

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

Gilberto Molinar Pineda

TESE DE MESTRADO

- 1984 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Este exemplar corresponde
defendida por Gilberto Molinar Pineda e aprovada
pela Comissão Julgadora 07/12/84
Carol H. Collins

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

TESE DE MESTRADO

Estudante: GILBERTO MOLINAR PINEDA

Orientador: Prof.^a Dr.^a CAROL H. COLLINS

- 1984 -

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

TESE DE MESTRADO

Estudante: GILBERTO MOLINAR PINEDA

Orientador: Prof.^a Dr.^a CAROL H. COLLINS

À NIDIA,
EIDY, EDITH e IDA,
com AMOR.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dr.^a CAROL H. COLLINS pelo dinamismo na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. KENNETH E. COLLINS, por sua preciosa assistência técnica nesta pesquisa.

Especial agradecimento a MARIA IZABEL M. S. BUENO, pela não usual e fina gentileza na correção e discussão deste texto.

Aos colegas do grupo de Radioquímica e Cromatografia, por sua sincera ajuda e incentivo.

À Diretoria do Instituto de Química da Unicamp.

À SUBIM e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Cromatografia líquida de partição-exclusão de íons é uma técnica usada para separar ácidos fracos, aminoácidos, açúcares, álcoois e outras substâncias, usando uma coluna trocadora de cátions. Por causa da exclusão de Donnan, o material iônico é rejeitado por esta resina trocadora. Não obstante, substâncias não-iônicas podem sofrer partição entre a fase móvel e a fase estacionária. Forças polares e de van der Waals interagem entre o soluto e a resina.

Estudou-se o comportamento cromatográfico de um grande número de ácidos carboxílicos e determinou-se seus tempos de retenção relativos ao ácido acético. Em vista de que a resina usada é um forte trocador de cátions na forma-H, sua regeneração não é necessária. Estudaram-se vários parâmetros, tais como grau de cruzamento de resina, pH e variação do comprimento da coluna, verificando-se seus efeitos na resolução das amostras.

Os tempos de retenção dos ácidos aumentam grandemente a medida que o grau de cruzamento diminui. A ordem de eluição dos ácidos pode ser, em uma maneira geral, correlacionada com seus valores de pKa. O uso de ácido mineral como eluente facilita a separação de ácidos moderadamente fortes, quando a separação não pode ser obtida, usando somente água. Neste estudo o aumento no comprimento da coluna aumentou os tempos de retenção, mas não melhorou as resoluções na separação dos ácidos carboxílicos.

ABSTRACT

Ion-exclusion partition chromatography is a technique used to separate weak acids, amino acids, sugar, alcohols and other substances on a cation-exchange column. Because of Donnan exclusion, ionic material is rejected by this exchange resin. However, non-ionic substances can undergo partition between the stationary phase and the mobile phase. Separations are based on polar and van der Waals interactions between the solute and the resin.

The chromatographic behavior of a large number of organic acids and their retention times with respect to acetic acid were determined. Based on the fact that the resin used is a strong cation exchanger in the H-form, it is not necessary to regenerate it. Several parameters, such as the resin crosslinkage, the pH and the length of the column were studied, to observe their effects on sample resolutions.

The retention times of the acids increase greatly as the crosslinkage decreases. The elution order of the acids may be correlated, in a general way, with their pK_a values. Using mineral acids as eluent makes the separation of moderately strong acids easier since the separation cannot be obtained using water as mobile phase. Increasing the column length resulted in greater retention times, but the resolution for carboxylic acid separations was not improved.

ÍNDICE

Pág.

RESUMO

ABSTRACT

1.0 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - APLICAÇÕES DE TROCA IÔNICA	2
1.2 - RESINAS DE TROCA IÔNICA	3
1.2.1 - RESINAS ORGÂNICAS	4
1.2.2 - OUTRAS RESINAS	12
1.3 - CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	14
1.4 - CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO-EXCLUSÃO DE ÍON	15
1.4.1 - MECANISMO DE EXCLUSÃO	15
1.4.2 - MECANISMO DE PARTIÇÃO	16
1.4.3 - MECANISMOS COMBINADOS	17
1.5 - APLICAÇÃO DE PARTIÇÃO-EXCLUSÃO DE ÍONS NA SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	18
2.0 - OBJETIVOS	25
3.0 - PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	26
3.2 - COLUNAS	26

3,3 - RESINAS	27
3.3.1 - RESINA AG 50W - X4	27
3.3.2 - RESINA AG 50W - X8	27
3.3.3 - RESINA AG 50W - X12	28
3,4 - ELUENTES	28
3,5 - EQUIPAMENTOS	28
3.5.1 - BOMBAS	28
3.5.2 - BANHO TERMOSTÁTICO	29
3.5.3 - DETECTOR	29
3.5.4 - REGISTRADOR	29
3,6 - PARTE EXPERIMENTAL	29
3.6.1 - ACONDICIONAMENTO DAS COLUNAS	30
3.6.2 - PROCEDIMENTO	30
3.6.3 - MÉTODO REFRACTOMÉTRICO	34
3.6.4 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	34
3,7 - DETERMINAÇÕES	35
3.7.1 - EFEITO DO GRAU DE CRUZAMENTO	35
3.7.2 - EFEITO DO pH DO ELUENTE	36
3.7.3 - EFEITO DO COMPRIMENTO DA COLUNA	36
4,0 - CÁLCULOS EXPERIMENTAIS	37
4,1 - TEMPO DE RETENÇÃO	37
4,2 - TEMPO DE RETENÇÃO RELATIVO	39
4,3 - FATOR DE SELETIVIDADE	39
4,4 - RESOLUÇÃO	40

5,0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5,1 - TEMPERATURA	43
5,2 - TEMPO DE RETENÇÃO RELATIVO	44
5,3 - ESTUDO DO GRAU DE CRUZAMENTO DA RESINA	46
5,4 - ESTUDO DO EFEITO DE PH	46
5,5 - EFEITO DE pKa SOBRE OS TEMPOS DE RETENÇÃO	48
5,6 - ESTUDO DO COMPRIMENTO DA COLUNA	50
6,0 - CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	70

1.0 - INTRODUÇÃO

O uso de cromatografia de troca iônica para as análises de espécies iônicas ou ionizáveis em solução, tem sido uma das mais poderosas ferramentas nos presentes dias da química analítica. Cromatografia de troca iônica está baseada na separação de substâncias por suas migrações diferenciais numa coluna de resina de troca iônica. Íons (cátions ou ânions) são separados segundo reações de troca iônica que são características de cada tipo de íon. A cromatografia na qual são separadas substâncias moleculares, tais como açúcar ou ácidos carboxílicos, usando um trocador iônico mas sem desempenhar esta função, é chamada de cromatografia de partição-exclusão de íons.

Desde o uso inicial de materiais de troca iônica para a resolução de compostos inorgânicos, a literatura analítica agora inclui extensivamente muitas referências para as separações bioquímicas (especialmente aminoácidos), biomédicas, de drogas, indústrias de alimentos e numerosas classes de compostos orgânicos. Entre estes compostos orgânicos, os ácidos carboxílicos são de importante interesse pelo papel que desempenham no desenvolvimento de nossas vidas.

Muitos métodos analíticos para a separação de ácidos carboxílicos são conhecidos; porém, a maioria envolve processos de extração e concentração ou derivatização a formas voláteis para a análise por cromatografia gasosa (1). Em vista destas limitações, a cromatografia líquida tem sido o método selecionado entre os pesquisadores de algumas disciplinas que têm interesse na determinação de ácidos carboxílicos. A algum tempo atrás, alguns progressos foram alcançados usando colunas empacotadas com sílica,

mas esta é instável a alguns valores de pH (2). Adicionalmente, sua aplicação a análises práticas, usando eluentes orgânicos, não é muito usada (3). A preferência para cromatografia líquida na separação de ácidos carboxílicos tem-se desenvolvido como resultado da recente disponibilidade de polímeros de troca iônicas de alta eficiência. Os novos polímeros de troca iônica apresentam vantagens como estabilidade sobre a faixa total de pH e resistência a decomposição química e física. As resinas podem ser obtidas em partículas pequenas (10 μm ou menos); elas são umedecidas com água e as colunas são facilmente empacotadas; as resinas podem ser usadas com solventes aquosos puros ou com soluções modificadas com líquidos orgânicos; suas capacidades são altas, suas estruturas físicas são uniformes para dar bandas simétricas de eluição; e seus comportamentos cromatográficos em relação aos solutos orgânicos podem ser "otimizados" escolhendo adequadamente o contra-íons inorgânicos (4). Com estas vantagens os novos polímeros preenchem os requerimentos da cromatografia líquida moderna.

1.1 - APLICAÇÕES DE TROCA IÔNICA

A faixa de aplicações (5) das técnicas de troca iônica é vasta, tanto no campo industrial como no laboratório. A tecnologia neste campo está constantemente sofrendo mudanças, devido principalmente a avanços em teorias fundamentais, desenhos nas plantas de engenharia e melhoria do material de troca iônica.

A seguir, listamos algumas das aplicações de troca iônica:

- Processos de purificação
- Tratamento de água por troca iônica

- Tratamento de efluentes
- Refinação de carboidratos
- Processos de recuperação
- Recuperação de metais de minérios de baixo grau
- Aplicações analíticas e cromatografia de troca iônica
- Cromatografia de partição-exclusão de íons
- Recuperação de produtos orgânicos e farmacêuticos por troca iônica
- Aplicações médicas
- Troca iônica como catalisador e peneira molecular
- Aplicações agrícolas
- Aplicações na engenharia
- Troca iônica em contra-corrente contínua
- Meio-ambiente
- Aplicações industriais

1.2 - RESINAS DE TROCA IÔNICA

Uma variedade de substâncias orgânicas e inorgânicas têm sido usadas como trocadores de íons. Produtos naturais como proteínas, celulose, carvão, argila comum e vários minerais contêm íons móveis que podem ser trocados com outros íons quando estão em solução. Estes produtos naturais têm o inconveniente de possuir uma baixa capacidade trocadora e outras propriedades físicas e químicas inadequadas para seu uso como trocadores de íons em aplicações requisitando reprodutibilidade (6).

Outras substâncias, tais como zeólitos naturais e sintéticas, vidros, alguns óxidos inorgânicos como sílica porosa, sais insolúveis e polímeros orgânicos com grupos funcionais, também

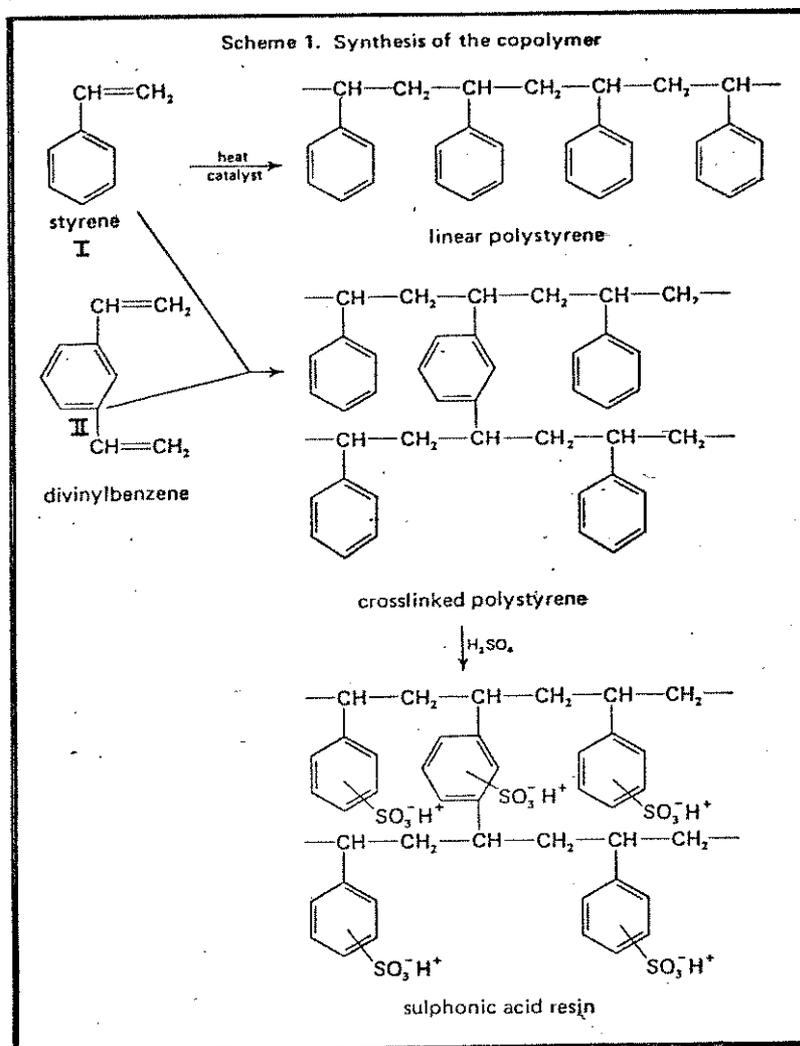
têm a habilidade de trocar um íon por outro. Os mais importantes em cromatografia de troca iônica são os que têm como esqueleto os polímeros orgânicos, mais conhecidos como resinas. Estes materiais sintéticos, tais como copolímeros de estireno-divinilbenzeno, são sólidos que podem ser representados estruturalmente como sendo formados de duas partes. A estrutura fundamental (ou esqueleto) destes trocadores consiste de uma matriz ou rede tridimensional hidrocarbonada e com propriedades elásticas. A segunda parte de sua estrutura é de natureza hidrofílica e consiste de grupos ionizáveis, quimicamente ligados à matriz hidrocarbonada. O material de troca iônica pode ser classificado como trocadores de cátions, trocadores de ânions ou trocadores de íons quelantes.

1.2.1 - RESINAS ORGÂNICAS

As resinas trocadoras de cátions ou ânions mais comuns são feitas de polímeros de estireno-divinilbenzeno entrecruzado. Por exemplo, o tipo mais comum de trocadores de cátions já preparado é feito pela sulfonação do anel benzeno de um copolímero de estireno-divinilbenzeno. Este estireno-divinilbenzeno, por sua vez é preparado pela copolimerização de estireno (I) e divinilbenzeno (DVB) (II). As estruturas e reações ilustram este exemplo (5).

Variando a quantidade de DVB na copolimerização, conseguem-se diferentes graus de entrecruzamento da cadeia linear do poliestireno. Para assegurar que o polímero final está em forma de partículas esféricas e pequenas, a polimerização é feita em estado de suspensão (6).

