

Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida

Álvaro José dos Santos Neto

*Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Ciências Exatas
37130-000 Alfenas (MG)*

Resumo

Esta edição continua a discussão sobre os problemas que resultam em picos distorcidos em cromatografia líquida. Distorções tais como caudas, assimetrias frontais, alargamentos e picos duplos ou com ombros podem ocorrer por diversos motivos, e um detalhamento desse assunto serve de subsídio ao usuário da técnica na busca pela solução de problemas. Assim como nos artigos anteriores, neste artigo, serão focados assuntos que se relacionam não apenas com aspectos físicos, mas também com aspectos químicos da separação. As ocorrências mais comuns relacionadas ao aparecimento de picos distorcidos serão brevemente estudadas e exemplificadas para uma melhor compreensão e estratégias para superação desses problemas serão apresentadas.

Palavras-chave

Assimetria; picos com cauda, picos com assimetria frontal, picos distorcidos, CLAE, cromatografia líquida.

Abstract

This edition continues discussions about peak shape problems occurring in liquid chromatography. Peak distortions like tailing, fronting, widening, and double peaks or peaks with shoulders may occur due to several reasons and this matter needs to be detailed to provide chromatographic users with background to solve these problems. Following the previous articles, this one discusses not only physical but also chemical aspects related with separation. The most common contributions to peak distortion will be briefly studied and exemplified for a better understanding, and strategies to overcome these problems will be presented as well.

Keywords

Asymmetry, Peak tailing, Peak fronting, Peak distortions, HPLC, Liquid chromatography

Nos últimos dois artigos, foram discutidos problemas relacionados à aparência de um cromatograma. Esse assunto é importante, pois dele resultam problemas de perda de resolução cromatográfica, assim como quantificações inadequadas dos analitos. A lista com os tópicos que vêm sendo discutidos é apresentada abaixo, com destaque para os assuntos que serão tratados, a seguir, nesta edição:

1. Uso de coluna defeituosa;
2. Uso de solvente com força inadequada para a amostra;
3. Sobrecarga de amostra introduzida na coluna;
4. Ocorrência de efeitos extracoluna;
5. **Ocorrências causadoras de assimetria frontal na banda cromatográfica;**
6. **Existência de sítios mais fortemente retentivos;**
7. **Existência de sítios secundários de retenção;**
8. Tamponamento inadequado da fase móvel;
9. Outros efeitos relacionados a distorções;
10. Ocorrência de pseudodistorções.

5 Ocorrências causadoras de assimetria frontal na banda cromatográfica

Picos cromatográficos que apresentam assimetria frontal são menos comuns que picos com caudas. Entretanto, devido à dificuldade no descobrimento das causas desse tipo de problema, algumas delas serão discutidas. Apesar de não se ter um conhecimento aprofundado de todas as causas para o aparecimento de picos com assime-

tria frontal, algumas soluções práticas serão apresentadas a seguir. Anteriormente, na Parte 2 dessa sequência de artigos, problemas físicos com a coluna foram descritos como eventuais causadores de picos com assimetria frontal. Naquele artigo, deu-se destaque aos problemas físicos com a coluna, ou seja, ao surgimento de entupimentos ou espaços vazios (*voids*) como possíveis causadores desse tipo de problema. Neste tópico, problemas causados pela interação com a coluna serão o foco das discussões. A Figura 1 esquematiza a aparência de uma banda cromatográfica com assimetria frontal.

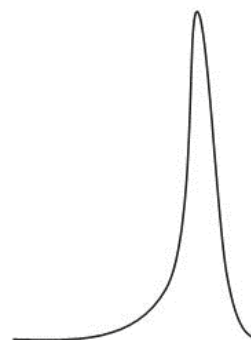


Figura 1 – Ilustração de pico cromatográfico com leve ocorrência de assimetria frontal.

A cromatografia com formação de par de íons (ion-pair chromatography – IPC) é um dos modos de cromatografia líquida em que podem surgir picos com assimetria frontal causados por variações na interação com a coluna. Uma das causas desse tipo de problema é a falta de controle adequado de temperatura na coluna. Diante disso, sempre se recomenda que separações por IPC aconteçam em condições termostabilizadas. O equilíbrio de distribuição que ocorre nesse modo cromatográfico e, conseqüentemente, o fator de retenção que os picos irão apresentar é facilmente perturbado por variações na temperatura. Quando separações por IPC são realizadas em coluna sem controle de temperatura, variações na temperatura ambiente causam interações diferenciadas que levam, muitas vezes, ao aparecimento de picos com assimetria frontal. Quando a seletividade desejada permitir, as temperaturas para esse tipo de separação podem ser mantidas constantes em torno de 40 a 50 °C, de maneira a garantir pi-

cos mais estreitos e adequada separação.¹

Outro cuidado essencial em separações por IPC é a dissolução da amostra na fase móvel. Geralmente, o uso de um solvente diferente daquele da fase móvel para a dissolução da amostra acarreta o aparecimento de picos com assimetria frontal ou outras distorções. A razão óbvia para isso é a interação diferenciada que porção da amostra experimentará quando tiver contato com a fase estacionária estando dissolvida em um solvente com composição diferente do da fase móvel.

