



Cromatografia em Coluna

A cromatografia é uma técnica utilizada para analisar, identificar ou separar os componentes de uma mistura. A cromatografia é definida como a separação de dois ou mais compostos diferentes por distribuição entre fases, uma das quais é estacionária e a outra, móvel.

A mistura é adsorvida em uma fase fixa (ou estacionária), e uma fase móvel arrasta continuamente a mistura adsorvida. Pela escolha apropriada da fase fixa e da fase móvel, além de outras variáveis, pode-se fazer com que os componentes da mistura sejam arrastados ordenadamente. Aqueles que interagem pouco com a fase fixa são arrastados facilmente e, aqueles com maior interação ficam mais retidos.

Os componentes da mistura adsorvem-se com as partículas de sólido, devido a interação de diversas forças intermoleculares. O composto terá uma maior ou menor adsorção, dependendo das forças de interação, que variam na seguinte ordem: formação de sais > coordenação > ligações de hidrogênio > dipolo-dipolo > London (dipolo induzido).

Dependendo da natureza das duas fases envolvidas tem-se diversos tipos de cromatografia:

- **Sólido-líquido** (exemplos: cromatografia em coluna, em camada delgada, ou em papel);
- **Líquido-líquido;**
- **Gás-líquido.**

A cromatografia em coluna é uma técnica de partição entre duas fases, sólida e líquida, baseada na capacidade de adsorção e solubilidade. O sólido deve ser um material insolúvel na fase líquida associada, sendo que os mais utilizados são a sílica gel (SiO_2) e alumina (Al_2O_3), geralmente na forma de pó.

A cromatografia em coluna é comumente utilizada para purificação de substâncias orgânicas ou, para remover o material de partida ou isolar o produto desejado de uma reação. Para tal, a mistura é passada através de um tubo de vidro vertical preenchido com sílica ou alumina (ou outra fase estacionária) e, é coletada em pequenas frações. Os vários componentes de uma amostra podem ser separados através da interação diferenciada com o solvente (**fase móvel**) e o adsorvente (**fase estacionária**).

Para uma fase estacionária contendo sílica, compostos polares irão interagir mais fortemente que compostos não polares, ficando mais retidos e, sendo eluídos posteriormente. Quando a polaridade dos componentes da amostra é similar, a separação/purificação se torna um desafio.

Se feita de maneira correta, a cromatografia em coluna, pode levar a compostos com alto grau de pureza. No entanto, em muitos aspectos do ponto de vista prático, a sua realização pode apresentar alguns desafios. A experiência no laboratório e algumas dicas podem ajudar na otimização desta técnica.

1. Escolha do adsorvente (fase estacionária)

Sílica e alumina são os adsorventes mais utilizados. Ambos são polares e, por isso, retêm mais fortemente componentes mais polares.

A sílica é recomendada na maioria dos casos. Esse adsorvente é levemente ácido, retendo com maior intensidade compostos básicos.

A alumina está disponível na forma básica, neutra ou ácida, sendo a forma básica a mais comum. Essa irá reter mais fortemente compostos ácidos. A Alumina enquanto adsorvente é ideal para componentes que

são fracamente ou moderadamente polares e para purificação de aminas.

O tamanho das partículas do adsorvente afeta o fluxo do solvente através da coluna. Tanto sílica quanto alumina estão disponíveis em vários tamanhos. O tamanho é dado através do valor de *mesh*. Quanto maior o valor de *mesh*, menor o tamanho da partícula, ou seja, por exemplo, sílica gel 230-400 tem partículas menor do que sílica gel 60. Tipicamente Sílica gel *mesh* de 70-230 é indicado para fazer coluna utilizando somente a força da gravidade para eluição. Partículas de sílica gel com *mesh* de 230-400 (cromatografia *flash*) podem ser utilizadas em coluna cromatográfica com uma pressão externa para acelerar a eluição. Isto acontece, pois partículas menores tem uma maior superfície de contato e permitem maior eficiência na eluição, mesmo em velocidades maiores. Sendo assim, é possível realizar a coluna em menor tempo, através da utilização de pressão para eluir.