As resinas usadas como trocadoras catiônicas ou aniônicas podem ser classificadas como microporosas ou macroporosas. A

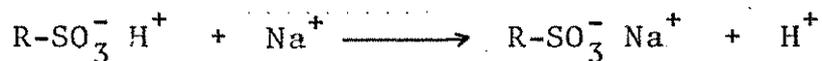


Estruturas e reações ilustrando a síntese de um polímero orgânico (5).

maioria dos trabalhos clássicos são feitos com resinas trocadoras microporosas. Este tipo de resina tem uma estrutura gelatinosa que contém água ocluída em quantidades consideráveis. Resinas trocadoras de íons com pequenos graus de entrecruzamentos são de tipo gel suave e tendem a dilatar-se ou contrair-se excessivamente quando são convertidas de uma forma iônica a outra. Resinas tipo gel com um alto grau de entrecruzamento tendem a excluir íons grandes, enquanto a difusão de íons de tamanho ordinário dentro do gel pode ser mais lenta que o esperado.

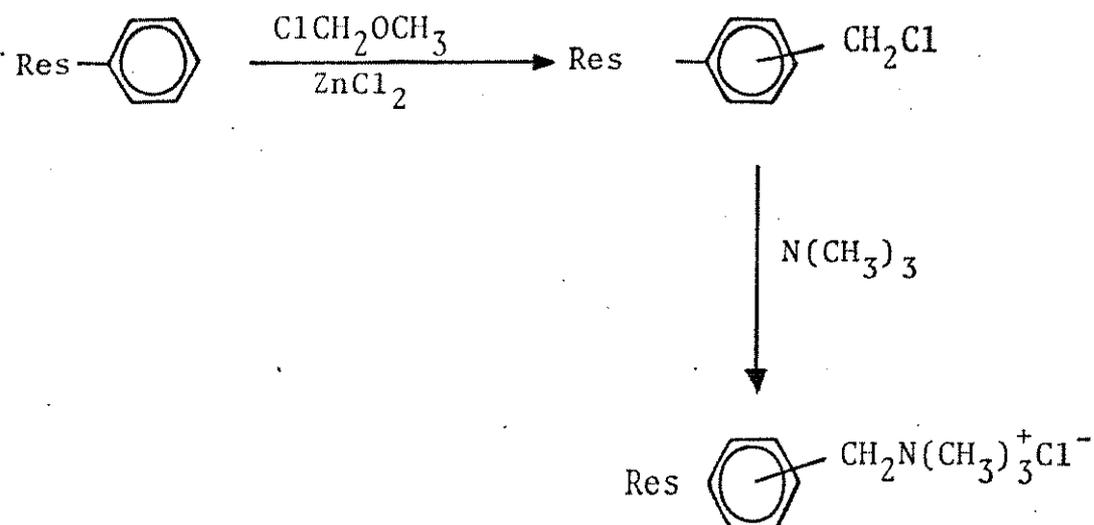
As diferentes formas de resinas de troca iônica são feitas introduzindo-se grupos funcionais adequados na partícula polimérica. O grupo funcional mais comumente usado como trocador catiônico é o grupo sulfônico. Ele é introduzido na resina por sulfonação do polímero de estireno-DVB. Estes grupos sulfônicos, $-SO_3^-$, representam os sítios ativos para a troca iônica e são quimicamente ligados à matriz, com sua movimentação drasticamente restringida. No entanto, o contra-íon H^+ está livre para movimentar-se (perto do $-SO_3^-$) e pode ser trocado por outro cátion.

Por exemplo, se uma solução de NaCl é colocada em contato com uma resina trocadora de cátions em forma hidrogênio (forma-H), ocorre a seguinte reação de troca:



onde R representa a matriz hidrocarbonada da resina.

O grupo funcional mais comumente usado como trocador de ânions é uma amina quaternária. Este trocador de ânions é obtido por reações de clorometilação dos anéis de benzeno da resina e então por reação com uma amina terciária, tal como a trietilamina:



Nesta resina só o ânion, Cl^- , é móvel e pode ser trocado por outro ânion.

1.2.1.1. Propriedades Físicas das Resinas Orgânicas de Troca Iônica

A maioria das resinas de troca iônica são vendidas em forma de grânulos esféricos e seu diâmetro pode variar de $5\mu\text{m}$ até 1mm (6). Os grânulos são dimensionados através das malhas de uma peneira, sendo que a malha varia inversamente proporcional ao diâmetro dos grânulos. Existem malhas de nº 16 até 400. As partículas menores das resinas são usadas em procedimentos cromatográficos onde os grânulos da resina são colocados num tubo ou coluna. As soluções a serem processadas fluem verticalmente através da coluna empacotada. As partículas mais grossas são usadas em operações não cromatográficas.

Quando os grânulos de resina são mergulhados em água, eles embebem uma quantidade do líquido e formam uma estrutura homogênea do tipo gel. Nesta estrutura o íon hidrogênio, se o trocador catiônico estiver em forma-H, ou o íon Cl^- , se o trocador aniônico estiver em forma- Cl^- , estarão completamente dissociados na água ocluída e estarão livres para difundir-se através do grânulo da resina. Por conseguinte, este contra-íon pode ser trocado por uma quantidade equivalente de íons de carga similar quando estiverem em contato na mesma solução.

dilatação e porosidade

Já que uma resina de troca iônica tem uma estrutura elástica tridimensional, elas não possuem um tamanho de poro definido. De fato, as resinas só tem uma porosidade apreciável quando são dilatadas por um solvente adequado. A quantidade de dilatação é diretamente proporcional ao número de grupos funcionais hidrofílicos unidos à matriz polimérica e inversamente proporcional ao grau de entrecruzamento (DVB) presente na resina. Este último fator é o mais importante na determinação da extensão em que a resina é livre para dilatar-se ou contrair-se (6).

grau de cruzamento

O grau de cruzamento num trocador de poliestireno é expressado com a fração de divinilbenzeno que está contido na resina de estireno-divinilbenzeno. O conteúdo de DVB varia de 1% a 16% em resinas comerciais. Cerca de 8% de DVB é considerado ideal para propósitos gerais.

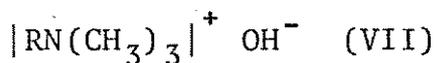
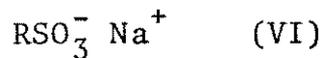
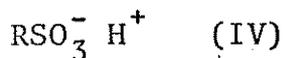
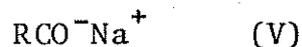
A porcentagem de cruzamento afeta puramente a estrutura física da partícula. Resinas com um baixo grau de cruzamento re-

têm uma considerável quantidade de água e dilatam-se formando uma estrutura suave e gelatinosa. Por outro lado, resinas com um alto grau de cruzamento dilatam-se em menor proporção; estas partículas retêm pequenas quantidades de água e, conseqüentemente, apresentam-se duras e quebradiças.

A relação entre o conteúdo de água e o grau de cruzamento é mostrado na fig. 1.1 para trocadores de forma-H e forma-Cl (7).

1.2.1.2. Propriedades Químicas das Resinas Orgânicas de Troca Iônica

Os trocadores de íons podem ser considerados como ácidos, bases ou sais insolúveis e podem ser representados usando fórmulas químicas. Símbolos como \emptyset , R, ou Res são usados para representar a parte orgânica de uma resina trocadora. Por exemplo:



as estruturas III e IV representam resinas trocadoras ácidas fracas e fortes, respectivamente. V e VI representam os sais de sódio de III e IV. O trocador fortemente básico está representado pela fórmula VII e se estiver na forma-Cl, é representado por VIII.

As resinas de troca aniônica fortemente básicas (p. ex.

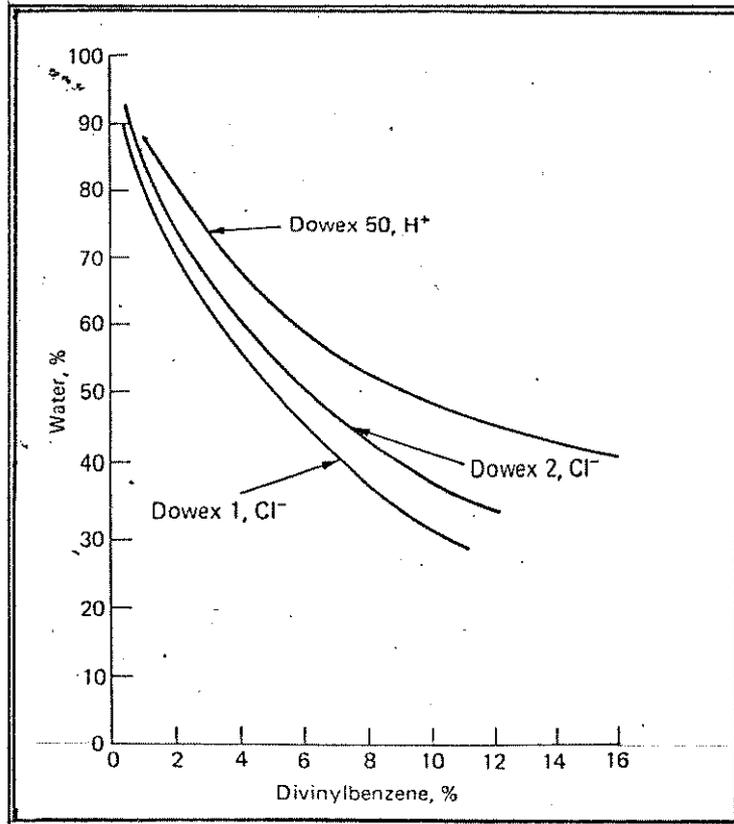
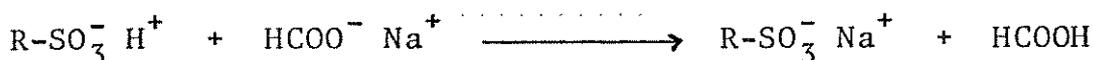


Figura 1.1 - Diagrama de conteúdo de umidade contra a porcentagem de divinilbenzeno numa resina (7).

$R-CH_2N^+(CH_3)_3 OH^-$) interagem com espécies aniônicas fortes e fracas. Da mesma forma, as resinas de troca catiônica fortemente ácidas (p. ex. $R-SO_3^- H^+$) interagem com espécies catiônicas fortes e fracas. Ambas as resinas têm a capacidade de desdobrar sais (8). A reação de desdobramento de um sal por uma resina de troca catiônica, pode ser descrita como na equação abaixo.



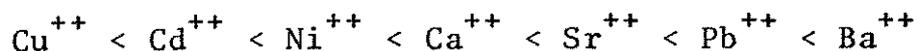
As resinas de troca aniônica fracamente básicas (p. ex. $R-NH_3^+ ^-OOCCH_3$) não interagem com os ânions dos sais de base fortes, bem como as resinas de troca catiônica fracamente ácidas não interagem com os cátions de sais de ácidos fortes. Ambas as resinas não têm a capacidade de desdobrar sais. As resinas de troca aniônica fracamente básicas interagem com os ânions de bases fortes.

As trocas iônicas numa resina progridem estequiometricamente, ou seja, por cada íon equivalente removido de uma solução por um trocador, um íon equivalente deve ser liberado pela resina. A capacidade de uma resina é normalmente expressada em miliequivalentes de íons trocáveis por grama de resina seca ou miliequivalente de íons trocáveis por grama de resina úmida. Resinas comerciais catiônicas contêm aproximadamente um grupo funcional por anel benzênico e têm uma capacidade trocadora de 4.5 meq/g (9). Resinas aniônicas têm tipicamente uma capacidade de 3.5-4.0 meq/g para o tipo gel.

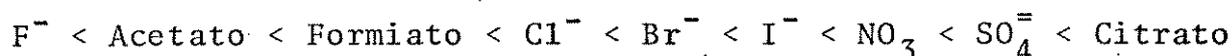
Em geral a afinidade de um trocador de íons por um outro íon aumenta com a carga deste último. Para íons monovalentes alcalinos, a afinidade aumenta com o peso atômico do íon. Esta propriedade da resina é chamada *SELETIVIDADE* pelos contra-íons. A ordem de afinidade dos cátions monovalentes comuns é:



Para cátions divalentes comuns é:



Para ânions, as séries de seletividade também têm sido estabelecidas. A seqüência é:



As seqüências de seletividade dependem do grupo funcional da resina (grupo fixo). O ordenamento anterior corresponde a resinas com grupos fortemente ácidos ou fortemente básicos.

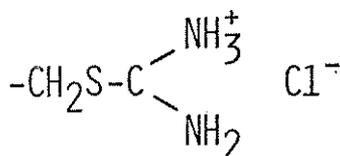
Normalmente as resinas trocadoras de íons são substâncias excepcionalmente inertes. A temperatura ambiente, as resinas de estireno-DVB são essencialmente insolúveis em soluções aquosas e em solventes usualmente empregados no laboratório. Nestas condições estas resinas são resistentes a decomposição por ataques químicos com exceção de agentes oxidantes muito fortes. Resinas sulfônicas na forma-H, decompõem-se em água a 150°C, produzindo ácido sulfúrico. Resinas com aminas quaternárias na forma-OH sofrem decomposição acima de 50°C. Outra limitação destas resinas é sua degradação e degeneração na presença de uma forte fonte de raios gama.

1.2.2. OUTRAS RESINAS

Outro tipo de resinas são as chamadas resinas peliculares, as quais são basicamente esferas de vidro envolvidas em uma fase estacionária ativa. Estas resinas foram descritas em traba-

lhos anteriores por Farris (8).

Recentemente têm sido desenvolvidos novos materiais para troca à base de sílica porosa que são utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (9). Propriedades diversas são mostradas por resinas preparadas para fins específicos. Por exemplo, resinas de intercâmbio iônico quelantes têm a habilidade de tomar ou complexar alguns íons metálicos enquanto outros são rejeitados. Resinas de iminodiacético, tipo quelante Dow, conhecidas também como Chelex 100, têm um grupo funcional $R-CH_2N(CH_2CO_2H)_2$ que reage com muitos íons metálicos a diversos pH (10). Koster e Schmucler (11) desenvolveram e patentearam uma resina contendo o grupo funcional isotiuronium que tem excelente seletividade para metais como ouro e platina.



Grupo funcional isothiuronium

As mais recentes resinas têm sido descritas nos anos 1970 e 1980 com propósitos analíticos. Estas resinas possuem propriedades quelantes, reagem rapidamente com íons metálicos e têm alto grau de cruzamento. Grupos funcionais com $-CO_2(CH_2)_6OCOCH_2SH$ ou "Crown Éter" têm sido usados. Uma excelente revisão sobre estes trabalhos já está na literatura (12).