Separções de compostos aniônicos em colunas empacotadas com partículas à base de sílica merecem cuidados para evitar o aparecimento de picos com assimetria frontal quando se utiliza fase móvel com o pH relativamente elevado. Sempre se recomenda o uso de fase móvel tampoadas para separações de compostos iônicos ou ionizáveis; porém, para o caso citado acima, mais cuidados são necessários. A elevação gradativa do pH da fase móvel leva à desprotonação dos grupos silanóis da superfície da partícula de sílica. Dependendo do tipo de recobrimento da fase estacionária utilizada, tamanho do poro e mecanismos de separação envolvidos, a presença de cargas negativas atribuídas aos grupos silanóis desprotonados pode causar a repulsão dos compostos aniônicos que se deseja separar para fora dos poros da fase estacionária. Esse fenômeno de repulsão, por sua vez, é maior quanto menor a força iônica do meio no qual o composto de interesse se encontra, uma vez que o aumento da força iônica oblitera essa capacidade de repulsão dos poros. Dessa forma, bandas cromatográficas correspondentes a diferentes concentrações de um analito aniônico experimentarão interações diferenciadas devido às diferentes forças iônicas que intrinsecamente elas apresentarão. Da mesma forma, a própria distribuição gaussiana de concentração do analito em uma banda cromatográfica levará a regiões com diferentes forças iônicas e conseqüente interação diferenciada com a fase estacionária. Dessa repulsão diferenciada dos analitos aniônicos nos poros de partículas de sílica com silanóis desprotonados, surgem as distorções, tais como assimetria frontal ou outras. Nesse tipo de problema, uma solução viável para a maioria dos casos é a elevação da força iônica da fase móvel por meio do aumento da concentração da solução tampão. Geralmente, concentrações entre 25 e 100 mmol/L são suficientes para corrigir as distorções dos picos. Um cuidado deve ser tomado em separações que utilizam o espectrômetro de massas como detector. Para os acoplamentos LC-MS, altas concentrações

de eletrólitos são costumeiramente prejudiciais e soluções-tampão com concentrações acima de 25 mmol/L ou menos devem ser evitadas. Nesse caso, o surgimento de picos com assimetria frontal causados pela situação descrita acima deve ser preferencialmente corrigido pela escolha de outra coluna que não apresente esse efeito, ao menos de maneira tão pronunciada. Uma possibilidade é a escolha de uma coluna polimérica ou com alta taxa de recobrimento dos grupos silanóis.

Generalizando, a assimetria frontal tem o aspecto oposto ao das caudas que aparecem nos picos cromatográficos e, justamente, são causados por fenômenos inversos. Enquanto picos com caudas dão a indicação de que uma menor retenção dos analitos surge com o aumento da concentração da amostra (que constitui a banda cromatográfica), picos com assimetria frontal dão o indicativo oposto de que, com o aumento da concentração, os analitos que compõe a amostra apresentam maior retenção na coluna. Em ambas as situações, quando se trabalha com altas concentrações das amostras, uma simples diluição pode conferir melhorias ao aspecto apresentado pelos picos cromatográficos.

6 Existência de sítios mais fortemente retentivos

Alguns tipos de fases estacionárias apresentam sítios de retenção com diferentes afinidades pelos analitos. Isso significa que nem todos os sítios retentivos disponíveis no interior da coluna interagirão com os compostos de interesse da mesma maneira, isto é, alguns interagirão mais fortemente do que outros. Esse fenômeno faz-se importante principalmente em separações em fase normal à base de sílica (adsorção) e em separações por troca iônica. Em ambos os casos, as colunas apresentam sítios específicos de interação com o analito na superfície de sua fase estacionária. Todavia, geralmente nem todos os sítios são equivalentes nessa interação, estando alguns poucos deles favoravelmente posicionados para uma interação mais intensa com os analitos. Essa interação diferenciada afeta a distribuição que os compostos terão ao serem separados ao longo da coluna. Os compostos que apresentam maior afinidade pela coluna são os mais afetados, ou seja, aqueles mais retidos geralmente apresentam caudas mais

pronunciadas. Para entender o que ocorre nessa situação, tem-se que considerar primeiramente que apenas uma pequena fração dos sítios de retenção de uma coluna apresentará uma interação diferenciada e mais intensa com os compostos a serem separados. Assim, durante a separação, esses sítios mais retentivos rapidamente serão tomados pelos compostos que por eles apresentarem as mais altas afinidades (ou seja, os mais retidos). Colunas empacotadas com partículas para troca iônica e fase normal são mais susceptíveis a esse tipo de problema do que colunas para exclusão por tamanho, pareamento iônico ou fase reversa, as quais têm um limiar de saturação muito mais alto. Vale ressaltar que esse efeito retentivo causado por sítios mais fortes de interação afeta mais significativamente os analitos com maior retenção na coluna, ou seja, os últimos picos eluídos em um cromatograma, normalmente aqueles com fator de retenção maior do que 10. A Figura 2 ilustra esse problema de assimetria que ocorre com os picos retidos em separações isocráticas.² Como esse tipo de problema afeta significativamente apenas os compostos muito retidos na coluna, uma estratégia adequada para resolver o problema é o emprego de uma fase móvel mais forte, de maneira a diminuir a retenção dos compostos que apresentam assimetria. Obviamente, nem sempre essa estratégia pode ser usada com sucesso, visto que os compostos eluídos no início da corrida cromatográfica podem perder a sua resolução. Nesses casos, a alternativa é o emprego de uma separação com gradiente, de maneira a garantir a resolução dos primeiros compostos a serem separados e ainda a eluição daqueles mais retidos com o menor fator de retenção possível. No caso de colunas de sílica em fase normal, outra estratégia que, por vezes, pode surtir resultado é a desativação dos sítios mais retentivos com a adição de pequena quantidade de água na fase estacionária. Essa estratégia já é utilizada em algumas separações, quando o teor de umidade da fase móvel oscila, fazendo com que o tempo de retenção dos analitos não seja reprodutível. Nesse caso em discussão, o mesmo procedimento também pode contribuir para resolver os problemas de assimetria dos compostos mais retidos do cromatograma. Nessa seção, discutiu-se o caso de colunas que têm sítios de retenção com um único mecanismo de ação, mas que, contudo, possuem diferentes forças de interação com o analito.¹

