

Extracção em Fase Sólida (EFS): – Tipos de Enchimento

MARIA DA CONCEIÇÃO CASTILHO, FERNANDO RAMOS
e MARIA IRENE NORONHA DA SILVEIRA *

O presente trabalho constitui a primeira parte de uma revisão sobre o processo de extracção em fase sólida (EFS). São apresentados os diferentes tipos de enchimento utilizados em SPE: sílica, sílica ligada, terra de diatomáceas, florisil, alumina, carvão activado, negro de carvão grafitizado e polímeros porosos macrorreticulares. Dada a importância dos enchimentos de sílica ligada, faz-se uma referência especial aos grupos funcionais polares (CN, 2OH, NH₂), apolares (C18, C8, C2, CH, PH), troca iónica (SAX, PSA, DEA, CBA, PRS, SCX), covalentes (PBA) e mistos.

INTRODUÇÃO

A preparação da amostra é um dos processos fundamentais em qualquer protocolo analítico. Apesar dos progressos alcançados nos anos oitenta na melhoria das técnicas tradicionais de tratamento da amostra, no mínimo 70 a 80% do tempo de uma análise é, ainda, dispendido nesta fase do processo analítico.

Se definirmos, genericamente, extracção em fase sólida EFS (Solid Phase Extraction) como um processo onde a retenção ocorre sobre um suporte sólido e a eluição se faz através de um líquido que atravessa esse suporte, verificamos que não existem grandes diferenças de princípios básicos entre EFS e a cromatografia em coluna. Contudo, a EFS constitui, indiscutivelmente, uma das mais populares técnicas utilizadas nos últimos anos na área da extracção/purificação de amostras, particularmente quando é necessário determinar pequenas concentrações de soluto em matrizes complexas.

A crescente utilização e optimização desta técnica, bem como das suas variantes, deve-se, sobretudo, às enormes vantagens que apresenta quando comparada com os métodos tradicionais de extracção/purificação de amostras, nomeadamente a partilha líquido/líquido.

A EFS oferece, como vantagens mais marcantes, rapidez, selectividade, versatilidade, boas recuperações, reprodutibilidade de resultados, economia (cinco vezes mais barata que outras técnicas devido a redução de mão de obra, consumo de solventes e material de vidro), facilidade de automatização, eliminação de emulsões, maior segurança para o operador e para o meio ambiente, redução ou mesmo eliminação de reacções cruzadas com extractos eficientemente purificados e compatibilidade com qualquer tipo de análise instrumental [1-7].

Por outro lado, a EFS tem sido utilizada com sucesso em vários campos como farmácia, química, bioquímica, alimentação e bebidas, agricultura, água e ambiente, entre outros, bem assim como, e independentemente do domínio da aplicação, no fraccionamento de amostras, mudanças de solventes e concentração de compostos [8].

Assim, devido à inexistência de artigos em língua portuguesa sobre o assunto, ao crescente número de utilizadores e, sobretudo, de potenciais utilizadores desta técnica que falam a língua de Camões, resolvemos associar a nossa experiência de trabalho com EFS com a de outros autores e produzir o presente texto.

Este primeiro artigo debruça-se, apenas, sobre os diferentes tipos de enchimentos que são utilizados em EFS. Seguir-se-ão, no entanto, outros que desenvolverão os mecanismos de extracção, a optimização da metodologia, a aplicação na análise de resíduos de hormonas e agonistas β_2 -adrenérgicos e, ainda, um outro que fará a abordagem de duas variantes deste método, a dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) [9] e a cromatografia de imunoafinidade (IAC) [10].

Por último, e muito embora a língua portuguesa seja uma das mais ricas em vocábulos, torna-se difícil encontrar um significado exacto para certas designações anglo-saxónicas, pelo que iremos manter as siglas como foram utilizadas pelos seus autores.

EXTRACÇÃO EM FASE SÓLIDA (EFS)

A extracção em fase sólida, também designada como um processo de extracção líquido/sólido, pode ser descrita como uma aplicação da forma clássica de cromatografia líquida de adsorção descrita por Tswett. Esta técnica envolve a retenção selectiva dos solutos ou substâncias co-extraídas, num enchimento que se encontra dentro de pequenas colunas.

Os princípios que regem a EFS são, como já dissemos, os mesmos da purificação tradicional por coluna cromatográfica. Neste processo intervem duas fases mutuamente imiscíveis, uma sólida e outra líquida, denominadas de enchimento e eluente, respectivamente. O enchimento, fase estacionária, como em qualquer outro método cromatográfico é a parte vital do processo e proporciona, selectivamente e numa única operação, o isolamento e/ou concentração do(s) soluto(s) de matrizes com composições por vezes bastante complexas.

Invólucro

Os invólucros existentes no mercado para a preparação de amostras por EFS são normalmente minicolunas, tipo corpo de seringa, de polipropileno de alta pureza ou de vidro contendo 50, 100, 200, 500 e 1000 mg ou, mesmo, 10g de uma ampla gama de enchimentos com diferentes selectividades, normalmente com 40 μ m de diâmetro de partícula, que permitem fluxos adequados sem aumento da pressão à saída da coluna.

Os dispositivos completos são constituídos pelo corpo da coluna, enchimento e dois minidiscos com secção idêntica à da coluna, normalmente de polietileno de 20 μ m de poro, usados como filtros e para reter o suporte sólido na coluna. No entanto, quando os analitos são incompatíveis com o material padrão das colunas e dos minidiscos, algumas casas fornecedoras dispõem já de material alternativo. A parte inferior

da coluna é do tipo Luer, pela facilidade de conexão que permite ao sistema de vácuo e à agulha de seringa aquando do lançamento directo do extracto no seu tubo de recolha final.

