na qual a fase estacionária é um segundo líquido que é imiscível com o líquido da fase móvel. A cromatografia por partição pode ser subdividida em **cromatografia líquido-líquido** e **cromatografia líquida com fase ligada**. A diferença entre as duas está na forma com a qual a fase estacionária é imobilizada nas partículas de suporte do recheio. O líquido é imobilizado por adsorção física em cromatografia líquido-líquido, enquanto é retido por meio de ligações químicas na cromatografia líquida com fase ligada. Inicialmente a cromatografia por partição era exclusivamente do tipo líquido-líquido; atualmente, contudo, os métodos de fase ligada predominam por causa de sua maior estabilidade. Os recheios do tipo líquido-líquido estão hoje em dia relegados a certas aplicações especiais.

Na **cromatografia por partição líquido-líquido**, a fase estacionária é um solvente que é imobilizado por adsorção sobre a superfície das partículas do recheio.

Na **cromatografia líquida por partição com fase ligada**, a fase estacionária é uma espécie orgânica que é imobilizada na superfície das partículas do material de recheio por meio de ligações químicas.

32B-1 Recheios com Fases Ligadas

A maioria dos recheios com fase ligada são preparados pela reação de um organoclorosilano com os grupos —OH formados na superfície das partículas de sílica por hidrólise a quente em ácido clorídrico diluído. O produto é um organosiloxano. A reação para um sítio SiOH sobre a superfície de uma partícula pode ser escrita como



em que R é geralmente um grupo octil ou octadecil de cadeia aberta. Outros grupos funcionais orgânicos que têm sido ligados às superfícies de sílica incluem as aminas alifáticas, éteres e nitrilas, bem como hidrocarbonetos aromáticos. Assim, as fases estacionárias estão disponíveis com muitas polaridades diferentes.

Os recheios com fases ligadas apresentam como vantagem uma estabilidade muito maior que as fases estacionárias imobilizadas fisicamente. Com essas últimas, o recobrimento periódico das superfícies do sólido é necessária porque a fase estacionária é dissolvida gradualmente pela passagem da fase móvel. Além disso, a eluição por gradiente não é viável com recheios tipo líquido-líquido, novamente por causa das perdas por solubilização na fase móvel. A maior desvantagem dos recheios com fase ligada está na sua capacidade de amostra limitada (somente pequenas quantidades de amostra podem ser admitidas na coluna).

32B-2 Recheios de Fases Normal e Reversa

Dois tipos de cromatografia por partição podem ser distinguidos com base nas polaridades relativas da fase estacionária e móvel. Os trabalhos iniciais em cromatografia líquida foram baseados em fases estacionárias altamente polares como o trietileno glicol ou água; um solvente relativamente não-polar, como o hexano ou

Na cromatografia por partição de fase normal, a fase estacionária é polar e a fase móvel, apolar. Na cromatografia por partição de fase reversa, a polaridade dessas fases são invertidas.

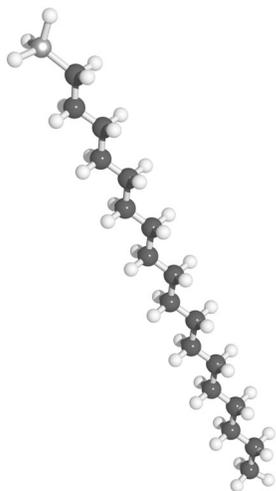
o éter *i*-propílico, servia, então, como fase móvel. Por razões históricas, esse tipo de cromatografia é atualmente chamado **cromatografia de fase normal**. Na **cromatografia de fase reversa**, a fase estacionária é não-polar, geralmente um hidrocarboneto, e a fase móvel corresponde a um solvente relativamente polar (como água, metanol, acetonitrila ou tetra-drofurano).⁶

Na cromatografia de fase normal, o componente *menos* polar é eluído primeiro; o *aumento* da polaridade da fase móvel *diminui* o tempo de eluição. Em contraste, na cromatografia de fase reversa, o componente *mais* polar elui primeiro e o *aumento* da polaridade da fase móvel *eleva* o tempo de eluição.

► Na cromatografia de fase normal, o analito menos polar é eluído primeiro. Na cromatografia de fase reversa, por último.

Foi estimado que mais de três quartos de todas as separações feitas por CLAE são atualmente realizadas em fase reversa com recheios com fase ligada contendo octil ou octadecil siloxano. Com o uso dessas preparações, os grupos hidrocarbonetos de cadeia longa encontram-se alinhados de forma paralela uns aos outros e perpendicular à superfície

da partícula, gerando uma superfície não-polar que se assemelha a uma escova. A fase móvel empregada com esses recheios é normalmente uma solução aquosa contendo várias concentrações de solventes como metanol, acetonitrila ou tetra-hidrofurano.



Modelo molecular do octadecil-siloxano

essa forma de cromatografia por partição. A Figura 32-10 ilustra a separação de compostos iônicos e não-iônicos utilizando sulfonatos alquílicos com cadeias de vários comprimentos como agentes de formação de pares iônicos. Observe que a mistura de sulfonatos alquílicos C₅⁻ e C₇⁻ produz os melhores resultados para a separação.

A **cromatografia por par iônico** é um subgrupo da cromatografia em fase reversa no qual as espécies facilmente ionizáveis são separadas em colunas de fase reversa. Nesse tipo de cromatografia, um sal inorgânico contendo um contra-íon orgânico de tamanho grande, como um íon de amônio quaternário ou um sulfonato alquílico, é adicionado à fase móvel como um reagente formador de par iônico. Dois mecanismos de separação são postulados. No primeiro, o contra-íon forma um par iônico não carregado com um íon do soluto de carga oposta na fase móvel. Esse par iônico particiona-se na fase não-polar estacionária, gerando uma retenção diferencial dos solutos com base na afinidade do par iônico pelas duas fases. Alternativamente, o contra-íon é retido fortemente pela fase estacionária, normalmente neutra, atribuindo carga a essa fase. A separação de íons do soluto orgânico de carga oposta ocorre por formação de complexos de pares iônicos, os solutos mais retidos formam os complexos mais fortes com a fase estacionária. Algumas separações excepcionais de compostos iônicos e não-iônicos presentes na mesma amostra podem ser realizadas com

32B-3 Escolha das Fases Móvel e Estacionária

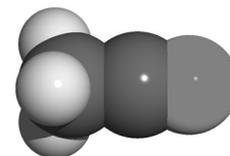
O sucesso da cromatografia por partição requer um equilíbrio adequado entre as forças intermoleculares existentes entre os três participantes no processo de separação – o analito e as fases móvel e estacionária.

⁶ Para uma discussão detalhada sobre CLAE em fase reversa, ver A. M. Krstulovic e P. R. Brown, *Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*. Nova York: Wiley, 1982.

Essas forças intermoleculares são descritas qualitativamente em termos da polaridade relativa de cada um dos três componentes. Em geral, as polaridades dos grupos funcionais orgânicos na ordem crescente são: hidrocarbonetos alifáticos < olefinas < hidrocarbonetos aromáticos < haletos < sulfetos < éteres < compostos nitro < ésteres \approx aldeídos \approx cetonas < alcoóis \approx aminas < sulfonas < sulfóxidos < amidas < ácidos carboxílicos < água.

Como regra, a maioria das separações cromatográficas é realizada igualando-se a polaridade do analito com aquela da fase estacionária; uma fase móvel de polaridade consideravelmente diferente é então empregada. Esse procedimento é mais bem-sucedido que outro no qual as polaridades do analito e da fase móvel são igualadas, sendo diferentes daquela da fase estacionária. Nesse caso, a fase estacionária geralmente não consegue competir com sucesso pelos componentes da amostra; os tempos de retenção tornam-se muito curtos para permitir sua aplicação prática. No outro extremo está a situação na qual as polaridades do analito e da fase estacionária são muito parecidas; assim, os tempos de retenção tornam-se indesejavelmente longos.

◀ A ordem de polaridade dos solventes comuns utilizados como fases móveis é água > acetonitrila > metanol > etanol > tetraidrofurano > propanol > ciclohexano > hexano.



Modelo molecular da acetonitrila. A acetonitrila ($\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{N}$) é amplamente empregada como solvente orgânico. Seu uso como fase móvel em CL vem do fato de que ela é mais polar que o metanol, porém menos polar que a água.

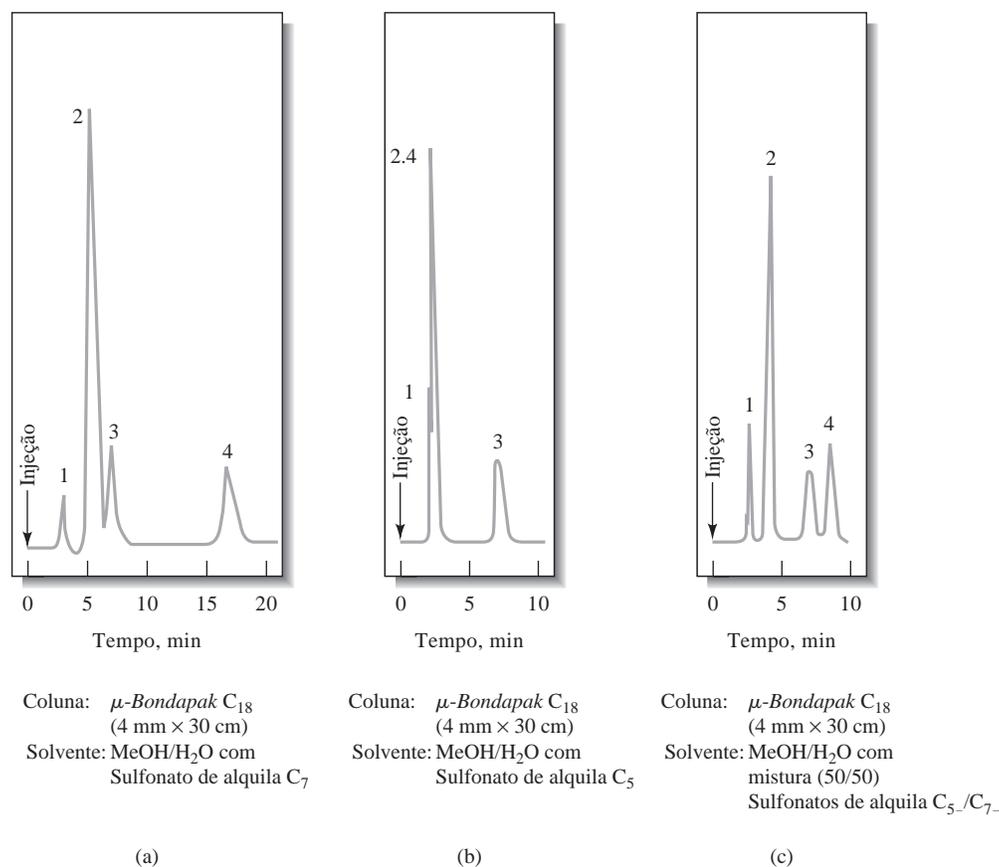


Figura 32-10 Cromatogramas ilustrando as separações de misturas de compostos iônicos e não-iônicos por cromatografia por par iônico. Compostos: (1) niacinamida, (2) pirodoxina, (3) riboflavina, (4) tiamina. Em pH 3,5 a niacinamida está fortemente ionizada, enquanto a riboflavina é não-iônica. A pirodoxina e a tiamina estão fracamente ionizadas. Coluna: μ -Bondapak C_{18} , 4 mm \times 30 cm. Fase móvel: (a) MeOH/ H_2O com sulfonato de alquila C_7 ; (b) MeOH/ H_2O com sulfonato de alquila C_5 ; (c) MeOH/ H_2O com uma mistura 1:1 de sulfonato de alquila C_5 e C_7 . (Cortesia da Waters Corp., Milford, MA.)

32B-4 Aplicações

A Figura 32-11 ilustra algumas aplicações típicas da cromatografia por partição em fase ligada para separar os aditivos de bebidas refrigerantes e inseticidas organofosforados. A Tabela 32-2 ilustra a variedade de amostras para as quais a técnica pode ser aplicada.

Figura 32-11 Aplicações típicas da cromatografia com fase ligada. (a) Aditivos em refrigerantes. Coluna: $4,6 \times 250$ mm recheada com material com fase ligada polar (nitrila). Eluição isocrática com 6% HOAc/94% H₂O. Vazão: 1,0 mL/min. (Cortesia de BTR Separations, uma afiliada da DuPont ConAgra.) (b) Inseticidas organofosforados. Coluna $4,5 \times 250$ mm recheada com partículas de $5 \mu\text{m}$ com fase ligada de C₈. Eluição por gradiente: 67% CH₃OH/33% H₂O até 80% CH₃OH/20% H₂O. Vazão: 2 mL/min. Ambas aplicações empregaram detectores UV a 254 nm.

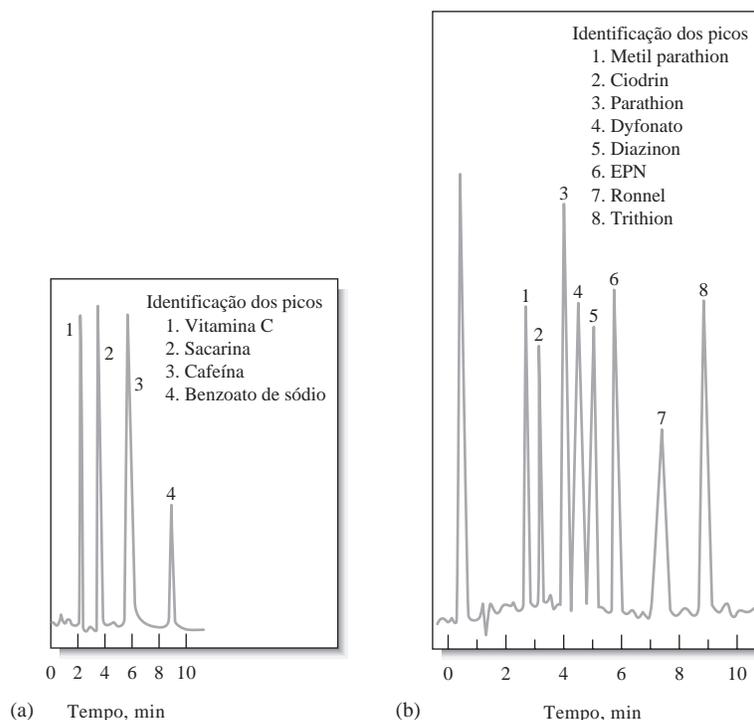


TABELA 32-2

Aplicações Típicas da Cromatografia por Partição de Alta Eficiência	
Campo	Misturas Típicas Separadas
Farmacêutico	Antibióticos, sedativos, esteróides, analgésicos
Bioquímico	Aminoácidos, proteínas, carboidratos, lipídeos
Produtos alimentícios	Adoçantes artificiais, antioxidantes, aflotoxinas, aditivos
Industrial químico	Aromáticos condensados, tensoativos, propelentes, corantes
Poluentes	Pesticidas, herbicidas, fenóis, bifenilas policloradas (PCBs)
Químico forense	Drogas, venenos, álcool no sangue, narcóticos
Médico clínico	Ácidos bilícos, metabólitos de drogas, extratos de urina, estrógenos

32C

CROMATOGRAFIA DE ALTA EFICIÊNCIA POR ADSORÇÃO

O trabalho pioneiro em cromatografia foi baseado na adsorção dos analitos em uma superfície sólida. A fase estacionária, nesse caso, é a superfície de um sólido polar finamente dividido. Nesse tipo de recheio,

Em **cromatografia por adsorção**, os analitos são adsorvidos sobre a superfície de um recheio polar.

o analito compete com a fase móvel pelos sítios da superfície do recheio e a retenção resulta das forças de adsorção.

32C-1 Fases Estacionária e Móvel

A sílica finamente dividida e a alumina são as únicas fases estacionárias empregadas extensivamente em cromatografia por adsorção. A sílica é preferida para a maioria (mas não todas) das aplicações por causa da sua alta capacidade de amostra e das suas várias formas úteis. As características de adsorção das duas substâncias são paralelas entre si. Para ambas, os tempos de retenção tornam-se mais longos à medida que a polaridade do analito aumenta.

Na cromatografia por adsorção, a única variável que afeta o coeficiente de distribuição dos analitos é a composição da fase móvel (contrastando com a cromatografia de partição, na qual a polaridade da fase estacionária também pode ser variada). Felizmente, uma variação enorme na retenção, e assim na resolução, acompanha as variações no sistema solvente, sendo, portanto, raro não se dispor de uma fase móvel adequada.

◀ Na cromatografia por adsorção, a fase móvel é constituída geralmente por um solvente orgânico ou por uma mistura de solventes orgânicos; a fase estacionária é composta por partículas finamente divididas de sílica ou alumina.

32C-2 Aplicações da Cromatografia por Adsorção

Atualmente, CLAE líquido-sólido é utilizada extensivamente para a separação de compostos relativamente não-polares insolúveis em água e com massas molares menores que cerca de 5.000. Uma vantagem em particular da cromatografia por adsorção, que não é compartilhada por outros métodos, está na sua habilidade de resolver as misturas isoméricas como aquelas de derivados para e metassubstituídos do benzeno.

32D CROMATOGRAFIA POR TROCA IÔNICA

Na Seção 30D, descrevemos algumas das aplicações das resinas trocadoras de íons em separações analíticas. Além disso, esses materiais são úteis como fases estacionárias para a cromatografia líquida, na qual são empregados para separar espécies carregadas.⁷ Na maioria dos casos, medidas de condutividade são empregadas para detectar as espécies eluídas.

Atualmente há dois tipos de cromatografia de íons em uso: **baseada em supressor** e de **coluna única**. Elas diferem no método utilizado para prevenir que a condutividade dos eletrólitos eluentes interfiram com a medida das condutividades dos analitos.

32D-1 Cromatografia de Íons Baseada em Supressores

Os detectores de condutividade apresentam muitas propriedades de um detector ideal. Eles podem ser altamente sensíveis, são universais para as espécies carregadas e, como regra, respondem de uma forma previsível às alterações na concentração. Além disso, esses detectores são de operação simples, de baixo custo de construção e de manutenção, fáceis de serem miniaturizados e, geralmente, operam por longos períodos sem necessitar de manutenção. A única limitação no uso de detectores de condutividade, que atrasou a difusão da sua aplicação em cromatografia de íons até a metade da década de 1970, foi a alta concentração de eletrólito necessária para a eluição da maioria dos íons dos analitos em um tempo razoável. Em consequência, a condutividade dos componentes da fase móvel tendem a se sobrepor à dos íons dos analitos, reduzindo, assim, a sensibilidade do detector.