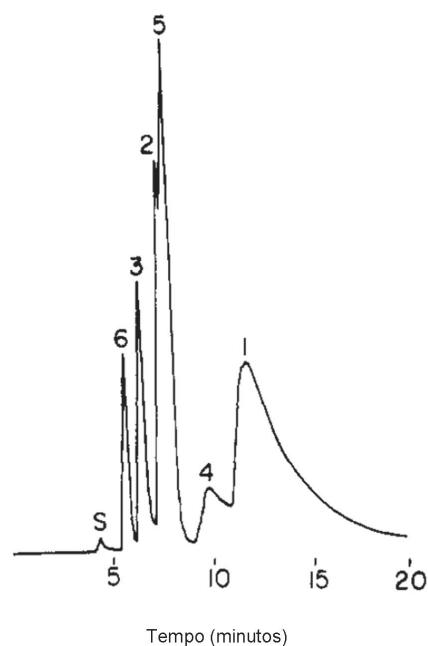


Figura 2 – Cromatograma da separação de ácidos orgânicos por cromatografia de troca iônica ilustrando o alto fator de assimetria para os compostos mais retidos. (1) ácido oxálico, (2) ácido tartárico, (3) ácido málico, (4) ácido cítrico, (5) ácido fumárico e (6) ácido succínico. Republicado a partir da ref. 2, com permissão da American Chemical Society.

7 Existência de sítios secundários de retenção

Outro caso a ser discutido envolve colunas que, apesar de apresentarem um mecanismo majoritário de separação, também possuem mecanismos secundários residuais de interação com os analitos. Cromatogramas de compostos básicos que apresentam caudas em separações com colunas de fase ligada sobre partículas de sílica são o exemplo típico desse tipo de problema. O cromatograma da Figura 3 ilustra o aspecto de picos afetados por tal situação. No caso das colunas com partículas de sílica, os responsáveis pelas interações secundárias são os grupos silanóis residuais que, muitas vezes, causam severas caudas nas bandas cromatográficas. De maneira geral, a assimetria ocasionada pelas interações secundárias pode ser explicada pelos dois seguintes fatores: (1) os sítios secundários de retenção estão disponíveis em pequena quantidade em relação aos sítios majoritários, sendo, então, rapidamente satura-

dos pelos analitos contidos na amostra e que apresentam afinidade por eles; (2) algumas vezes, a interação com os sítios secundários é muito forte, levando a uma cinética desfavorável para o desfazimento da sorção, ou seja, os analitos sorvidos demoram muito para serem novamente liberados para a fase móvel. Os problemas de interação com sítios secundários das colunas estão entre os mais comuns causadores de picos com caudas. Além disso, os variáveis graus de interação com os sítios secundários de colunas fornecidas por diferentes fabricantes levam à irreprodutibilidade das condições de separação quando se troca inadvertidamente de coluna. Alguns artigos encontrados na literatura científica têm reportado extensivos trabalhos comparando colunas e estudando suas seletividades, similaridades e diferenças.³⁻⁵ Os diversos mecanismos de separação afetados por interações secundárias terão esses efeitos discutidos a seguir.

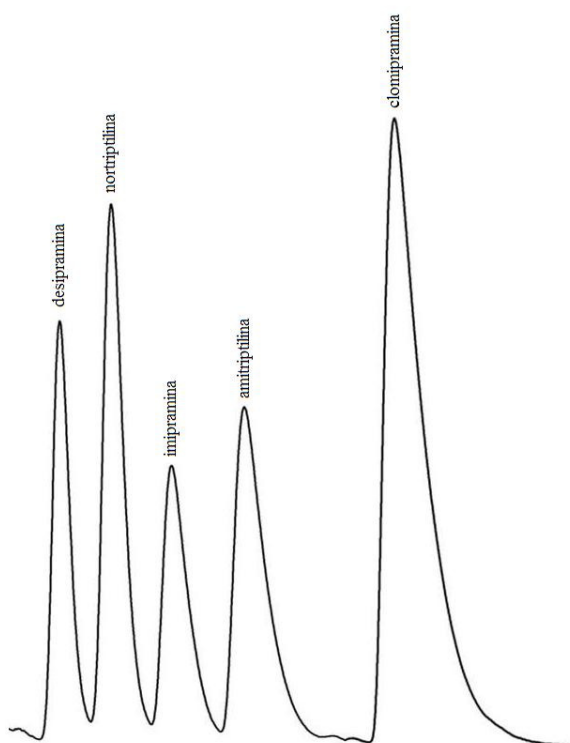


Figura 3 – Cromatograma de cinco antidepressivos tricíclicos apresentando picos com caudas em separação com coluna de fase C18 ligada sobre sílica.