Enchimento

O material de um enchimento deve ser suficientemente reactivo, de modo a facilitar a modificação da sua superfície através de reacção química, e, ao mesmo tempo, suficientemente estável para possibilitar a utilização de uma ampla variedade de tipos de amostras e de solventes.

Presentemente, existem disponíveis no mercado vários tipos de enchimentos: carvão grafitizado, terra de diatomáceas, alumina, florissil, sílica, sílica ligada (octadecil, octil, etil, ciclo-hexil, fenil, cianopropil, diol, aminopropil, ácido fenilborónico, sulfonilpropil, dietilaminopropil, trimetilaminopropil, entre outros) e polímeros porosos macrorreticulares. Cada um destes produtos exibe propriedades únicas para reter os analitos através de uma multiplicidade de interacções moleculares.

Com excepção da alumina, florissil, carvão grafitizado, terra de diatomáceas e polímeros, os restantes enchimentos disponíveis no mercado, baseiam-se numa modificação química das partículas da sílica.

Os enchimentos de sílica e de sílica ligada são talvez os mais populares e mais versáteis de todos os suportes sólidos usados na EFS valendo a pena descrevê-los mais detalhadamente.

I. Sílica

A sílica é formada por uma rede de ligações siloxano numa estrutura rígida tridimensional com poros interligados e uma área superficial de 675 m² g⁻¹, completamente inerte face a compostos lábeis. Considera-se que a sílica é um produto de condensação do ácido ortossilícico, habitualmente preparada por uma reacção hidrolítica, a quente, entre o silicato de sódio e o ácido clorídrico du-

rante um ou dois dias. O produto resultante, o gel de sílica, é física e quimicamente muito heterogéneo apresentando uma superfície porosa de estrutura muito complexa, contendo principalmente como grupos reactivos funções siloxano, silanol, livres e ligados, e água adsorvida (figura 1). Os grupos silanol livres (cerca de 8 μmol / m²) estão distribuídos em monocamadas e de um modo irregular na superfície da partícula da sílica enquanto os grupos silanol ligados resultam da ligação por pontes de hidrogénio de dois hidroxilos consecutivos. As funções siloxano correspondem à desidratação de dois silanóis geminados [11-14].

As propriedades da sílica resultam das interacções dos grupos referidos com as moléculas polares do analito, apresentando contudo uma acção adsorvente diferente. Assim, os silanóis ligados apresentam forte adsorção, os livres adsorção intermédia e os siloxanos apresentam características adsorventes fracas [15].

A activação do gel de sílica, por aquecimento a temperaturas de 200°C, liberta os grupos hidroxilos dos componentes adsorvidos fisicamente. Acima dos 400°C, os grupos silanol livres podem perder uma molécula de água formando-se, por uma ponte de hidrogénio entre os dois átomos de sílica, um sítio de adsorção menos activo que conduz a uma diminuição das suas propriedades adsorventes [16]. A presença de siloxano deve-se à temperatura à qual foi levada a sílica, aumentando na razão directa do aumento de temperatura.

A característica física do gel de sílica que mais afecta as propriedades de extracção/purificação é o seu teor em grupos hidroxilo, ou seja o seu teor em água, que, numa sílica não modificada, está directamente relacionado com a área de superfície da sílica, o diâmetro do poro e o seu volume. A textura da sílica determina não só o numero dos seus grupos mas também a relação entre os sítios ligados e os sítios livres. Admite-se, geralmente, que as sílicas cujo diâmetro de poro seja inferior a 2 nm

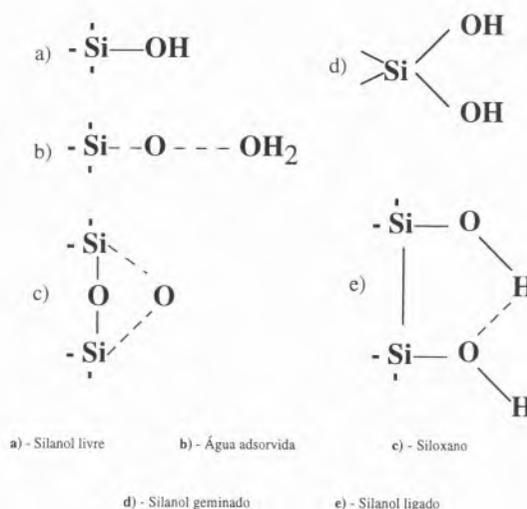


Fig. 1 - Grupos reactivos à superfície da sílica.

têm a vantagem de possuir mais grupos silanol ligados que as de poro maior.

Os silanóis ligados são grupos bastante fortes, hidrofílicos, conferindo ao gel de sílica a característica de adsorver água, pelo que se torna necessário manter a sílica seca e hermeticamente fechada antes de qualquer utilização. A sua fraca acidez e facilidade de ionização conferem ao enchimento propriedades de permuta catiónica.

II. Sílica ligada

O conceito de fase ligada foi introduzido para obter uma fase estacionária que exibisse algumas das características da cromatografia líquido/líquido e que, por outro lado, mantivesse a estabilidade da fase no sistema sólido/líquido. A aplicação destes enchimentos à EFS tornou possível a eliminação dos compostos hidrofóbicos das amostras aquosas que até então só eram removidos por técnicas laboriosas como a extracção líquido/líquido.