◀ O detector de condutividade é muito adequado para a cromatografia por troca iônica.

Em 1975, o problema criado pela alta condutância dos eluentes foi resolvido pela introdução de uma **coluna supressora do eluente** logo após a coluna trocadora de íons.⁸ A coluna do supressor é recheada

⁷ Para uma revisão curta sobre a cromatografia de íons, ver J. S. Fritz, *Anal. Chem.*, 1987, v. 59, p. 335A; P. R. Haddad, *Anal. Chem.*, 2001, v. 73, p. 266A. Para uma descrição detalhada do método, ver H. Small, *Ion Chromatography*. Nova York: Plenum Press, 1989; D. T. Gjerde e J. S. Fritz, *Ion Chromatography*, 3. ed. Nova York: A. Heuthig, 2000.

⁸ H. Small, T. S. Stevens e W. C. Bauman, *Anal. Chem.*, 1975, v. 47, p. 1801.

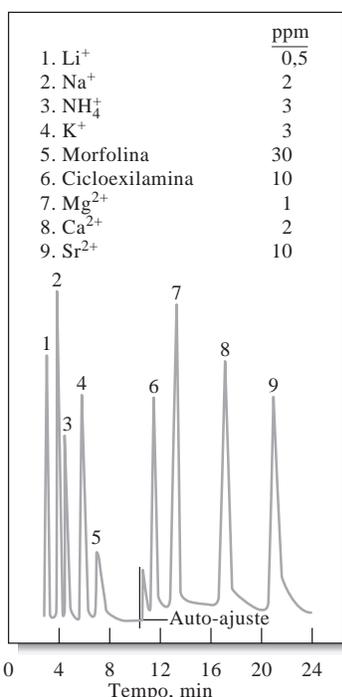


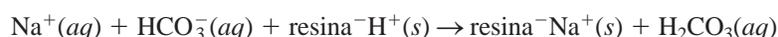
Figura 32-12 Cromatograma de íons de uma mistura de cátions. (Cortesia da Dionex, Sunnyvale, CA.)

com uma segunda resina trocadora de íons que converte efetivamente os íons do solvente de eluição para espécies moleculares de ionização limitada sem afetar a condutividade dos íons dos analitos. Por exemplo, quando se pretende separar e determinar cátions, o ácido clorídrico é selecionado como reagente eluente e a coluna de supressão é constituída por uma resina trocadora de íons na forma hidróxida. O produto da reação na coluna de supressão é a água. Isto é



Os cátions do analito não são retidos por essa segunda coluna.

Na separação de ânions, o recheio supressor está na forma ácida de uma resina trocadora de cátions e o agente de eluição é constituído por bicarbonato ou carbonato de sódio. A reação no supressor é



O ácido carbônico pouco dissociado não contribui significativamente para a condutividade.

Uma inconveniência associada com as colunas supressoras originais era a necessidade de regenerá-las periodicamente (tipicamente a cada 8 ou 10 horas) para reconverter o recheio para a sua forma ácida ou básica. Recentemente, contudo, os supressores com micromembranas que operam continuamente tornaram-se disponíveis.⁹ Por exemplo, quando o carbonato ou bicarbonato de sódio devem ser removidos, o eluente passa sobre uma série de membranas ultrafinas de trocadoras de cátions que os separam de uma corrente de solução ácida de regeneração que flui continuamente na direção oposta. Os íons sódio do eluente são trocados com os íons hidrogênio na superfície interna da membrana trocadora e então migram para outra superfície para serem trocados com os íons hidrogênio do reagente regenerador. Os íons hidrogênio da solução regeneradora migram na direção inversa preservando, assim, a neutralidade elétrica.

As Figuras 32-12 e 32-13 mostram as aplicações da cromatografia de íons baseadas em uma coluna supressora e na detecção condutométrica. Nessas aplicações, os íons estão presentes na faixa de partes por milhão; o volume da amostra foi de 50 μL em um caso e de 20 μL no outro. O método é particularmente importante para a análise de ânions porque não existe outro método rápido e conveniente para resolver as misturas desse tipo.

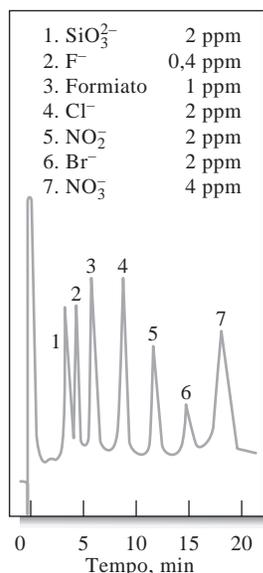


Figura 32-13 Cromatograma de íons de uma mistura de ânions. (Cortesia da Dionex, Sunnyvale, CA.)

32D-2 Cromatografia de Íons em Coluna Única

Recentemente, a instrumentação comercial para a cromatografia de íons, que não requer nenhuma coluna supressora, tornou-se disponível. Essa abordagem depende da pequena diferença de condutividade entre os íons da amostra e os íons prevalentes do eluente. Para amplificar essas diferenças, trocadores de baixa capacidade são empregados permitindo a eluição com soluções com baixas concentrações de eletrólitos. Além disso, eluentes de baixa condutividade são selecionados.¹⁰

⁹ Para uma descrição desse dispositivo, ver G. O. Franklin, *Amer. Lab.*, 1985, v. 3, p. 71.

¹⁰ Ver R. M. Becker, *Anal. Chem.*, 1980, v. 52, p. 1510; J. R. Benson, *Amer. Lab.*, 1985, v. 6, p. 30; T. Jupille, *Amer. Lab.*, 1986, v. 5, p. 114.

A cromatografia de íons com coluna única oferece a vantagem de não requerer equipamentos especiais para a supressão. Contudo, é um método um pouco menos sensível para determinar os ânions que os métodos que empregam as colunas supressoras.

32E CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO POR TAMANHO

A cromatografia por exclusão por tamanho ou em gel é o mais recente dos procedimentos cromatográficos. Ela se constitui em uma técnica poderosa particularmente aplicada às espécies de alta massa molar.¹¹

32E-1 Recheios de Colunas

Os recheios para a cromatografia por exclusão por tamanho consistem em partículas pequenas ($\sim 10 \mu\text{m}$) de sílica ou polímeros contendo uma rede de poros uniformes dentro dos quais as moléculas do soluto e do solvente podem difundir. Enquanto estão ocupando os poros, as moléculas estão efetivamente presas e removidas do fluxo da fase móvel. O tempo de residência médio das moléculas do analito depende do seu tamanho efetivo. As moléculas que são muito maiores que o tamanho médio dos poros do recheio são excluídas e assim não sofrem nenhuma retenção; isto é, elas se deslocam através da coluna na velocidade da fase móvel. As moléculas que são apreciavelmente menores que os poros podem penetrar por meio do labirinto dos poros e são assim retidos por tempos mais longos; elas são as últimas a ser eluídas. Entre esses dois extremos estão as moléculas de tamanho intermediário cuja penetração média nos poros do recheio depende dos seus diâmetros. O fracionamento que ocorre dentro desse grupo está diretamente relacionado com o tamanho molecular e, em alguma extensão, com a forma da molécula. Observe que as separações por exclusão por tamanho diferem de outros tipos de cromatografia sob o aspecto de que nenhuma interação física ou química entre os analitos e a fase estacionária está envolvida no processo. De fato, todos os esforços são dirigidos no sentido de se evitar essas interações, pois elas levam a uma degradação da eficiência da coluna.

Muitos recheios para a exclusão por tamanho estão no mercado. Alguns são hidrofílicos para ser empregados com fases móveis aquosas; outros são hidrofóbicos e empregados junto a solventes não-polares orgânicos. A cromatografia baseada em recheios hidrofílicos é às vezes denominada **filtração em gel**, ao passo que as técnicas baseadas em recheios hidrofóbicos são chamadas **permeação em gel**. Para ambos os tipos de recheio, muitos diâmetros de poros estão disponíveis. Geralmente, um dado recheio pode acomodar uma faixa que vai de 2 a 2,5 décadas de massa molar. A massa molar média adequada para um dado recheio pode ser tão pequena como poucas centenas ou tão grande como vários milhões de Daltons.

Na **cromatografia de íons baseada em supressor**, a coluna do trocador de íons é seguida por uma **coluna supressora** ou por uma **membrana supressora** que converte um eluente iônico em espécies não-iônicas que não interferem com a detecção condutométrica dos íons dos analitos.

Na **cromatografia por troca iônica em coluna única**, os íons dos analitos são separados em um trocador de íons de baixa capacidade por meio de um eluente de pequena força iônica que não interfere com a detecção condutométrica dos íons dos analitos.

Na **cromatografia por exclusão por tamanho**, o fracionamento é baseado no tamanho das moléculas.

A **filtração em gel** é um tipo de cromatografia por exclusão por tamanho na qual o recheio é hidrofílico. É empregada para separar as espécies polares.

A **permeação em gel** é um tipo de cromatografia por exclusão por tamanho na qual o recheio é hidrofóbico. É utilizada na separação de espécies não-polares.

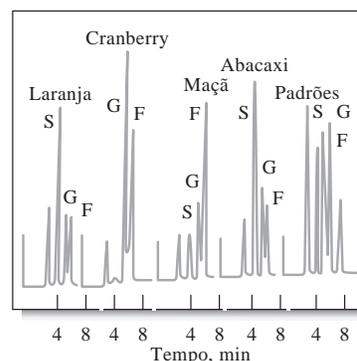


Figura 32-14 Cromatograma por filtração em gel para glicose (G), frutose (F) e sacarose (S) em sucos enlatados. (Cortesia da BTR Separations, uma afiliada da DuPont ConAgra.)

¹¹ Para monografias sobre esse assunto, ver *Size Exclusion Chromatography*, B. J. Hunt e S. R. Holding, Eds. Nova York: Chapman and Hall, 1988; *Handbook of Size Exclusion Chromatography*, C. S. Wu, Ed. Nova York: Dekker, 1995; *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*, C. S. Wu, Ed. San Diego: Academic Press, 1999.

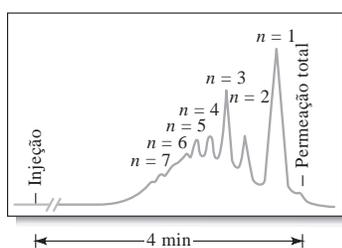


Figura 32-15 Separação dos componentes de uma resina epóxi por permeação em gel. (Cortesia da BTR Separations, uma afiliada da DuPont ConAgra.)

massas moleculares de polímeros de cadeia longa ou de produtos naturais. A chave para essas determinações está na calibração exata da massa molecular. As calibrações podem ser realizadas pelo uso de padrões de massa molecular conhecida (método da posição do pico) ou pelo “método universal de calibração”. Esse último está baseado no princípio de que o produto da viscosidade molecular intrínseca η e a massa molecular M é proporcional ao volume hidrodinâmico (volume efetivo, incluindo a camada de solvatação). Idealmente, as moléculas são separadas por cromatografia por exclusão por tamanho de acordo com o volume hidrodinâmico. Portanto, uma curva de calibração universal pode ser obtida plotando-se um gráfico $\log [\eta M]$ versus o volume de retenção, V_r , em que $V_r = t_r \times F$. Alternativamente, uma calibração pode ser realizada empregando-se um detector sensível à massa molar como o detector de espalhamento de luz a baixo ângulo.

O Destaque 32-2 ilustra como a cromatografia por exclusão por tamanho pode ser empregada na separação de fulerenos.

DESTAQUE 32-2

Buckyballs: A Separação Cromatográfica de Fulerenos

Nossas idéias a cerca da natureza da matéria são com frequência profundamente influenciadas por descobertas feitas ao acaso. Nenhum evento de memória recente tomou a imaginação dos cientistas e do público tanto quanto a descoberta inesperada em 1985 da molécula C_{60} , em forma de bola de futebol. Essa molécula, ilustrada na Figura 32D-3, a sua prima C_{70} e outras moléculas similares descobertas desde 1985 são denominadas *fulerenos* ou, mais comumente, *buckyballs*.¹² Os compostos são assim chamados em consideração a um famoso arquiteto, R. Buckminster Fuller, que projetou muitos edifícios com cúpulas geodésicas apresentando a mesma estrutura hexagonal/pentagonal como os *buckyballs*. Desde a sua descoberta, milhares de grupos de pesquisa em todo o mundo têm estudado várias propriedades físicas e químicas dessas moléculas muito estáveis. Elas representam uma terceira forma alotrópica do carbono, além do grafite e do diamante.

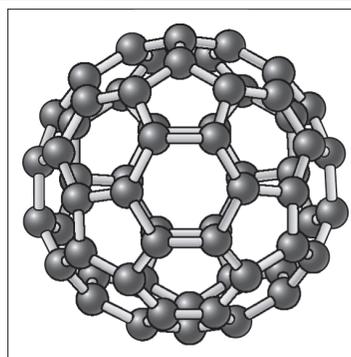


Figura 32D-3 Buckminster fullereno, C_{60} .

A preparação das *buckyballs* é quase trivial. Quando um arco *ca* é formado entre dois eletrodos de carbono em um fluxo de atmosfera de hélio, a fuligem coletada é rica em C_{60} e C_{70} . Embora a preparação seja simples, a separação e a purificação de mais do que poucos miligramas de C_{60} mostram-se demoradas e de alto custo. Quantidades relativamente grandes de *buckyballs* têm

¹²R. F. Curl e R. E. Smalley, *Sci. Am.*, 1991, v. 265 n. 4, p. 54.

sido separadas por cromatografia por exclusão por tamanho.¹³ Os fulerenos são extraídos da fuligem, preparada como descrito anteriormente, e injetados em uma coluna de 199 mm × 30 cm, 500 Å Ultrastyrigel (Waters Corp., Milford, MA), empregando-se o tolueno como fase móvel e detecção

ultravioleta/visível, após a separação. Um cromatograma típico é mostrado na Figura 32D-4. Os picos no cromatograma estão rotulados com suas identificações e tempos de retenção.

Observe que o C₆₀ elui antes do C₇₀ e dos fulerenos superiores. Isso vai contra o esperado; a

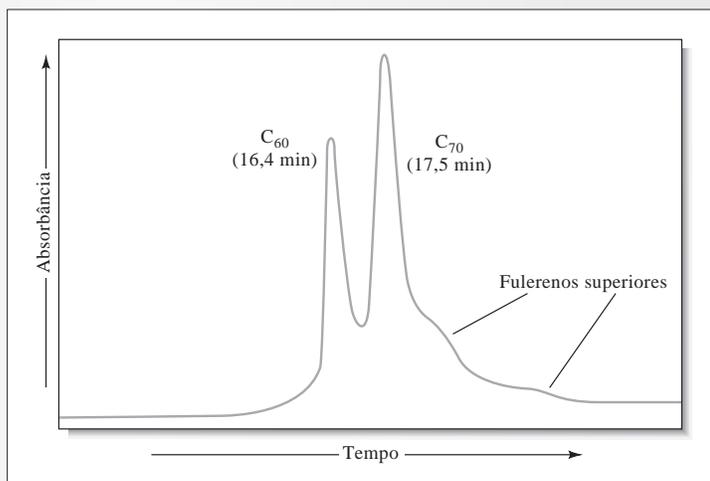


Figura 32D-4 Separação de fulerenos.

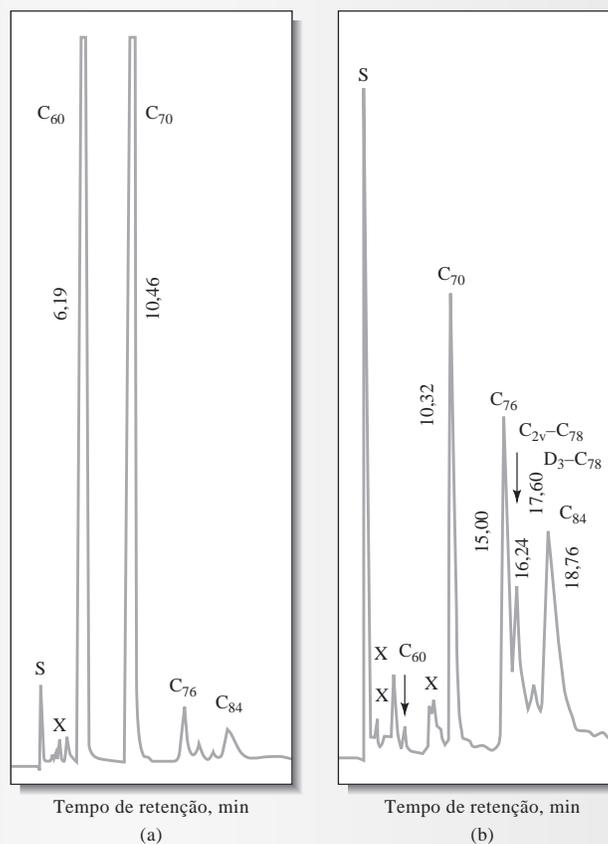


Figura 32D-5 Cromatogramas do extrato total de fuligem (a) e da fração contendo os fulerenos superiores (b) obtidos com uma coluna polimérica ODS e com fase móvel constituída de acetonitrila:tolueno. (Reproduzido com permissão de F. Diederich e R. L. Whetten, *Acc. Chem. Res.*, 1995, v. 25, p. 121. Copyright da American Chemical Society.)

(continua)

¹³M. S. Meier e J. P. Selegue, *J. Org. Chem.*, 1992, v. 57, p. 1924; A. Gugel e K. Mullen, *J. Chromatogr.*, 1993, v. 628, p. 23.

molécula menor, C_{60} , deveria ser retida mais intensamente que a C_{70} e os fulerenos superiores. Tem sido sugerido que a interação entre as moléculas, o soluto e o gel acontece na superfície deste em vez de ocorrer nos poros. Uma vez que o C_{70} e os fulerenos superiores apresentam áreas superficiais maiores que o C_{60} , os fulerenos superiores são retidos mais fortemente na superfície do gel e, assim, são eluídos após o C_{60} . Com um instrumento automático, esse método de separação pode ser empregado na preparação de vários gramas de C_{60} com pureza igual a 99,8% a partir de 5 a 10 g de uma mistura de C_{60} a C_{70} em um período de 24 horas. Essas quantidades de C_{60} podem ser então usadas para estudar a química e

a física de derivados dessas formas do carbono interessantes e raras.