7.1 Cromatografia em fase reversa

Interações secundárias em separações em

fase reversa podem estar relacionadas com a presença de grupos silanóis residuais ou impurezas metálicas no material de empacotamento da coluna. O efeito dos grupos silanóis é o mais frequente causador de problemas de assimetria. Apesar de a interação com os silanóis afetar principalmente e mais severamente os compostos básicos, analitos ácidos também podem sofrer um pouco desses efeitos. Do ponto de vista químico, são dois os mecanismos de interação dos compostos básicos com os grupos silanóis: formação de ligações de hidrogênio e interação iônica. A Figura 4 esquematiza os tipos de interações envolvendo compostos básicos e grupos silanóis.

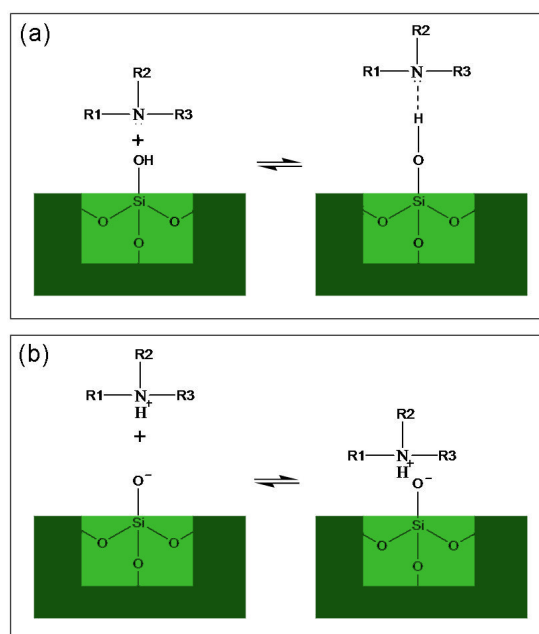


Figura 4 – Esquema de interações químicas entre grupos silanóis residuais da fase estacionária e solutos básicos introduzidos na coluna: (a) interação por ligação de hidrogênio e (b) interação iônica.

Por causa desse tipo de interação, foram desenvolvidas diversas modificações nas fases estacionárias à base de grupos alquílicos ligados sobre sílica, de maneira a minimizar os problemas com compostos básicos. Grupos silanóis residuais são aqueles que restam após a derivatização da sílica com a fase ligada, e um dos principais desenvolvimentos foi o recobrimento deles com grupos alquílicos pequenos (geralmente a metila). Essas colunas recebem o recobrimento dos grupos Si-OH pelos grupos -Si(CH₃) em um processo geralmente chamado de capeamento.

Atualmente diversas gerações de colunas totalmente ou parcialmente desativadas para análise de compostos básicos e ácidos são encontradas, e tecnologias complementares à técnica de recobrimento com grupos alquílicos têm sido utilizadas.

Uma dessas modificações para melhorar a estabilidade de fases quimicamente ligadas consiste no uso de grupos volumosos, em substituição aos grupos metila geralmente encontrados em fases ligadas monoméricas produzidas a partir de reagentes monofuncionais do tipo alquilclorosilanos. Em substituição às metilas laterais do átomo de silício são geralmente ligados grupos isopropil ou mesmo terc-butil (mais volumosos), de maneira a aumentar a proteção estérica do acesso aos grupos silanóis residuais.

Outra possibilidade é a inserção de grupos polares na cadeia alquílica da fase reversa. Alguns dos grupos polares mais usados são amida, carbamato, uréia ou amina. Essas fases são adequadas para a análise de compostos polares fornecendo picos bastante simétricos para analitos básicos, necessitam de menores quantidades de modificadores orgânicos na fase móvel, além de serem estáveis e reprodutíveis frente a fases móveis altamente aquosas. Algumas referências comerciais encontradas para essas colunas são as denominações "Polar", "Aqua", "AQ", "Hydro", "Symmetry-Shield", "ABZ", entre outras.

Além das fases monoméricas, chamadas de fases tipo escova por terem as cadeias alquílicas ligadas individualmente sobre os grupos hidroxila presentes na superfície da partícula (intermediada pela ligação com átomo de silício), também existem diversas formas de funcionalizações poliméricas. Dentre as funcionalizações poliméricas, umas das formas de reduzir o acesso aos silanóis residuais é a formação de uma polimerização horizontal com uma mistura de organosilanos com cadeias alifáticas C-18 e C-1. Essa polimerização horizontal forma uma espécie de monocamada auto-organizada que restringe o acesso dos analitos polares aos silanóis residuais da superfície da partícula de sílica.

Outras possíveis modificações incluem o uso de funcionalizantes bidentados e polidentados, os quais possuem maior estabilidade química e garantem menor acesso aos silanóis residuais, bem como, em alguns casos, menor quantidade de silanóis residuais após a etapa de funcionalização. O emprego de reações de silanização em que grupos contendo hidreto de silício (Si-H) são ligados em substituição aos silanóis também reduz drasticamente a cobertura de silanóis da partícula de síli-

ca, permitindo ainda modificações posteriores como a ligação de cadeias alquílicas com finalidade de fase reversa.