As fases ligadas apresentam uma composição física e quimicamente heterogénea e não actuam apenas como um suporte sólido mas contribuem, também, para o processo de extracção/purificação com os

seus grupos funcionais e requisitos estruturais.

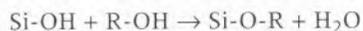
O tamanho das partículas da sílica ligada num enchimento para EFS é, normalmente, de 40 µm com poros de 60 Å. Estas características permitem otimizar a relação de fluxos e providenciar a capacidade de ligação exigida.

Os enchimentos de sílica ligada são estáveis à hidrólise num intervalo de pH variável, segundo os diversos autores. Assim, enquanto Van Horne [17] refere um intervalo entre 2 e 7,5, Gill [18] alarga de 2 até 8, Karch e col. [13] apresentam valores de 1 a 8,5 e Unger e col. [19] estabelecem mesmo um intervalo de 0 a 8,5. No entanto, todos são unânimes em afirmar que quando se ultrapassa o valor de pH superior dos intervalos referidos por cada um, pode haver dissolução da sílica não sendo, portanto, seguro trabalhar com esses valores de pH.

McDowall [6] e Van Horne [17] referem que, por vezes, este intervalo de pH pode ser alargado de 1 até 14 desde que o enchimento permaneça apenas em contacto com os solventes durante curtos períodos de tempo.

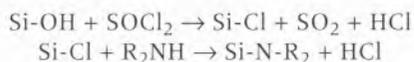
As fases ligadas são preparadas usualmente por meio de reacções de superfície entre o suporte de sílica, poroso e completamente hidroxilado, e um modificador apropriado, sendo aceite que se, pelo menos, 50% dos grupos silanol reagirem, estamos perante um bom enchimento [19]. Os grupos funcionais podem ligar-se ao silanol da superfície da sílica por três tipos diferentes de reacções [11, 13, 20, 21]:

1) - Por esterificação com álcoois dando origem a uma ligação do tipo Si-O-R. Este tipo de enchimento apresenta um uso muito limitado devido à sua instabilidade à hidrólise;

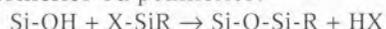


2) - Por reacção com cloreto de tionilo, originando grupos Si-Cl que, por sua vez, vão reagir com aminas primárias ou secundárias dando aminossilanos Si-N-R que apresentam

uma estabilidade superior aos anteriores, mesmo em sistemas aquosos:



3) - Por reacção com organoclorossilanos ou organoalcoxisilanos, através de uma ligação covalente siloxano ou silil-éter, resultando fases quimicamente ligadas e do tipo monomérico ou polimérico.



R - Radical orgânico

X - Cl, OCH₃ ou OC₂H₅

Para que as reacções descritas em 3) tenham lugar e que seja obtida a capacidade máxima de ligação, o suporte de sílica deve apresentar-se seco e com a superfície completamente hidroxilada, isto é, com um número máximo de grupos silanol por unidade de área, ou seja, 8 µmoles/m² [13, 19, 22]

Após as reacções referidas anteriormente permanecem sempre silanóis não ligados. Tal facto tem a ver não só com razões estereoquímicas, cerca de 4 µmoles/m² dos grupos silanol do gel de sílica não reagem durante a etapa de ligação química permanecendo, portanto, activos, como, também, com a situação de hidrólise do clorossilano que, sendo seguida por uma reacção à superfície da sílica dá origem a grupos hidroxilos adicionais livres. Estes grupos conferem ao enchimento de sílica ligada uma certa polaridade que se traduz por interacções secundárias, muitas vezes indesejáveis, entre o suporte e o analito.

Para reduzir estes grupos silanol remanescentes, os enchimentos de sílica ligada podem ser submetidos a uma operação de protecção (*endcapping*) através de uma reacção de derivatização com um agente de sililação monofuncional como, por exemplo, o trimetilclorossilano [23].

As fases ligadas do tipo monomérico são preparadas através de mono, di ou triclorossilanos e com controlo rigoroso do teor em água resultando fases do tipo cerda com alta velocidade de transferência de

massa. Se a água que se encontra fisicamente adsorvida na superfície da sílica não for removida haverá lugar a hidrólise com conseqüente formação de uma estrutura polimérica. A necessidade de activar ou desidratar a sílica antes de executar a reacção de ligação justifica-se, pois, plenamente quando se pretende preparar estruturas do tipo monomérico.

As fases poliméricas apresentam maiores capacidade e estabilidade de pH do que as monoméricas, no entanto, a transferência de massa é mais lenta. As fases monoméricas apresentam, contudo, um controlo de reacção mais fácil, uma maior actividade e mais átomos de silanol descobertos e desprotegidos que as fases poliméricas [11].

Em resumo, as fases ligadas devem preencher completamente a superfície original da sílica de modo a que não haja lugar a mecanismos de retenção secundários. Devem, ainda, possuir composição reproduzível e definida e serem química e termicamente estáveis. A estabilidade das fases ligadas perante a hidrólise aumenta desde a ligação Si-O-R, passando por Si-N-R, até atingir um máximo na ligação Si-R [13, 24].

Grupos funcionais

Os grupos funcionais que se encontram ligados à sílica determinam a identidade e as características do enchimento. Assim, consoante o carácter do grupo funcional a que se encontram ligados classificam-se os enchimentos em: polares, apolares, troca iónica, covalentes e mistos.