1.3. CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

A cromatografia de troca iônica baseia-se na separação de substâncias por suas migrações diferenciais sobre uma coluna de troca iônica. Estas separações ocorrem principalmente através do mecanismo simples de intercâmbio iônico e são governados primeiramente por um processo de difusão, acompanhado de uma troca rápida e estequiométrica de um contra-íon por outro. A afinidade por um contra-íon que migra ao longo da coluna depende da magnitude da sua carga e está diretamente relacionada a sua mobilidade a qual, por sua vez, está relacionada com a forma e tamanho deste contra-íon. O trocador de íons mostra uma pequena preferência por contra-íons com um pequeno volume de solvatação. Assume-se que na maioria dos casos, os interstícios ou poros da matriz de um trocador de íons não excluem os íons grandes por peneiração mecânica. Também é assumido que o principal tipo de enlace entre o contra íon e o grupo funcional é de natureza iônica e não sortiva (ou de sorção).

Nos últimos três anos, recentes avanços e aplicações em cromatografia de troca iônica têm revivido o interesse na aplicação de trocadores de íons com grandes poros na separação de proteínas, polipeptídeos e polinucleotídeos. Tudo isto é incentivado pela importância da biotecnologia (13). Uma revisão abrangente sobre os recentes desenvolvimentos em cromatografia de troca iônica foi publicada por Walton (14). Neste trabalho, foram cobertos tópicos sobre materiais de troca iônica, seletividade, métodos experimentais, separações de metais por complexação, e a cromatografia de compostos orgânicos.

1.4. CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO-EXCLUSÃO DE ÍON

Outras das utilidades de uma coluna de troca iônica é o uso de resina para a separação de compostos não-iônicos, tais como oligossacarídeos, lipídeos, álcoois, açúcares, fenóis e ácidos carboxílicos, pelo mecanismo de partição-exclusão de íon.

A cromatografia de partição-exclusão de íon é uma velha técnica que recentemente tem recebido uma crescente atenção. Segundo seu mecanismo, o material iônico é rejeitado pela resina de troca iônica passando rapidamente através da coluna. O material não-iônico é retido e atravessa a coluna mais lentamente.

1.4.1. MECANISMO DE EXCLUSÃO

Uma resina de troca iônica consiste de três partes:

- (A) A matriz sólida (porosa da resina).
- (B) O líquido ocluído dentro dos grânulos da resina
- (C) A fase móvel intersticial entre os grânulos da resina.

Os grânulos atuam como uma membrana semipermeável, entre as duas fases aquosas (B) e (C). Embora a água seja o único líquido usado, o líquido ocluído (B) tem um caráter diferente ao do líquido intersticial (C), porque (B) está no interior da matriz hidrocarbonada que contém uma alta concentração de grupos iônicos.

A separação de eletrólitos* de não-eletrólitos, em uma coluna empacotada com resina de troca catiônica é chamada de exclusão de íons. O mecanismo de exclusão de íons pode ser explicado pela teoria da membrana de Donnan (6), segundo a qual os solutos diluídos altamente ionizados, tais como ácidos minerais, que são postos em contato com trocadores de alta capacidade, são excluídos do líquido interior (B) e passam rapidamente através da coluna saindo com o mesmo tempo de retenção de compostos não retidos.

Os solutos não-iônicos não são excluídos e podem sofrer partição entre as duas fases (B) e (C) e ter a mesma concentração em ambas as fases. A teoria da membrana de Donnan não é aplicável a estes solutos não-iônicos.

A teoria de exclusão de íons tem sido discutida por Wheaton e Bauman (15) e por Simpson e Wheaton (16). Por outro lado, o efeito de contra-íon em cromatografia de partição-exclusão de íon foi estudado por Dieter e Walton (4).

1.4.2. MECANISMO DE PARTIÇÃO

Solutos não-iônicos têm tendências a penetrar na matriz hidrocarbonada do trocador, de tal forma que verifica-se um movimento de "entrada e saída" ao redor da resina. Esta tendência produz um efeito retardador, o qual é diferente para cada tipo de

*Neste texto os termos eletrólitos e não-eletrólitos são tomados relativamente, p. ex., o ácido oxálico com K_i igual a 5.9×10^{-2} é denominado eletrólito e o ácido acético com K_i igual a 1.75×10^{-5} é não-eletrólito

soluto não-iônico. Estas diferenças – nas tendências a retardar são devido a (i) atrações polares entre os grupos funcionais e (ii) forças de van der Waals entre os não-eletrólitos e a parte hidrocarbonada da resina. O resultado é a partição do soluto entre o líquido ocluído (B) (secção 1.4.1) e a fase móvel intersticial entre os grânulos da resina. A partição é descrita pelo coeficiente de distribuição, $K_d = C_r/C$, onde C_r é a concentração de um soluto na fase estacionária (resina) e C é a concentração do mesmo soluto na fase móvel (17). Outros fatores, tais como a natureza e a concentração dos solutos, afetam as diferenças da retenção dos solutos na fase da resina (17). Além disto, uma pequena molécula não-iônica, por ter maior facilidade de "viajar" através do interior das partículas de resina, será eluída mais tarde que aquelas moléculas maiores não-iônicas (18). Reichenberg e Wall (6) têm discutido a absorção de moléculas não carregadas por resinas de troca iônica.

1.4.3. MECANISMOS COMBINADOS

A combinação destes mecanismos, exclusão de íons e partição, representa uma excelente ferramenta para as separações de:

- Eletrólitos fortes de eletrólitos fracos
- Eletrólitos de não-eletrólitos
- Misturas de compostos não iônicos
- Moléculas não-iônicas pequenas daquelas grandes não-iônicas.

Além do mecanismo de exclusão de íons e partição, outros efeitos de sorção contribuem nas separações cromatográficas.

Walton (4) estudou recentemente o efeito da água de hidratação do contra-íon e as interações existentes entre o soluto e a água de oclusão da resina, pela formação de ponte de hidrogênio.

1.5. APLICAÇÃO DE PARTIÇÃO-EXCLUSÃO DE ÍONS NA SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

A separação de ácidos carboxílicos por resina de troca catiônica na forma-H representa o mecanismo de partição-exclusão de íons baseado na repulsão de solutos ionizados do interior da resina, pela membrana de Donnan. Muito embora limitadas, excelentes revisões sobre cromatografia líquida (13) e separações de ácidos carboxílicos (19,20) têm sido feitas. Assim podemos encontrar diversos trabalhos e estudos sobre suas aplicações analíticas.

Harlow e Morman (17) estudaram o comportamento de um grande número de ácidos orgânicos e inorgânicos, usando uma coluna empacotada com resina na forma-H, da Dowex 50W-X12. O eluente usado foi água destilada. Os ácidos foram titulados automaticamente com hidróxido de sódio tão logo que emergiam da coluna. Os tempos de retenção dos ácidos em relação ao ácido acético são mostrados na tabela 1.1. Os ácidos fortes, tais como ácido sulfúrico e clorídrico eluem junto com os compostos não retidos, porque eles estão altamente ionizados e não podem entrar na fase da resina. Harlow e Morman fizeram algumas generalizações para prever o comportamento de eluição dos ácidos:

- 1 - Membros de uma série homóloga emergem em ordem crescente de força ácida e em ordem decrescente de solubilidade em

Tabela 1.1 - Tempos de Retenção de Alguns Ácidos Carboxílicos

COMPOSTOS	RETENÇÃO	
	(a)	(b)
Mesoxálico	0,47	
Oxálico	0,48	0,62
Pirúvico	0,52	0,71
Meléico	0,52	0,61 - 0,71
Tartrônico	0,52	
Tartárico	0,58	
Malônico	0,59	0,72
Glioxálico	0,60	
Málico	0,64	
Metoxiacético	0,80	
Glicólico	0,82	0,82
Láctico	0,83	0,84
Fumárico	0,87	1,00
Glicérico	0,87	0,75
Succínico	0,89	0,82
Fórmico	0,91	0,91
Acético	1,00	1,00
Propiônico	1,07	1,17
Acrílico	1,14	1,23
Isobutírico	1,29	1,32
Butírico	1,37	1,45
Crotônico	1,76	1,95

- (a) tempo de retenção relativo ao ácido acético utilizando resina catiônica fortemente ácida. AG 50W-X8, forma hidrogênio, <400 mesh e água como eluente, segundo Yoshikawa (19).
- (b) tempo de retenção relativo ao ácido acético usando resina catiônica fortemente ácida, Dowex 50W-X12, forma hidrogênio, 200-300 mesh, e água como eluente, segundo Harlow e Norman (17).

água. Um exemplo é a série dos ácidos fórmico, acético e propiônico.

- 2 - Ácidos dibásicos eluem mais rapidamente que os monobásicos do mesmo número de carbonos. Ácido oxálico elue antes que o acético, malônico antes que o propiônico e assim por diante.
- 3 - Um isoácido elue antes que o ácido normal correspondente. Por exemplo o isobutírico emerge antes do butírico, isovalérico antes do valérico e metacrílico antes do crotônico.
- 4 - Uma dupla ligação tende a retardar o tempo de eluição de um ácido: Propiônico (pH 4.82) elue antes do acrílico (pK 4.26) e butírico (pK 4.82) elue antes que o ácido crotônico (pK 4.70) e metacrílico (pK 4.66). Este é um caso onde um ácido forte pode emergir depois que um ácido fraco.
- 5 - Ácidos com anel benzeno são retidos fortemente.
- 6 - Um grupo ceto acelera o tempo de eluição de ácidos carboxílicos em relação a outros com o mesmo número de carbonos; α -cetovalérico elue muito antes que o valérico. Ácido pirúvico elue antes que o propiônico.
- 7 - Um grupo hidroxila (OH) parece ter um comportamento imprevisível já que o ácido glicólico elue antes que o acético e por outro lado α -hidroxibutírico elue depois que o butírico.

Metha e colaboradores (22) separaram misturas de ácidos orgânicos de dois e três componentes. Dos resultados de seus estudos eles observaram principalmente que:

- 1 - Pequenas mudanças em temperaturas não produziam variações significantes nas resoluções.
- 2 - A sorção de ácidos carboxílicos (alifáticos e aromáticos) é inversamente proporcional ao grau de cruzamento da resina.

- 3 - A presença de uma dupla ligação na molécula do ácido reduz grandemente o tempo de retenção do isômero cis em relação ao trans.
- 4 - Um grupo α -ceto no ácido reduz a partição do ácido em relação ao ácido carboxílico correspondente. P. ex. ácido pirúvico elue antes que o propiônico.
- 5 - Um grupo hidroxila (OH^-) na molécula reduz a partição da molécula quando é comparada ao ácido carboxílico correspondente. Um segundo grupo OH^- na molécula contribui para a redução de partição, porém em menor grau.

Reichenberg e Wall (18) estudaram alguns fatores envolvidos nos processos de partição de solutos não-eletrólitos. Eles desenvolveram um estudo para os ácidos fracos, como acético, propiônico e n-butírico, utilizando resinas de troca catiônica. A partir dos resultados, observaram que a partição é influenciada pela forma catiônica, pelo grau de cruzamento de resina, pelo comprimento da cadeia hidrocarbonada, pelos grupos polares do soluto, assim como pela concentração da solução. Os fatores operacionais que influenciam a partição são:

- Dissolução do soluto na água presente na resina;
- Solvatação dos grupos polares da resina;
- Interações de London, entre a parte hidrocarbonada do soluto e os núcleos benzênicos da resina;
- Atrações polares entre os grupos funcionais dos solutos.

Devido à hidratação dos grupos polares da resina (13), sua polaridade é diminuída, assim os solutos se difundem mais facilmente no seu interior. Quanto menos polar é o soluto, mais ele é retido pela resina. Portanto, o coeficiente de distribui-

ção aumenta na seguinte ordem dos ácidos: acético, propiônico e n-butírico.

Turkelson e Richard (3) podem ser considerados responsáveis pelo renascimento da cromatografia de exclusão-partição. Seu trabalho mostrou-se prático para a cromatografia moderna por suas separações do ciclo do ácido cítrico e outros ácidos orgânicos. As separações foram feitas em uma coluna de troca catiônica de 22 cm empacotada com Aminex 50W-X4 (30-35 μ m). Uma importante característica deste trabalho foi mostrar as vantagens de usar um eluente ácido. Primeiramente só água foi usada como eluente; porém os picos obtidos foram largos e assimétricos, possivelmente devido ao fato de que cada ácido estava em ambas as formas molecular e aniônica. A adição de ácido clorídrico ao eluente (água) reprimiu a ionização dos ácidos fracos e converteu a amostra parcialmente ionizada em uma forma molecular. Isto melhorou grandemente as resoluções e aumentou a agudeza dos picos. Os ácidos separados foram detetados com um detetor UV a 210 nm.

Tanaka e Ishinzuka (21) também estudaram o comportamento de eluição de alguns ácidos fortes e fracos, e calcularam seus coeficientes de distribuição. O coeficiente de distribuição dos ácidos foi calculado da equação convencional para cromatografia de exclusão de íons: $V_r = V_o + K_d x V_i$. Como os valores de K_d da maioria dos ácidos está entre 0 e 1, foi possível avaliar o mecanismo de separação dos ácidos baseando-se no efeito de exclusão de íons.

Woo e Benson (2) apresentaram análises cromatográficas de ácidos carboxílicos provenientes de fontes tais como: misturas de ácidos orgânicos, vinhos, iogurte, urina e fluidos cérebro-es-

pinhal. As magníficas separações apresentadas foram obtidas em minutos, usando-se polímeros trocadores de cátions e pressão de 100 atmosferas. Eles concordam que o principal mecanismo para a separação de ácidos usando um trocador de cátions em forma-H é a exclusão de íons, e que a ordem de eluição está correlacionada com o pKa. Em seus resultados e discussões, eles ressaltaram que colunas poliméricas com frequência exibem aumento de eficiência quando são usadas a temperaturas elevadas, o que foi comprovado em seus estudos. Outro destaque de grande significância foi o fato de que a temperatura da coluna influencia a seletividade. Alguns compostos eluíram em ordem inversa quando a temperatura foi aumentada de 35 a 65°C.

Yoshikawa (19) recentemente aplicou a cromatografia líquida de partição-exclusão de íons com o objetivo de separar e identificar espécies tritiadas, obtidas por irradiação de compostos de lítio. Para as separações foram usadas colunas empacotadas com as resinas: 1) AG 50W-X8, usando água desionizada como eluentes e 2) resina Bio-Rex 70, usando como eluentes água desionizada, HCl 5×10^{-3} M e HClO₄ 5×10^{-3} M. As resinas AG-50W-X8 e Bio-Rad 70 são trocadores catiônicos fortes e fracamente ácidos, respectivamente. O trocador fraco Bio-Rad 70 não foi bem sucedido na separação de ácidos. Com a resina AG 50W-X8 foram separadas nove espécies tritiadas quando carbonato de lítio foi irradiado e seis, quando irradiou-se oxalato de lítio. Destas espécies, a maioria correspondiam a ácidos carboxílicos monobásicos. Yoshikawa também estudou o comportamento cromatográfico de alguns ácidos e apresentou seus tempos de retenção em relação ao ácido acético. (Tabela 1.1). Os valores por ela encontrados não seguem a mesma ordem dos valores de Harlow e Morman (17).