Além das diversas formas de funcionalização da partícula de sílica, manipuladas de maneira a reduzir o número dos silanóis residuais na superfície da partícula de sílica e o acesso a eles, outra forma de se tratar o problema consiste no uso de partículas híbridas inorgânico-orgânicas de alta pureza. Uma das modificações da síntese das partículas de sílica consiste da adição do reagente metiltrietoxissilano, o qual introduz grupos metila na superfície da partícula de sílica. A introdução dos grupos metila na superfície resulta, conseqüentemente, na redução da densidade dos silanóis disponíveis na superfície da partícula. Outra forma de hibridação consiste da reação de co-condensação de 1,2-bis(trietoxissilil)etano (BTEE) com tetraetoxissilano (TEOS), em proporções diferentes, a qual leva a inserção de um grupo etil posicionado entre dois átomos de silício adjacentes. Ou seja, são formadas "pontes" de etano inseridas na estrutura híbrida da partícula, diminuindo conseqüentemente a presença de silanóis na superfície, bem como aumentando a estabilidade química, especialmente frente a altos valores de pH.

Uma revisão de Tonhi e colaboradores⁶ apresenta com mais detalhes algumas das modificações descritas acima, enquanto trabalho científico recente de Molíková e Jandera⁷ caracteriza o efeito de algumas dessas modificações das fases estacionárias sobre separações em fase reversa.

Dada a variabilidade de tipos de desativação, de acidez do suporte de sílica, da taxa de recobrimento pela fase ligada, entre outros fatores, nem todos os compostos de interesse (particularmente os básicos) respondem adequadamente a todo o tipo de coluna e há colunas destinadas a aplicações com analitos específicos.³⁻⁵

Além da possibilidade de interação com compostos básicos, os grupos silanóis, dependendo de sua acidez, do tipo e do pH da fase móvel e da acidez dos analitos, também podem interagir com compostos ácidos. A Figura 5 mostra duas possibilidades, fundamentadas em ligações de hidrogênio, para esse tipo de interação.

Apesar das interações apresentadas nas Figuras 4 e 5 serem possíveis, é importante enfatizar que o intervalo de pH quando o silanol está ionizado (oxigênio negativo) e a base (nitrogênio) está positiva ou o ácido (carboxílico) não está ionizado é relativamente restrito e depende dos respectivos valores de pK_a .

Outra estratégia para melhorar o desempe-

no das separações cromatográficas, e fugir de uma total dependência da perfeita inércia do material de empacotamento, consiste em introduzir modificadores na fase móvel. A Figura 6 esquematiza algumas possibilidades de modificação da fase móvel e o seu efeito sobre compostos neutros, ácidos e básicos separados em uma coluna C18 ordinária e em outra C18 parcialmente desativada por meio de capeamento.

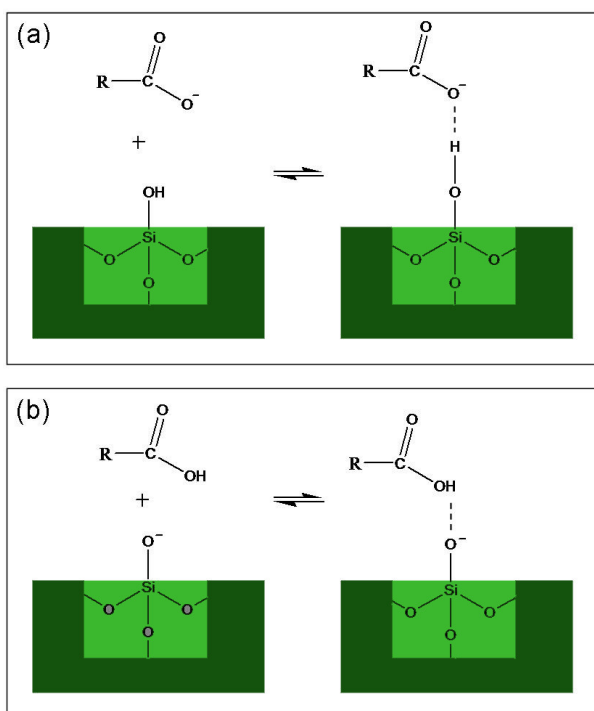


Figura 5 – Esquema de interações químicas entre grupos silânóis residuais da fase estacionária e solutos ácidos introduzidos na coluna: (a) interação por ligação de hidrogênio com o soluto ionizado e (b) interação por ligação de hidrogênio com o grupo silanol ionizado.

Cada esquema, na Figura 6, ilustra a separação em fase reversa (RP) utilizando a mesma proporção entre a composição aquosa e orgânica da fase móvel e o mesmo pH. Essa figura permite uma visão simplista dos principais efeitos que modificadores químicos promovem sobre compostos ácidos e básicos que experimentam interações secundárias com a fase estacionária. De maneira resumida, devem-se utilizar, como modificadores, compostos com grupos análogos aos que sofrem interação com a coluna. Por exemplo, como modificadores para compostos básicos, geralmente são usadas aminas terciárias com cadeias alquílicas

curtas, as quais se encontram protonadas na fase móvel. Para compostos ácidos, similarmente, usam-se ácidos carboxílicos de cadeia curta. No Esquema 1, utiliza-se o par fosfato/ácido fosfórico na fase móvel; sob essa condição, tanto compostos ácidos quanto básicos podem facilmente experimentar interações secundárias com a coluna. É de particular interesse a retenção e assimetria excessiva demonstrada por compostos básicos em colunas sem desativação significativa dos silanóis residuais (Esquema 1b). Por vezes, analistas nem chegam a observar o pico de eluição de compostos muito básicos, tamanha a interação secundária com a coluna. Por sua vez, colunas desativadas (Esquema 1a) apresentam uma retenção muito menor para esses compostos. Obviamente, exceto no caso de colunas completamente desativadas, algum grau de assimetria ainda permanece no pico desses compostos básicos. Compostos ácidos também podem experimentar interações secundárias; por vezes, eles apresentam-se alargados, com caudas e mais retidos que o esperado para a respectiva separação em fase reversa empregada.