Atualmente, tem-se empregado extensivamente a fase estacionária ligada de sílica octadecil (SOD) na separação de fulerenos por CLAE.¹⁴ As fases monoméricas e poliméricas SOD têm sido empregadas, produzindo maior seletividade quando comparada a outras fases. A Figura 32D-5 mostra uma separação preparativa a partir do extrato total de fuligem e da fração contendo os fulerenos superiores em uma coluna de SOD polimérica. Essas estão entre as primeiras separações dos fulerenos superiores individuais. Observe a excelente resolução quando comparada com a separação por exclusão por tamanho da Figura 32D-4.

32F CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE

A cromatografia por afinidade envolve a ligação covalente de um reagente denominado **ligante de afinidade** a um suporte sólido.¹⁵ Os ligantes de afinidade típicos são anticorpos, inibidores enzimáticos ou outras moléculas que se ligam reversivamente e seletivamente com as moléculas do analito na amostra. Quando uma amostra passa através da coluna, somente as moléculas que se ligam seletivamente ao ligante de afinidade são retidas. As moléculas que não se ligam passam pela coluna juntamente com a fase móvel. Após a remoção das moléculas indesejadas, os analitos retidos podem ser eluídos alterando-se as condições da fase móvel.

A fase estacionária para a cromatografia por afinidade é um sólido como a agarose ou microesferas de vidro poroso no qual o ligante de afinidade é imobilizado. A fase móvel em cromatografia por afinidade desempenha dois papéis distintos. Primeiro, ela deve permitir uma forte ligação das moléculas do analito com o ligante. Segundo, uma vez que as espécies indesejáveis tenham sido removidas, a fase móvel deve enfraquecer ou eliminar a interação entre o analito e o ligante de forma que o analito possa ser eluído. Geralmente as alterações no pH ou na força iônica são empregadas para se alterar as condições de eluição durante os dois estágios do processo.

A cromatografia por afinidade apresenta uma extraordinária seletividade como sua vantagem principal. O seu principal uso é no isolamento de biomoléculas durante a etapa preparativa.

32G CROMATOGRAFIA QUIRAL

Um avanço enorme tem sido realizado nos últimos anos em relação à separação de compostos que são imagens especulares não-sobreponíveis um do outro, os chamados **compostos quirais**. Essas imagens especulares são denominadas **enantiômeros**. Os aditivos na fase móvel ou fases estacionárias quirais são requeridos para essas separações.¹⁶ A complexação preferencial entre o agente de resolução quiral (aditivo ou fase estacionária) e um dos isômeros resulta na separação dos enantiômeros. O **agente de resolução quiral** deve apresentar por si um caráter quiral para reconhecer a natureza quiral do soluto.

¹⁴ K. Jinno, H. Ohta e Y. Sato, in *Separation of Fullerenes by Liquid Chromatography*, K. Jinno, Ed. Ch. 3. Londres: Royal Society of Chemistry, 1999.

¹⁵ Para detalhes sobre a cromatografia por afinidade, ver R. R. Walton, *Anal. Chem.*, 1985, v. 57, p. 1097A; *Handbook of Affinity Chromatography*, T. Kline, Ed. Nova York: Dekker, 1993; *Analytical Affinity Chromatography*, I. M. Chaiken, Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1987.

¹⁶ *Chiral Separations: Applications and Technology*, S. Ahuja, Ed. Washington: American Chemical Society, 1996; S. Ahuja, *Chiral Separations by Chromatography*, Nova York: Oxford University Press, 2000.

As fases estacionárias quirais têm recebido maior atenção.¹⁷ Nesse caso, um agente quiral é imobilizado sobre a superfície de um suporte sólido. Várias formas diferentes de interação podem ocorrer entre o agente de resolução quiral e o soluto.¹⁸ Em uma das formas, a interação dá-se em virtude de forças de atração como aquelas existentes entre as ligações π , ligações de hidrogênio ou dipolos. Em outro tipo, o soluto pode se ajustar em cavidades quirais na fase estacionária para formar complexos de inclusão. Não importando como, a habilidade de separar esses compostos muito semelhantes entre si é de extrema importância em muitas áreas. A Figura 32-16 mostra a separação de uma mistura racêmica de um éster em uma fase estacionária quiral. Observe a excelente resolução obtida para os enantiômeros *R* e *S*.

Um agente de resolução quiral é um aditivo da fase móvel ou uma fase estacionária quiral que complexa preferencialmente um dos enantiômeros.

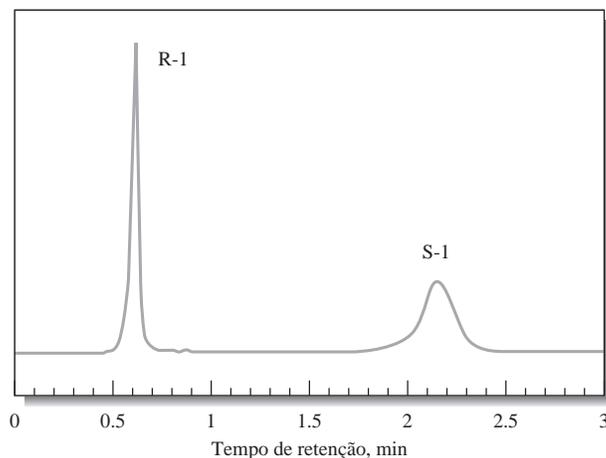


Figura 32-16 Cromatograma de uma mistura racêmica de éster **1** de N-(1-Naftil)leucina em uma fase estacionária quiral de dinitrobenzeno-leucina. Os enantiômeros *R* e *S* são muito bem separados. Coluna: 4,6 × 50 mm; fase móvel, 20% 2-propanol em hexano; vazão: 1,2 mL/min; detector UV a 254 nm. (Reproduzido com permissão de L. H. Bluhm, Y. Wang e T. Li, *Anal. Chem.*, 2000, v. 72, p. 5201. Copyright da American Chemical Society.)

32H COMPARAÇÃO ENTRE A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E A CROMATOGRAFIA GASOSA

A Tabela 32-3 fornece uma comparação entre a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia gás-líquido. Quando ambas podem ser aplicadas, a cromatografia gás-líquido oferece a vantagem da velocidade e simplicidade do equipamento. Por outro lado, a cromatografia líquida de alta eficiência pode ser aplicada a substâncias não-voláteis (incluindo os íons inorgânicos) e a materiais termicamente instáveis, enquanto a cromatografia gás-líquido não pode. Geralmente os dois métodos são complementares.

TABELA 32-3

Comparação entre a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a Cromatografia Gás-Líquido

Características de ambos os métodos

- Eficientes, altamente seletivos, amplamente aplicados
- Necessitam de uma pequena quantidade de amostra
- Podem ser não destrutivos da amostra
- Prontamente adaptados à análise quantitativa

Vantagens da CLAE

- Pode separar compostos não-voláteis e termicamente instáveis
- Pode ser aplicada de forma geral a íons inorgânicos

Vantagens da CG

- Equipamento simples e de baixo custo
- Rápida
- Resolução incomparável (com colunas capilares)
- Fácil de ser interfaceada a espectrômetros de massas

¹⁷ Para uma revisão atual sobre as fases estacionárias quirais, ver D. W. Armstrong e B. Zhang, *Anal. Chem.*, 2001, v. 73, p. 557A.

¹⁸ Para uma revisão sobre as interações quirais, ver M. C. Ringo e C. E. Evans, *Anal. Chem.*, 1998, v. 70, p. 315A.

EXERCÍCIOS NA WEB

XXXXXXXXXXXX
 XXXXXXXXXXXX
 XXXXXXXXXXXX

Conecte-se a <http://chemistry.brookscole.com/skoogfac/>. A partir do menu das Chapter Resources, selecione *Web Works* e localize a seção do Capítulo 32. Encontre a conexão com a revista LC-GC. A partir da página inicial da LC-GC, procure por artigos sobre LC/MS. Encontre um artigo, escrito em 2001, que compare os analisadores de massas para aplicações de LC/MS. Quais são as fontes de ionização mais empregadas para LC/MS? Descreva as diferenças na faixa de massas e na resolução entre os analisadores de massas do tipo quadrupolo, tempo de vóo e aprisionamento de íons (transformada de Fourier). Esses analisadores mostram diferenças com relação ao uso em análises qualitativas e quantitativas?

QUESTÕES E PROBLEMAS

- 32-1.** Liste os tipos de substâncias para as quais os seguintes métodos cromatográficos são mais adequados
- *(a) gás-líquido.
 - (b) partição em líquido.
 - *(c) troca iônica.
 - (d) adsorção em líquido.
 - *(e) permeação em gel.
 - (f) filtração em gel.
 - *(g) gás-sólido.
- 32-2.** Defina
- *(a) eluição isocrática.
 - (b) eluição por gradiente.
 - *(c) injeção com parada de fluxo.
 - (d) recheio de fase reversa.
 - *(e) recheio de fase normal.
 - (f) cromatografia por pares de íons.
 - *(g) cromatografia de íons.
 - (h) coluna supressora do eluente.
 - *(i) filtração em gel.
 - (j) permeação em gel.
- 32-3.** Indique a ordem pela qual os seguintes compostos deverão ser eluídos de uma coluna de CLAE contendo um recheio de fase reversa:
- *(a) benzeno, éter dietílico, *n*-hexano.
 - (b) acetona, dicloroetano, acetamida.
- 32-4.** Indique a ordem de eluição para os seguintes compostos e uma coluna de fase normal de CLAE:
- *(a) acetato de etila, ácido acético, dimetilamina.
 - (b) propileno, hexano, benzeno, diclorobenzeno.
- *32-5.** Descreva a diferença fundamental entre as cromatografias por adsorção e por partição.
- 32-6.** Descreva a diferença fundamental entre as cromatografias por troca iônica e por exclusão por tamanho.
- *32-7.** Descreva a diferença entre as cromatografias por permeação em gel e por filtração em gel.
- 32-8.** Quais espécies podem ser separadas por CLAE, mas não podem ser separadas por CG?
- *32-9.** Descreva os diversos tipos de bombas empregados em cromatografia líquida de alta eficiência. Quais são as vantagens e desvantagens de cada um?
- 32-10.** Descreva as diferenças entre as cromatografias de íons de coluna única e com coluna de supressão.
- *32-11.** A espectrometria de massas constitui um sistema de detecção extremamente versátil para a cromatografia gasosa. Contudo, o interfaceamento de um sistema CLAE com um espectrômetro de massas é uma tarefa muito mais difícil. Descreva as razões principais pelas quais é mais difícil combinar a CLAE com a espectrometria de massas do que a CG com a espectrometria de massas.
- 32-12.** Quais detectores para CG listados na Tabela 31-1 são adequados para a CLAE? Por que alguns deles são inadequados para a CLAE?
- *32-13.** O detector ideal para CG é descrito na Seção 31A-4. Quais das oito características de um detector ideal para CG se aplicam aos detectores para a CLAE? Que características adicionais deveriam ser adicionadas para descrever um detector ideal para a CLAE?
- 32-14.** Embora a temperatura não exerça um grande efeito sobre as separações em CLAE como em CG, ela também pode exercer um papel importante. Discuta como a temperatura pode ou não influenciar as seguintes separações:
- (a) uma separação de esteróides por cromatografia de fase reversa.

(b) uma separação de uma mistura de isômeros bastante semelhantes por cromatografia por adsorção.

***32-15.** Em uma separação por CLAE, dois componentes apresentam tempos de retenção que diferem por 15 s. O primeiro pico elui após 9,0 min e as larguras dos picos são aproximadamente iguais. O tempo morto t_M é de 65 s. Empregue uma planilha de cálculo para encontrar o número mínimo de pratos teóricos necessário para obter os seguintes valores de resolução, R_s : 0,50; 0,75; 0,90; 1,0; 1,10; 1,25; 1,50; 1,75; 2,0; 2,5. Como os resultados iriam ser alterados se a largura do pico 2 fosse duas vezes a do pico 1?

32-16. Um método de CLAE foi desenvolvido para a separação e determinação de ibuprofen em amostras de plasma de rato como parte de um estudo do tempo de permanência da droga em animais de laboratório. Vários padrões foram cromatografados e os seguintes resultados obtidos:

Concentração de Ibuprofen $\mu\text{g/mL}$	Área Relativa do Pico
0,5	5,0
1,0	10,1
2,0	17,2
3,0	19,8
6,0	39,7
8,0	57,3
10,0	66,9
15,0	95,3

Depois, uma amostra de 10 mg/kg de ibuprofen foi administrada por via oral a um rato de laboratório. As amostras de sangue foram retiradas a vários intervalos de tempo após a administração da droga e analisadas por CLAE. Os seguintes resultados foram obtidos:

Tempo, h	Área do Pico
0	0
0,5	91,3
1,0	80,2
1,5	52,1
2,0	38,5
3,0	24,2
4,0	21,2
6,0	18,5
8,0	15,2

Encontre a concentração de ibuprofen no plasma sanguíneo para cada intervalo de tempo e faça um gráfico da concentração *versus* tempo. Em bases percentuais, em qual período de meia hora (1^o, 2^o, 3^o etc.) a maior parte do ibuprofen é perdida?

32-17. Problema Desafiador. Suponha por simplicidade que a altura de prato em CLAE, H , possa ser dada pela Equação 30-27 como

$$H = \frac{B}{u} + C_E u + C_M u = \frac{B}{u} + C u$$

em que $C = C_E + C_M$.

(a) Empregando-se os cálculos para encontrar o valor mínimo para H , mostre que a velocidade $u_{ót}$ pode ser expressa como

$$u_{ót} = \sqrt{\frac{B}{C}}$$

(b) Mostre que isso leva a um valor mínimo da altura de prato H_{\min} , dado por

$$H_{\min} = 2\sqrt{BC}$$

(c) Sob certas condições cromatográficas, C_E é desprezível quando comparado com C_M . Para as colunas recheadas de CL, C_M é dado por

$$C_M = \frac{\omega d_p^2}{D_M}$$

em que ω é uma constante adimensional, d_p é o tamanho das partículas do recheio da coluna e D_M é o coeficiente de difusão na fase móvel. O coeficiente B pode ser expresso como

$$B = 2\gamma D_M$$

em que γ é também uma constante adimensional. Expresse $u_{ót}$ e H_{\min} em termos de D_M , d_p e das constantes adimensionais γ e ω .

(d) Se as constantes adimensionais forem próximas da unidade, mostre que $u_{ót}$ e H_{\min} podem ser expressos como

$$u_{ót} \approx \frac{D_M}{d_p} \quad \text{e} \quad H_{\min} \approx d_p$$

(e) A partir das condições na parte (d), como a altura de prato poderia ser reduzida de um terço? O que aconteceria com a velocidade ótima sob essas condições? O que aconteceria com o número de pratos teóricos N para o mesmo comprimento da coluna?

(f) Para as condições na parte (e), como você manteria o mesmo número de pratos teóricos mesmo reduzindo sua altura de um terço?

(g) A discussão anterior assume que o alargamento de banda ocorre dentro da coluna. Indique duas fontes de alargamento de banda extracoluna que podem contribuir também para a largura total dos picos em CL.

CAPÍTULO 33

Outros Métodos de Separação

A eletroforese capilar (EC) tem assumido um papel de importância crescente na identificação forense de DNA. No desastre do World Trade Center, os materiais coletados no local foram transportados em comboios e embarcados para Fresh Lills Landfill no centro de Staten Island. Os restos mortais humanos foram então separados e utilizados na aquisição de provas de DNA. A eletroforese capilar foi a ferramenta mais empregada no processo de identificação. A EC é particularmente útil quando se dispõe de uma pequena quantidade de amostra e quando as amostras podem ter sido degradadas com o tempo. A EC tem sido usada para a identificação de DNA em ossos, sangue, sêmen, saliva e cabelo.

Este capítulo trata de diversos métodos de separação que não podem ser classificados diretamente, incluindo a cromatografia supercrítica, a cromatografia em papel, a eletroforese capilar e o fracionamento por campo e fluxo. O uso de EC para seqüenciamento de DNA é o assunto de destaque na seção de eletroforese deste capítulo.

Neste capítulo, discutiremos vários outros métodos para realizar as separações analíticas: cromatografia supercrítica, cromatografia em camada delgada, cromatografia em papel, eletroforese capilar e fracionamento por campo e fluxo.

33A CROMATOGRAFIA SUPERCRÍTICA

Um **fluido supercrítico** é um estado físico de uma substância mantida acima de sua temperatura crítica.

A cromatografia supercrítica (CS), na qual a fase móvel é um fluido supercrítico, é uma técnica híbrida entre a cromatografia gasosa e líquida que combina algumas das melhores características de cada uma delas. Para certas aplicações, ela parece ser claramente superior a ambas, a cromatografia gás-líquido e a cromatografia líquida de alta eficiência.¹

33A-1 Propriedades Importantes dos Fluidos Supercríticos

A **temperatura crítica** é aquela acima da qual uma substância não pode ser liquefeita.

Um **fluido supercrítico** é formado sempre que uma substância é aquecida acima da sua **temperatura crítica**. Acima dessa temperatura, a substância não pode mais ser condensada como um líquido aumentando-se simplesmente a sua pressão. Por exemplo, o dióxido de carbono é

¹ T. L. Chester e J. D. Pinkston, *Anal. Chem.*, 2002, v. 74, p. 2901; T. L. Chester e J. D. Pinkston, *Anal. Chem.*, 2000, v. 72, p. 129R; T. L. Chester, J. D. Pinkston e D. B. Raynie, *Anal. Chem.*, 1998, v. 70, p. 301R; K. Anton e C. Berger, Eds., *Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns. Techniques and Applications*. Nova York: Dekker, 1998; M. Caude e D. Thiebaut, Eds., *Practical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*. Amsterdã: Harwood, 2000.