Goodman e colaboradores (23) compararam o fato de que os ácidos carboxílicos de baixo peso molecular eluem em ordem crescente de seus pesos moleculares. Eles usaram resina catiônica, Amberlite CG 120 na forma-H. Suas determinações foram a nível de traços.

Patel e Bafna (24) com uma resina Dowex 50-X4, separaram misturas duplas de ácidos e observaram que a partição umenta va com a série homóloga.

Richards (25) usou HCl 0.01 N como eluente, com resinas Dowex 50W-X4 e Aminex 50W-X4. Sua ordem de eluição foi: Maleico, citracônico, fumárico, acético e acrílico. Também observou que os tempos de retenção são diretamente proporcionais à concentração do eluente.

Lunder e Missori (26), depois de separar com sucesso uma mistura de dez ácidos carboxílicos com uma coluna Beckman tipo AAI5 na forma-H e eluente HCl 0.005 M, afirmaram que a separação dos ácidos não obedece estritamente a variação dos graus de dissociação, em contraste ao trabalho de Woo e Benson (2).

2.0 - OBJETIVOS

Recentes avanços em separações cromatográficas com a cromatografia líquida, usando colunas contendo material polimérico com grupos sulfônicos quimicamente ligados, têm produzido um método muito adequado para a determinação de ácidos orgânicos provenientes de uma grande variedade de fontes.

Nosso objetivo é: desenvolvimento de uma análise completa de ácidos mono e dicarboxílicos de baixo peso molecular, oxigenados ou não.

A técnica usada será: Cromatografia de partição-exclusão de íons.

Neste trabalho serão feitas novas experiências a fim de melhorar a resolução e resultados de recentes pesquisas (8,19) mediante o estudo e a variação de alguns parâmetros. A ferramenta comparativa a ser usada será:

Determinação dos tempos de retenção de 31 ácidos carboxílicos em relação ao tempo de retenção do ácido acético.

As variáveis a estudar são:

- Efeito da variação do grau de cruzamento da resina sobre a efetividade da separação de ácidos carboxílicos;
- Efeito da mudança do pH do eluente na resolução das amostras ácidas;
- Efeito produzido na variação do comprimento da coluna sobre a resolução das misturas ácidas.

3.0 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para estes experimentos foram utilizados H_2SO_4 0.1 N e soluções aquosas, 0.1 molar de trinta ácidos carboxílicos. Depois de preparadas as soluções destes ácidos, mistura-se cada uma destas soluções com um volume igual (proporção 1:1) de ácido acético (0.2 M).

As soluções foram preparadas e estocadas na geladeira durante o período destas experiências.

3.2 - COLUNAS

Foram usadas colunas cromatonix Tipo LC que consistem de um tubo de precisão feito com vidro de borossilicato, êmbolos interno e externo, e um suporte de Teflon para a resina.

As colunas usadas têm 1000 mm de comprimento e 5.5 mm de diâmetro interno. Estas colunas foram empacotadas no laboratório de radioquímica da UNICAMP com as resinas abaixo descritas. As colunas foram colocadas dentro de "jaquetas" de vidro que permitem a circulação de água a temperatura controlada fora da coluna.

3.3 - RESINAS

As resinas utilizadas foram do "tipo Gel", copolímeros sulfonados de estireno-divinilbenzeno.

Estas resinas são trocadoras catiônicas fortemente ácidas, da Bio-Rad Laboratories com as seguintes características:

3.3.1 - RESINA AG 50W - X4

- diâmetro médio dos grânulos < 0,037 mm
- malha < 400 (< 0,037 mm);
- forma: hidrogênio;
- Capacidade total: 1.2 meq/ml de resina hidratada
5.2 meq/g de resina seca
- matriz: poliestireno com 4% de divinilbenzeno
- íon permanente: ácido sulfônico
- tipo: porosa
- tamanho efetivo dos poros: grande

3.3.2 - RESINA AG 50W - X8

- Malha < 400
- forma: hidrogênio
- capacidade total: 1.7 meq/ml de resina hidratada
5.1 meq/g de resina seca
- matriz: poliestireno com 8% de divinilbenzeno
- íon permanente: ácido sulfônico
- tipo: poroso
- tamanho efetivo dos poros: médio (1-5 nm)

3.3.3 - RESINA AG 50W - X12

- Malha < 400
- forma: hidrogênio
- capacidade: 2.3 meq/ml de resina hidratada
5.0 meq/g de resina seca
- matriz: poliestireno com 12% de divinilbenzeno
- íon permanente: ácido sulfônico
- tipo: poroso
- tamanho efetivo dos poros: pequeno

3.4 - ELUENTES

Durante as experiências cromatográficas foram usados os seguintes eluentes como fase móvel.

- H₂O destilada a desionizada (água DI) pH = 5.5
- solução aquosa de HClO₄ pH = 3.0
- solução aquosa de HClO₄ pH = 1.0

Os eluentes tiveram de ser desgaseificados antes de serem usados.

3.5 - EQUIPAMENTOS

3.5.1 - BOMBAS

- A bomba mais usada nesta pesquisa foi fabricada pela Instrumentation Specialities Company (ISCO) Modelo Dia-

lograd 384; a mesma está acoplada a um sistema de transmissão, que controla a velocidade de fluxo e programação de misturas das soluções.

- Bomba de pulso e reservatório limitado, Modelo 396/2396, fabricado por Milton Roy Company. (Esta bomba foi usada como mais uma alternativa).

3.5.2 - BANHO TERMOSTÁTICO

A temperatura das colunas e detector foi controlada pelo banho termostático Varian-Aerograph Série 4100 com sistema de circulação, interno ou externo.

3.5.3 - DETECTOR

Índice de refração (RI) de Varian-Aerograph Série 512.

3.5.4 - REGISTRADOR

Equipamento Científico do Brasil (ECB) Modelo RB 101.

3.6 - PARTE EXPERIMENTAL

O diagrama de blocos das figuras 3.1 e as figuras 3.2 e 3.3 representam o sistema de cromatografia líquida usado para a

separação e detecção dos ácidos carboxílicos.

3.6.1 - ACONDICIONAMENTO DAS COLUNAS

Usando cuidadosas técnicas e em condições similares, as colunas cromatográficas foram empacotadas e estabilizadas a 400 P.S.I., com as correspondentes resinas em forma-H. Depois de montadas no sistema cromatográfico, elas foram estabilizadas termicamente à mesma temperatura que o detector (RI), usando o banho termostático.

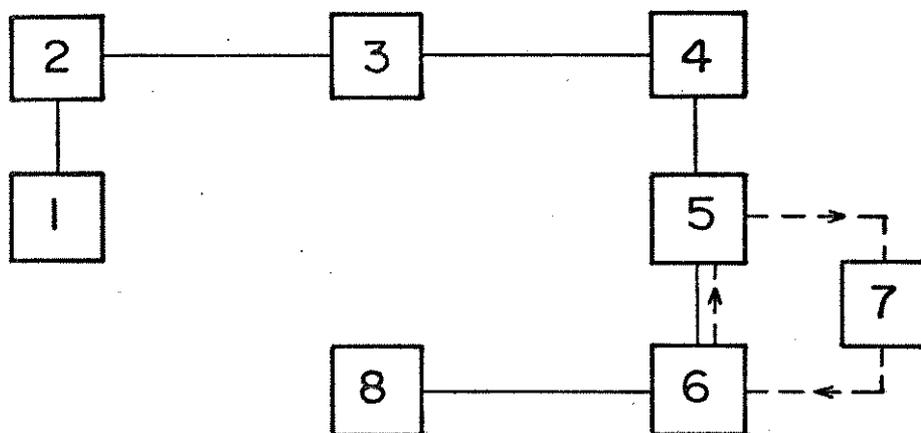
Dessa maneira, foram feitas e usadas, neste trabalho, colunas empacotadas com as resinas AG 50W - X4, AG 50W - X8 e AG 50W - X12, descritas anteriormente.

3.6.2 - PROCEDIMENTO

Quantidades conhecidas das misturas dos ácidos foram dissolvidos em água e injetadas (na ordem de μl) na coluna através do septo injetor. Depois da passagem pela coluna, a fase móvel passa por um detector de índice de refração, o qual envia um sinal ao registrador onde é registrado o cromatograma. Posteriormente são feitas medidas e cálculos destes dados (Cap. 4).

Diariamente antes de fazer uma análise, o aparelho é calibrado. O registrador também é calibrado junto com o detector para máxima deflexão da pena e aproveitamento da largura do papel.

Para assegurar que as condições cromatográficas são constantes, uma amostra apropriada de H_2SO_4 diluído é injetada na



- 1 Sistema de Controle
- 2 Bomba
- 3 Monitor de pressão
- 4 Septo Injetor
- 5 Coluna
- 6 Refratômetro Diferencial
- 7 Banho Termostático
- 8 Registrador

Figura 3.1 - Diagrama de blocos do sistema de cromatografia líquida de partição-exclusão de íon.

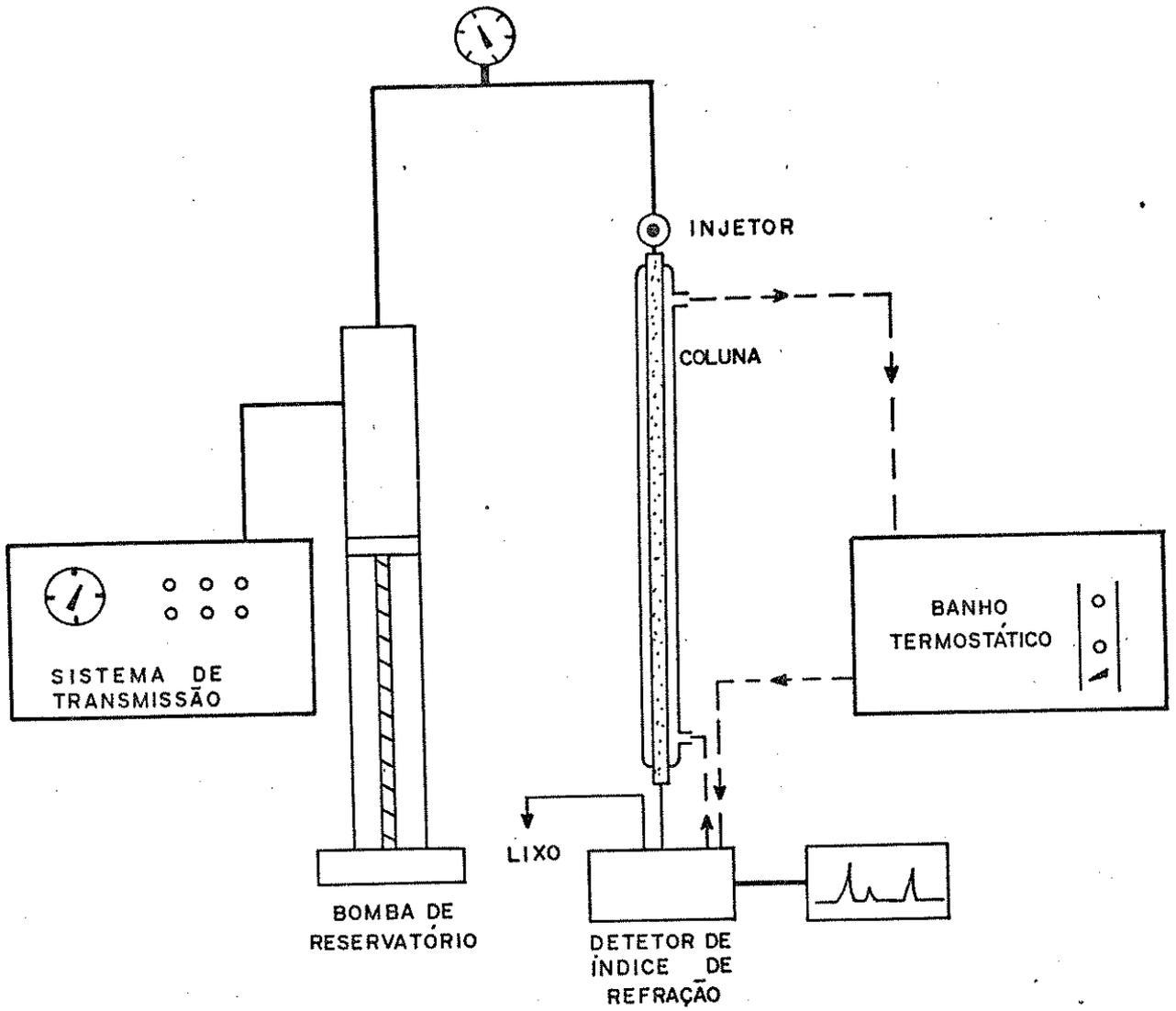


Figura 3.2 - Instalações cromatográficas para a separação de ácidos carboxílicos.