A) Polares

Os grupos funcionais polares ligados à base de sílica e disponíveis comercialmente são: cianopropil (CN), diol (2OH) e aminopropil (NH₂), conforme se pode observar no quadro I.

(i) Cianopropil (CN)

O grupo cianopropil confere à sílica uma polaridade média, sendo ideal naqueles casos em que analitos

Quadro I - Enchimentos com grupos funcionais polares

Classificação	Grupo funcional	Estrutura
POLAR	2OH	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \\ \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{OH} \text{ OH} \end{array}$
	CN	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN} \\ \end{array}$
	NH ₂	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \\ \end{array}$

muito apolares são retidos irreversivelmente nos enchimentos apolares, particularmente C18 e C8. Também é recomendado com analitos que são irreversivelmente retidos em suportes polares como a sílica ou sílica ligada a grupos funcionais diol. O grupo ciano propicia ao enchimento uma selectividade específica que pode ser alterada mediante a escolha apropriada de uma mistura de solventes. Por vezes os enchimentos com o grupo funcional ciano não são reprodutíveis. Tal facto deve-se à possibilidade deste grupo se poder hidrolizar para amida, numa primeira fase, e, em seguida, para ácido carboxílico, originando uma reacção altamente irreprodutível.

(ii) Diol (2OH)

O grupo diol origina um suporte sólido bastante polar usado para extrair compostos polares de soluções relativamente apolares através de mecanismos de ligação por pontes de hidrogénio. Este enchimento é comparável à sílica, sendo, no entanto, mais reprodutível, quer na tendência que tem para formar ligações fortes com os átomos de hidrogénio dos analitos quer na mestria que possui para discriminar compostos muito semelhantes como sejam isómeros estruturais.

O grupo diol encontra-se ligado à sílica por uma estrutura alquil o que lhe permite, através de solvatação apropriada, conseguir um carácter apolar suficiente para reter analitos relativamente apolares de matrizes polares.

Tal como a sílica também possui a capacidade de adsorver água e outros compostos polares de um modo irreprodutível.

(iii) Aminopropil (NH₂)

O grupo funcional aminopropil, apesar de ser usualmente classificado como polar, proporciona ao suporte sólido todo o tipo de interacções. É bastante polar, forma com grande facilidade pontes hidrogénio e pode também actuar como permutador aniónico fraco. Face a uma amostra de pH inferior a 9,8, valor do pKa do enchimento, a amina carrega-se positivamente. Por estas razões, a espécie de interacções que surgem no seio do enchimento são devidas mais ao conjunto solvente/matriz do que, propriamente, ao enchimento

Dado o seu carácter catiónico é o suporte sólido adequado para a retenção de aniões bastante fortes como, por exemplo, os ácidos sulfónicos.

B) Apolares

A sílica quando ligada a grupos funcionais apolares origina os enchimentos mais populares de EFS, ou seja, C18, C8, C2, CH, PH, entre ou-

tros (quadro II). Todos estes enchimentos podem ter ou não os grupos silanol residuais protegidos (*endcapped*) consoante se pretende tirar ou não partido das interacções secundárias polares durante o processo de extracção.

(i) Octadecil (C18)

O grupo funcional mais utilizado é o octadecil (C18) que permite, por mecanismos apolares, uma retenção inespecífica dum grande numero de analitos. Os compostos muito apolares dificilmente são eluídos deste enchimento e, inversamente, moléculas muito polares não são retidas.

As interacções secundárias polares e de intercâmbio iónico são de somenos importância devido ao comprimento da sua cadeia alquil, sobretudo quando comparada com os restantes enchimentos deste grupo. É, como já se disse, considerada uma fase pouco selectiva dado que retém elevado numero de compostos presentes em matrizes veiculadas por soluções aquosas. Devido à sua baixa selectividade, os extractos finais não apresentam um grau de pureza muito elevado quando comparado com outros enchimentos mais selectivos. No entanto, é o enchimento modelar para compostos estruturalmente muito diferentes e de grande utilidade na remoção de sais, para os quais não tem qualquer afinidade.

Quadro II - Enchimentos com grupos funcionais apolares

Classificação	Grupo funcional	Estrutura
APOLAR	C18	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37} \\ \end{array}$
	C8	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_8\text{H}_{17} \\ \end{array}$
	C2	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_2\text{H}_5 \\ \end{array}$
	PH	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \end{array}$
	CH	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{C}_{10}\text{H}_{21} \\ \end{array}$

(ii) Octil (C8)

O enchimento C8 apresenta propriedades semelhantes ao anterior. Contudo, como possui uma cadeia hidrocarbonada mais curta, também o seu poder de retenção dos analitos é ligeiramente diferente, sobretudo quando é baseada apenas nas interações apolares, o que o transforma numa boa opção para os analitos que permanecem retidos no C18. Devido também ao tamanho da cadeia alquil as interações polares, como mecanismo secundário, têm um pouco mais de influência porque os grupos residuais silanol da superfície da sílica se encontram mais acessíveis.

(iii) Etil (C2)

O grupo funcional etil, possuindo uma cadeia muito mais curta e apesar de ser classificado como apolar, apresenta, também, propriedades polares muito significativas.

Um enchimento com este tipo de grupo funcional é substitutivo dos dois anteriores quando os analitos são fortemente retidos naqueles e quando está em causa o mesmo mecanismo de retenção.

(iv) Ciclo-hexil (CH)

O ciclohexil tem uma polaridade média que exhibe uma certa selectividade para alguns analitos. O mecanismo primário de retenção é semelhante ao do C2. A polaridade da sua superfície torna-o adequado à retenção de compostos bastante polares como, por exemplo, grupos fenol.