TABELA 33-1

Comparação das Propriedades dos Fluidos Supercríticos, Líquidos e Gases*			
Propriedade	Gás (STP)	Fluido Supercrítico	Líquido
Densidade, g/cm ³	$(0,6-2) \times 10^{-3}$	0,2 – 0,5	0,6 – 2
Coefficiente de difusão cm ² s ⁻¹	$(1-4) \times 10^{-1}$	$10^{-3} - 10^{-4}$	$(0,2-2) \times 10^{-5}$
Viscosidade, g cm ⁻¹ s ⁻¹	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(0,2-3) \times 10^{-2}$

*Dados somente em ordem de grandeza.

um fluido supercrítico a temperaturas acima de 31 °C. Nesse estado, as moléculas do dióxido de carbono atuam independentemente umas das outras, assim como fazem em um gás.

Como mostrado na Tabela 33-1, as propriedades de um fluido supercrítico podem ser radicalmente diferentes das propriedades tanto daquelas do estado líquido como do gasoso. Por exemplo, a densidade do fluido supercrítico é tipicamente 200 a 400 vezes maior que a do gás correspondente aproximando-se daquela do estado líquido. As propriedades comparadas na Tabela 33-1 são aquelas importantes para as cromatografias gasosa, líquida e supercrítica.

Uma importante propriedade dos fluidos supercríticos relacionada com a sua alta densidade (0,2 a 0,5 g/cm³) é a sua habilidade de dissolver moléculas grandes não-voláteis. Por exemplo, o dióxido de carbono dissolve prontamente *n*-alcanos contendo entre 5 e 22 átomos de carbono, di-*n*-alquilftalatos nos quais os grupos alquila contêm entre 4 e 16 átomos de carbonos e vários hidrocarbonetos policíclicos aromáticos constituídos por vários anéis.²

As temperaturas críticas para os fluidos empregados em cromatografia variam amplamente, de cerca de 30 °C até maiores que 200 °C. As temperaturas críticas mais baixas são vantajosas em cromatografia sob muitos pontos de vista. Por essa razão, a maioria dos trabalhos até o momento é focalizada nos fluidos supercríticos mostrados na Tabela 33-2. Observe que essas temperaturas e as pressões a essas temperaturas situam-se bem dentro das condições usuais da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

◀ A densidade de um fluido supercrítico é de cerca de 200 a 400 vezes aquela do seu estado gasoso e próxima à do seu estado líquido.

◀ Os fluidos supercríticos tendem a dissolver as moléculas grandes não-voláteis.

33A-2 Instrumentação e Variáveis Operacionais

Os instrumentos para a cromatografia supercrítica são similares aos cromatógrafos líquidos de alta eficiência, exceto que em CS a pressão da coluna é medida e controlada. Muitos fabricantes iniciaram a comercialização de instrumentos para a cromatografia supercrítica em meados dos anos 1980.³

TABELA 33-2

Propriedades de Alguns Fluidos Supercríticos				
Fluido	Temperatura Crítica, °C	Pressão Crítica, atm	Densidade no Ponto Crítico, g/mL	Densidade a 400 atm, g/mL
CO ₂	31,3	72,9	0,47	0,96
N ₂ O	36,5	71,7	0,45	0,94
NH ₃	132,5	112,5	0,24	0,40
<i>n</i> -Butano	152,0	37,5	0,23	0,50

Reproduzido com permissão de M. L. Lee e K. E. Markides, *Science*, 1987, v. 235, p. 1345. Copyright American Association for the Advancement of Science. Dados obtidos de *Matheson Gas Data Book and CRC Handbook of Chemistry and Physics*.

² Alguns processos industriais importantes são baseados na alta solubilidade de espécies orgânicas em dióxido de carbono supercrítico. Por exemplo, esse meio tem sido empregado para extrair a cafeína de grãos de café para produzir café descafeinado e para extrair a nicotina de tabaco de cigarros.

³ Para uma descrição de vários instrumentos comerciais de CS, ver F. Wach, *Anal. Chem.*, 1994, v. 66, p. 369A; B. Erikson, *Anal. Chem.*, 1997, v. 69, p. 683A.

O Efeito da Pressão

A densidade de um fluido supercrítico aumenta rapidamente e de forma não-linear com a elevação da pressão. O aumento da densidade altera também os fatores de retenção (k) e, assim, os tempos de eluição. Por exemplo, o tempo de eluição para o hexadecano decresce de 25 para 5 min quando a pressão do dióxido de carbono aumenta de 70 a 90 atm. Um efeito similar ao da programação da temperatura na cromatografia gasosa e eluição por gradiente em CLAE pode ser obtido elevando-se linearmente a pressão da

▶ A eluição por gradiente pode ser obtida em CS alterando-se sistematicamente a pressão da coluna ou a densidade do fluido supercrítico.

coluna ou regulando-se a pressão para se obter um aumento linear da densidade. A Figura 33-1 ilustra a melhoria nos cromatogramas obtidos por programação de pressão. A decompressão dos fluidos à medida que eles se deslocam através da coluna pode originar variações de temperatura que podem afetar as separações e as medidas termodinâmicas.

Colunas

As colunas recheadas e tubulares abertas são empregadas em cromatografia supercrítica. As colunas recheadas podem fornecer um número maior de pratos teóricos e manipular volumes grandes de amostras que as colunas tubulares abertas. Por causa da baixa viscosidade do meio supercrítico, os comprimentos das colunas podem ser muito maiores que aqueles empregados em cromatografia líquida. As colunas com comprimentos de 10 a 20 m com diâmetro interno de 50 a 100 μm são comuns. Para as separações mais

▶ As colunas muito longas podem ser usadas em CS porque a viscosidade dos fluidos supercríticos é muito baixa.

difíceis, as colunas com 60 m de comprimento ou mais longas têm sido utilizadas. As colunas recheadas podem ter acima de 100.000 pratos. As tubulares abertas são similares às colunas de sílica fundida tubulares abertas (FSOT) descritas na página 959.

A maior parte dos recobrimentos empregados em cromatografia líquida tem sido também utilizada em cromatografia supercrítica. Tipicamente, estes são constituídos de polisilanos (ver Seção 31B-3) que são ligados quimicamente à superfície das partículas de sílica ou na parede interna de sílica dos tubos capilares. A espessura dos filmes é de 0,05 a 0,4 μm .

Fases Móveis

A fase móvel mais empregada em cromatografia supercrítica é o dióxido de carbono. Este é um excelente solvente para uma grande variedade de moléculas orgânicas não-polares. Além disso, transmite na região do ultravioleta e é inodoro, não-tóxico, acessível e de custo notavelmente baixo em relação a outros sol-

Amostra: 1. octanato de colesterol
2. decilato de colesterol
3. laurato de colesterol
4. miristato de colesterol
5. palmitato de colesterol
6. estearato de colesterol

Coluna: DB-1
Fase móvel: CO_2
Temperatura: 90 °C
Detector: DIC

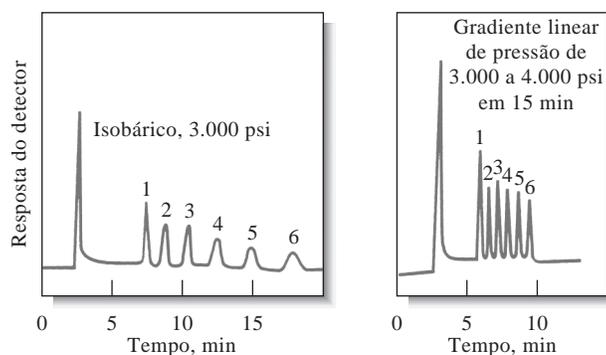


Figura 33-1 O efeito da programação de pressão em cromatografia supercrítica. Observe o menor tempo para o cromatograma com gradiente de pressão à direita em comparação com o cromatograma isobárico à esquerda. (Cortesia de Brownlee Labs., Santa Clara, CA.)

ventes cromatográficos. Sua temperatura crítica de 31 °C e sua pressão de 73 atm à temperatura crítica permitem ampla seleção de temperaturas e pressões sem que se exceda os limites operacionais dos equipamentos modernos de cromatografia de alta eficiência. Em algumas aplicações, os modificadores orgânicos polares, como o metanol, são introduzidos a baixas concentrações ($\approx 1\%$) para modificar os valores de alfa dos analitos.

Inúmeras outras substâncias têm sido empregadas como fases móveis em cromatografia supercrítica, incluindo o metano, o pentano, o diclorodifluorometano, o dietil éter e o tetraidrofurano.

Detectores

A maior vantagem da cromatografia supercrítica está no fato de que os detectores universais da cromatografia gás-líquido podem ser usados com essa técnica. Por exemplo, o conveniente detector de ionização em chama da cromatografia gás-líquido pode ser aplicado simplesmente permitindo que o fluido supercrítico de arraste se expanda através de um constritor e daí para uma chama ar-hidrogênio, na qual os íons são formados a partir dos analitos e coletados pelos eletrodos polarizados, gerando uma corrente elétrica.

33A-3 Cromatografia Supercrítica versus Outros Métodos de Coluna

A informação na Tabela 33-1, bem como outros dados, revela que várias propriedades dos fluidos supercríticos são intermediárias entre as propriedades dos gases e dos líquidos. Em consequência, esse novo tipo de cromatografia combina algumas das características de ambas as cromatografias gasosa e líquida. Assim, como na cromatografia gasosa, a cromatografia supercrítica é inerentemente mais rápida que a cromatografia líquida por causa da baixa viscosidade e das altas velocidades de difusão na fase móvel. Contudo, a alta difusibilidade leva ao espalhamento longitudinal da banda, que é um fator significativo para a cromatografia gasosa, mas não o é para a cromatografia líquida. Dessa forma, as difusibilidades e viscosidades intermediárias dos fluidos supercríticos resultam em separações mais rápidas do que podem ser obtidas com cromatografia líquida, as quais são acompanhadas por menor espalhamento de zona que o encontrado em cromatografia gasosa.

A Figura 33-2 mostra o comportamento das alturas de prato H em função da velocidade linear \bar{u} em cm/s para as cromatografias líquida de alta eficiência e supercrítica. Em ambos os casos, o soluto era constituído por pireno e a fase estacionária era uma fase reversa de actadecil silano mantida a 40 °C. A fase móvel para a CLAE era a acetonitrila e água, enquanto a fase móvel para a CS era o dióxido de carbono. Essas

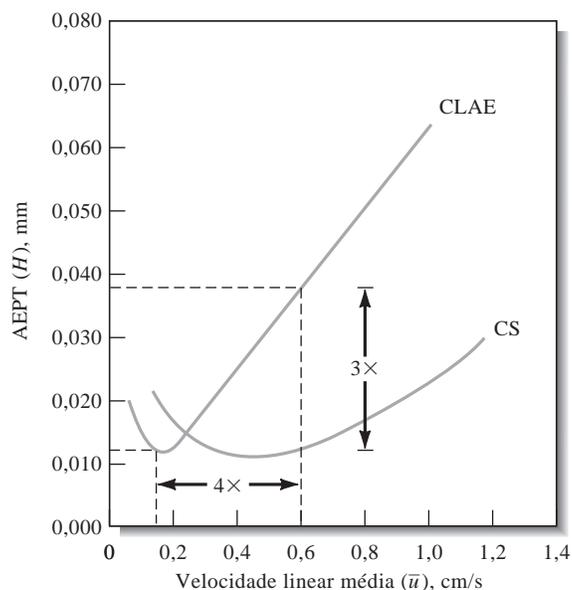
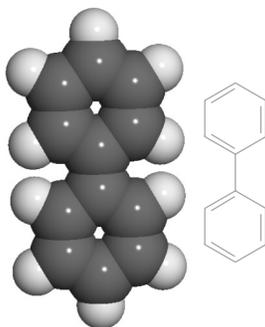


Figura 33-2 Características de desempenho de uma coluna de 5 μm de ODS quando a eluição é feita por uma fase móvel convencional (CLAE) e por dióxido de carbono supercrítico (DCS). (De D. R. Gere, *Application Note 800-3*. Hewlett-Packard Corp., Palo Alto, CA, 1983.)



Modelo molecular da estrutura da bifênila, um hidrocarboneto aromático perigoso. Este composto é utilizado como intermediário na produção de emulsificadores, polidores, plásticos e muitos outros compostos. A bifênila tem sido usada como meio de transferência de calor em fluidos de aquecimento, como carga de corantes em têxteis e papel de copiadora e como solvente em preparações farmacêuticas. Um papel impregnado com bifênila é empregado para embalar frutas cítricas de forma a reduzir o ataque por fungos. A exposição a esse composto por curtos intervalos de tempo causa irritação nos olhos e na pele e efeitos tóxicos sobre o fígado, rins e sistema nervoso. A exposição por longos períodos causou danos aos rins em animais de laboratório e pode afetar o sistema nervoso central em seres humanos.

condições forneceram aproximadamente o mesmo fator de retenção (k) para ambas as fases móveis. Observe que o mínimo de altura de prato ocorreu a velocidades lineares de 0,13 cm/s com CLAE e 0,40 cm/s com a CS. A conseqüência dessas diferenças é mostrada na Figura 33-3, em que essas mesmas condições são empregadas para a separação de pireno de bifênila. Observe que a separação em CLAE necessitou mais que o dobro do tempo necessário para a separação em CS.

Apesar dessas vantagens, a CS não tem ganho ampla aceitação por causa da complexidade e do custo da instrumentação e do pequeno número de aplicações para as quais é considerada a única técnica capaz de fornecer informações. Contudo, a CS ainda ocupa um espaço importante no mundo das separações e estabelece uma conexão entre a cromatografia gasosa e a CLAE.

33A-4 Aplicações

A cromatografia supercrítica parece apresentar um nicho potencial no espectro dos métodos cromatográficos em coluna por causa da sua aplicabilidade a uma classe de compostos para a qual a cromatografia gasosa ou a cromatografia líquida não são adequadas. Esses compostos incluem as espécies que não são voláteis ou que são termicamente instáveis e que, além disso, não contêm grupos cromóforos que possam ser empregados na sua detecção fotométrica. A separação desses compostos é possível em cromatografia supercrítica

▶ A CS com detecção por ionização em chama funciona muito bem para os compostos não-voláteis ou termicamente instáveis que não apresentam grupos cromóforos para detecção fotométrica.

a temperaturas abaixo de 100 °C; além do mais, a detecção é realizada prontamente através de um detector de ionização em chama altamente sensível. É importante observar também que as colunas de CS apresentam a vantagem adicional de poderem ser mais facilmente interfaceadas aos espectrômetros de massas que as colunas de cromatografia líquida.

33B CROMATOGRAFIA PLANAR

Os métodos de cromatografia planar incluem a **cromatografia em camada delgada** (CCD), a **cromatografia em papel** (CP) e a **eletrocromatografia**. Todas elas fazem uso de uma camada relativamente fina de material que é auto-suportado ou que recobre uma superfície de vidro, plástico ou metal. A fase móvel movimenta-se através da fase estacionária por ação de capilaridade, algumas vezes assistida pela gravidade ou por um potencial elétrico. A cromatografia planar foi inicialmente denominada cromatografia bidimensional, muito embora esse termo atualmente signifique o acoplamento de duas técnicas cromatográficas com mecanismos de separação diferentes.

Atualmente, a maior parte da cromatografia planar é baseada na técnica de camada delgada que é mais rápida, apresenta uma melhor resolução e é mais sensível que a cromatografia em papel. Esta seção é dedicada aos métodos de camada delgada. A eletrocromatografia capilar é descrita na Seção 33D.

33B-1 O Escopo da Cromatografia em Camada Delgada

Em termos teóricos, os tipos de fases móveis e estacionárias e aplicações, a cromatografia em camada delgada e a líquida são muito similares. De fato, as placas de camada delgada podem ser empregadas com vantagem

no desenvolvimento das condições ótimas para a separação por cromatografia líquida em coluna. As vantagens de se empregar esse procedimento são a velocidade e o baixo custo dos experimentos exploratórios em camada delgada. Alguns cromatografistas postulam que os experimentos em camada delgada devem sempre preceder os experimentos em coluna.

A cromatografia em camada delgada tornou-se a técnica de uso geral na indústria de medicamentos para todas as determinações de pureza de produtos. Também encontra ampla utilização nos laboratórios clínicos e constitui a espinha dorsal de muitos estudos bioquímicos e biológicos. Finalmente, encontra uso extensivo nos laboratórios industriais.⁴ Em consequência dessas múltiplas áreas de aplicação, a CCD mantém-se como uma técnica muito importante

33B-2 Princípios da Cromatografia em Camada Delgada

Tipicamente, as separações em camada delgada são realizadas sobre uma placa de vidro que é recoberta com uma camada fina e aderente de partículas finamente divididas. Essa camada constitui a fase estacionária. As partículas são similares àquelas descritas na discussão sobre as cromatografias em coluna por adsorção, de partição em fase normal e reversa, troca iônica e exclusão por tamanho. As fases móveis são também similares àquelas empregadas em cromatografia líquida de alta eficiência.

Preparação das Placas de Camada Delgada

Uma placa de camada delgada é preparada pelo espalhamento de uma suspensão aquosa de um sólido finamente pulverizado sobre uma superfície de vidro ou plástico limpa ou sobre uma lâmina de microscópio. Frequentemente, um agente é incorporado à suspensão para melhorar a adesão entre as partículas e destas com o vidro. A placa permanece em descanso até que a camada seja formada e esteja fortemente aderida à superfície; para alguns usos, pode ser aquecida em um forno por várias horas. Muitos fabricantes oferecem placas pré-recobertas de diversos tipos.

Desenvolvimento da Placa

O **desenvolvimento da placa** é o processo pelo qual a amostra é arrastada através da fase estacionária pela fase móvel. Essa operação é análoga à eluição na cromatografia líquida. A forma mais comum de desenvolver uma placa é colocar uma gota da amostra próximo a uma extremidade da placa (muitas placas têm dimensões de 5×20 ou 20×20 cm) e marcar sua posição com um lápis. Após a evaporação do solvente da amostra, a placa é colocada em um recipiente saturado com vapores do solvente de desenvolvimento (desenvolvedor). Uma extremidade da placa é imersa nesse solvente tomando-se cuidado para se evitar o contato direto entre a amostra e o desenvolvedor (Figura 33-4). Depois de o desenvolvedor ter atravessado metade ou dois terços do comprimento da placa, esta é removida do recipiente e secada. As posições dos componentes são determinadas de diversas formas.