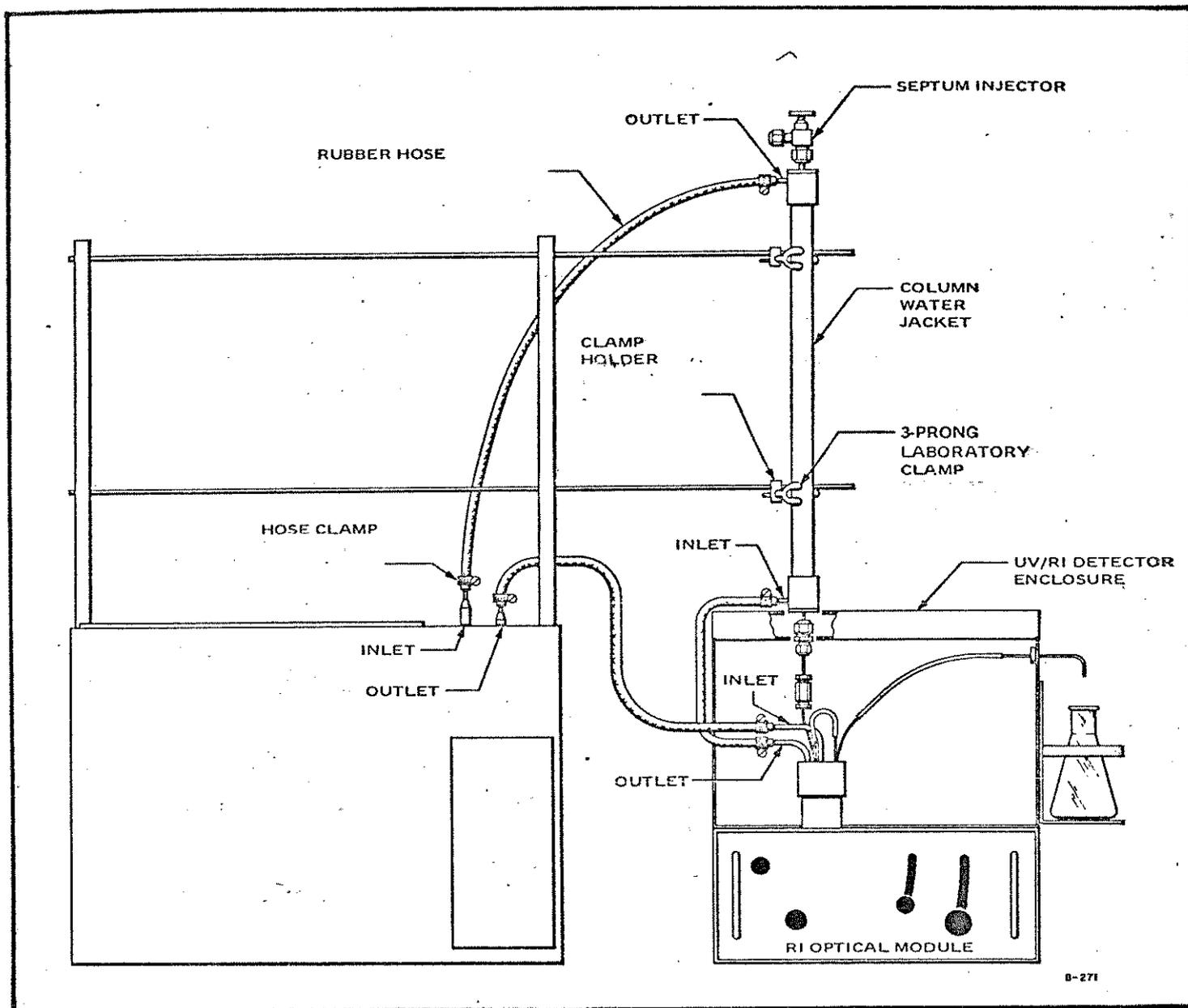


Figura 3.3 - Arranjo típico do sistema cromatográfico,
coluna e detector controlados termicamente.
(27)

coluna no início e fim de cada jornada de trabalho. O tempo de retenção do ácido sulfúrico serve como padrão para verificar que velocidade da fase móvel, temperatura, pressão e velocidade do registrador estão sempre constantes.

3.6.3 - MÉTODO REFRACTOMÉTRICO

É conhecido que um refratômetro diferencial dá resposta a qualquer composto que tenha índice de refração diferente ao do eluente. Em nosso caso, o eluente não mudava durante a análise e mediante rigoroso controle de temperatura se conseguiram linhas-base estáveis.

Tal como aparece no diagrama da figura 3.2, o refratômetro foi instalado na saída das colunas cromatográficas. Com este método refractométrico foi possível analisar o comportamento cromatográfico de 31 ácidos carboxílicos e suas misturas.

3.6.4 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Temperatura do termostato	37°C
Fase móvel	H ₂ O ou HClO ₄ dil.
Velocidade de fluxo	21.6 ml/h
Pressão	variável
Comprimento da coluna	1 m ou 2 m

3.7 - DETERMINAÇÕES

Para dar cumprimento aos objetivos deste trabalho determinaram-se os tempos de retenção dos ácidos carboxílicos em relação ao tempo de retenção do ácido acético, mediante o estudo e variação de alguns parâmetros, tais como:

Grau de cruzamento das resinas

Efeito do pH do eluente (fase móvel) na resolução dos ácidos carboxílicos

Efeito do comprimento da coluna sobre a resolução da mistura ácida

3.7.1 - EFEITO DO GRAU DE CRUZAMENTO

Para avaliar o efeito do grau de cruzamento da resina sobre a efetividade da separação de ácidos carboxílicos, utilizou-se 3 colunas de 1 metro de comprimento empacotadas com resinas AG 50W - X4, AG 50W - X8 e Ag 50W - X12 respectivamente. As designações X4, X8, X12 dão o grau de cruzamento, relacionado com a porcentagem de divinilbenzeno presente na resina.

As condições de empacotamento e de análises cromatográficas foram idênticas para as três colunas e suas respectivas resinas. A fase móvel ou eluente principalmente usado foi água desionizada - degaseificada. Além disso, foram usadas soluções aquosas de ácido perclórico a outros pH's.

3.7.2 - EFEITO DO pH DO ELUENTE

Para este estudo, cada coluna com sua respectiva resina foi submetida às análises de ácido carboxílico usando três eluentes, em separado, a diferentes pH's.

Os pH's usados foram:

pH 5.5	água pura - desionizada
pH 3.0	solução aquosa de HClO_4 (0.001N)
pH 1.0	solução aquosa de HClO_4 (0.1N)

As outras condições cromatográficas, tais como fluxo da F.M., temperatura, quantidade injetada, etc. mantiveram-se constantes. As colunas foram acondicionadas bombeando-se as respectivas soluções ácidas por espaço de 2.5 horas ou até a obtenção de uma linha base estável, antes do início das injeções.

3.7.3 - EFEITO DO COMPRIMENTO DA COLUNA

Nesta parte do estudo, duas colunas conectadas em série cujo comprimento total foi de 2000 mm, e empacotadas com resina AG 50W - X8, serviram para avaliar o efeito do comprimento da coluna sobre as resoluções das misturas ácidas.

O diagrama da figura 3.2 mostra a disposição do equipamento em uma maneira similar ao sistema aqui usado. O comprimento da união entre as duas colunas foi mínimo para evitar um volume morto. Como eluente utilizou-se água desionizada num fluxo de 21.6 ml/h, sob uma pressão de 130 psi.

4.0 - CÁLCULOS EXPERIMENTAIS

4.1 - TEMPO DE RETENÇÃO

Se as amostras injetadas numa coluna cromatográfica são suficientemente pequenas, são obtidos picos simétricos (tipo Gaussiano), cada vez que um componente elue da coluna. Sob tais condições, é possível relacionar diretamente o tempo de eluição do máximo do pico ao coeficiente de distribuição (K_d).

O tempo de eluição de um ácido é descrito como o tempo no qual a metade da quantidade da amostra ácida leva para atravessar a coluna cromatográfica. Este tempo é uma função de muitos fatores, tais como velocidade de fluxo, largura da coluna, temperatura, empacotamento e tempo durante o qual a coluna tem sido usada (17). O tempo de eluição também é chamado tempo de retenção (t_r), e é ilustrado na figura 4.1. Assume-se que a metade das moléculas do soluto mantém uma distribuição equilibrada ao se viajar através da coluna. Quando um pico simétrico é obtido, o tempo de retenção é independente da quantidade da amostra injetada (28).

Já que o tempo de eluição ou t_r é uma função da velocidade de fluxo da fase móvel, com freqüência é usado o mais fundamental parâmetro de retenção; o volume de retenção (V_r). O volume de retenção de uma amostra representa o número de mililitros da fase móvel que devem ser passados pela coluna para eluir um componente. O volume de retenção é simplesmente igual à velocidade de fluxo da fase móvel (F) pelo tempo de retenção (t_r). O tempo de retenção pode ser lido diretamente sobre cada cromatograma e é fornecido em nossas tabelas. O volume de retenção pode ser calculado rapidamente a partir dos dados das tabelas a serem apresenta

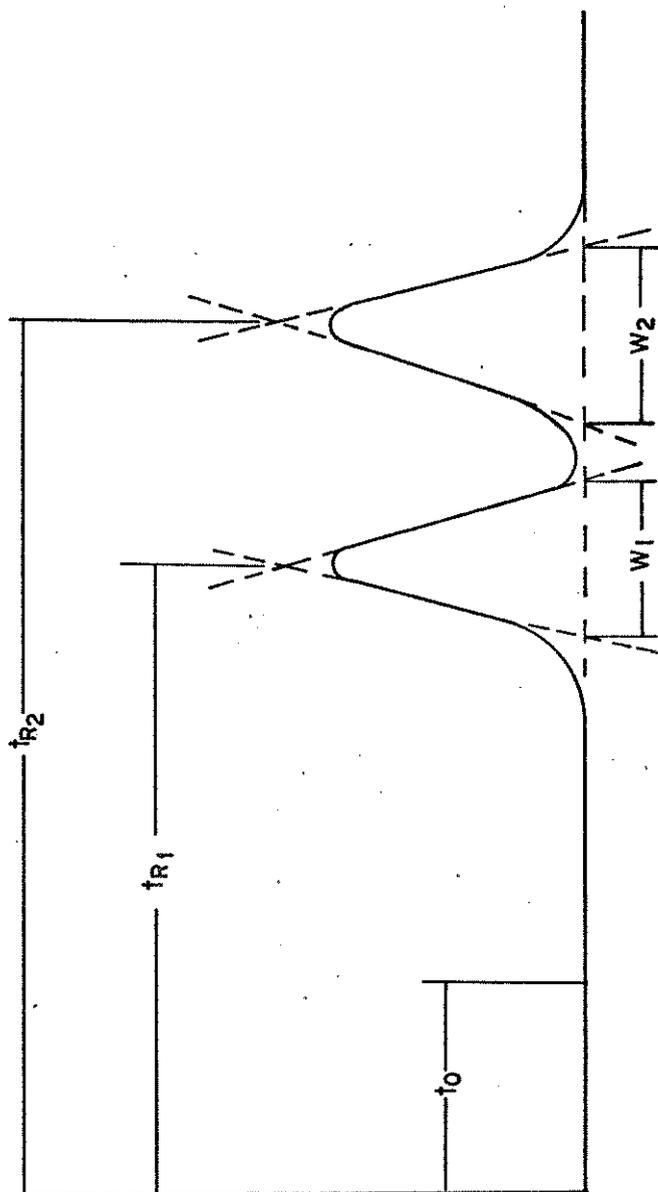


Fig. 4.1 - Cromatograma ilustrando a definição de tempo de retenção (tr); tempo não-absorvido (t_0); largura de banda (w) e resolução (R_s).

das no cap. 5.

A figura 4.1 mostra o tempo de eluição de um componente não retido, t_0 ; $t_0 \times F$ dá o volume de eluição de um componente não retido, o qual também representa o volume da fase móvel intersticial dentro da coluna de exclusão (volume morto).

O tempo de retenção também depende do fator de capacidade (k'), das quantidades relativas de fase móvel e fase estacionária, assim como do coeficiente de distribuição (K_d).

4.2 - TEMPO DE RETENÇÃO RELATIVO

Uma forma segura e adequada de expressar o tempo de retenção (t_r) de um ácido é expressar este tempo em relação a outro ácido, o qual foi cromatografado sob as mesmas condições. Desta maneira, o tempo de retenção (t_r) do ácido será obtido em relação a uma constante relativa. Neste trabalho e nas maiorias das publicações sobre análise cromatográfica de ácidos carboxílicos, o composto de referência é o ácido acético. Então o tempo de retenção relativo (t_{rr}) será igual ao t_r do ácido em questão dividido pelo t_r do ácido acético. A medida que o t_{rr} afasta-se da unidade, as separações são mais efetivas.

4.3 - FATOR DE SELETIVIDADE

O fator de seletividade da coluna (α) é medido pela separação relativa de picos (29) e é dada pelo equação.

$$\alpha = \frac{tr_2 - t_0}{tr_1 - t_0} = \frac{tr'_2}{tr'_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad \text{eq. 4.1}$$

onde tr_1 e tr_2 = tempo de retenção dos componentes 1 e 2, respectivamente.

tr'_1 e tr'_2 = tempos de retenção ajustados dos componentes 1 e 2, respectivamente.

K_1 e K_2 = coeficientes de distribuição dos componentes 1 e 2, respectivamente.

O coeficiente de distribuição é igual à concentração do soluto na fase estacionária dividido pela concentração na fase móvel. Este valor α mais fundamentalmente é igual à razão dos coeficientes de distribuição.

4.4 - RESOLUÇÃO

O grau de separação em cada cromatograma foi avaliado através do cálculo da resolução (R_s). Quando um cromatograma de dois componentes é analisado, reconhece-se imediatamente que duas características determinam o grau da separação, ou seja, a distância entre os máximos dos picos e a largura da base dos picos. A figura 4.1 mostra a influência destas duas características sobre a resolução (R_s).

Os cálculos da resolução foi feito usando a relação

$$R_s = \frac{2 (tr_2 - tr_1)}{W_2 + W_1} \quad \text{eq. 4.2}$$

onde tr_2 e tr_1 são os tempos de retenção de componentes retidos, medidos a partir da injeção até o máximo do pico. W_1 e W_2 são as larguras da base dos picos, determinadas pela intersecção das tangentes nos pontos de inflexão do pico com a linha base do cromatograma.

A eficiência da coluna determina a largura do pico na base. Esta é uma função de parâmetros da coluna, tais como fluxo, tamanho da partícula, diâmetro da coluna etc. A separação dos picos é uma função da seletividade da coluna, isto é da natureza da fase móvel e estacionária. Então é claro que para melhor resolução, os picos devem estar muito separados e suas bandas bem estreitas. Quanto maior o valor de R_s , maior é o grau de separação dos picos. O cálculo de resolução é mostrado na figura 4.1.

A equação 4.3 relaciona a resolução (R_s) a três parâmetros fundamentais em cromatografia

$$R_s = \frac{1}{4} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k'}{1 + k'} \right] \sqrt{N} \quad \text{eq. 4.3}$$

onde k' = fator de capacidade

N = número de pratos teóricos

Quando $\alpha=1$, a resolução é zero (eq. 4.3) independentemente do número de pratos teóricos da coluna.

5.0 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - TEMPERATURA

Segundo as bases teóricas de cromatografia, a eficiência da coluna geralmente aumenta com o incremento da temperatura. Desde que alguns compostos são mais afetados pela temperatura da coluna que outros, é possível usar o controle da temperatura para otimizar separações de componentes que eluem perto um do outro. Apesar destas bases teóricas, existe um desacordo entre pesquisadores para correlacionar este fato. Por exemplo, Harlow e Norman (17) afirmam que só foi observada uma ligeira melhoria quando a temperatura da coluna aumentou de 0° a 50°C . Metha e colaboradores (22) indicaram que pequenas variações na temperatura não provocam mudanças significativas nas medições cromatográficas. Por outro lado, Woo e Benson (2) afirmam que mudando a temperatura da coluna de 35° a 65°C , a seletividade da coluna foi influenciada, de tal forma que alguns compostos ácidos eluíram em ordem inversa.

O trabalho aqui apresentado foi realizado a uma temperatura constante de 37°C . Experiências iniciais sem controle de temperatura mostraram irreprodutibilidades que foram eliminadas com o uso do banho termostático, como é ilustrado na figura 3.3.