A alumina está ainda disponível como tipo I, II ou III. Esta classificação refere-se à quantidade de água, I tem a menor quantidade de água e III, a maior. Uma quantidade menor de água significa que há um maior número de sítios polares disponíveis na alumina, e que compostos polares irão ficar mais retidos. A alumina tipo I ou III com *mesh* 150 é a mais utilizada.

2. Escolha do solvente

Esta é a escolha mais difícil e, mais importante, para a realização da coluna. Em um laboratório de química orgânica, há uma quantidade grande de solventes orgânicos que podem ser utilizados, o que dificulta a escolha.

Uma coluna cromatográfica, quase sempre, utiliza uma mistura de solventes (geralmente, dois solventes) como eluente. Claro que, ocasionalmente um único solvente pode ser utilizado ou ainda uma mistura com três ou quatro solventes. A tabela abaixo traz os solventes mais comuns em cromatografia em coluna.

Tabela 1. Solventes comumente utilizados em cromatografia em coluna.

	Sistema de um único solvente*	Sistema com dois solventes*	Sistema de solvente exótico*
1	Hidrocarbonetos como pentano, éter de petróleo e hexano	Éter mais éter de petróleo, hexano ou pentano	<i>n</i> -butanol mais ácido acético mais água.
2	Éter ou diclorometano	Hexano mais acetato de etila ou diclorometano**	2-metil-1-propanol mais ácido acético mais água.
3	Acetato de etila	Diclorometano mais metanol	1-propanol mais NH ₄ OH _(aq) mais água.
4		A porcentagem destes solventes pode ser ajustada para levar a diferentes polaridades. É importante notar que metanol não deve ser utilizado em quantidade maior que 10% (isto interferiria na estrutura da sílica, interagindo com os grupos OH da mesma)	Sistemas mais complexos são utilizados em separações mais difíceis.

* listado do menos para o mais polar.

** Sistema de solvente mais utilizado.

Para obter uma boa separação e, utilizar a menor quantidade de solvente possível, o sistema de solvente a ser utilizado deve ser testado em CCD (cromatografia de camada delgada). Lembrando que se a fase estacionária da coluna for sílica a CCD deve conter sílica e se a fase estacionária da coluna for alumina, a CCD deve conter alumina.

Para saber mais sobre CCD, o material complementar sobre esse assunto deve ser consultado.

Além da separação na CCD, existem outros fatores a serem considerados. As vezes o melhor sistema de separação não é o escolhido,

por conta do preço ou do ponto de ebulição de algum solvente. Geralmente, há preferência pela utilização de solventes mais baratos e de preferência menos tóxicos (não halogenados, por exemplo). Além disso, solventes com menor ponto de ebulição são mais fáceis de separar do produto puro (através de evaporação).

3. Tamanho da coluna

Alguns consideram este o fator menos importante para realização de coluna cromatográfica. De fato, na teoria, é possível utilizar uma coluna comprida e fina ou uma coluna curta e com maior diâmetro, utilizando, aproximadamente, a mesma quantidade de adsorvente (fase estacionária), sem afetar a separação (Figura 1).



Figura 1. Escolha do tamanho da coluna é menos importante do que a quantidade do adsorvente da fase estacionária.

No entanto, na prática, a maioria das pessoas escolhe um tamanho de coluna que permita ao adsorvente **ocupar 1/3 do tamanho** total da coluna, sem considerar o solvente. Claro, que essa escolha depende da quantidade de adsorvente que deve ser utilizada.

Figura 2. Guia rápido para escolha do tamanho da coluna.

Diâmetro	10 mm	20 mm	30 mm	40 mm	50 mm
Amostra ($R_f > 0,2$)	100 mg	0,5 g	1 g	1,5 g	2,5 g
Amostra ($R_f \sim 0,1$)	40 mg	150 mg	350 mg	0,5 g	1 g




4. Quantidade de Sílica

A quantidade de adsorvente a ser utilizada, depende da quantidade de amostra a ser separada. A quantidade utilizada não precisa ser exata, mas deve ser aproximada para evitar desperdício de tempo e recursos.