(v) Fenil (PH)

O fenil, outro grupo funcional que se pode ligar a uma base de sílica, é um suporte sólido com propriedades semelhantes às do C8 quando o mecanismo de retenção primário dos analitos é o apolar. Em relação aos outros enchimentos apolares a sua selectividade é ligeiramente diferente devido à densidade electrónica do anel aromático. Como mecanismo secundário apresenta, principalmente, interações de intercâmbio catiónico.

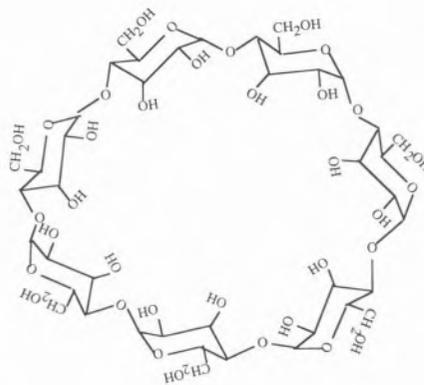


Fig. 2 - Estrutura completa da β-Ciclodextrina.

(vi) Outros

Na bibliografia consultada encontramos, ainda, alguns grupos funcionais ligados à sílica que actuam, também e principalmente, por mecanismos apolares como butil (C4) e metil (C1). A β-ciclodextrina (β-CYD) é outro dos enchimentos em que o principal mecanismo de extracção/purificação é apolar. A β-CYD (figura 2) é formada por sete unidades de glicose com os grupos hidroxilo orientados para o exterior da cavidade, exibindo, assim, uma estrutura cujo interior é hidrofóbico. O mecanismo de separação fundamenta-se nas interações da parte hidrofóbica do analito com a parte interior da estrutura da ciclodextrina.

C) Troca iónica

As fases de troca iónica dependem das interações iónicas como um mecanismo primário de retenção. Estas interações ocorrem entre a molécula do analito, contendo uma carga positiva ou negativa, e um enchimento contendo uma carga de sinal contrário. Existem comercialmente disponíveis dois grupos de fases de troca iónica: catiónica e aniónica.

As fases de troca catiónica, como o nome indica, retêm compostos de carga positiva, enquanto as fases de troca aniónica retêm os compostos de carga negativa.

Os factores principais que influenciam os mecanismos de troca iónica são o pH, a força iónica e a força do contra-íon.

Intercâmbio aniónico

Os enchimentos representativos desta classe apresentam como grupos funcionais a trimetilaminopropil (SAX), a N-propiletilenodiamina (PSA) e o dietilaminopropil (DEA), conforme se pode verificar no quadro III.

(i) Trimetilaminopropil (SAX)

Este grupo funcional origina um suporte sólido de troca aniónica forte sempre carregado, devido à presença do grupo amina quaternária.

Quadro III - Enchimentos com grupos funcionais de troca iónica

Classificação	Grupo funcional	Estrutura
Catiónica	SCX	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3^-$
	CBA	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{COO}^-$
	PRS	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$
Aniónica	SAX	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$
	DEA	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{H})(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
	PSA	$-\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{H})_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$

rio. As interações primárias deste grupo são aniônicas e as secundárias, apolares, são reduzidas como consequência da cadeia carbonada se encontrar dissimulada pela amina. Na presença de solventes apolares exibe um certo carácter polar, sem no entanto ser capaz de formar pontes de hidrogénio por impedimento estereoquímico da amina e pela sua natureza quaternária. É eficaz para extrair compostos aniônicos tanto de soluções aquosas como de orgânicas.

(ii) *N-propiletilenodiamina (PSA)*

O grupo funcional PSA é constituído por um ligando bidentado que torna o enchimento exímio na formação de quelatos ou complexos. Possui muitas analogias com o aminopropil (NH₂). É também um permutador aniônico mas como detém dois grupos amino, primária e secundária, cujos pKa são 10,1 e 10,9, constitui um enchimento mais forte que o de aminopropil. As interações primárias são de carácter polar, intercâmbio aniônico e de complexação e as secundárias de intercâmbio catiónico e apolar. A densidade de carbonos é superior à do aminopropil, tornando-o um pouco mais apolar, pelo que vantajosamente substitui este último nas separações de analitos muito polares fortemente retidos na NH₂.

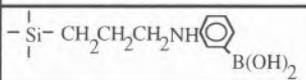
(iii) *Diethylaminopropil (DEA)*

Este enchimento também apresenta propriedades idênticas às do grupo funcional amina. A capacidade de permutador aniônico é da ordem de 1,0 mEq g⁻¹ e o seu carácter apolar deve-se aos átomos de carbono ligados ao grupo funcional. O pKa é de 10,7 sendo mais polar que as fases C2 e CN.

Intercâmbio catiónico

Os grupos funcionais representativos desta classe são o carboximetil (CBA), o sulfonilpropil (PRS) e o propilbenzenossulfónico (SCX). No quadro III apresentam-se as correspondentes estruturas químicas.