5.2 - TEMPO DE RETENÇÃO RELATIVO

Os ácidos escolhidos para este trabalho têm uma variedade de estruturas (tabela 5.1). Os dados apresentados nas tabelas 5.2 a 5.11 mostram os tempos de retenção destes ácidos em relação ao tempo de retenção do ácido acético. Cada tabela mostra uma situação diferente para estes compostos orgânicos. Os valores de tempo de retenção relativos (t_{rr}) estão na faixa de 0,38, para os ácidos mais fortes, até 1.97, para outros ácidos, a diferentes pH's.

Outros dados apresentados nas tabelas 5.2 a 5.11 são o tempo de retenção (t_r), a resolução (R_s) e a seletividade (α), calculados como indicamos no capítulo 4.

É interessante mencionar as influências que alguns ácidos exercem sobre o ácido acético que é o componente usado neste trabalho como referência para as determinações dos t_{rr} . Estas influências, desconhecidas até o momento, têm, como consequência mudanças (drásticas em alguns casos e sutis em outros) no tempo de retenção do ácido acético. Como exemplo desta observação, tem-se o caso da mistura dos ácidos tartrônico - acético ilustrado na figura 5.1. Apesar de que o t_r do ácido acético mantinha-se constante na maioria das misturas (fig. 5.1 a e b) cromatografadas, no caso do ácido tartrônico (fig. 5.1 c) este t_r diminuía pronunciadamente.

Aqui tem-se uma evidência da vantagem do t_{rr} com respeito ao t_r para medir e determinar irregularidades na identificação de um composto numa mistura analisada por técnicas cromatográficas.

5.3 - ESTUDO DO GRAU DE CRUZAMENTO DA RESINA

O conteúdo de divinilbenzeno (DVB) ou grau de cruzamento da resina tem um importante papel na retenção de espécies não ionizadas. As separações foram feitas com os trocadores de cátions Bio-Rad AG 50W-X4, X8 e X12, usando água como fase móvel. Um estudo das tabelas 5.2, 5.5 e 5.8, onde é comparado o efeito destas resinas, mostra que os tempos de retenção dos ácidos aumentam dramaticamente a medida que o grau de cruzamento diminui. Este efeito é mostrado na figura 5.2. Geralmente, a um baixo grau de cruzamento existem uma alta invasão de eletrólitos no interior da resina, como consequência do efeito de Donnan. Isto provoca um maior tempo de eluição da amostra. Comparando as tabelas 5.5 e 5.8, observa-se que a resina 50W-X12, com alto grau de cruzamento, dá melhor resolução para os ácidos fracamente ionizados (parte inferior da tabela 5.8), enquanto que a resina Bio-Rad 50W X8 melhora a resolução para os eletrólitos mais fortes (parte superior da tabela 5.5), e a resina 50W-X4 apresenta, de uma forma geral, pobres resoluções, mostrando picos assimétricos com bandas relativamente espalhadas (grande valor para W).

O efeito de grau de cruzamento de resina foi comparado também a pH 1 e 3, encontrando-se resultados similares aos anteriormente explicados.

5.4 - ESTUDO DO EFEITO DE PH

Para o estudo do efeito de pH na separação de ácido carboxílico, foram usadas como fase móvel água pura desionizada

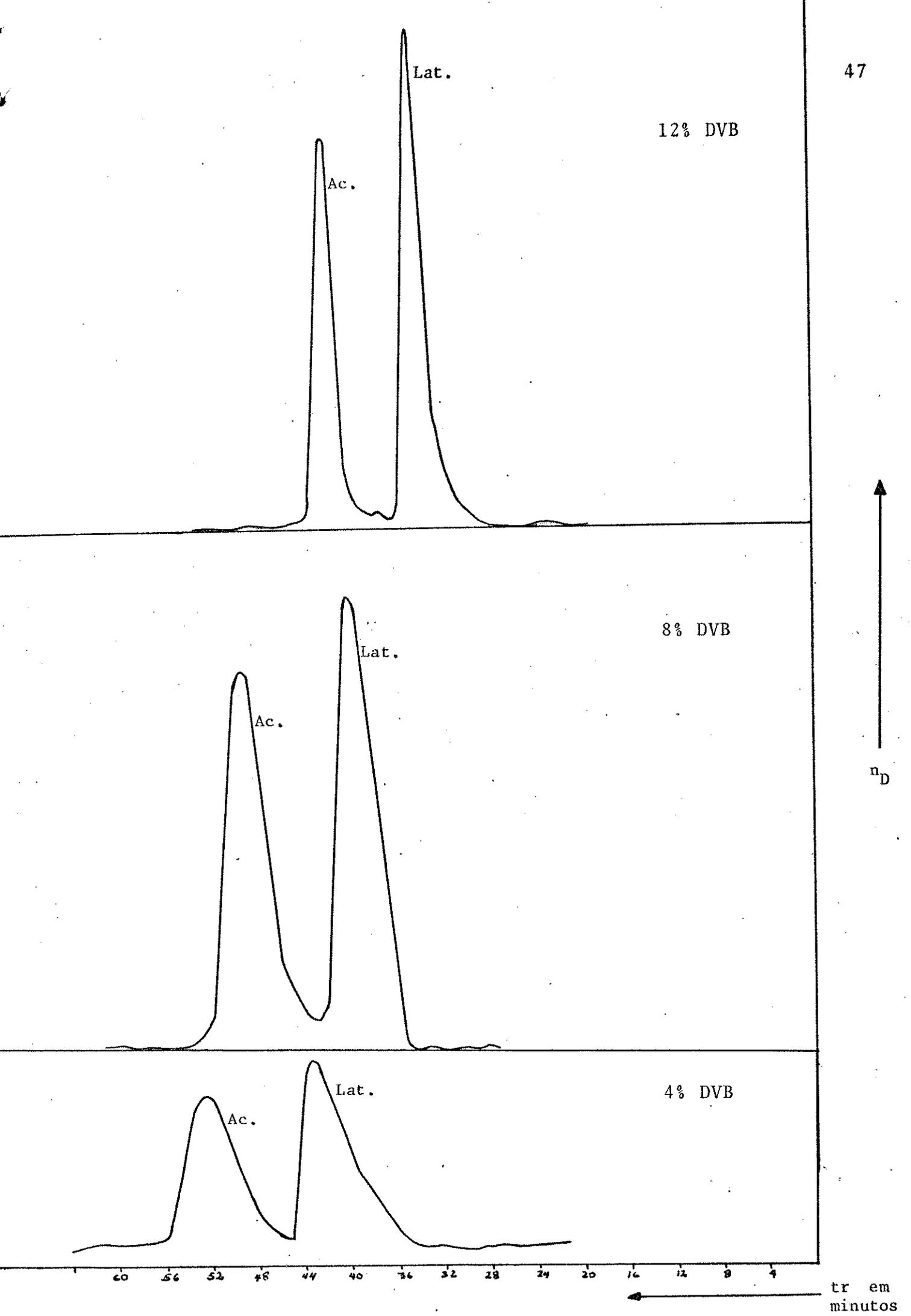


Figura 5.2 - Efeito do grau de cruzamento das resinas Bio Rad

(pH 5.5) e soluções aquosas de HClO_4 a pH 3 (0.001 N) e pH 1 (0.1 N). A resina escolhida inicialmente para este estudo foi a AG 50W-X8.

No início, a água pura (pH 5.5) foi usada como eluente. Os picos obtidos com este eluente foram largos e não simétricos, provavelmente porque cada ácido existia nas formas iônica e molecular ao mesmo tempo. Quando a fase móvel foi mudada para solução ácida a pH 1, o ácido perclórico reprimiu a forma iônica do ácido orgânico permitindo só a existência da forma molecular. Isto melhorou a simetria dos picos, os quais apareceram menos largos e mais agudos. Este efeito é mostrado na figura 5.3. A pH 1, os tempos de retenção (comparar tabelas 5.5 e 5.7) aumentaram significativamente, sobretudo para os eletrólitos fortes que, agora, com suas formas moleculares prevalecendo, conseguiram penetrar no interior da resina e como consequência ter maior tempo de permanência na coluna.

Os resultados alcançados com pH 3 e com a resina AG 50W-X8, (tabela 5.6) foram geralmente valores intermediários entre os valores para pH 5.5 (água pura) e pH 1.

5.5 - EFEITO DE pK_a SOBRE OS TEMPOS DE RETENÇÃO

Apesar de que algumas variáveis contribuem ao estudo cromatográfico na separação dos ácidos de interesse, um fator muito importante neste momento é claramente o pK_a dos ácidos. Harlow e Morman (17) estabeleceram que a constante de dissociação, a solubilidade em água e o peso molecular são fatores importantes na separação de ácidos por cromatografia de exclusão de íons. Tanaka

e Ishizuka (19) discutiram a relação entre a primeira constante de dissociação (pK_1) e o volume de retenção (V_r) de vários ácidos. Eles graficaram os volumes de retenção de 22 ácidos contra seus pK_1 (figura 5.4). Nesta figura, é fácil observar o limite de exclusão total (para ácidos fortes como HI, H_2SO_4 , $HClO_4$, HNO_3 e $H_2C_2O_4$) e o limite de alta sorção, partição (para ácidos altamente fracos como carbônico, cianídrico e bórico e para metanol) pela resina com 8% de DVB.

Analisando a tabela 5.5 verifica-se que os ácidos pobremente ionizados (não eletrolíticos) foram eluídos mais lentamente que aqueles mais ionizados (eletrólitos), a medida que seus pK_1 aumentava em ordem numérica. Estes resultados são uma evidência de que os tempos de retenção são dependentes do grau de acidez dos ácidos. A maioria dos ácidos analisados neste trabalho (tabela 5.1) ficariam na faixa intermediária entre os limites de exclusão total e forte sorção (ou permeação) da figura 5.4. Isto é outra evidência de que os ácidos são separados pelo mecanismo combinados de partição-exclusão de íons quando se usam colunas empacotadas com resinas trocadoras de íons fortemente ácidas na forma-H e que permanecem seletivamente no interior da resina.

5.6 - ESTUDO DO COMPRIMENTO DA COLUNA

Duas colunas de um metro de comprimento e empacotadas com resina AG 50W-X8 foram conectadas em série com o objetivo de melhorar as separações dos ácidos carboxílicos de interesse. Depois de cromatografar cada uma das misturas ácidas procedeu-se a

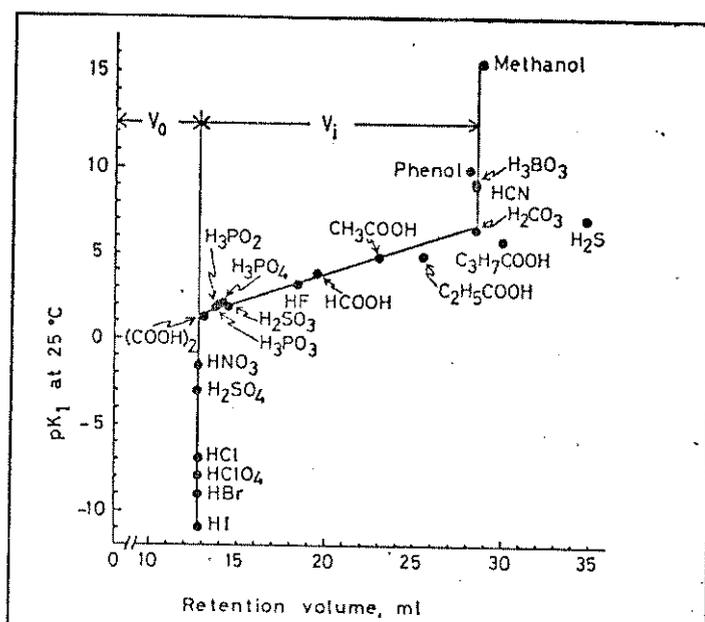


Figura 5.4 - Relação entre volume de retenção (V_r) e a primeira constante de dissociação (pK_1) de ácidos (21).

analisar os dados. Comparando as tabelas 5.5 e 5.11 observou-se que os resultados não foram muito satisfatórios. Verificou-se que ao duplicar o comprimento da coluna também duplicou-se os tempos de retenção, resultando em longos períodos de análise (90 minutos aproximadamente) para cada amostra. Esta duplicação do tempo com a duplicação da coluna está de acordo com as bases teóricas. Além disto, as resoluções não melhoraram significativamente. Este fato tem sua explicação segundo os princípios teóricos que indicam que sob certas condições cromatográficas, a separação de picos ou a diferença em coeficientes de distribuição (K_d) para um par de componentes está diretamente relacionada à seletividade de coluna. Esta seletividade é inerente ao trocador, o qual permite a distinção termodinâmica de um componente do outro a medida que viajam pela coluna. A teoria dos pratos teóricos prevê (6) que, se existe uma diferença finita no coeficiente de distribuição de dois componentes porém pequena, é possível aumentar a distância de separação dos picos em proporção direta ao comprimento da coluna. No entanto, a teoria dos pratos teóricos também prevê que a largura da base dos picos também pode aumentar, em proporção à raiz quadrada do comprimento da coluna. Deste modo os cromatogramas obtidos neste estudo mostraram picos assimétricos e com um alto grau de espalhamento na linha base quando empregamos as colunas mais longas.