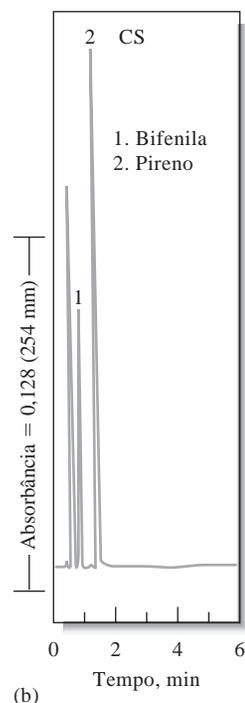
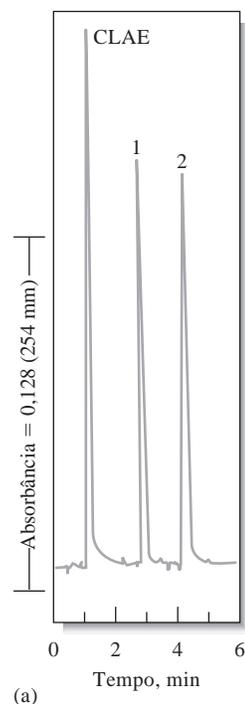
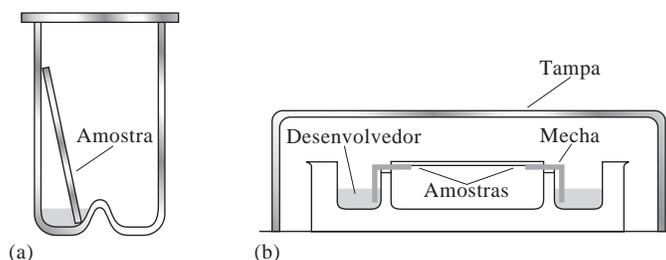


Figura 33-3 Separação de pireno e bifenil por (a) CLAE e (b) CS. (Reproduzido com permissão de D. R. Gere, *Science*, 1983, v. 222, p. 255. Copyright da American Association for the Advancement of Science.)

⁴ Duas monografias dedicadas aos princípios e aplicações da cromatografia em camada delgada são de B. Fried e J. Sherma, *Thin Layer Chromatography*, 4. ed. Nova York: Dekker, 1999; R. Hamilton e S. Hamilton, *Thin Layer Chromatography*. Nova York: Wiley, 1987. Para as revisões recentes, ver J. Sherma, *Anal. Chem.*, 2002, v. 74, p. 2653; J. Sherma, 2000, v. 72, p. 9R; C. F. Poole e S. K. Poole, *Anal. Chem.*, 1994, v. 66, p. 27A.

Figura 33-4 (a) Câmara de desenvolvimento de fluxo ascendente. (b) Câmara de desenvolvimento de fluxo horizontal na qual as amostras são colocadas em ambas as extremidades da placa e desenvolvidas para o centro, dobrando, assim, o número de amostras que podem ser processadas.



A Figura 33-5 ilustra a separação dos aminoácidos de uma mistura pelo desenvolvimento em duas direções (**cromatografia em camada delgada bidimensional**). A amostra foi colocada em um canto de uma placa quadrada, que foi desenvolvida na direção ascendente com o solvente A. Esse solvente foi então removido por evaporação e a placa foi submetida a uma rotação de 90 graus e, a seguir, foi desenvolvida com o solvente B. Após a remoção do solvente, as posições dos aminoácidos foram determinadas por aspersão com ninidrina, um reagente que forma um produto de cor entre rosa e vermelha com aminoácidos. As manchas foram identificadas por comparação de suas posições com aquelas de padrões.

Localização dos Analitos na Placa

Muitos métodos são empregados para se localizar os componentes da amostra após a separação. Dois métodos comuns que podem ser aplicados a muitas misturas orgânicas envolvem a aspersão com solução

O processo de localizar os analitos em uma placa de camada delgada é denominado **visualização** ou **revelação**.

de iodo ou ácido sulfúrico, ambos reagem com os compostos orgânicos formando produtos de cor amarela-escura. Muitos reagentes específicos (como a ninidrina) são úteis também para localizar as espécies separadas.

Outra forma de detecção é baseada na incorporação de um material fluorescente na fase estacionária. Após o desenvolvimento, a placa é examinada sob a luz ultravioleta. Os componentes da amostra suprimem a fluorescência do material de forma que toda a placa fluoresce, exceto os locais onde os componentes não-fluorescentes da amostra estão localizados.

33B-3 Cromatografia em Papel

As separações em cromatografia em papel são realizadas da mesma forma que em placas de camada delgada. Os papéis são fabricados com celulose altamente purificada, com controle rigoroso da porosidade e espessura. Esses papéis contêm água adsorvida suficiente para formar uma fase aquosa estacionária. Contudo, outros líquidos podem substituir a água fornecendo diferentes tipos de fases estacionárias. Por

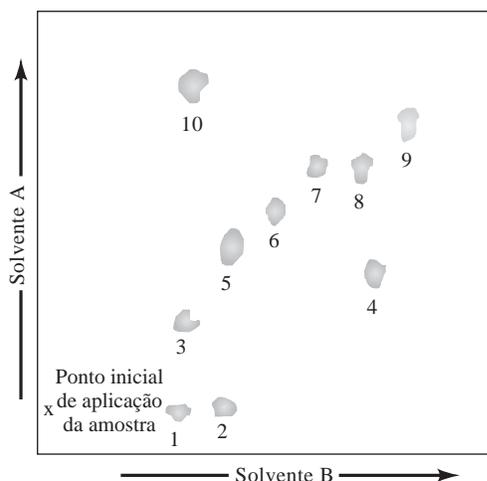


Figura 33-5 Cromatograma em camada delgada bidimensional (sílica gel) de alguns aminoácidos. Solvente A: tolueno/2-cloroetanol/piridina. Solvente B: clorofórmio/álcool benzílico/ácido acético. Aminoácidos: (1) ácido aspártico, (2) ácido glutâmico, (3) serina, (4) β -alanina, (5) glicina, (6) alanina, (7) metionina, (8) valina, (9) isoleucina e (10) cisteína.

exemplo, o papel tratado com silicone ou óleo de parafina permite a realização da cromatografia em papel de fase reversa, na qual a fase móvel é um solvente polar. Também, papéis especiais estão disponíveis comercialmente contendo um adsorvente ou uma resina trocadora de íons, possibilitando, assim, a cromatografia por adsorção e por troca iônica em papel.

33C ELETROFORESE CAPILAR⁵

A **eletroforese** é um método de separação baseado nas velocidades de migração diferenciais de espécies carregadas em um campo elétrico *cc*. Essa técnica de separação para as amostras de tamanho macro foi desenvolvida inicialmente por Arne Tiselius, um químico sueco, nos anos 1930, para o estudo de proteínas do soro sanguíneo, que ganhou o Prêmio Nobel por esse trabalho.

As separações por **eletroforese** são baseadas nas diferenças de velocidade segundo as quais as espécies com carga migram em um campo elétrico.

A eletroforese em escala macro é aplicada a uma variedade de problemas envolvendo separações analíticas difíceis: ânions e cátions inorgânicos, aminoácidos, catecolaminas, drogas, vitaminas, carboidratos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, polinucleotídeos e inúmeras outras espécies. Uma característica particular marcante da eletroforese está na sua habilidade única de separar moléculas carregadas de interesse dos bioquímicos, biólogos e químicos clínicos. Por muitos anos, a eletroforese tem sido o método mais empregado para a separação de proteínas (enzimas, hormônios, anticorpos) e ácidos nucleicos (DNA, RNA), para os quais oferece uma resolução que não encontra paralelo.⁶

Até o aparecimento da eletroforese capilar, as separações não eram realizadas em colunas, mas sim em um meio plano estabilizado como papel ou um gel poroso semi-sólido. Separações surpreendentes foram realizadas nesses meios, porém a técnica era lenta, tediosa e necessitava de uma grande habilidade do operador. No início dos anos 1980, os cientistas começaram a verificar a viabilidade de realizar as mesmas separações com microamostras em tubos capilares de sílica fundida. Seus resultados mostraram-se promissores em termos de resolução, velocidade e potencial para automação. Em consequência, a eletroforese capilar (EC) tornou-se uma ferramenta importante para a solução de ampla variedade de problemas analíticos envolvendo separações e este será o único tipo de eletroforese que vamos considerar.

33C-1 Instrumentação para a Eletroforese Capilar

Como mostrado na Figura 33-6, a instrumentação para a eletroforese capilar é simples.⁷ Um capilar de sílica fundida preenchido com um tampão, tipicamente com um diâmetro interno entre 10 e 100 μm e com comprimento de 40 a 100 cm, é estendido entre dois reservatórios de tampão que também contêm eletrodos de platina. A introdução da amostra é realizada em uma das extremidades e a detecção na outra. Um potencial de 5 a 30 kV *cc* é aplicado entre os eletrodos. A polaridade dessa alta voltagem pode ser como indicado na Figura 33-6 ou pode ser revertida para possibilitar uma separação rápida de ânions.

◀ Os instrumentos de eletroforese capilar são relativamente simples.

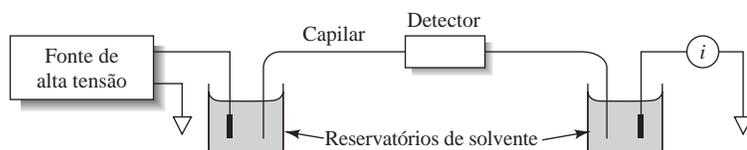


Figura 33-6 Diagrama esquemático de um sistema de eletroforese capilar de zona.

⁵ Para uma discussão suplementar sobre os princípios, instrumentação e aplicações da eletroforese capilar, ver M. G. Khaledi, Ed., *High-Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques and Applications*. Nova York: Wiley, 1998; P. Camilleri, Ed., *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1993; R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*. Nova York: Academic Press, 2000.

⁶ Ver S. Hu e N. J. Dovichi, *Anal. Chem.*, 2002, v. 74, p. 2833; S. N. Krylov e N. J. Dovichi, *Anal. Chem.*, 2000, v. 72, p. 111R.

⁷ Para uma revisão sobre os detectores comerciais disponíveis na atualidade, ver L. DeFrancesco, *Anal. Chem.*, 2001, v. 73, p. 497A.

A introdução da amostra é freqüentemente realizada por injeção sob pressão, na qual uma extremidade do capilar é inserida em um frasco contendo a amostra. O frasco é elevado por curto intervalo de tempo acima do nível do capilar para forçar a amostra para dentro do tubo. Alternativamente, vácuo pode ser aplicado no tubo, na extremidade do detector. A introdução também pode ser feita através de fluxo eletrosmótico, que será descrito na próxima seção.

Uma vez que, em muitos tipos de eletroforese, os analitos separados se movem passando por um ponto comum, os detectores são similares no desenho e na função àqueles descritos para a CLAE. A Tabela 33-3 lista os diversos métodos de detecção que têm sido relatados para a eletroforese capilar. A segunda coluna da tabela mostra os limites de detecção para esses detectores.

TABELA 33-3

Detectores para a Eletroforese Capilar	
Tipo de Detector	Limite de Detecção Representativo* (atomols detectados)
Espectrometria	
Absorção†	1–1,000
Fluorescência	1–0,01
Lentes térmicas†	10
Raman†	1000
Quimiluminescência†	1–0,0001
Espectrometria de massas	1–0,01
Eletroquímicos	
Condutividade†	100
Potenciometria†	1
Amperometria	0,1

Fontes: B. Huang, J. J. Li, L. Zhang, J. K. Cheng, *Anal. Chem.*, 1996, v. 68, p. 2366; S. C. Beale, *Anal. Chem.*, 1998, v. 70, p. 279R; S. N. Krylov e N. J. Dovichi, *Anal. Chem.*, 2000, v. 72, p. 111R; S. Hu e N. J. Dovichi, *Anal. Chem.*, 2002, v. 74, p. 2833.

*Os limites de detecção cotados foram determinados com volumes injetados de 18 pL a 10 nL.

†O limite de detecção em massa foi convertido a partir do limite de determinação em concentração empregando-se um volume de injeção de 1 nL.

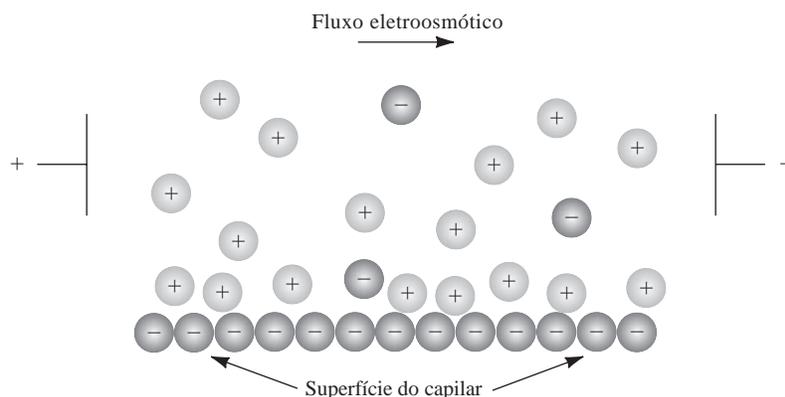


Figura 33-7 Distribuição de cargas na interface sílica/capilar e o fluxo eletrosmótico resultante. (De A. G. Ewing, R. A. Wallingford e T. M. Olefirowicz, *Anal. Chem.*, 1989, v. 61, p. 298A.)

33C-2 Fluxo Eletrosmótico

Uma característica particular da eletroforese capilar consiste no fluxo **eletrosmótico**. Quando uma alta voltagem é aplicada por meio de um capilar de sílica fundida contendo uma solução tampão, um fluxo eletrosmótico é geralmente produzido, causando uma migração do solvente em direção ao cátodo. A velocidade de migração pode ser substancial. Por exemplo, foi verificado que um tampão 50 mmol L^{-1} a pH 8 flui através de um capilar de 50 cm em direção ao cátodo a aproximadamente 5 cm/min com um potencial aplicado de 25 kV .⁸

⁸ J. D. Olechno, J. M. Y. Tso, J. Thayer e A. Wainright, *Amer. Lab.*, 1990, v. 22, n. 17, p. 51.

Como mostrado na Figura 33-7, a causa do fluxo eletrosmótico é a dupla camada elétrica que se desenvolve na interface sílica/solução. A valores de pH maiores que 3, a parede interna do capilar de sílica encontra-se carregada negativamente em virtude da ionização dos grupos silanóis (Si-OH) da sua superfície. Os cátions do tampão congregam-se em uma dupla camada elétrica adjacente à superfície negativa do capilar de sílica. Os cátions na camada difusa externa à dupla camada são atraídos para o cátodo, ou eletrodo negativo, e uma vez que estão solvatados arrastam o solvente com eles. Como pode-se observar na Figura 33-8, a eletrosmose leva a um fluxo líquido da solução com um perfil plano através do tubo porque o fluxo origina-se em suas paredes. Esse perfil contrasta com o perfil laminar (parabólico) observado em fluxos gerados por pressão encontrados na CLAE. Visto que o perfil é essencialmente plano, o fluxo eletrosmótico não contribui significativamente para o alargamento de banda, como o fluxo gerado por pressão o faz em cromatografia líquida.

A vazão do fluxo eletrosmótico é geralmente maior que a velocidade de migração eletroforética dos íons individuais e torna-se efetivamente a bomba de fase móvel da eletroforese capilar de zona. Mesmo que os analitos migrem de acordo com as suas cargas dentro do capilar, a vazão eletrosmótica é normalmente suficiente para arrastar todas as espécies positivas, neutras e mesmo negativas para a mesma extremidade do capilar, de forma que todas podem ser detectadas quando elas passam por um ponto comum (Figura 33-9). O **eletroferograma** resultante mostra-se como um cromatograma, porém com picos mais estreitos.

A eletrosmose é freqüentemente desejável em certos tipos de eletroforeses capilares, mas não o é em outros. O fluxo eletrosmótico pode ser minimizado por recobrimento da parede interna do capilar com um reagente como o trimetilclorosilano para eliminar os grupos silanóis da superfície.

◀ O perfil de um fluxo eletrosmótico é aproximadamente plano, o que minimiza o alargamento de banda.

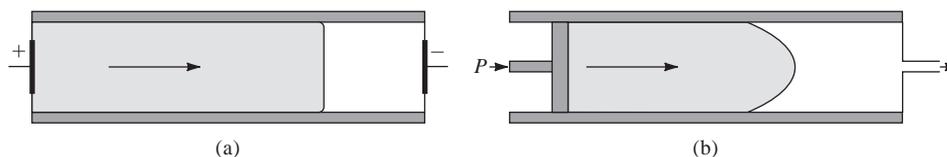


Figura 33-8 Perfis de fluxo para líquidos sob (a) fluxo eletrosmótico e (b) fluxo induzido por diferença de pressão.

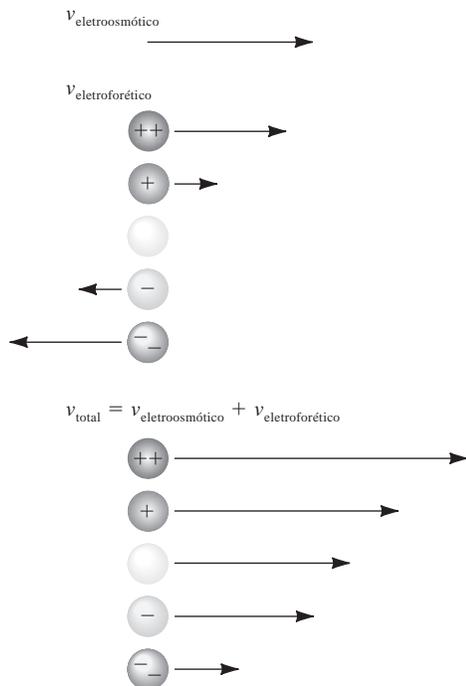


Figura 33-9 Velocidades na presença de um fluxo eletrosmótico. Os comprimentos das setas próximas aos íons indicam a grandeza de suas velocidades; a seta aponta para a direção de movimentação. O eletrodo negativo estaria à direita e o eletrodo positivo à esquerda dessa seção da solução.