Quadro IV - Enchimentos com grupos funcionais covalentes

Classificação	Grupo funcional	Estrutura
COVALENTE	PBA	$\begin{array}{c} \\ -\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH} \\ \\ \text{B}(\text{OH})_2 \end{array}$ 

(i) *Carboximetil (CBA)*

Este enchimento possui um pKa de 4,8 e apresenta uma polaridade média com interações secundárias polares e apolares consoante o meio. Uma característica particular é o seu carácter fraco de troca catiónica sendo as aminas os contra-íons mais empregues com este suporte sólido. Para um pH superior ao seu pKa, o CBA surge com uma carga negativa que é utilizada para reter os analitos catiónicos, enquanto que um pH inferior a 4,8 facilita a eluição dos compostos retidos por neutralização dos grupos funcionais do enchimento.

(ii) *Sulfonilpropil (PRS)*

O grupo funcional PRS origina uma fase ligada de troca catiónica forte de elevada polaridade na qual as interações apolares são nulas, podendo apresentar tanto interações polares como formação de pontes de hidrogénio. A sua utilização para extrair compostos básicos, quer de soluções aquosas quer de soluções orgânicas, é frequente. Por exemplo, os analitos catiónicos fracos, piridínicos, são retidos neste tipo de enchimento que, por sua vez, são eluídos através de solventes com força iónica elevada ou por neutralização da sua carga.

(iii) *Propilbenzenossulfónico (SCX)*

O SCX é, também, um enchimento de troca catiónica forte com baixo pKa, muito semelhante ao anterior. Contrariamente ao PRS, e por possuir um anel benzénico na sua superfície, manifesta interações apolares. É útil para aqueles analitos que tenham um carácter simultaneamente catiónico e apolar.

D) Covalentes

São suportes sólidos de sílica impregnada com agentes complexantes que vão melhorar a separação

de misturas contendo compostos poli-hidroxil e, nomeadamente, grupos diol vicinais. O exemplo mais característico deste grupo é o ácido fenilborónico (quadro IV). Este é um enchimento específico para isolar compostos com hidroxilos coplanares vicinais de soluções aquosas como, por exemplo, as catecolaminas. O mecanismo de separação fundamenta-se nas interações covalentes com os analitos. Como a ligação covalente se rompe para valores de pH inferiores a 8, a eluição dos analitos de interesse faz-se facilmente com uma solução ácida.

E) Mistos

Estes enchimentos contêm dois ou mais tipos de grupos funcionais ligados à base de sílica. Em teoria, qualquer combinação dos grupos descritos anteriormente é possível. Contudo verifica-se que os grupos funcionais mais utilizadas neste tipo de enchimento são as combinações de apolares com troca iónica, seja ela catiónica, aniônica ou, mesmo, ambas em simultâneo.

III) Outros enchimentos

Terra de diatomáceas

A terra de diatomáceas é um adsorvente orgânico, amorfo obtido dos esqueletos de diatomáceas capaz de absorver até 4 vezes o seu peso em água. Apresenta uma baixa área superficial, é um adsorvente fraco e é usado para reter analitos fortemente polares e substâncias altamente hidrofílicas [25].

Florisil

O florisil é um silicato de magnésio preparado por precipitação a partir de uma mistura de soluções de sulfato de magnésio e silicato de sódio calcinados a 1200°C. Muito

poroso com uma área específica de cerca de 200 - 250 m² g⁻¹, normalmente bastante ácido, tem de ser activado antes do uso. Este enchimento apresenta como inconvenientes as possibilidades de absorção irreversível dos compostos básicos e as oscilações nas suas propriedades de lote para lote [26].

Alumina

A alumina é um enchimento semelhante à sílica que separa as substâncias na base da polaridade, sendo constituída por uma mistura de γ -alumina com pequenas quantidades de α -alumina e carbonato de sódio[27]. É obtida por desidratação da alumina tri-hidratada tendo como centros activos os hidroxilos, com uma densidade média de 13 mmol/m², e os iões óxidos. Encontra-se disponível comercialmente, completamente activada e pronta para uso, nas formas ácida, neutra e básica.

A alumina ácida, com um pH 3,5-4,5, resulta da lavagem da alumina neutra com um ácido. Tem uma grande actividade e pode absorver moléculas por interacções com o centro metálico do alumínio, por ligações por pontes de hidrogénio com os grupos hidroxilos da superfície e por troca aniónica.

A alumina neutra, pH 6,9-7,1, é obtida por lavagem da alumina básica com água destilada. Permite interacções do centro metálico do alumínio com compostos de carácter electronegativo devido à presença de heteroátomos ou de estruturas altamente aromáticas. Pode ser útil para reter aminas e compostos aromáticos de matrizes aquosas e não aquosas.

A alumina básica de pH 10-10,5, em solução aquosa, apresenta uma superfície com uma carga manifestamente negativa que lhe confere propriedades de troca catiónica.

Carvão activado

Este suporte sólido é obtido por oxidação do carvão vegetal, a baixas temperaturas. Apresenta uma área específica entre os 300 - 1000 m² g⁻¹, muito heterogénea e com um grande diâmetro de poro. Da complexidade

da sua estrutura, com destaque para os grupos funcionais lactona, quinona e carboxílicos fenólicos, resultam mecanismos de interacção com analitos também bastante variados como, por exemplo, interacções hidrofóbicas, complexações por transferência de carga e ligações por pontes de hidrogénio. Esta multiplicidade de ligações se por um lado providencia uma forte ligação, por outro exerce um efeito negativo no mecanismo de eluição, conduzindo a recuperações baixas de determinados analitos [27].