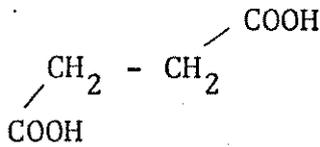
TABELA 5.1

ESTRUTURAS DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS *

Mesoxálico pK ₁ = - pK ₂ = -	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O} = \text{C} - \text{C} - \text{OH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C} \quad \text{C} - \text{OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	Glioxálico pK=3.34	$\text{H} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{OH}$
Oxálico pK ₁ =1.23 pK ₂ =4.19 (25°C)	$\begin{array}{c} \text{O}=\text{C} - \text{C}=\text{O} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{HO} \quad \text{OH} \end{array}$	Málico pK ₁ =3.40 pK ₂ =5.11	$\begin{array}{c} \text{HO} - \text{CH} - \text{COOH} \\ \\ \text{H} - \text{CH} - \text{COOH} \end{array}$
Pirúvico pK=2.49	$\text{CH}_3 - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{H} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{OH}$	Metoxiacético pK = -	$\text{CH}_3 - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
Malêico pK ₁ =1.83 pK ₂ =6.07 (25°C)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO} - \text{C} - \text{C} = \text{C} - \text{OH} \\ \diagdown \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{O} \end{array}$	Glicólico pK=3.83 (25°C)	$\text{HO} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$
Tartrônico pK ₁ =2.42 pK ₂ =4.54	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO} - \text{C} - \text{C} - \text{OH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{H} \quad \text{C} - \text{OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	Lático pK=3.08 (100°C)	$\text{CH}_3 - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \text{COOH}$
D-L Tartárico pK ₁ =2.42 pK ₂ =4.54 (25°C)	$\text{HO} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \underset{\text{OH}}{\text{CH}} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{OH}$	Fumárico pK ₁ =3.03 pK ₂ =4.44 (18°C)	$\text{HO} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{CH} = \text{CH} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{OH}$
Malônico pK ₁ =2.83 pK ₂ =5.69	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} - \text{C} - \text{C} - \text{OH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{H} \quad \text{C} - \text{OH} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$	Glicérico pK=3.55	$\text{CH}_2 - \underset{\text{OH}}{\text{CH}_2} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{OH}$

TABELA 5.1 - (continuação)

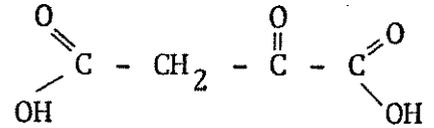
Succínico

pK₁=4.16pK₂=5.61
(25°C)

Oxalacético

pK=2.56

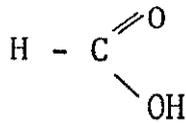
(17°C)



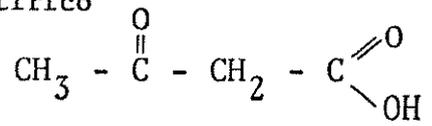
Fórmico

pK=3.75

(20°C)



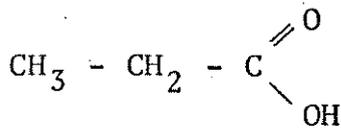
2-Cetobutírico



Propiônico

pK=4.86

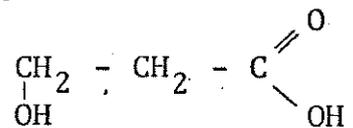
(21°C)



3-Hidroxi propiônico

pK=4.51

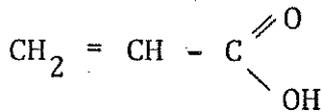
(25°C)



Acrílico

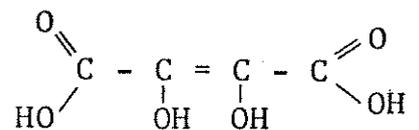
pK=4.25

(25°C)



Dihidroxi maleico

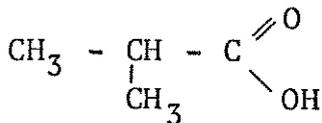
pK= -



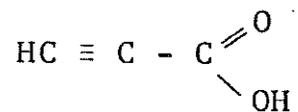
Isobutírico

pK=4.84

(18°C)



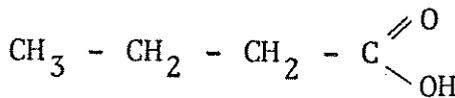
Propiólico

pK₁ = -

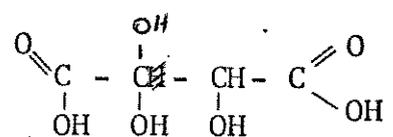
Butírico

pK=4.81

(20°C)



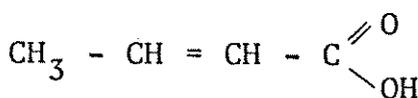
2-Hidroxi tartárico

pK₁ = -pK₂ = -

Crotônico

pK=4.69

(25°C)



Acetileno dicarboxílico

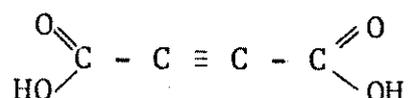
pK₁ = -pK₂ = -

TABELA 5.2

Resina X4 L = 1.0 m
 F.M. H₂O F = 21.6 ml/h
 pH 5.5 T = 37°C

ÁCIDO	tr*	Rs	trr	α
Sulfúrico	23.0	-	-	-
Acetileno dicarboxílico	22.6	3.87	0.43	-74.1
2-Hidroxitartárico	23.0	4.45	0.44	-
Oxálico	23.4	4.52	0.44	74.5
Mesoxálico	24.6	4.36	0.47	19.0
Oxalacético	25.0	2.51	0.50	15.0
Maléico	26.6	3.83	0.50	8.4
Propiônico	27.4	3.60	0.52	6.25
Piruvato de sódio	27.8	3.39	0.52	6.3
D-L tartárico	29.2	3.20	0.55	4.87
2-Cetobutírico	30.2	2.30	0.57	3.92
Tartrônico	27.2	2.97	0.59	5.5
Glioxálico	32.4	2.88	0.61	3.2
Malônico	32.4	2.64	0.61	3.2
Diglicólico	34.4	2.63	0.65	2.55
Málico	34.4	2.44	0.65	2.65
Fumárico	35.6	1.78	0.67	2.38
Glicólico	42.8	1.30	0.80	1.52
Lático	43.6	1.07	0.83	1.45
Metoxiacético	44.2	0.92	0.84	1.42
Succínico	44.4	0.92	0.85	1.37
Dihidroximaleico	45.6	1.0	0.86	1.32
Fórmico	45.6	0.97	0.86	1.33
Acético	52.8	-	-	-
Acrílico	52.8	0	1.0	1.0
3-hidroxiopropiônico	53.0	0	1.0	1.0
Propiônico	61.4	0.91	1.15	1.27
Isobutírico	67.0	1.38	1.27	1.49
Butírico	71.4	1.75	1.35	1.62
Crotônico	84.6	2.54	1.58	2.03

* tr em minutos

TABELA 5.3

Resina X4
 F.M. HClO_4
 pH 3

L = 1.0 m
 F = 21.6 ml/h
 T = 37°C

ÁCIDO	tr*	Rs	t _{rr}	α
Sulfúrico	21.2	-	-	-
Acetileno dicarboxílico	21.6	5.29	0.39	84.30
Oxálico	23.4	4.82	0.42	15.45
Mesoxálico	25.6	4.58	0.45	8.18
Maleico	27.0	3.71	0.49	5.79
Oxalacético	29.2	3.27	0.53	4.27
Piruvato de sódio	29.4	3.48	0.54	4.10
Tartrônico	27.6	3.06	0.57	4.25
Tartárico	32.6	2.74	0.60	2.95
Malônico	34.8	2.59	0.63	2.48
Glicólico	35.0	2.34	0.64	2.40
Málico	37.4	2.20	0.68	2.10
Lático	47.0	0.94	0.85	1.31
Fórmico	48.2	0.89	0.88	1.24
Metoxiacético	54.8	0.0	1	1
Acético	54.8	-	-	-
3-Hidroxiopropiônico	55.4	0.0	1	1
Propiônico	63.0	0.91	1.16	1.26
Acrílico	64.4	0.94	1.17	1.28
Isobutírico	71.6	1.47	1.31	1.50
Butírico	76.8	1.84	1.40	1.65

* tr em minutos

TABELA 5.4

Resina X4
 F.M. HClO_4
 pH 1.0

L = 1.0 m
 F = 21.6 ml/h
 T = 37°C

ÁCIDO	tr*	Rs	trr	α
Sulfúrico	23.4	-	-	-
Acetileno dicarboxílico	33.0	2.91	0.59	3.40
Mesoxálico	33.8	2.90	0.60	3.35
Oxálico	36.2	2.7	0.64	2.73
2-Hidroxitartárico	39.6	2.23	0.69	2.19
D-L tartárico	40.8	1.98	0.71	2.0
Glioxálico	42.4	1.88	0.74	1.82
Tartrônico	39.6	1.73	0.74	1.90
Málico	44.2	1.43	0.77	1.67
Oxalacético	44.4	1.29	0.79	1.55
Piruvato de sódio	46	1.26	0.80	1.51
Malônico	46.8	1.18	0.82	1.47
Dihidroximaleico	45.6	1.01	0.83	1.40
Diglicólico	47.0	1.02	0.84	1.38
Maleico	47.8	0.99	0.84	1.38
Glicólico	48.4	0.79	0.86	1.32
Lático	50.8	-	-	-
Succínico	52.4	-	-	-
Fórmico	54.4	0	1.0	-
Propiônico	56.0	0	1.0	-
Metoxiacético	57.8	0	1.0	-
Acético	57.8	-	-	-
3-Hidroxiopropiônico	57.0	-	-	-
Propiônico	66.2	0.92	1.15	1.26
Fumárico	66.6	0.93	1.18	1.31
Acrílico	69.2	1.04	1.20	1.36
Vinilacético	70.52	1.30	1.26	1.44
Isobutírico	75.4	1.63	1.30	1.53
Butírico	78.6	1.91	1.40	1.70
Crotônico	93.6	2.70	1.67	2.20

* tr em minutos

TABELA 5.5

Resina X8
F.M. H₂O
pH 5.5

L = 1.0 m
F = 21.6 ml/h
T = 37°C

ÁCIDO	tr	Rs	trr	α	pK ₁	pK ₂
Sulfúrico	22,6	-	-	-	-	-
Acetileno dicarboxílico	22.6	8.19	0.46	132.0	-	-
Oxálico	23.6	7.28	0.48	22.0	1.25	4.19
2-hidroxitartárico	23.6	7.18	0.49	21.33	-	-
Mesoxálico	24.2	7.02	0.50	14.70	-	-
Oxalacético	25.2	5.31	0.52	10.0	2.56	-
Maleico	26.6	4.82	0.54	6.60	1.83	6.07
Piruvato de sódio	27.4	4.25	0.56	5.24	2.49	-
Propiônico	27.6	4.33	0.57	5.04	-	-
D-L Tartárico	28.4	4.66	0.59	4.26	2.98	4.34
Tartrônico	26.4	4.20	0.61	5.20	2.42	4.54
2-cetobutírico	29.6	3.65	0.61	3.71	-	-
Malônico	30.4	3.37	0.63	3.15	2.83	5.69
Glioxálico	30.8	4.0	0.64	3.0	3.34	-
Málico	32.0	4.0	0.66	2.70	3.40	5.11
Diglicólico	32.4	5.16	0.67	2.60	-	-
Fumárico	34.5	1.56	0.71	2.14	3.02	4.44
Lático	39.6	1.38	0.80	1.55	3.08	-
Glicólico	41.0	2.23	0.81	1.54	3.83	-
Dihidroximaleico	40.8	1.77	0.84	1.41	-	-
Succínico	42.0	1.06	0.85	1.41	4.16	5.61
3-hidroxi propiônico	41.8	1.06	0.86	1.34	4.51	-
Fórmico	42.8	0.88	0.87	1.30	3.77	-
Metoxiacético	46.4	0.60	0.95	1.10	-	-
Acético	48.8	-	-	-	4.74	-
Acrílico	57.4	1.08	1.17	1.32	4.26	-
Propiônico	58.6	1.06	1.18	1.34	4.87	-
Vinilacético	58.1	1.66	1.19	1.35	-	-
Isobutírico	68.2	2.83	1.34	1.61	4.84	-
Butírico	71.6	2.33	1.45	1.87	4.82	-
Crotônico	87.6	3.74	1.76	2.43	4.70	-

* tr em minutos

TABELA 5.6

Resina X8 L = 1.0 m
 F.M. HClO₄ F = 21.6 ml/h
 pH 3 T = 37°C

ÁCIDO	tr*	Rs	trr	α
Sulfúrico	23.0	-	-	-
Acetileno dicarboxílico	23.2	8.6	0.46	70.0
Oxálico	24.2	7.6	0.48	20.0
Mesoxálico	25.2	7.7	0.49	12.9
2-Hidroxitartárico	25.6	7.2	0.50	6.24
Maleico	28.0	5.23	0.55	5.42
Oxalacético	29.4	5.35	0.58	4.34
Piruvato de sódio	29.6	5.23	0.58	4.23
Tartrônico	27.4	5.30	0.60	4.91
Propiônico	30.6	4.12	0.60	3.66
D-L tartárico	30.4	5.18	0.60	3.66
Glioxálico	33	4.72	0.65	2.80
Malônico	33.2	4.34	0.54	2.75
Málico	34.2	4.05	0.67	2.84
Lático	42.6	1.90	0.84	1.42
Fórmico	45.4	1.26	0.89	1.24
Metoxiacético	47.4	0.8	0.93	1.15
Acético	50.8	-	-	-
Propiônico	59.6	2.73	1.18	1.33
Isobutírico	69.6	2.86	1.35	1.63
Butírico	74.0	3.58	1.47	1.87
Crotônico	90.6	5.32	1.77	2.40

* tr em minutos

TABELA 5.7

Resina X8 L = 1.0 m
 F.M. HClO₄ F = 21.6 ml/h
 pH 1 T = 37°C

ÁCIDO	tr*	Rs	trr	α
Sulfúrico	24.0	-	-	-
Mesoxálico	29.2	5.54	0.57	5.0
Acetileno dicarboxílico	30.8	5.37	0.60	3.90
Oxálico	31.6	4.8	0.62	3.46
2-Hidroxitartárico	33.8	4.5	0.67	2.67
D-L tartárico	35.0	4.2	0.68	2.62
Glioxálico	36.0	4.11	0.70	2.37
Tartrônico	33.6	4.1	0.71	4.20
Málico	36.8	3.5	0.72	2.16
Malônico	39.6	2.68	0.77	1.79
Oxalacético	39.6	2.76	0.77	1.73
Piruvato de sódio	39.6	2.8	0.78	1.72
Maleico	40.4	2.50	0.80	1.64
Diglicólico	40.8	2.17	0.80	1.58
Dihidroximaleico	42.0	2.30	0.82	1.52
Glicólico	43.2	1.78	0.85	1.39
Succínico	44.0	1.53	0.86	1.35
Lático	44.8	1.4	0.88	1.30
2-cetobutírico	45.4	1.12	0.90	1.26
3-hidroxi propiônico	45.6	1.08	0.90	1.24
Fórmico	46.6	0.90	0.93	1.15
Metoxiacético	50.4	-	1,0	1,0
Acético	51.2	-	-	-
Propiólico	54.6	0.88	1.07	1.14
Fumárico	57.8	1.05	1.13	1.24
Propiônico	60.0	1.60	1.17	1.31
Acrílico	62.6	2.36	1.23	1.44
Vinilacético	65.8	2.47	1.3	1.54
Isobutírico	69.0	2.90	1.36	1.66
Butírico	74.4	3.74	1.45	1.85
Crotônico	90.8	5.35	1.77	2.45