O Esquema 2 utiliza a modificação com o par acetato/ácido acético. Esse par, como pode ser observado na Figura 6, corrige os efeitos secundários sobre os compostos ácidos. Contudo, esse modificador não apresenta efeito benéfico sobre compostos básicos, podendo até afetá-los negativamente em alguns casos. O Esquema 3 traz o uso do modificador trietilamina (TEA), o qual, na verdade, encontra-se em sua maior parte na forma de íon trietilamônio, ou seja, uma amina protonada. Pode-se observar que, com esse modificador, os picos dos compostos básicos apresentam-se com simetria adequada. Dependendo do composto básico, mesmo em colunas não desativadas, uma concentração adequada de TEA ou outro modificador desse tipo pode corrigir completamente a assimetria; em outros casos, a assimetria não chega a ser completamente eliminada, mas reduzida a níveis aceitáveis. Alguns analistas têm o receio de danificar a coluna ao usar TEA; contudo, desde que seu uso não seja desencorajado pelo fabricante da coluna, ele traz benefícios para análises complicadas por picos com caudas. A TEA não é altamente retida nas colunas e pode ser lavada sem maiores dificuldades, permitindo o reequilíbrio com fase móvel que não contenha esse aditivo. Outros modificadores da classe das dimetilalquilaminas (dimetiloctilamina – DMOA e dimetilhexilamina – DMHA, por exemplo), apesar de menos comuns, também podem ser usados com a mesma finalidade. Eles geralmente são testados quando a