Negro de carvão grafitizado

O negro de carvão grafitizado (Graphitized Carbon Black - GCB) é um enchimento não revestido, bastante versátil, com uma área específica de 100 m² g⁻¹, completamente inorgânico, química e termicamente estável. O negro de carvão é obtido por combustão de óleos, na ausência de oxigénio, e, posteriormente, convertido a carvão grafitizado (GCB) por aquecimento numa atmosfera inerte a 3000°C [28-29]. Apresenta uma superfície homogénea apolar, isenta de duplas ligações ou sítios activos polares, formada por uma base hexagonal de grafite semelhante a anéis aromáticos condensados. A retenção do analito na superfície apolar do GCB faz-se unicamente por forças de dispersão. Consequentemente, as interacções entre o analito e o enchimento não são função dos momentos dipolares dos compostos, mas sim do seu tamanho, volume molecular e polaridade. Devido às suas propriedades, os compostos naturais contendo grupos polarizáveis nitro, fenil e dicloro podem ser fortemente retidos na superfície do GCB [30-31].

Polímeros porosos macrorreticulares

As resinas aromáticas não iónicas tipo XAD-1,2 e 4 são co-polímeros de estireno divinilbenzeno, estáveis num grande intervalo de pH e com estrutura macrorreticular. Apresentam capacidade para reagir com

moléculas relativamente lipofílicas solúveis em água, quer por forças de Van der Waals, quer por interacções dipolo-dipolo[6].

Outras resinas, como as XAD 7 e 8, são ésteres acrílicos não aromáticos com fraca capacidade de troca iónica e mais hidrofílicas que as anteriores. Possuem grande capacidade de adsorção para os compostos polares e menor para os apolares [27].

Os inconvenientes destes enchimentos são a sua baixa capacidade, por exemplo, são necessários 0,5 g de resina/ml de urina, a sua baixa velocidade de fluxos, cujo máximo ronda os 0,2 ml/min./cm² [32], e a exigência de uma purificação cuidadosa antes do seu uso [33].

Estes enchimentos estão sujeitos a contaminação microbiológica pelo que, após a purificação, devem ser mantidos em frascos de vidro hermeticamente fechados a - 20°C e até ao seu uso [34].

Por sua vez, as resinas de troca iónica são, também, polímeros de estireno divinilbenzeno aos quais foram incorporados grupos funcionais de ácidos sulfónico ou carboxílico ou, ainda, de amónio quaternário. São mais estáveis frente a ácidos ou bases fortes do que os enchimentos de sílica ligada e, além disso, são compatíveis com solventes aquosos e orgânicos [27]. Normalmente, os analitos são eluídos com o mesmo tipo de solvente que foi utilizado para lavar a coluna mas adicionado de um ácido ou base volátil.

CONCLUSÃO

Não pretendemos ser exaustivos na abordagem que fizemos da panóplia de enchimentos utilizados em EFS, até porque a matéria se encontra num processo evolutivo. Contudo, pensamos que ficaram descritos os princípios fundamentais por forma a que qualquer potencial utilizador possa, à partida e uma vez conhecedor das propriedades do analito, escolher o(s) enchimento(s) que necessita para realizar o seu processo de extracção/purificação. Os solventes a

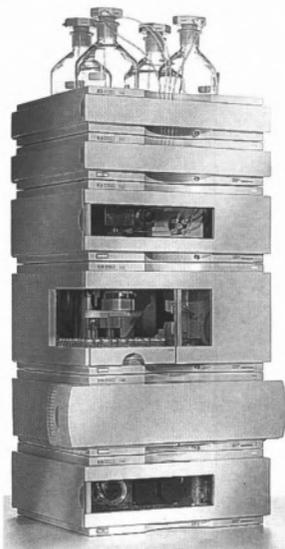
utilizar, bem assim como os mecanismos de extracção envolvidos serão objecto duma posterior publicação.

* *Laboratório de Bromatologia-Faculdade de Farmácia-Universidade de Coimbra – 3000 Coimbra*