* tr em minutos

TABELA 5.8

Resina X12
F.M. H₂O
pH 5.5

L = 1.0 m
F = 21.6 ml/h
T = 37°C

ÁCIDO	tr*	Rs	trr	α
Sulfúrico	24.4	-	-	-
2-Hidroxitartárico	24.4	6.92	0.57	10.25
Mesoxálico	24.2	4.40	0.61	- 76.00
Acetileno dicarboxílico	25.4	3.21	0.62	37.50
Oxálico	24.4	3.65	0.63	-
Maleico	25.4	3.50	0.64	15.0
D-L tartárico	26.4	3.48	0.64	8.30
Piruvato de sódio	25.6	3.28	0.66	12.20
Oxalacético	27.0	4.19	0.67	12.20
Glioxálico	27.4	3.27	0.67	7.10
Málico	27.8	2.91	0.67	6.15
Malônico	27.8	3.10	0.68	6.00
2-cetobutírico	29.0	3.35	0.71	4.56
Propiônico	29.0	3.28	0.71	4.47
Diglicólico	29.0	4.14	0.71	4.41
Tartrônico	25.2	2.86	0.72	13.50
Fumárico	33.0	2.14	0.78	2.31
Succínico	33.2	2.97	0.78	2.28
Glicólico	34.0	2.90	0.80	2.05
Dihidroximaleico	32.2	1.48	0.83	1.87
Lático	35.2	2.30	0.83	1.83
3-Hidroxiopropiônico	34.4	1.54	0.85	1.70
Metoxiacético	38.0	1.33	0.89	1.40
Fórmico	36.8	1.43	0.90	1.31
Acético	40.8	-	-	-
Acrílico	48.8	1.25	1.18	1.47
Propiônico	49.2	1.31	1.21	1.53
Vinilacético	49.6	1.92	1.23	1.62
Isobutírico	60.6	2.74	1.42	2.06
Butírico	63.6	3.62	1.56	2.52
Crotônico	79.6	5.72	1.88	3.27

* tr em minutos

TABELA 5.9

Resina X12
 F.M. HClO_4
 pH 3

L = 1.0 m
 F = 21.6 ml/h
 T = 37°C

ÁCIDO	tr*	Rs	trr	α
Sulfúrico	26.0	-	-	-
Acetileno dicarboxílico	27.2	7.08	0.61	15.17
Oxálico	24.8	5.84	0.62	-11.67
Mesoxálico	26.0	6.08	0.63	-
2-Hidroxitartárico	27.4	5.83	0.63	12.66
D-L tartárico	27.4	5.0	0.65	11.71
Malônico	27.8	5.43	0.65	9.44
Maleico	28.4	4.77	0.66	7.17
Piruvato de sódio	28.2	4.26	0.68	7.0
Glioxálico	28.2	4.96	0.68	6.58
Oxalacético	30.0	5.0	0.68	4.50
Málico	29.2	4.26	0.69	5.12
Lático	31.2	3.54	0.71	3.38
Tartrônico	27.8	4.58	0.72	7.11
Dihidrôximaleico	32.4	2.62	0.81	2.20
Propiônico	36.4	2.11	0.83	1.69
Fórmico	39.4	1.4	0.90	1.31
Metoxiacético	39.6	1.8	0.91	1.28
Acético	42.4	-	-	-
Propiônico	50.6	1.95	1.21	1.56
Isobutírico	63.8	3.19	1.47	2.17
Butírico	70.0	3.79	1.58	2.42
Crotônico	85.4	5.31	1.94	3.30

* tr em minutos

TABELA 5.10

Resina X12 L = 1,0 m
 F.M. HClO₄ F = 21.6 ml/h
 pH 1 T = 37°C

ÁCIDO	tr*	Rs	trr	α
Sulfúrico	25.4			
Mesoxálico	26.8	5.78	0.63	14.0
D-L tartárico	28	4,8	0.66	3.0
2-hidroxitartárico	28.8	4.36	0.67	5.23
Oxálico	28.2	4.75	0.67	6.30
Acetileno dicarboxílico	29.6	3.58	0.68	4.40
Glioxálico	28.6	4.5	0.69	5.20
Málico	29.3	3.93	0.71	4.21
Tartrônico	28.6	13.80	0.73	4.47
Malônico	31.0	3.31	0.74	2.96
Diglicólico	32.0	2.81	0.76	2.37
Piruvato de sódio	32.8	2.91	0.77	2.33
Oxalacético	32.8	2.85	0.77	2.27
Maleico	32.8	2.61	0.78	2.31
Succínico	34.0	2.42	0.79	2.07
Dihidroximaleico	34.0	2.90	0.80	2.0
Glicólico	33.8	2.31	0.82	1.90
Lático	36.0	1.79	0.84	1.64
3-hidroxiopropiônico	36.6	1.30	0.87	1.5
2-cetobutírico	37.6	1.22	0.88	1.41
Fórmico	39.6	1.09	0.91	1.26
Metoxiacético	40.4	-	1.0	-
Fumárico	43.0	-	1.0	-
Acético	42.3	-	-	-
Propiólico	45.8	0.85	1.07	1.18
Propiônico	49.6	1.91	1.20	1.54
Acrílico	52.6	2.44	1.26	1.69
Vinilacético	57.4	2.74	1.35	1.86
Isobutírico	60.4	2.63	1.49	2.35
Butiríco	69.2	3.61	1.60	3.92
Crotônico	81.0	2.55	1.97	3.55

* tr em minutos

TABELA 5.11

Resina X8
 F.M. H₂O
 pH 5.5

L = 2.0 m
 F = 21.6 ml/h
 T = 37°C

ÁCIDO	tr*	Rs	trr	α
Sulfúrico	42.8	-	-	-
Acetileno dicarboxílico	43.6	11.35	0.38	77.52
Oxálico	44.4	7.41	0.48	62.0
2-Hidroxitartárico	44.0	6.22	0.49	58.50
Mesoxálico	45.2	7.21	0.49	20.80
Maleico	48.2	5.77	0.52	8.93
Piruvato de sódio	50.4	5.06	0.54	6.66
Propiônico	50.4	5.06	0.54	6.83
Oxalacético	52.4	5.52	0.54	5.48
2-Cetobutírico	52.8	4.30	0.57	5.0
D-L tartárico	53.7	2.38	0.59	4.6
Tartrônico	48.8	4.33	0.61	6.57
Malônico	56.4	4.0	0.61	3.73
Glioxálico	58.0	4.30	0.63	3.32
Diglicólico	59.6	3.81	0.65	3.00
Málico	60.0	3.59	0.65	2.90
Fumárico	61.2	2.50	0.66	2.68
Lático	73.6	2.14	0.80	1.60
Glicólico	72.6	2.43	0.80	1.65
Succínico	76.6	1.97	0.83	1.47
Dihidroxi propiônico	77.6	1.85	0.84	1.42
3-Hidroxi propiônico	79.0	1.25	0.85	1.38
Fórmico	80.0	1.49	0.86	1.34
Metoxiacético	87.2	0.75	0.93	1.14
Acético	92.8	-	1.0	1.0
Acrílico	105.2	0.6	1.14	1.27
Propiônico	108.0	3.33	1.17	1.33
Butírico	130.4	3.44	1.42	1.81
Crotônico	158	5.01	1.71	2.32

* tr em minutos

6.0 - CONCLUSÕES

Para os estudos cromatográficos dos ácidos carboxílicos foram escolhidos vários daqueles que apresentavam estruturas moleculares não incluídas em trabalhos anteriores. Isto foi feito com o objetivo de aumentar a lista de ácidos já estudados e de comprovar se as generalizações feitas até o momento são válidas, independente da fórmula molecular. Nossas observações e sugestões são incluídas a seguir:

6.1

a - Os membros de uma série homóloga emergem em ordem crescente de seus pesos moleculares e em ordem decrescente de suas forças ácidas. P. ex. a ordem é fórmico, acético, propiônico e butírico. Esta ordem é seguido para as três resinas utilizadas, a qualquer pH.

b - Ácidos dicarboxílicos emergem mais rapidamente que os ácidos monocarboxílicos correspondentes. Assim:

malônico	antes	que	propiônico
tartrônico	"	"	3-hidroxi propiônico
succínico	"	"	butírico
oxalacético	"	"	2-cetobutírico

c - Um isoácido elue antes que o ácido normal correspondente; p. ex., isobutírico elue antes que o butírico.

d - Uma dupla ligação aumenta o tempo de retenção de um ácido.

propiônico	antes	que	acrílico (só a pH < 5.5)
butírico	"	"	crotônico
DL-tartárico	"	"	dihidroximalêico

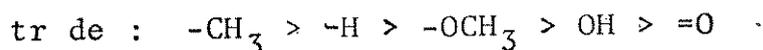
- e - Uma molécula com tripla ligação elue antes que outra com du
pla ligação em compostos ácidos de estruturas similares;
propiólico antes que acrílico
acetileno-dicarboxílico antes que fumárico
- f - Um grupo ceto diminui o tempo de retenção de um ácido car-
boxílico em relação a outro do mesmo número de carbonos.
- | | | | |
|----------------|-------|-----|------------|
| pirúvico | antes | que | propiónico |
| 2-cetobutírico | " | " | butírico |
| oxalacético | " | " | succínico |
| glioxálico | " | " | acético |
- g - um grupo hidroxila diminui o tempo de retenção em relação ao
ácido monocarboxílico correspondente.
- | | | | |
|-----------|-------|-----|------------|
| glicólico | antes | que | acético |
| lático | " | " | propiónico |
- h - Dois grupos hidroxila na molécula do ácido diminui o tempo
de retenção em relação aos ácidos carboxílicos com apenas uma
hidroxila. Então:
- tartárico antes que málico
- Esta situação não é aplicável a ácidos com dupla ligação. Exem
plo:
- dihidroximalêico antes que malêico.
- i - A presença de um grupo metóxi diminui o tempo de retenção do
ácido em relação ao ácido monocarboxílico correspondente. As-
sim:
- metoxiacético elue um pouco antes que o acético.

j - O isômero cis de um ácido com dupla ligação elue antes que o trans. Desta forma:

malêico elue antes que o fumárico.

os itens (a) a (d) estão de acordo com as generalizações de Harlow e Norman (11), e os itens (f), (g), (h), (j) são consistentes com os estudos de Metha e colaboradores (21). A maioria dos pontos conclusivos referentes aos efeitos estruturais dos ácidos são consistentes com aqueles apresentados por Yoshikawa (14).

De uma forma geral é possível fazer um ordenamento de tr para certos grupos funcionais numa molécula de ácido carboxílico. Isto é:



Exemplo

↑ tr	Acético	CH_3COOH	Propiônico	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$
	Glicólico	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{C-COOH} \end{array}$	Metoxiacético	$\text{CH}_3\text{O-CH}_2\text{-COOH}$
	Glioxálico	$\begin{array}{c} \text{H-C-COOH} \\ \\ \text{O} \end{array}$	Lático	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-C-COOH} \end{array}$
			Pirúvico	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-C-COOH} \\ \\ \text{O} \end{array}$

F.M. H₂O

Para misturas de ácidos eletrólitos:

Resina X-8

F.M. pH=1

Para misturas de eletrólitos com não eletrólitos

Resina X-8 ou X-12

F.M. pH=1 ou um gradiente entre pH=1 e pH=5.5

6.6

A aplicação das condições cromatográficas determinadas neste trabalho poderão ser aplicadas, com sucesso, na análise das misturas de ácidos provenientes de experiências radiolíticas com carbonatos, bem como na análise das misturas de ácidos provenientes de estudos biológicos.

REFERÊNCIAS

1. Hanai, T., ed., "CRC Handbook of Chromatography", vol. 1 CRC press. Boca Raton, Florida (1982).
2. Woo, J.D. e Benson, J.R., Liq. Chromatogr. 1, 238(1983)
3. Turkelson, V.T. e Richards M., Anal. Chem. 50, 1420 (1978).
4. Walton, H.F., Anal. Chem. 55, 2109 (1983).
5. Grimshaw, R.W. e Harland, C.E. "Ion-Exchange: Introduction to Theory and Practice", The Chemical Society, London, (1975).
6. Khym, J.X., "Analytical Ion-Exchange Procedure in Chemistry and Biology", Prentice-Hall, Englewood Cliffs, (1974).
7. "Chromatography, Electrophoresis, Immunochemistry and HPLC", catálogo da Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA, (1982).
8. Farris, M.G. "Produtos de Radiólise do Ba¹⁴CO₃", Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, (1980).
9. Fritz, J.S., Gjerde D.T. e Pohlandt C. "Ion Chromatography", Hüthig, New York (1982).
10. Hirsch, H.F., Gancher, E., e Russo, F.R., Talanta, 17 483(1970).
11. Koster G. e Schmuckler, G., Anal. Chim. Acta, 38, 179 (1967).
12. Blasius, E., Janzen, K., Adrian, W., Klautke, G., Maurer, P. e Nguyem, V.B., Z. anal Chem. 284, 337 (1977).

13. Major, E.M., Barth, H. e Lochmuller C.H., "Column Liquid Chromatography", Anal. Chem. 56, 300R (1984).
14. Walton H.F., J. Chromatogr. Libr. 22A, 225 (1983).
15. Wheaton, R.M. e Bauman, W.C., Ind. Eng. Chem. 45, 228 (1953)
16. Simpson, D.W. e Wheaton, R.M., Chem. Eng. Progr., 50, 45 (1954).
17. Harlow, G.A. e Morman, D.H., Anal. Chem., 36, 2438 (1964).
18. Reichenberg, D. e Wall, W.F., J. Chem. Soc., 3364 (1956).
19. Yoshikawa, O.A.E., "Espécies Tritiadas Obtidas por Irradiação de Compostos de Lítio", Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, (1981).
20. Jandera, P. e Churáček, J., J. Chromatogr., 86, 351-421 (1973).
21. Tanaka, K. e Ishisuka, T., J. Chromatogr., 174, 153(1979)
22. Metha, M.J., Bhatt, R.A., Hegje, R.S., Patel, D.J. e Bafna, S. L., Indian Chem. Soc., 46, 130 (1969).
23. Goodman, G.W., Lewis, B.C. e Taylor, A.F., Talanta, 16, 897 (1969).
24. Patel, D.J. e Bafna, S.L., Ind. Eng. Chem., Prod. Res. Developed., 4, 1 (1965).
25. Richard, M., J. Chromatogr. 115, 259 (1975).
26. Lunder, T.L. e Messori, F., Cromatografia, 12, 716 (1979).

27. "Aerograph Refractive Index Detector", manual de operação da Varian Instrument Division, Los Altos, CA., EUA, (1975).
28. Snyder, L.R. e Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", John Wiley and Sons, New York, (1979).
29. Nina, H. e Baumann, F., "Basic Liquid Chromatography", Varian Aerograph, (1971).
30. Os valores de pK são oriundos de:
 - a - "MERCK INDEX", ninth edition. Merck & Co., Inc. Rahway, N. J., USA, 1976.
 - b - "CRC Handbook of chemistry and physics", 58th edition, CRC Press, Inc. Cleveland, Ohio, 1977-1978.