33C-3 As Bases para as Separações Eletroforéticas

A velocidade de migração v de um íon em um campo elétrico é dada por

$$v = \mu_e E = \mu_e \cdot \frac{V}{L} \quad (33-1)$$

em que E é a força do campo elétrico em volts por centímetro; V , a voltagem aplicada; L , o comprimento do tubo entre os dois eletrodos; e μ_e , a **mobilidade eletroforética**, que é proporcional à carga do íon e inversamente proporcional à força de retardo por fricção sobre o íon. A força de retardo por fricção sobre um íon é determinada pelo tamanho e formato do íon e pela viscosidade do meio.

A **mobilidade eletroforética** é a razão entre a velocidade de migração de um íon e o campo elétrico aplicado.

Tem sido demonstrado que o número de pratos N de uma coluna de eletroforese capilar é dado por

$$N = \frac{\mu_e V}{2D} \quad (33-2)$$

em que D é o coeficiente de difusão do soluto (cm^2/s). Uma vez que a resolução aumenta com o número de pratos, é desejável que se aplique altas voltagens para se obter separações com uma alta resolução. Observe que, em eletroforese, ao contrário da situação em cromatografia, o número de pratos não aumenta com o comprimento da coluna.

Tipicamente, o número de pratos em eletroforese capilar é de 100.000 a 200.000 com as voltagens usuais aplicadas.

33C-4 Aplicações da Eletroforese Capilar⁹

As separações eletroforéticas são realizadas de diversas formas denominadas modos. Estes incluem a **focalização isoeletrica**, a **isotacoforese** e a **eletroforese capilar de zona (ECZ)**. Consideramos aqui somente os modos da eletroforese capilar de zona na qual a composição do tampão é constante através da região de separação. O campo aplicado leva cada um dos componentes iônicos distintos da mistura a migrar de acordo com as suas próprias mobilidades e a separar-se em zonas, as quais podem ser completamente resolvidas ou podem ser parcialmente sobrepostas. As regiões completamente resolvidas apresentam regiões de tampão entre elas. A situação é análoga à cromatografia de eluição em coluna, na qual as regiões de fase móvel estão localizadas entre as zonas contendo os analitos separados.

Separação de Íons Pequenos

Em muitas separações eletroforéticas de íons pequenos, o menor tempo de análise é obtido quando os íons do analito movem-se na mesma direção do fluxo eletroosmótico. Assim, para a separação de cátions, as paredes do capilar não são tratadas e o movimento do fluxo eletroosmótico e dos cátions se dá em direção ao cátodo. Contudo, para a separação de ânions, o fluxo eletroosmótico é geralmente revertido pelo tratamento das paredes do capilar com um sal de alquilamônio, como o brometo de trimetilamônio. Os íons amônio positivamente carregados ligam-se à superfície negativamente carregada da sílica criando uma dupla camada negativamente carregada de solução, a qual é atraída para o ânodo, revertendo o sentido do fluxo eletroosmótico.

⁹ Para revisões sobre as aplicações da eletroforese capilar e da eletrocromatografia, ver D. R. Baker, *Capillary Electrophoresis: An Introduction*. Nova York: Wiley, 1995; *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2. ed., J. P. Landers, Ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 1997; R. Weinberger, *Practical Capillary Electrophoresis*. Nova York: Academic Press, 2000; S. N. Krylov e N. J. Dovichi, *Anal. Chem.*, 2000, v. 72, p. 111R; S. Hu e N. J. Dovichi, *Anal. Chem.*, 2002, v. 74, p. 2833.

No passado, o método mais comum de análise de íons pequenos era a cromatografia por troca iônica. Para os cátions, as técnicas preferidas têm sido a espectroscopia de absorção e a espectroscopia de emissão em plasma indutivamente acoplado. Contudo, recentemente, os métodos eletroforéticos capilares têm começado a competir com esses métodos tradicionais de análise de pequenos íons. Muitas razões relevantes para a adoção dos métodos eletroforéticos têm sido reconhecidas: menor custo dos equipamentos, necessidade de menor quantidade de amostra, velocidade muito maior e melhor resolução.

O custo inicial do equipamento e de manutenção em eletroforese é em geral significativamente menor que em cromatografia líquida e espectroscopia atômica. Assim, os instrumentos eletroforéticos comerciais são vendidos na faixa de preço de US\$ 10.000 a 65.000.¹⁰

O volume das amostras em eletroforese situa-se na faixa de nanolitros, enquanto microlitros ou volumes maiores são normalmente necessários para outras técnicas de análise de íons pequenos. Assim, os métodos eletroforéticos são mais sensíveis que outros métodos em termos de massa (mas geralmente não em termos de concentração).

◀ As amostras podem ter volumes de poucos nanolitros em eletroforese capilar.

A Figura 33-10 ilustra a velocidade e resolução incomparáveis das separações eletroforéticas de ânions pequenos. Nesse caso, 30 ânions foram separados de forma completa em apenas três minutos. Tipicamente, uma separação por troca iônica de somente três ou quatro ânions poderia ser feita nesse curto intervalo de tempo. A Figura 33-11 mostra ainda mais a velocidade na qual as separações podem ser realizadas. Nesse caso, 19 cátions foram separados em menos de dois minutos.

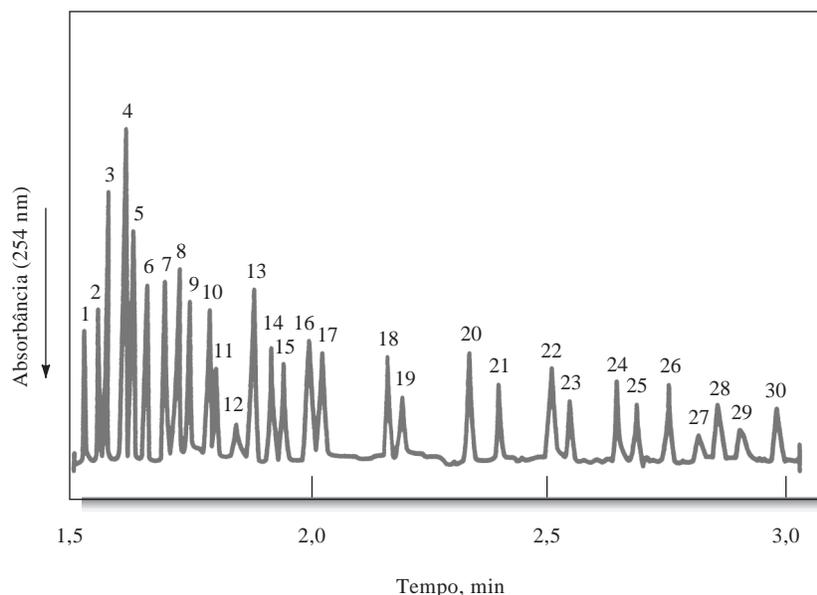


Figura 33-10 Eletroferograma mostrando a separação de 30 ânions. Diâmetro interno do capilar: 50 μm (sílica fundida). Detecção: UV indireta, 254 nm. Picos: 1 = tiosulfato (4 ppm), 2 = brometo (4 ppm), 3 = cloreto (2 ppm), 4 = sulfato (4 ppm), 5 = nitrito (4 ppm), 6 = nitrato (4 ppm), 7 = molibdato (10 ppm), 8 = azida (4 ppm), 9 = tungstato (10 ppm), 10 = monofluorofosfato (4 ppm), 11 = clorato (4 ppm), 12 = citrato (2 ppm), 13 = fluoreto (1 ppm), 14 = formiato (2 ppm), 15 = fosfato (4 ppm), 16 = fosfito (4 ppm), 17 = clorito (4 ppm), 18 = galactarato (5 ppm), 19 = carbonato (4 ppm), 20 = acetato (4 ppm), 21 = etanossulfonato (4 ppm), 22 = propionato (5 ppm), 23 = propanossulfato (4 ppm), 24 = butirato (5 ppm), 25 = butanossulfato (4 ppm), 26 = valerato (5 ppm), 27 = benzoato (4 ppm), 28 = *l*-glutamato (5 ppm), 29 = pentanossulfonato (4 ppm), 30 = *d*-gluconato (5 ppm). (Reproduzido com permissão de W. A. Jones e P. Jandik, *J. Chromatogr.*, 1991, v. 546, p. 445, com permissão da Elsevier Science.)

¹⁰ Ver L. DeFrancesco, *Anal. Chem.*, 2001, v. 73, p. 497A.

Separações de Espécies Moleculares

Uma grande variedade de moléculas pequenas de herbicidas, pesticidas e fármacos que são ou que podem ser convertidos a íons tem sido separada e analisada por ECZ. A Figura 33-12 é ilustrativa desse tipo de aplicação; três drogas antiinflamatórias, que são derivados carboxílicos, são separadas em menos de 15 min.

As proteínas, os aminoácidos e os carboidratos têm sido todos separados em tempos mínimos por ECZ. No caso de carboidratos neutros, as separações são precedidas pela formação de complexos com borato negativamente carregados. A separação de misturas de proteínas é ilustrada na Figura 33-13. O Destaque 33-1 discute o uso de arranjos de eletroforese capilar em seqüenciamento de DNA.

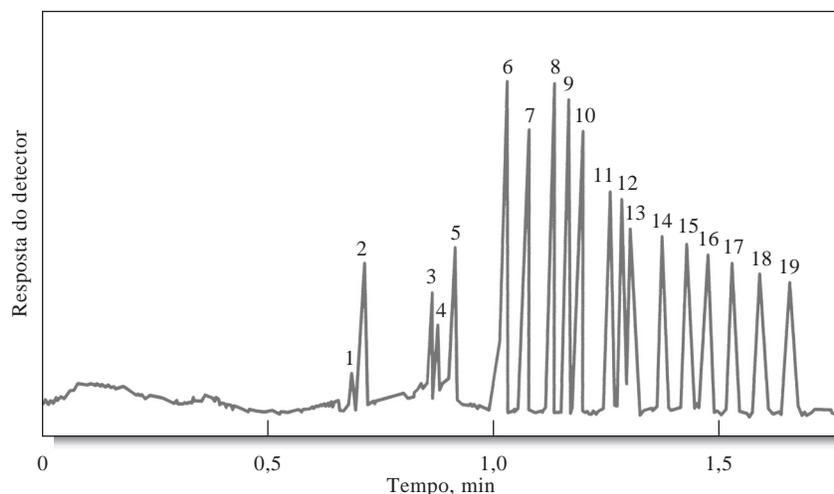


Figura 33-11 Separação de alcalinos, alcalinoterrosos e lantanídeos. Capilar: 36,5 cm \times 75 μ m de sílica fundida, + 30 kV. Injeção: hidrostática, 20 s a 10 cm. Detecção: UV indireta, 214 nm. Picos: 1 = rubídio (2 ppm), 2 = potássio (5 ppm), 3 = cálcio (2 ppm), 4 = sódio (1 ppm), 5 = magnésio (1 ppm), 6 = lítio (1 ppm), 7 = lantânio (5 ppm), 8 = cério (5 ppm), 9 = praseodímio (5 ppm), 10 = neodímio (5 ppm), 11 = samário (5 ppm), 12 = európio (5 ppm), 13 = gadolínio (5 ppm), 14 = térbio (5 ppm), 15 = disprósio (5 ppm), 16 = hólmio (5 ppm), 17 = érbio (5 ppm), 18 = túlio (5 ppm), 19 = itérbio (5 ppm). (De P. Jandik, W. R. Jones, O. Weston e P. R. Brown, *LC-GC*, 1991, v. 9, p. 634. Com permissão.)

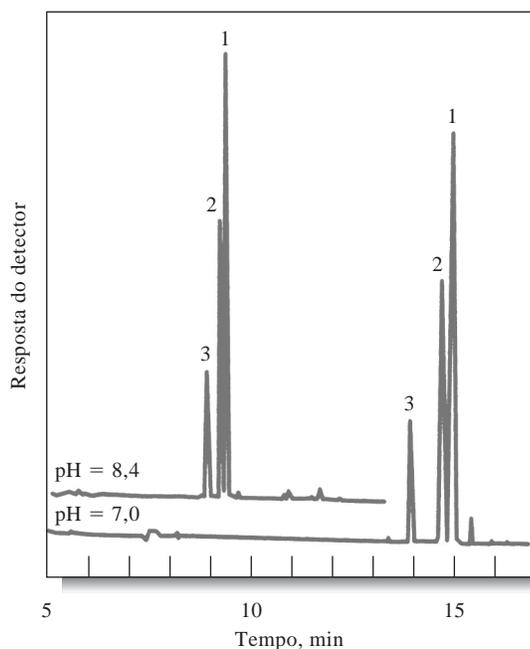


Figura 33-12 Separação de drogas antiinflamatórias por ECZ. Detecção: UV a 215 nm. Analitos: (1) naproxen, (2) ibuprofen, (3) tolmetin. (De A. Wainright, *J. Microcolumn. Sep.*, 1990, v. 2, p. 166. Reproduzido com permissão da John Wiley & Sons, Inc.)

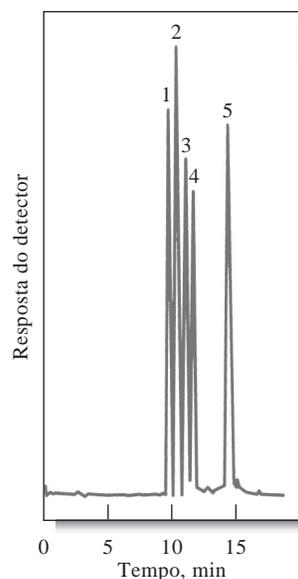
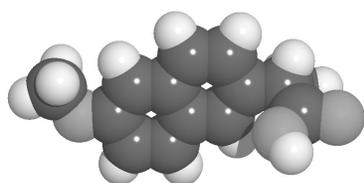


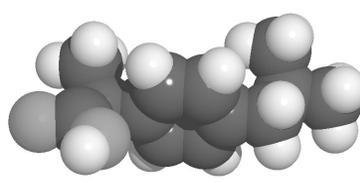
Figura 33-13 Separação por ECZ de uma mistura-modelo de proteínas. Condições: tampão pH = 2,7; detecção por absorbância a 214 nm; 22 kV, 10 μ A. Os picos podem ser identificados na tabela a seguir.

Proteínas-modelo Separadas a pH 2,7

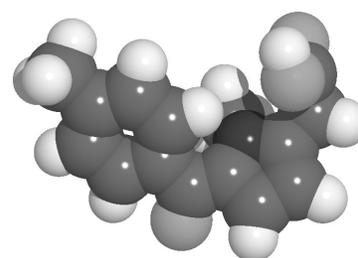
Nº do Pico	Proteínas	Massa Molecular	Ponto Isoelétrico, pH
1	Citocromo c	12.400	10,7
2	Lisozima	14.100	11,1
3	Tripsina	24.000	10,1
4	Tripsinogeno	23.700	8,7
5	Inibidor da tripsina	20.100	4,5



Naproxen



Ibuprofen



Tolmetin

Modelos moleculares das drogas antiinflamatórias: naproxen, ibuprofen e tolmetin. Acredita-se que esses agentes antiinflamatórios não-esteroidais aliviam a dor pela inibição da síntese de prostaglandinas, as quais estão envolvidas na percepção da dor e na produção da febre e inflamação. O ibuprofen também é conhecido como Motrin, Advil e Nuprin. O naproxen sódico é o Aleve e o tolmetin é o Tolectin. Cada um deles tem sido empregado no tratamento dos sintomas da artrite e para aliviar a dor causada por gota, bursite, tendinite, torções, distensões e outras contusões e cólicas menstruais. O ibuprofen e o naproxen têm venda livre nos Estados Unidos.

DESTAQUE 33-1

Arranjo de Eletroforese Capilar para o Sequenciamento de DNA

Uma das maiores metas do projeto genoma humano é determinar a ordem de ocorrência das quatro bases, adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T), em moléculas de DNA. A

sequência define o código genético de um indivíduo. A necessidade de sequenciar o DNA tem impulsionado o desenvolvimento de muitos instrumentos analíticos novos. Entre as aborda-

(continua)

gens mais atraentes encontram-se os arranjos de eletroforese capilar.¹¹ Nessa técnica, 96 capilares são operados em paralelo. Os capilares são recheados com uma matriz de separação, geralmente um gel de poli(acrilamida) linear. Os capilares apresentam diâmetros internos de 35 a 75 μm e comprimento de 30 a 60 cm.

No seqüenciamento, o DNA extraído de células é fragmentado por vários métodos. Dependendo da base terminal do fragmento, um de quatro corantes fluorescentes é ligado aos vários fragmentos. A amostra contém muitos fragmentos de diferentes tamanhos, cada um deles com um marcador fluorescente. Sob influência do campo eletroforético, os fragmentos de menor massa molecular movem-se mais rapidamente e atingem o detector antes dos segmentos de maior massa molecular. A seqüência do DNA é determinada pela seqüência de cor do corante dos fragmentos eluídos. Um laser é empregado para excitação dos corantes fluorescentes. Muitas técnicas diferentes têm sido descritas para a detecção da fluorescência. Um dos métodos emprega um sistema de varredura de forma que o feixe de capilares se move em relação ao laser de excitação e um sistema de detecção de quatro comprimentos de onda. No sistema de detecção, ilustrado pela Figura 33D-1, um feixe de laser é focalizado sobre o arranjo de capilares por uma lente. A imagem da região iluminada pelo laser é adquirida por um detector CCD (ver Seção 25A-4). Os filtros permitem a seleção do comprimento de onda para

detectar as quatro cores. A separação simultânea de 11 fragmentos de DNA em 100 capilares tem sido relatada.¹² Outros desenhos incluem sistemas de detecção tipo *sheath-flow* ou detectores que empregam dois lasers de diodo para excitação. Os instrumentos comerciais estão disponíveis com preços na faixa de US\$ 85.000 até mais de US\$ 300.000.¹³ Os desenvolvimentos futuros devem incluir a miniaturização desses dispositivos pela tecnologia de *lab-on-a-chip* e pelas melhorias nos sistemas de detecção. Esses sistemas miniaturizados vão, eventualmente, tornar-se portáteis e poderão ser usados no campo. A eletroforese capilar tem desempenhado um papel dos mais importantes na identificação dos restos mortais do desastre do World Trade Center.