Como a densidade do adsorvente varia com o tipo, é aconselhável medir a quantidade de adsorvente através do peso.

Outro fator a ser considerado, é o grau de dificuldade da separação dos componentes da amostra. Isso é determinado através de CCD, como parte do processo de escolha do solvente. Quanto mais difícil é a separação, maior quantidade de adsorvente deve ser utilizada (Tabela 3).

Tabela 3. Guia para a quantidade de adsorvente.

		Razão aproximada Adsorvente (g) / Amostra (g)
Separação simples		20:1
Separação média		50:1
Separação difícil		Até 100:1

Uma vez escolhido o solvente (fase móvel), o adsorvente, sua quantidade e o tamanho da coluna, a cromatografia em coluna pode ser iniciada.

5. Preparando a coluna

Algumas colunas possuem uma retenção de vidro para prevenir que o adsorvente da fase estacionária passe através da torneira. Outras colunas não possuem essa barreira e precisam ser fechadas com algodão (Figura 2). O algodão pode ser descartado após o término da coluna. O tipo de barreira ou a quantidade de algodão podem fazer a velocidade de eluição variar.

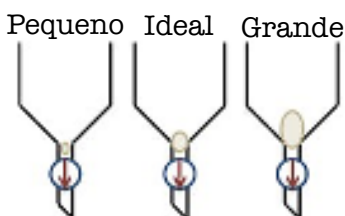


Figura 2. Colocação do pedaço de algodão.

6. Empacotamento da coluna

Existem várias formas de preencher a coluna, ou seja, empacotar a coluna. Todos os métodos tem suas vantagens e desvantagens. Algumas vezes o tamanho da coluna exige um tipo de empacotamento particular, mas no geral o método utilizado pode ser uma escolha pessoal.

Opção 1: Método de empacotamento seco

- Preencher a coluna com o solvente, permitindo que um pouco passe pelo algodão ou barreira de vidro;
- Com o auxílio de um funil no topo da coluna, adicionar lentamente o adsorvente ao solvente dentro da coluna. Todo o adsorvente deve estar decantado antes de se adicionar mais;
- Após toda fase estacionária decantar, bater gentilmente na coluna para auxiliar esse processo;

- A torneira deve ser aberta para permitir que o solvente caia até que o nível de solvente fique na superfície da fase estacionária (ou um pouco acima).

*** Observação:** Deve-se tomar cuidado para não secar a fase estacionária. Isso pode causar rachaduras e vale para os outros métodos de empacotamento também!

Vantagens do método de empacotamento: Minimiza a quantidade de solvente utilizado.

Desvantagens do método de empacotamento: Difícil de obter uma coluna bem empacotada.

Opção 2: Método de empacotamento seco 2

- Adicionar o adsorvente na coluna. Uma bomba de vácuo pode ser acoplada na saída da torneira para auxiliar a compressão do adsorvente. Bater, gentilmente, na coluna para auxiliar a compressão;
- Colocar o solvente. No caso de aplicação de vácuo, deve-se manter a bomba conectada;
- Permitir que o solvente flua através do adsorvente até quase a base da coluna. Nesse ponto, se for estiver utilizando vácuo, a bomba de vácuo deve ser desconectada da coluna.
- Permitir que o solvente passe através de toda coluna várias vezes (até estar com empacotamento completo);
- Deixar o nível do solvente aproximadamente no nível do adsorvente.

Vantagens do método de empacotamento: Alta compressão da fase estacionária.

Desvantagens do método de empacotamento: Necessita grande quantidade de solvente.

Opção 3: Método em pasta

- Em um frasco separado, colocar o adsorvente e o solvente (aproximadamente 1,5 vezes o volume da coluna);

- Misturar até formar uma pasta homogênea;
- Adicionar a pasta à coluna com o auxílio de um funil e permitir que o solvente flua, abrindo a torneira;
- Bater, gentilmente, na coluna para expulsar bolhas de ar e auxiliar no empacotamento;
- Limpar as bordas da coluna lavando com um pouco de solvente;
- Abrir a torneira e drenar o solvente até que ele fique no mesmo nível da fase estacionária.
- Todo esse processo pode ser feito com pressão de uma bomba para acelerar e aumentar a eficiência de empacotamento. Nesse caso, um conector deve ser colocado no topo da coluna.