BIBLIOGRAFIA

1. A. Newman, *Environ. Sci. Technol.* **26** (1992) 1294.
2. J. Horack and R.E. Majors, *LC-GC Int.* **6** (1993) 208.
3. R.E. Majors, *LC-GC Int.* **6** (1993) 346.
4. A.C.P. Araújo e M.C. Salvadori, *Rev. Port. Farm.* **XLIV** (1994) 177.
5. R.D. McDowall, *LC-GC Int.* **7** (1994) 638.
6. R.D. McDowall, J.C. Pearce and G.S. Murkitt, *J. Pharm. Biom. Anal.* **4** (1986) 3.
7. B.K. Logan, D.T. Stafford, I.R. Tebett e C.M. Moore, *J. Anal. Toxicol.* **14** (1990) 154.
8. R.E. Majors, *LC-GC Int.* **6** (1993) 130.
9. S.A. Barker, A.R. Long and C.R. Short, *J. Chromatogr.* **475** (1989) 353.
10. L.A. van Ginkel, *J. Chromatogr.* **564** (1991) 363.
11. H. Colin and G. Guichon, *J. Chromatogr.* **141** (1977) 289.
12. J. Kohler, D. B. Chase, R. D. Farlee, A. J. Vega and J. J. Kirkland, *J. Chromatogr.* **352** (1986) 275.
13. K. Karch, I. Sebastian and I. Halász, *J. Chromatogr.* **122** (1976) 3.
14. R. P. W. Scott, *Contemporary Liquid Chromatography*, vol. XI, John Wiley & Sons, New York, 1976.
15. R. W. Yost, L. S. Ette and R. D. Colon, *Introduccion a la Cromatografia Liquida Pratica*, Perkin Elmer, Norwalk, 1980.
16. A.S.Y. Chau and H.-B. Lee, *Analysis of Pesticides in Water*, CRC Press, New York, 1977.
17. K.C. van Horne, *Sorbent Extraction Technology*, Analytichem International, 2ª edição, Harbor City, 1990.
18. R. Gil in *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids and Post-Mortem Material*, Editor A.C. Moffat, 2ª edição, The Pharmaceutical Press, London, 1986.
19. K.K. Unger, N. Becker and P. Roumeliotis, *J. Chromatogr.* **125** (1976) 115.
20. R. V. Vivilechia, R. L. Cottler, R. J. Limpert, N. Z. Thimot and J. N. Little, *J. Chromatogr.* **99** (1974) 407.
21. A.J.L.O. Pombeiro, *Técnicas e operações unitárias em química laboratorial*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1983.
22. P. Roumeliotis and K.K. Unger, *J. Chromatogr.* **149** (1978) 211.
23. R.E. Majors and M.J. Hopper, *J. Chromatogr. Sci.* **12** (1974) 767.
24. A. G. Marina and B. Castillo, *Cromatografia Líquida de Alta Resolução*, 1ª edição, Noriega Editores, México, 1988.
25. L. R. Snyder, *Principles of the Adsorption Chromatography - The Separation of Nonionic Organic Compounds*, Vol. 3, Marcel Dekker Inc., New York, 1968.
26. G. Zweig, *Analytical methods for pesticides, plant growth regulators, and food additives*, Academic Press, New York, 1963.
27. S.K. Poole, T.A. Dean, J.W. Oudsema and C.F. Poole, *Anal. Chim. Acta* **236** (1990) 3.
28. J. H. Knox and B. Kaur, *J. Chromatogr.* **352** (1986) 3.
29. J. H. Knox, K. K. Unger and H. Mueller, *J. Liq. Chromatogr.* **6** (S-1) (1983) 3.
30. K. R. Kim, J. Y. Lee and S. Leeh, *J. Chromatogr.* **400** (1987) 285.
31. M. C. Castilho, F. Ramos and M. I. Silveira, *Rev. Port. Farm.*, submetido para publicação.
32. J. Sjøvall and M. Axelson, *J. Steroid Biochem.* **11** (1979) 129.
33. M. Dressler, *J. Chromatogr.* **165** (1979) 167.
34. J. M. Rosenfeld, M. Mureika-Russel and A. Phatak, *J. Chromatogr.* **283** (1984) 127.

SÉRIE HP 1100 MÓDULOS E SISTEMAS PARA HPLC DA N/ REPRESENTADA "HEWLETT-PACKARD"



Sistemas de HPLC desenhados para validação automática

Escolha entre 3 sistemas de Introdução de Solventes
Isocrático – Binário e Quaternário

Desgasificação por Vácuo

Grande diversidade de Detectores

Dois Sistemas de Controlo e Aquisição de Dados

Identificação Automática da Coluna



SOQUÍMICA

Sociedade de Representações de Química, Lda.

Rua Coronel Santos Pedroso, 15 • 1500 LISBOA • Tel.: 716 51 60 • Fax: 716 51 69
Sede Social: Av. da Liberdade, 220-2º • 1298 LISBOA CODEX
Rua 5 de Outubro, 269 • 4100 PORTO • Tels.: 609 30 69 • Fax: 600 08 34

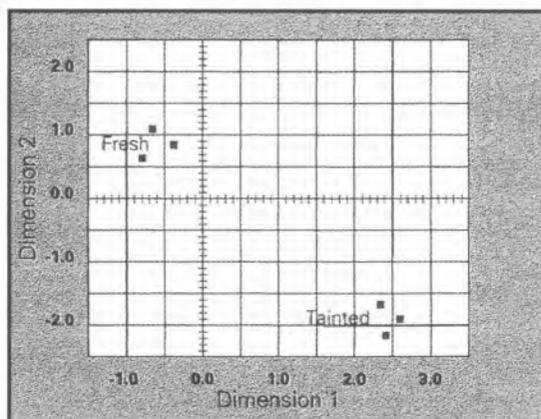
Consegue cheirar a diferença?

AromaScan, Sim!

Ambos parecem frescos.
Mas serão realmente?
Pela aparência e pelo gosto
não os conseguirá distinguir.
mas o AromaScan, sim!
E depressa.

Desde a selecção de matérias primas
e desenvolvimento de novos produtos até
ao controlo de fabrico "on-line" e controlo
de qualidade do produto final, a tecnologia
única da AromaScan, ajudá-lo-á a classificar,
identificar, discriminar entre aromas simples
ou complexos.

AromaScan provou o seu valor em laboratórios
alimentares e linhas de processo à volta do
mundo, reduzindo perdas, optimizando a
produtividade e ajudando o controlo de
qualidade.



*Gráfico AromaScan a 2 dimensões
a partir da informação multidimensional
de aromas, permite tomar decisões de
forma rápida e simples.*

Como líder mundial no desenho, desenvolvimento
e fabricação de sistemas sensoriais que copiam
o nariz humano, AromaScan poderá ajudá-lo a
reconhecer a diferença.

Deixe que lhe provemos.

Contacte já o distribuidor exclusivo em Portugal:



DIAS DE SOUSA LDA

Praceta Aníbal Faustino, nº 6 B
Quinta da Piedade, 2625 Póvoa de Sta. Iria
T: (01) 9592316 / 9594462 / 9594615 / 9592409
Fax: (01) 9500813 / 9564995