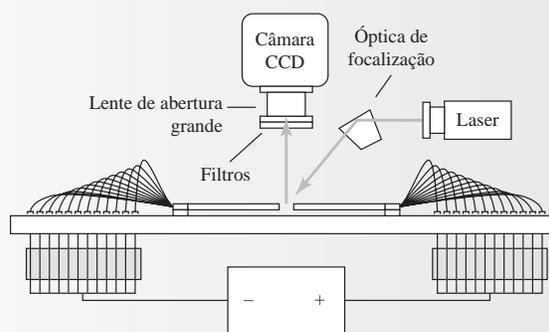


Figura 33D-1 Sistema de detecção em coluna através de fluorescência excitada por laser para arranjos de eletroforese capilar. Um laser é focalizado como uma linha sobre o arranjo de capilares a um ângulo de 45°. A fluorescência é filtrada e detectada por uma câmara de CCD empregando uma lente de grande abertura. (Reproduzido com permissão de K. Ueno e E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 1994, v. 66, p. 1424. Copyright da American Chemical Society.)

33D ELETROCROMATOGRAFIA CAPILAR

A **eletrocromatografia capilar** (ECC) é um híbrido da CLAE e da eletroforese capilar que oferece algumas das melhores características dos dois métodos.¹⁴ Como na CLAE, pode ser aplicada à separação de espécies neutras. Como em EC, contudo, fornece separações altamente eficientes empregando microvolumes de solução da amostra, sem a necessidade dos sistemas de bombeamento de alta pressão necessários para a CLAE. Em ECC, a fase móvel é transportada por meio de uma fase estacionária por um fluxo eletroosmótico. Como mostrado na Figura 33-8, o bombeamento eletroosmótico produz um perfil plano em vez do parabólico, como o que resulta em um fluxo induzido por pressão. O perfil plano do bombeamento osmótico produz bandas estreitas e, assim, altas eficiências de separação.

¹¹ Para uma revisão, ver I. Kheterpal e R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, 1999, v. 71, p. 31A.

¹² K. Ueno e E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, 1994, v. 66, p. 1424.

¹³ Para uma revisão sobre os seqüenciadores comerciais, ver J. P. Smith e V. Hinson-Smith, *Anal. Chem.*, 2001, v. 73, p. 327A.

¹⁴ Para uma discussão sobre esse método, ver L. A. Colon, Y. Guo e A. Fermier, *Anal. Chem.*, 1997, v. 69, p. 461A.

33D-1 Eletrocromatografia em Coluna Recheada

A eletrocromatografia baseada em colunas recheadas é a menos madura das técnicas de eletroseparação. Nesse método, um solvente polar é geralmente impulsionado por fluxo eletrosmótico através de um capilar recheado com uma fase reversa de CLAE. As separações dependem da distribuição dos analitos entre a fase móvel e a fase estacionária líquida retida no recheio. A Figura 33-14 mostra um eletrocromatograma típico de uma separação de 16 hidrocarbonetos poliaromáticos em um capilar de 33 cm de comprimento com diâmetro interno de 75 μm . A fase móvel era constituída por uma solução 4 mmol L^{-1} de borato de sódio em acetonitrila. A fase estacionária era composta por partículas de octadecilsilica de 3 μm .

33D-2 Cromatografia Eletrocinética Capilar Micelar

Os métodos eletroforéticos capilares que descrevemos até agora não podem ser aplicados à separação de solutos não-carregados. Contudo, em 1984, Terabe e colaboradores¹⁵ descreveram uma modificação do método que permitiu a separação de fenóis aromáticos e nitrocompostos de baixo peso molecular com equipamento similar àquele mostrado na Figura 33-6. Essa técnica envolve a introdução de um tensoativo em nível de concentração no qual forma **micelas**. As micelas formam-se em solução aquosa quando a concentração de espécies iônicas apresentando uma cauda longa de hidrocarboneto aumenta acima da chamada **concentração micelar crítica (CMC)**. Nesse ponto, o tensoativo começa a formar agregados esféricos constituídos por 40 a 100 íons com suas caudas de hidrocarbonetos voltadas para o interior do agregado e as suas extremidades carregadas expostas à água na parte exterior. As micelas constituem uma segunda fase estável que pode incorporar os compostos não-polares no interior das partículas, constituído por hidrocarbonetos, *solubilizando*, dessa forma, espécies não-polares. Essa solubilização é a mesma observada no dia-a-dia quando um material ou superfície gordurosa é lavada com uma solução de detergente.

As **micelas** são agregados esféricos com caudas de hidrocarbonetos no seu interior e extremidades carregadas no exterior expostas à água. Ver nota de margem na página 835.

A eletroforese capilar realizada na presença de micelas é chamada **cromatografia eletrocinética capilar micelar** e recebe o acrônimo CECM (em inglês, MECC ou MEKC). Nessa técnica, os tensoativos

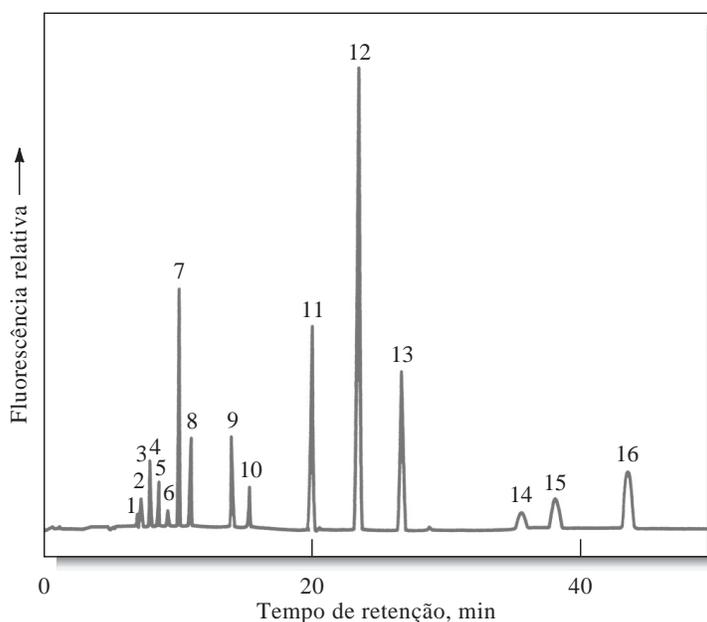


Figura 33-14 Eletrocromatograma mostrando uma separação eletrocromatográfica de 16 HPAs ($\sim 10^{-6}$ a 10^{-8} mol L^{-1} de cada composto). A identificação dos picos é: (1) naftaleno, (2) acenaftaleno, (3) acenafteno, (4) fluoreno, (5) fenantreno, (6) antraceno, (7) fluoranteno, (8) pireno, (9) benz[*a*]antraceno, (10) criseno, (11) benzo[*b*]fluoranteno, (12) benzo[*k*]fluoranteno, (13) benzo[*a*]pireno, (14) dibenz[*a,h*]antraceno, (15) benzo[*ghi*]perileno e (16) indeo [1,2,3-*cd*]pireno. (Reproduzido com permissão de C. Yan, R. Dadoo, H. Zhao, D. J. Rakestroaw e R. N. Zare, *Anal. Chem.*, 1995, v. 67, p. 2026. Copyright da American Chemical Society.)

¹⁵S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya e T. Ando, *Anal. Chem.*, 1984, v. 56, p. 111; S. Terabe, K. Otsuka e T. Ando, *Anal. Chem.* 1985, v. 57, p. 841. Ver também K. R. Nielsen e J. P. Foley, in *Capillary Electrophoresis*, P. Camilleri, Ed., Capítulo 4, Boca Raton, FL: CRC Press, 1993.

são adicionados ao tampão de operação em quantidades que excedem à concentração micelar crítica. Em muitas aplicações descritas até o momento, o tensoativo empregado tem sido o dodecil sulfato de sódio (DSS). A superfície de uma micela iônica desse tipo apresenta alta carga negativa, que lhe atribui alta mobilidade eletroforética. Contudo, a maioria dos tampões exibe um fluxo eletro-osmótico tão alto em direção ao eletrodo negativo que as micelas também são transportadas para aquele eletrodo, mas a uma velocidade muito menor. Assim, durante o experimento, a mistura tampão consiste em uma fase aquosa que se move rapidamente e uma fase micelar que se move mais lentamente. Quando uma amostra é introduzida nesse sistema, os componentes se distribuem entre as fases aquosa e de hidrocarboneto do interior das micelas. A posição do equilíbrio resultante depende da polaridade dos solutos. Para os solutos polares, a solução aquosa é favorecida; com os compostos não-polares, o ambiente formado pelos hidrocarbonetos é preferido.

O fenômeno descrito é muito similar àquele que ocorre na cromatografia líquida de partição em coluna, exceto pelo fato de que a “fase estacionária” está se movendo ao longo da extensão da coluna a uma velocidade muito menor que a fase móvel. O mecanismo de separação é idêntico nos dois casos e depende das diferenças entre as constantes de distribuição dos analitos entre a fase aquosa móvel e a **fase pseudo-estacionária** de hidrocarboneto. O processo é, na verdade, uma cromatografia; daí o nome *cromatografia* eletrocinética micelar. A Figura 33-15 ilustra duas separações típicas realizadas por CECM.

A cromatografia capilar na presença de micelas parece ter um futuro promissor. Uma vantagem dessa técnica híbrida sobre a CLAE está na eficiência da coluna (100.000 pratos ou mais). Além disso, a alteração da segunda fase em CECM é simples, envolvendo apenas a alteração da composição micelar do tampão. Em contraste, em CLAE, a segunda fase somente pode ser alterada pela troca do tipo de recheio da coluna.

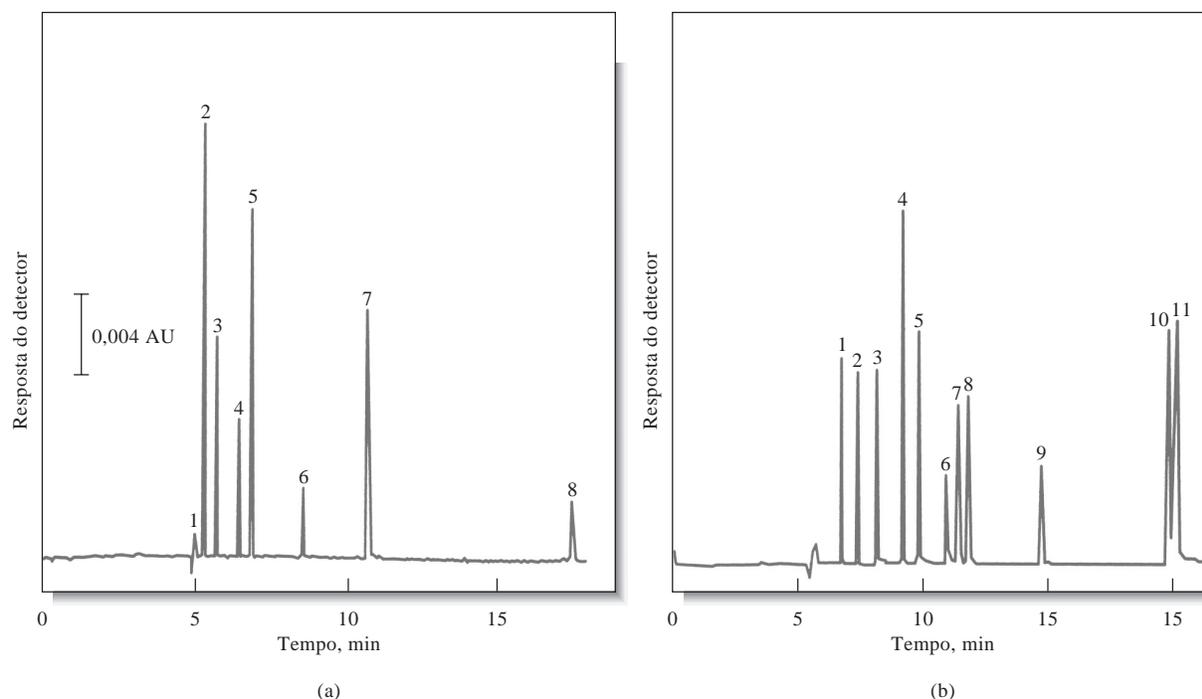
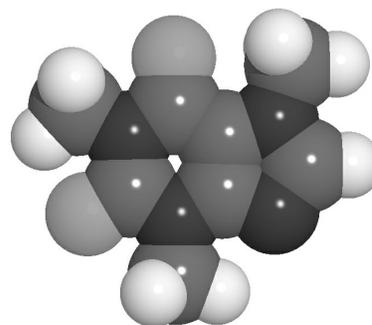


Figura 33-15 Separações típicas por CECM. (a) Alguns compostos-teste: 1 = metanol, 2 = resorcinol, 3 = fenol, 4 = *p*-nitroanilina, 5 = nitrobenzeno, 6 = tolueno, 7 = 2-naftol, 8 = Sudan III; capilar com 50 μm de diâmetro interno, 500 mm até o detector; voltagem aplicada, ca. 15 kV; detecção por absorção de UV a 210 nm. (b) Análise de um medicamento para a gripe: 1 = acetaminofen, 2 = cafeína, 3 = sulpirina, 4 = naproxen, 5 = guaifenesina, 10 = noscapina, 11 = clorfeniramina e tipepidina; voltagem aplicada, 20 kV; capilar igual ao do item anterior; detecção por absorção de UV a 220 nm. (De S. Terabe, *Trends Anal. Chem.*, 1989, v. 8, p. 129.)

33E FRACIONAMENTO POR CAMPO E FLUXO

O fracionamento por campo e fluxo (FCF) – em inglês FFF, *field-flow fractionation* – descreve um grupo de técnicas analíticas que têm-se tornado bastante úteis para a separação e caracterização de matérias em suspensão como polímeros, partículas grandes e colóides. Embora o conceito do FCF tenha sido primeiramente descrito por Giddings em 1966,¹⁶ apenas recentemente suas vantagens sobre outros métodos e suas aplicações práticas foram demonstradas.¹⁷



Modelo molecular da cafeína. A cafeína estimula o córtex cerebral por inibição de uma enzima que inativa uma certa forma de trifosfato de adenosina, a molécula que supre energia. A cafeína é encontrada no café, chá e bebidas tipo cola.

33E-1 Mecanismos de Separação

As separações em FCF ocorrem em um canal estreito e plano como o mostrado na Figura 33-16. O canal tem comprimento típico de 25 a 100 cm e de 1 a 3 cm de largura. A espessura da estrutura planar é normalmente de 50 a 500 μm . O canal é geralmente recortado em um espaçador fino que é inserido entre duas paredes. Um campo elétrico, térmico ou centrífugo é aplicado perpendicularmente à direção do fluxo. Alternativamente, um fluxo transversal perpendicular ao fluxo principal pode ser empregado.

Na prática, a amostra é injetada na entrada do canal. O campo externo é aplicado logo após através da face do canal, como ilustrado na Figura 33-16. Na presença do campo, os componentes da amostra migram em direção à **parede de acumulação** a uma velocidade determinada pela intensidade da interação do componente com o campo. Os componentes da amostra rapidamente atingem uma distribuição de concentração estacionária próxima à parede de acumulação, como pode ser visto na Figura 33-17. A espessura média da camada do componente, l , está relacionada com o coeficiente de difusão D da molécula e a velocidade, induzida pelo campo em direção à parede, u . Quanto mais rapidamente o componente se move no campo, mais fina será a camada próxima à parede. Quanto maior for o coeficiente de difusão, maior será a espessura da camada. Uma vez que os componentes têm valores de D e u diferentes, a espessura média da camada vai variar entre os componentes.

Uma vez que os componentes tenham atingido seus perfis estacionários próximos à parede de acumulação, o fluxo no canal é iniciado. O fluxo é laminar, resultando em um perfil parabólico, como mostrado à esquerda na Figura 33-17. O fluxo principal de arraste apresenta sua maior velocidade no centro do canal e a sua menor velocidade próximo às paredes. Os componentes que interagem mais fortemente com o campo são comprimidos muito próximos à parede, como exposto pelo componente A na Figura 33-18.

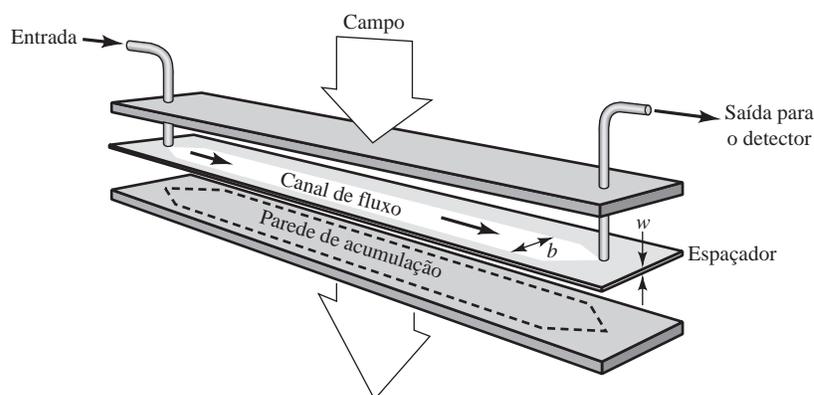


Figura 33-16 Diagrama esquemático de um canal de FCF inserido entre duas paredes. Um campo externo (elétrico, térmico, centrífugo) é aplicado perpendicularmente à direção do fluxo.

¹⁶J. C. Giddings, *Sep. Sci.* 1966, v. 1, p. 123.

¹⁷Para uma revisão sobre os métodos FCF, ver J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, 1995, v. 67, p. 592A.

Figura 33-17 Quando o campo é aplicado em FCF, os componentes migram para a parede de acumulação, na qual um perfil exponencial de concentração existe, como visto à direita. Os componentes se estendem por uma distância y para dentro do canal. A espessura média da camada é igual a l , que difere para cada componente. O fluxo principal do canal é então iniciado e o perfil parabólico do fluxo do solvente de eluição é apresentado à direita.