Vantagens do método de empacotamento: Rápido e fácil

Desvantagens do método de empacotamento: Necessita de grande quantidade de solvente.

Observação: De qualquer forma, o eluente utilizado no empacotamento pode ser reutilizado durante a separação efetiva. Isso pode ser feito, pois o eluente só teve contato com o adsorvente e não foi contaminado.

7. Adição da amostra

Após todas estas etapas, você está pronto para adicionar a amostra e realizar a cromatografia em coluna.

Se a amostra for líquida ela pode ser diretamente colocada sobre a fase estacionária. No caso de uma amostra sólida, ela pode ser dissolvida em pequena quantidade de solvente (mínimo possível, 5-10 gotas). Outra maneira de incorporar uma amostra sólida é realizar a adsorção da amostra em uma pequena quantidade do adsorvente utilizado como fase estacionária. Para tal, deve-se dissolver a amostra sólida em um solvente volátil e colocar em um balão de fundo redondo, adicionar uma pequena quantidade de sílica ou alumina e evaporar o solvente. A amostra estará adsorvida em sílica ou alumina e poderá ser adicionada com o auxílio de um funil ao topo da coluna.

Para amostras que serão adicionadas em solução ou são líquidas, os seguintes passos devem ser seguidos:

- Adicionar a solução ou amostra líquida com ao auxílio de uma pipeta de Pasteur. Adicionar cuidadosamente diretamente na fase estacionária. Cuidadar para não criar buracos na superfície. Idealmente a amostra deve ficar uniformemente distribuída no topo da coluna;
- Após a adição completa da amostra, permitir que a coluna drene o líquido até o nível da fase estacionária;
- Cuidadosamente, adicionar uma camada de areia ou algodão que prevenirá o aparecimento de buracos na superfície do adsorvente;
- Finalmente, adicionar cuidadosamente o eluente para iniciar a separação.

8. Coletando as frações e obtendo o composto

Para iniciar, uma estante com tubos de ensaio ou frascos de vidro deve ser colocada abaixo da coluna. Deve-se abrir a torneira e ajustar o fluxo da eluição. Se o fluxo for muito lento, ocorrerá uma ampliação da faixa onde estão os componentes, podendo interferir na separação. Se a eluição for muito rápida, pode não haver tempo hábil para equilibrar o sistema e, isso leva a uma diminuição da eficiência. Colunas mais largas podem ser ajustadas com um fluxo maior. O tamanho das partículas do adsorvente também deve ser levado em conta para ajustar a vazão da coluna. Adsorventes com partículas menores podem ser utilizados com gotejamento mais rápido, induzido por pressão, por exemplo.

As frações devem ser coletadas nos tubos de ensaio ou frascos de vidro. O tamanho das frações depende da quantidade de amostra e da separação dos componentes da mesma. As frações devem ser analisadas por CCD e agrupadas por similaridade.

Após, o solvente deve ser evaporado, e o componente da amostra (puro) pode ser obtido.

Para esvaziar a coluna você deve secá-la com o auxílio de pressão. O solvente remanescente que foi coletado deve ser adequadamente

descartado ou recuperado. O adsorvente deve ser descartado nos resíduos sólidos ou sofrer processo de recuperação.

Bibliografia e maiores detalhes:

1. *High-performance gradient elution*, Lloyd Snyder, John Dolan. John Wiley & Sons, New York, USA, **2006**.
2. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Lloyd Snyder, Joseph Kirkland, John Dolan. John Wiley & Sons, New York, USA, **2010**.
3. http://www.chemistryviews.org/details/education/2345141/Tips_and_Tricks_for_the_Lab_Column_Troubleshooting_and_Alternatives.html