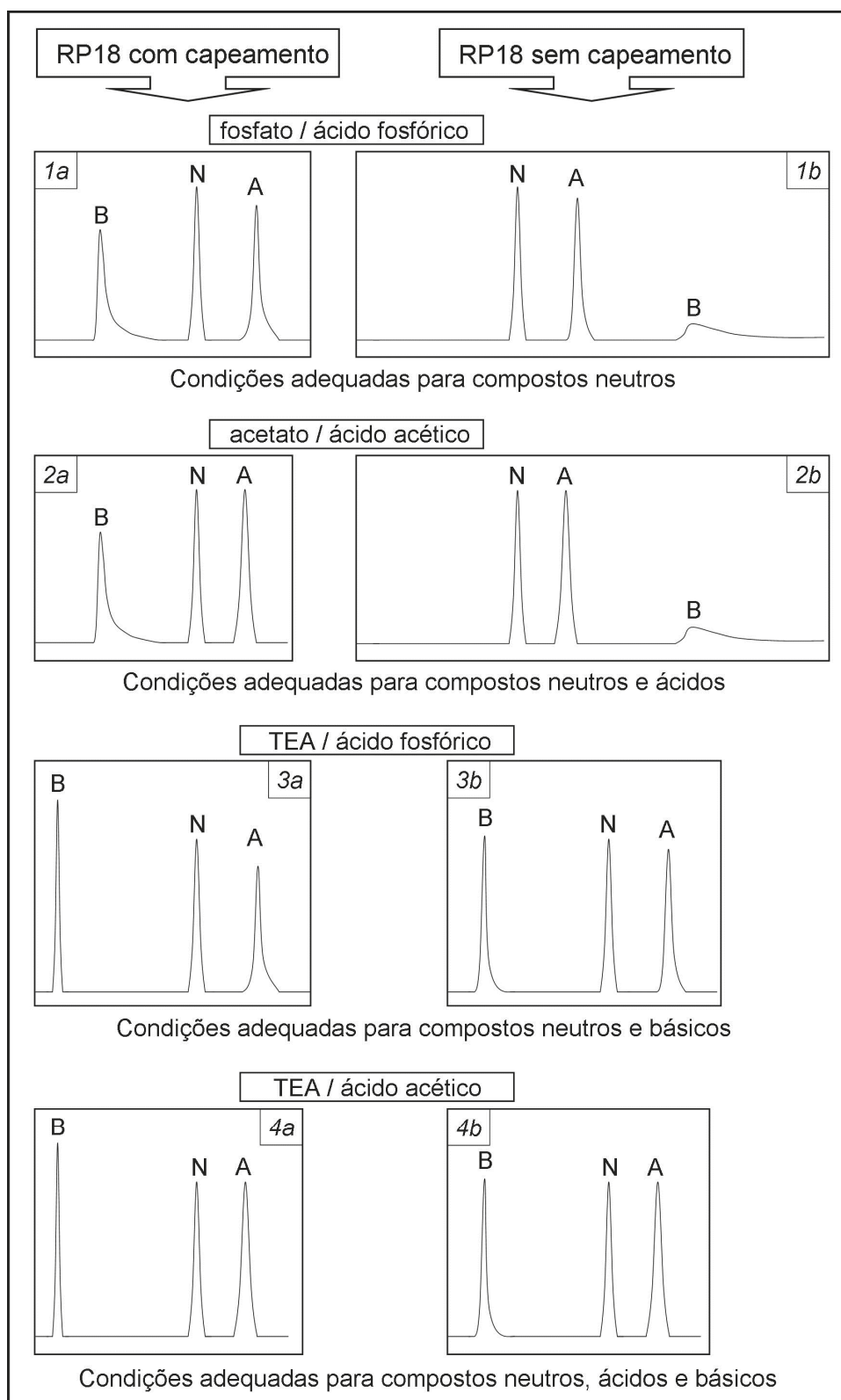


Figura 6 – Cromatogramas esquemáticos ilustrando o efeito de modificadores químicos adicionados à fase móvel sobre a retenção, separação e perfil de eluição de compostos neutros, ácidos e básicos. Os esquemas numerados ilustram o uso dos respectivos modificadores: 1a e 1b – fosfato/ácido fosfórico; 2a e 2b – acetato/ácido acético; 3a e 3b – trietilamina/ácido fosfórico; 4a e 4b – trietilamina/ácido acético. Os cromatogramas rotulados com a letra “a” esquematizam separações feitas em colunas parcialmente desativadas e com a letra “b” em colunas comuns.

TEA (primeira escolha) não consegue minimizar a assimetria do pico, visto que possuem um maior poder de supressão das interações secundárias. Todavia, eles são mais difíceis de serem lavados da coluna quando se faz necessário o uso de uma fase móvel que não os contenha, e há relatos de que esses compostos podem prejudicar o perfil cromatográfico de alguns analitos, enquanto resolvem a assimetria de outros.

O Esquema 4 da Figura 6 mostra o uso concomitante de TEA e ácido acético como estratégia para uma adequada análise simultânea de compostos neutros, ácidos e básicos. A concentração típica de TEA como modificador para a fase móvel é de 10 mmol/L. Concentrações mais baixas, da ordem de 1 a 5 mmol/L, podem ser utilizadas no caso de acoplamento com LC-MS e ainda são capazes de surtir efeitos positivos na assimetria. Por outro lado, a supressão da ionização, especialmente com a interface do tipo *electrospray* (ESI), precisa ser ponderada. Há casos em que concentrações da ordem de 5 mmol/L acarretam supressões significativas na ionização por LC-ESI-MS. O aumento da concentração de TEA em situações de interações secundárias mais exigentes pode chegar até a 50 mmol/L; porém, acima desses valores, os ganhos serão pequenos. O ácido acético geralmente é adicionado na proporção de 1% do total da mistura. Em separações que utilizam gradiente, esses modificadores podem ser adicionados a ambos os solventes (aquoso e orgânico) para manter a sua concentração final constante.

7.1.1 Efeitos de interações iônicas

Estudos já mostraram que alguns grupos silanóis de colunas cromatográficas são bastante ácidos. Mesmo em valores de pH tão baixos quanto dois, as interações secundárias podem ser observadas, sugerindo que esses grupos encontram-se desprotonados. No caso de interações iônicas, uma solução para o problema é a elevação da força iônica da fase móvel para antagonizar a retenção secundária. A concentração da solução-tampão em alguns casos pode ser elevada acima de 2 mol/L para conseguir superar esses problemas. Obviamente, concentrações tão altas devem ser evitadas, testando-se anteriormente as alternativas descritas acima. Caso sejam inevitáveis, os procedimentos devem ser cautelosos para evitar danos ao sistema cromatográfico e à coluna.

7.1.2 Interação com impurezas metálicas da fase estacionária

Alguns materiais de empacotamento utilizados como fase estacionária em cromatografia podem apresentar contaminação por metais pesados. Na separação de certos compostos, a existência dessas impurezas causa um aspecto cromatográfico similar àquele das interações secundárias com grupos silanóis. Geralmente, os solutos afetados por esse efeito são os que têm a capacidade de estabelecer coordenação com resíduos metálicos. Interações desse tipo, além de ocorrer com sítios metálicos existentes na fase estacionária, também podem acontecer em outras superfícies metálicas do sistema cromatográfico (válvula de injeção, conexões metálicas, filtros ou fritas da coluna, entre outros). Esse tipo de problema, atualmente, é bem menos comum que as supracitadas interações com silanóis; em todo caso, quando os tratamentos descritos nas seções anteriores não surtirem efeito, uma interação com impurezas ou resíduos metálicos pode ser colocada em suspeita. Um tratamento com compostos quelantes, ou mesmo o seu uso como aditivo na fase estacionária, costuma resolver o problema. O EDTA é o composto de escolha para adição na fase estacionária e suplanta indesejadas interações com sítios metálicos mesmo quando adicionado na ordem de poucos mmol/L de solução.

7.2 Cromatografia em fase normal

Em fase normal, as interações secundárias podem ter origem em: (1) reações de troca iônica com grupos silanóis que se encontram ionizados, mecanismo análogo ao descrito e esquematizado na seção anterior; ou (2) interações das moléculas com silanóis residuais no uso de fases polares quimicamente ligadas, situação também análoga à descrita anteriormente.