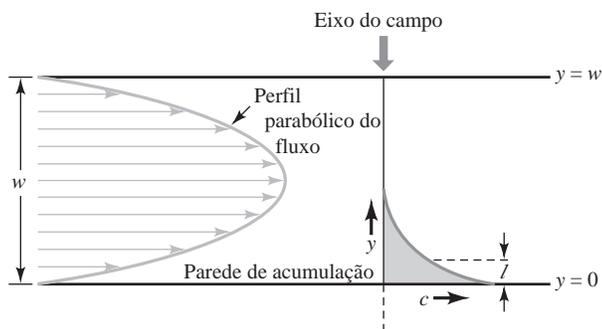
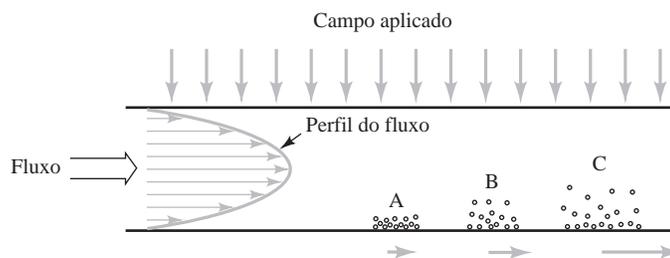


Figura 33-18 Os três componentes A, B e C são mostrados no estado comprimido contra a parede de acumulação em FCF em quantidades diferentes em razão das diferentes intensidades de interação com o campo externo. Quando o fluxo inicia-se, o componente A experimenta a menor velocidade do solvente. O componente B projeta-se mais no canal, no qual experimenta uma velocidade de fluxo maior. O componente C, que interage menos com o campo, experimenta a maior velocidade de fluxo do solvente e, assim, é deslocado mais rapidamente pelo fluxo.



Nesse caso, eles são eluídos pelo solvente que se move lentamente nas proximidades da parede. Os componentes B e C projetam-se mais no canal e experimentam uma região de maior velocidade do solvente. A ordem de eluição, portanto, é C, depois B e então A. Os componentes que são separados por FCF fluem através de um detector de absorção de ultravioleta-visível, de índice de refração ou fluorescência, localizado ao final do canal.

33E-2 Métodos de Fracionamento por Campo e Fluxo

As subtécnicas de FCF diferentes resultam da aplicação de diferentes tipos de campos ou gradientes.¹⁸ Até o momento, os métodos que têm sido empregados são **FCF por sedimentação**, campos **elétrico**, **térmico** e **por fluxo**.

No **fracionamento por campo e fluxo**, os componentes que interagem mais fortemente com o campo aplicado são dirigidos para a parede de acumulação. Um fluxo de arraste elui os componentes que se projetam no canal antes daqueles que foram comprimidos próximo à parede de acumulação.

Fracionamento por Campo e Fluxo por Sedimentação

A FCF por sedimentação é de longe a forma mais utilizada. Nessa técnica, o canal é enrolado e colocado dentro de uma centrífuga. Os componentes com maior massa e densidade são dirigidos para a parede pela força de sedimentação (centrifugação) e eluem por último. As espécies de massa menor são eluídas primeiro. Existe uma seletividade alta entre as partículas de tamanhos diferentes em FCF por sedimentação. A separação de pequenas esferas de poliestireno de vários diâmetros em FCF por sedimentação é mostrada na Figura 33-19.

¹⁸ Para uma discussão sobre os vários métodos de FCF, ver J. C. Giddings, *Unified Separation Science*, Capítulo 9. Nova York: Wiley, 1991; M. E. Schimpf, K. Caldwell e J. C. Giddings, Eds., *Field-Flow Fractionation Handbook*. Nova York: Wiley, 2000.

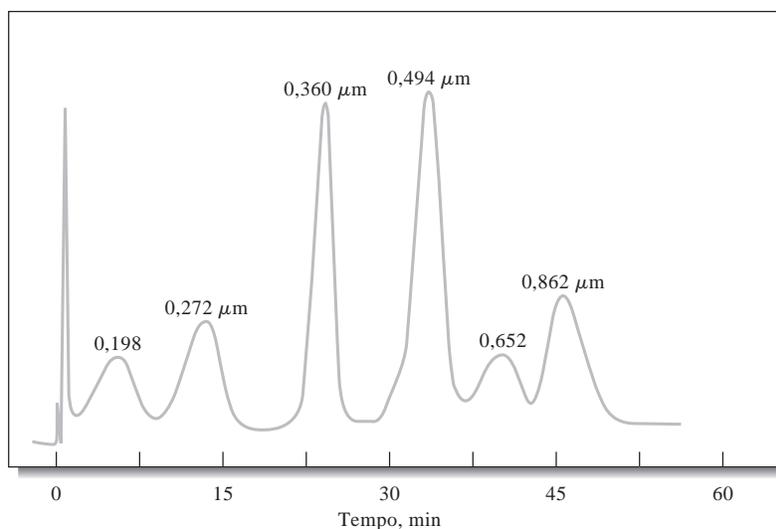


Figura 33-19 Fractograma ilustrando a separação de pequenas esferas de poliestireno de vários diâmetros em FCF por sedimentação. O fluxo no canal foi de 2 mL/min. (Cortesia da FFFractionation, LLC, Salt Lake City, UT.)

Uma vez que as forças centrífugas são relativamente fracas para as moléculas pequenas, a FCF por sedimentação é mais aplicada para moléculas com peso molecular acima de 10^6 . Os sistemas como polímeros, macromoléculas biológicas, colóides naturais e industriais, emulsões e partículas subcelulares parecem ser adequadas para a separação em FCF por sedimentação.

Fracionamento por Campo Elétrico e Fluxo

Em FCF elétrica, um campo elétrico é aplicado perpendicularmente à direção do fluxo. A retenção e a separação ocorrem com base na carga elétrica. As espécies com maior carga são dirigidas com mais eficiência para a parede de acumulação. As espécies de menor carga não são tão compactadas e projetam-se mais para a região de maior velocidade. Dessa forma, as espécies de menor carga são eluídas primeiro e as de maior carga são mais retidas.

Em virtude de os campos elétricos serem muito intensos, mesmo os íons pequenos podem estar sujeitos à separação por FCF elétrica. Contudo, os efeitos de eletrólise têm limitado as aplicações desse método à separação de misturas de proteínas e outras moléculas grandes.

Fracionamento por Campo Térmico e Fluxo

Em FCF térmico, um campo térmico é empregado perpendicularmente à direção do fluxo pela formação de um gradiente de temperatura através do canal de FCF. A diferença de temperatura induz a difusão térmica, na qual a velocidade de movimentação está relacionada com o coeficiente de difusão térmica das espécies.

A FCF térmica é particularmente adequada para a separação de polímeros sintéticos com pesos moleculares na faixa de 10^3 a 10^7 . A técnica apresenta vantagens significativas em relação à cromatografia por exclusão por tamanho para os polímeros com altos pesos moleculares. Contudo, os polímeros com baixos pesos moleculares parecem ser mais bem separados por métodos por exclusão por tamanho. Além dos polímeros, partículas e colóides têm sido separados por FCF térmica.¹⁹

Fracionamento por Campo de Fluxo e Fluxo

Talvez a técnica mais versátil de todas as subtécnicas de FCF seja a FCF de fluxo, na qual um campo externo é substituído por um fluxo lento, transversal ao líquido de arraste. O fluxo perpendicular transporta material para a parede de acumulação de uma forma não seletiva. No entanto, as espessuras das camadas de estado estacionário são diferentes para os vários componentes porque elas dependem não só da velocidade de transporte, mas também da difusão molecular. As distribuições exponenciais de diferentes espessuras são formadas, assim como na FCF normal.

¹⁹ P. M. Shiundu, G. Liu e J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, 1995, v. 67, p. 2705.

A FCF de fluxo tem sido aplicada na separação de proteínas, polímeros sintéticos e uma variedade de partículas coloidais. A Figura 33-20 ilustra a separação de três proteínas por FCF de fluxo. A repetibilidade é mostrada pelos fractogramas para três injeções.

33E-3 Vantagens do Fracionamento por Campo e Fluxo sobre os Métodos Cromatográficos

O fracionamento por campo e fluxo parece apresentar muitas vantagens sobre os métodos cromatográficos comuns para algumas aplicações. Primeiro, nenhum material de recheio ou fase estacionária é necessário para que a separação ocorra. Em alguns sistemas cromatográficos, podem existir interações indesejáveis entre o material de recheio ou a fase estacionária com os constituintes da amostra. Alguns solventes ou materiais da amostra adsorvem ou reagem com a fase estacionária ou com seu suporte. As macromoléculas e partículas são particularmente sujeitas a esses tipos de interações adversas.

A geometria e os perfis de fluxo envolvidos em FCF são muito bem caracterizados. Da mesma forma, os efeitos de muitos campos externos podem ser prontamente modelados. Em consequência, previsões teóricas muito exatas da retenção e altura de prato podem ser feitas em FCF. Em comparação, as previsões em cromatografia ainda são bastante imprecisas.

Finalmente, o campo externo governa a retenção em FCF. Com FCF elétrica, centrífuga e de fluxo, as forças perpendiculares podem ser variadas rapidamente e de forma programada no tempo. Isso introduz certa versatilidade na FCF que permite sua adaptação a diferentes tipos de amostras. Igualmente, os métodos podem ser prontamente otimizados em relação à resolução e ao tempo de separação.

Embora o fracionamento por campo e fluxo seja a mais recente contribuição aos métodos de separação analíticos, este tem-se mostrado ser altamente complementar à cromatografia. Os métodos FCF são mais adequados, no presente, para partículas e macromoléculas, as quais, na sua maioria, situam-se fora da faixa de massa molecular dos métodos cromatográficos. No entanto, os métodos cromatográficos são claramente superiores para as substâncias de baixa massa molecular.

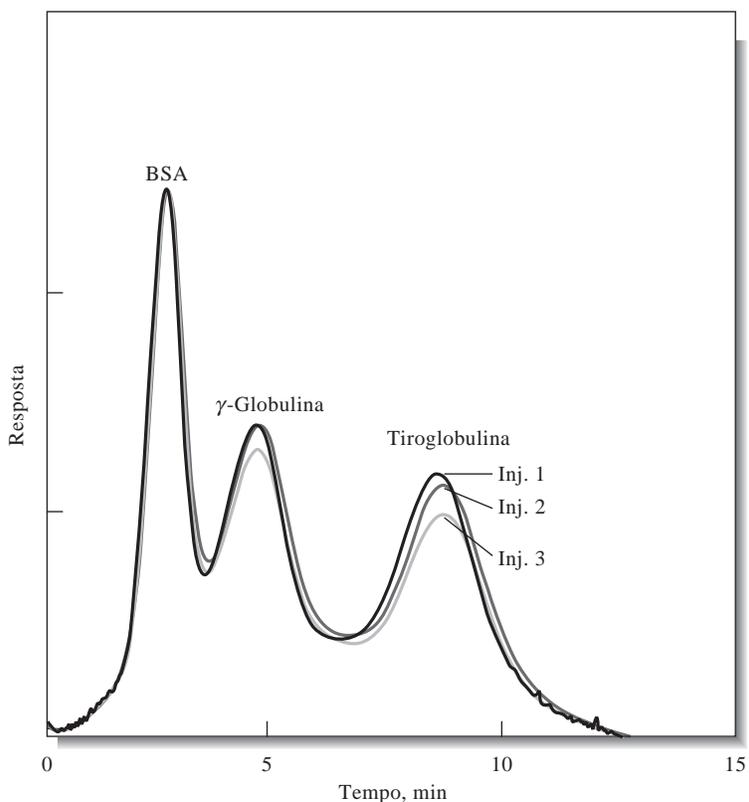


Figura 33-20 Separação de três proteínas por FCF de fluxo. Três injeções distintas são apresentadas. No experimento mostrado, a amostra foi concentrada no início do canal por um fluxo oposto. (Reproduzido com permissão de H. Lee, S. K. R. Williams e J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, 1998, v. 70, p. 2495. Copyright da American Chemical Society.)

EXERCÍCIOS NA WEB

Conecte-se à nossa página na Web no endereço <http://www.thomsonlearning.com.br>. A partir do menu do *Chapter Resources*, escolha *Web Works*. Localize a seção do Capítulo 33 e clique no *link* com a página da Agilent Technologies na Web. Encontre o resumo da aplicação intitulada *Analysis of human rhinovirus* (vírus comum da gripe) *in virals preparations by CZE*. Que tipo de detector foi empregado nesse estudo? Que tipo de injeção foi utilizado e por quanto tempo ela foi aplicada? Qual foi a voltagem aplicada? Qual eletrólito foi empregado?

XXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXX

QUESTÕES E PROBLEMAS

- 33-1.** Liste os tipos de substâncias para as quais cada um dos seguintes métodos de separação são mais adequados:
- *(a) cromatografia com fluido supercrítico.
 - (b) cromatografia em camada delgada.
 - *(c) eletroforese capilar de zona.
 - (d) FCF térmica.
 - *(e) FCF de fluxo.
 - (f) cromatografia eletrocinética capilar micelar.
- 33-2.** Defina
- *(a) fluido supercrítico.
 - (b) ponto crítico.
 - *(c) cromatografia em camada delgada bidimensional.
 - (d) mobilidade eletroforética.
 - *(e) concentração micelar crítica.
 - (f) FCF por sedimentação.
- *33-3.** Quais propriedades de um fluido supercrítico são importantes em cromatografia?
- 33-4.** De que forma os instrumentos para a cromatografia com fluido supercrítico diferem daqueles para (a) a CLAE e (b) a CG.
- *33-5.** Descreva o efeito da pressão em cromatogramas com fluidos supercríticos.
- 33-6.** Liste algumas vantagens do CO₂ supercrítico como fase móvel em separações cromatográficas.
- *33-7.** Qual é a propriedade importante dos fluidos supercríticos relacionada com as suas densidades.
- 33-8.** Compare a cromatografia com fluido supercrítico com outros métodos de cromatografia em coluna.
- *33-9.** Para o dióxido de carbono supercrítico, preveja o efeito que cada uma das seguintes alterações terá no tempo de eluição em um experimento de CS.
- (a) Aumento da vazão (a temperatura e pressão constantes).
 - (b) Aumento da pressão (a temperatura e vazão constantes).
 - (c) Aumento da temperatura (a pressão e vazão constantes).
- 33-10.** O que é um fluxo eletro-osmótico? Por que ocorre?
- *33-11.** Sugira uma forma pela qual o fluxo eletro-osmótico possa ser eliminado.
- 33-12.** Por que o pH afeta a separação de aminoácidos em eletroforese?
- *33-13.** Qual é o princípio de separação em eletroforese capilar de zona?
- 33-14.** Certo cátion inorgânico apresenta uma mobilidade eletroforética de $4,31 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$. Esse mesmo íon mostra um coeficiente de difusão de $9,8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Se esse íon for separado por eletroforese capilar de zona em um capilar de 50,0 cm, qual seria o número de pratos esperado nas seguintes voltagens aplicadas
- (a) 5,0 kV?
 - (b) 10,0 kV?
 - (c) 30,0 kV?
- *33-15.** O analito catiônico do Problema 33-14 foi separado por eletroforese capilar de zona em um capilar de 50,0 cm a 10,0 kV. Sob essas condições de separação, a velocidade linear do fluxo eletroosmótico foi de 0,85 mm s⁻¹ em direção ao cátodo. Se o detector foi colocado a 40,0 cm da extremidade de injeção do capilar, quantos minutos foram necessários para que o cátion do analito atingisse o detector após a aplicação do campo?
- 33-16.** Qual é o princípio da cromatografia eletrocinética micelar? Como ela difere da eletroforese capilar de zona?
- *33-17.** Descreva a maior vantagem da cromatografia eletrocinética capilar sobre a cromatografia líquida convencional.

- 33-18. Três proteínas grandes estão ionizadas a um pH no qual uma separação por FCF elétrica é efetuada. Se os íons são designados como A^{2+} , B^+ e C^{3+} , preveja a ordem de eluição.
- *33-19. O que determina a ordem de eluição em FCF por sedimentação?
- 33-20. Liste as maiores vantagens e as limitações da FCF quando comparada aos métodos cromatográficos.
- 33-21. **Problema Desafiador.** A doxorubicina (DOX) é uma antraciclina amplamente empregada e que é efetiva no tratamento da leucemia e do câncer de seio (A. B. Anderson, C. M. Ciriaks, K. M. Fuller e E. A. Ariaga, *Anal. Chem.*, 2003, v. 75, p. 8). Infelizmente, efeitos colaterais como intoxicação hepática e resistência à droga têm sido relatados. Em estudos recentes, Anderson et al. empregaram a fluorescência induzida por laser (FIL) como forma de detecção em eletroforese capilar para investigar os metabólitos da DOX em células únicas e em frações subcelulares. Os seguintes resultados são similares aos obtidos por Anderson et al. na quantificação de dextrorubicina por FIL. As áreas dos picos de EC foram medidas em função da concentração de DOX para construir uma curva analítica.
- | Concentração de DOX,
nmol L ⁻¹ | Área do Pico |
|--|--------------|
| 0,10 | 0,10 |
| 1,00 | 0,80 |
| 5,00 | 4,52 |
| 10,00 | 8,32 |
| 20,00 | 15,7 |
| 30,00 | 26,2 |
| 50,00 | 41,5 |
- (a) Encontre a equação para a curva analítica e os desvios padrão para a inclinação e para o intercepto. Encontre o valor de R^2 .
- (b) Rearranje a equação encontrada na parte (a) para expressar a concentração em termos da área medida.
- (c) O limite de detecção para a DOX foi determinado como 3×10^{-11} mol L⁻¹. Se o volume era de 100 pL qual é o limite de detecção em mols?
- (d) Duas amostras de concentração desconhecidas de DOX foram injetadas e as áreas dos picos iguais a 11,3 e 6,97 foram obtidas. Quais são as concentrações e seus desvios padrão?
- (e) Sob certas condições, o pico referente à DOX requer 300 s para atingir o detector de FIL. Qual seria o tempo necessário se a voltagem aplicada fosse dobrada? Quanto tempo seria necessário se o comprimento do capilar fosse dobrado e a voltagem aplicada mantida igual?
- (f) O capilar empregado na parte (e) sob condições normais apresenta um número de pratos igual a 100.000. Qual seria o valor de N se o comprimento do capilar fosse dobrado e a voltagem mantida constante? Qual seria o valor de N se a voltagem fosse dobrada e o comprimento do capilar mantido constante?
- (g) Para um capilar de 40,6 cm de comprimento e de diâmetro interno de 50 μ m, qual seria a altura de prato para um capilar com $N = 100.000$?
- (h) Para o mesmo capilar descrito na parte (g) qual é a variância σ^2 para um pico típico?