Em termos práticos, esses problemas podem ser resolvidos pela adição de pequena quantidade (em torno de 0,1%) de um modificador amineado (TEA, por exemplo), para compostos básicos, ou a mesma proporção de ácido acético no caso de ácidos. Há relatos de interação de alguns compostos neutros com colunas que contêm funcionalização do tipo ciano quimicamente ligadas sobre sílica; adição de TEA ou 0,2% de água cos-

tumam surtir efeitos benéficos nesses casos.⁸

7.3 Cromatografia de exclusão por tamanho

A interação secundária ocorre principalmente em colunas à base de sílica usadas para separações em meio aquoso (filtração em gel).

Os efeitos secundários podem ser:

1. Exclusão iônica: Ela ocorre em valores mais altos de pH, quando a sílica encontra-se com cargas negativas. Nessa situação, compostos que deveriam penetrar nos poros por causa dos seus tamanhos, sendo assim mais retidos, passam a ser repelidos, eluindo em tempo menor do que o esperado. Esse tipo de problema pode ser evitado com o aumento da força iônica do meio (uso de eletrólito mais concentrado) ou diminuição do pH da fase móvel.

2. Troca iônica: Na mesma faixa de pH do caso acima, moléculas com carga positiva podem sofrer interação eletrostática, ficando mais retidas do que o normalmente esperado. Da mesma forma que no problema anterior, o aumento da força iônica é uma das alternativas para se evitar o problema. A segunda alternativa seria o aumento do pH ao ponto de tornar os solutos não-ionizados. Nessa última, um cuidado adicional seria evitar o aumento exagerado do pH, o qual pode causar a solubilização da sílica que constitui a fase estacionária.

3. Interação hidrofóbica: Materiais de empacotamento à base de sílica para cromatografia de exclusão por tamanho em meio aquoso geralmente possuem, ligados em sua superfície, grupos com alguma característica hidrofóbica. Moléculas suficientemente hidrofóbicas podem interagir com esses sítios, apresentando retenção maior do que aquela normalmente esperada para os seus tamanhos. O aumento da força de eluição da fase estacionária com a adição de 5 a 10% de etanol ou isopropanol é uma forma de mitigar o problema. Outra maneira de tornar a interação mais branda é a redução do efeito de "salting out" na fase móvel, o qual é provocado pela concentração salina da fase móvel. Nesse caso, sugere-se a diminuição da concentração de sal e a preferência por sais

constituídos de íons monovalentes.

7.4 Cromatografia por pareamento iônico

Em vista do mecanismo dual da cromatografia por pareamento iônico, sítios hidrofóbicos e de troca iônica ocorrem em concentrações equitativas, sendo mais difíceis de se tornarem saturados e provocar picos com caudas. Todavia, para compostos muito básicos, recomenda-se a prevenção de caudas por meio da utilização de TEA. Nessas situações, o agente de pareamento costumeiramente é algum alquilsulfonato, e a TEA é adicionada numa proporção de 20 a 30% da concentração desse composto, ou por volta de 20 a 30 mmol/L.⁹

Finalizando o assunto da ocorrência de interações secundárias, reitera-se que a maioria dos problemas com essas causas podem ser antecipados com base no conhecimento da química envolvida na separação. Uma observação pertinente é que, dentro da mesma classe química de compostos, o fator de assimetria tende a aumentar com o aumento do fator de retenção dos analitos. Recapitulando, os efeitos secundários tornam-se mais pronunciados em compostos que são mais retidos na coluna. É bem verdade que isso pode não ocorrer da mesma forma para compostos de classes diferentes. Por exemplo, um composto ácido mais retido pode estar isento de assimetria, enquanto um básico bem menos retido pode apresentar significativa cauda na banda cromatográfica.

Como se pode observar pelas discussões que já foram desenvolvidas, são vários os problemas causadores de distorções nos picos cromatográficos. Esses problemas foram listados e estão sendo tratados, um a um, nessa sequência de artigos. Na próxima edição, a discussão acerca desses tópicos será finalizada.

Caros leitores, finalizo o texto desta edição, primeiro artigo do segundo ano de existência da Scientia Chromatographica, com um contato mais pessoal com o público-alvo. Primeiramente, espero que as informações trazidas nesta coluna estejam atendendo às suas expectativas. Portanto, reitero o desejo de um retorno com críticas, sugestões e complementações acerca dos assuntos já tratados, bem como também com sugestão de novos temas ou relatos de problemas a serem investigados/abordados neste espaço.

Referências Bibliográficas

1. J.W. Dolan, L.R. Snyder. Troubleshooting LC systems – A comprehensive approach to troubleshooting LC equipment and separation. Totowa, New Jersey: Humana Press. 500 p. (1989).
2. B.S. Buslig, C.W. Wilson III, P.E. Shaw. *J. Agric. Food Chem.*, 30 342 (1982).
3. M.R. Euerby, P. Petersson. *J. Chromatogr. A*, 994 13 (2003).
4. J.J. Gilroy, J.W. Dolan, L.R. Snyder. *J. Chromatogr. A*, 1000 757 (2003).
5. J. Layne. *J. Chromatogr. A*, 957 149 (2002).
6. E. Tonhi, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins. *Quim. Nova*, 25 616 (2002).
7. M. Molíková, P. Jandera. *J. Sep. Sci.*, 33 453 (2010).
8. S.M. Plaisted, T.A. Zwier, B.G. Snider. *J. Chromatogr.*, 281 151 (1983).
9. A.P. Goldberg, E. Nowakowska, P.E. Antle, L.R. Snyder. *J. Chromatogr.*, 316 241 (1984).