

Cromatografia

JOÃO COSTA PESSOA*

1 - INTRODUÇÃO

Os métodos de separação constituem normalmente uma parte importante das análises e a "cromatografia" é sem dúvida a técnica separativa mais importante em Química Analítica, sendo os cromatógrafos instrumentos indispensáveis nos laboratórios de Química Analítica modernos. Neste texto pretende-se apenas apresentar uma introdução muito geral ao método.

Quem primeiro usou a designação cromatografia foi o botânico russo M. Tswett [1,2], que a utilizou para descrever a separação de pigmentos corados de plantas com uma coluna de vidro contendo CaCO_3 . Os diversos compostos apareciam como bandas coradas na coluna e daí a escolha do nome do método (do grego: cor - chroma e escever - graphein).

Tswett escolheu o nome de cromatograma para designar a série de bandas que se formavam na coluna de cromatografia quando realizou a separação de pigmentos de folhas.



Figura 1 — Cromatograma segundo a definição de Tswett

Na mesma época outros investigadores, em trabalhos independentes, estabeleceram técnicas experimentais semelhantes à proposta por Tswett, mas foi só depois de 1940 que a cromatografia teve um desenvolvimento espectacular devido aos trabalhos de Martin e Synge [3], que introduziram uma técnica que hoje é conhecida como cromatografia líquido-líquido. Estes autores deram também uma contribuição importante para a compreensão dos métodos cro-

matográficos, comparando-os com as separações por extracção em contra-corrente e introduzindo a "teoria dos pratos" (ver adiante).

Como alternativa à teoria dos pratos apareceram mais tarde as "teorias de velocidade" (ver adiante) e um dos trabalhos que teve mais impacto foi o de Deemter, Zuiderweg e Klinkenberg [4].

O desenvolvimento da cromatografia em papel teve origem nos trabalhos de Martin colaboradores [5] e devido à sua grande simplicidade esta técnica teve rapidamente um grande desenvolvimento para a análise de produtos orgânicos e inorgânicos. Os trabalhos de Ismailov e Shraiber [6] conduziram ao desenvolvimento das técnicas de cromatografia executadas em camadas de adsorvente — cromatografia em camada fina, que em muitas separações apresentam diversas vantagens em relação à cromatografia em papel. A cromatografia em camada fina desenvolveu-se especialmente depois dos trabalhos de Stahl [7,8], que utilizou com sucesso camadas finas de adsorvente.

A cromatografia de permuta iónica passou a ser uma técnica importante depois de ter sido utilizada com êxito na separação de terras raras [9,10], isolamento de elementos transurânicos [11,12] e na separação de aminoácidos [13,14]. Em 1975 esta técnica ganhou novo impulso com a introdução pela DIONEX de novas concepções para os sistemas de detecção.

Em 1959 surgiu a cromatografia de exclusão molecular. Esta técnica tem sido aplicada em bioquímica e biotecnologia (ex. separação de proteínas e polisacarídeos) e em estudos de polímeros.

Em 1952 Martin e James aplicaram a cromatografia na separação de gases — cromatografia em fase gasosa ou cromatografia gasosa. Hoje pode dizer-se que esta técnica é, em geral, a mais adequada para separação e doseamento de substâncias gasosas ou voláteis.

A cromatografia com fluidos supercríticos (SFC) foi utilizada pela primeira vez em 1962 por Klesper, Corwin e Turner [17] para a separação de porfirinas de níquel. O primeiro aparelho comercial só surgiu em 1981 e desde então o número de aplicações tem cres-

cido enormemente.

É difícil definir com rigor o que se entende por cromatografia dada a grande variedade de sistemas e técnicas que têm sido aplicadas. No entanto todos os métodos envolvem uma fase estacionária e uma fase móvel. Os componentes da mistura a separar são deslocados ao longo da fase estacionária pelo caudal da fase móvel e a separação resulta das diferentes velocidades de migração (migração diferencial) dos diversos componentes da amostra. Alternativamente pode dizer-se que os vários componentes da amostra são retardados na sua passagem, na proporção das suas interações com a fase estacionária.

A fase estacionária pode ser um líquido ou um sólido. Se for um líquido pode estar depositada sobre partículas de um suporte sólido inerte e ser manuseada como se se tratasse de um sólido. Nas "colunas abertas" utilizadas frequentemente em cromatografia gasosa ou com fluidos supercríticos, a fase estacionária "líquida" é depositada sobre as paredes internas da coluna, podendo ou não existir um suporte sólido intermédio. Resumindo, podem considerar-se as seguintes configurações para uma fase estacionária em cromatografia:

1 — partículas de um sólido com ou sem fase "líquida" a recobri-las enchem o interior de uma coluna,

2 — partículas de um sólido também com ou sem fase "líquida" a recobri-las, estão depositadas sobre uma placa de vidro ou de outro material adequado. É o caso da cromatografia em camada fina,

3 — fibras de um polímero com uma fase "líquida" a recobri-lo, constituindo um leito aberto. É o caso da cromatografia em papel, em que este polímero é constituído por fibras de celulose e a fase estacionária é água adsorvida a essas fibras.

4 — uma fase "líquida" está depositada sobre a parede interna de um tubo aberto. É o caso das colunas capilares utilizadas com frequência em cromatografia gasosa.

A fase estacionária "líquida" pode estar ligada a um suporte sólido por forças de adsorção física ou por ligações covalentes. Conforme a natureza destas

fases, estas podem ter características semelhantes às de um líquido ou não. Em alguns casos tem-se simplesmente um grupo funcional mais ou menos complexo ligado a um suporte sólido por uma ligação covalente.

A cromatografia em papel e em camada fina, em que o processo cromatográfico se desenrola numa câmara fechada em que a fase estacionária e a móvel contactam com a "atmosfera", constituem técnicas que é costume designar por "leito aberto". As restantes técnicas cromatográficas desenrolam-se em colunas que constituem sistemas fechados que contêm as fases estacionária e móvel.

2 - CONSTITUIÇÃO DE UMA COLUNA CROMATOGRÁFICA

Uma coluna cromatográfica de enchimento (fig. 2) é constituída de um modo geral por um tubo de material quimicamente inerte (vidro, aço inoxidável, resina epoxi, etc.), na qual foram introduzidas partículas de um sólido finamente dividido. Uma placa filtrante situada na extremidade inferior da coluna, não deixa estas partículas sair e considera-se que estas ocupam posições fixas na coluna.

Dentro do possível as partículas do enchimento estão dispostas de uma maneira uniforme e deixando um mínimo de espaços vazios entre elas. Estas partículas podem ser de forma esférica ou irregular e podem ser porosas ou não.

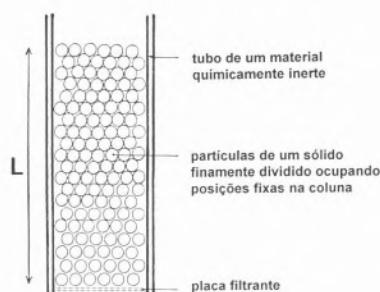


Figura 2 — Representação esquemática de uma coluna cromatográfica de enchimento. A fase móvel ocupa os espaços intersticiais entre as partículas

Numa outra configuração de colunas cromatográficas, a fase estacionária recobre as paredes internas de um tubo de diâmetro relativamente pequeno 0.10-0.35 mm, não havendo neste caso um enchimento; é o caso, já referido, das colunas abertas.

3 - CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

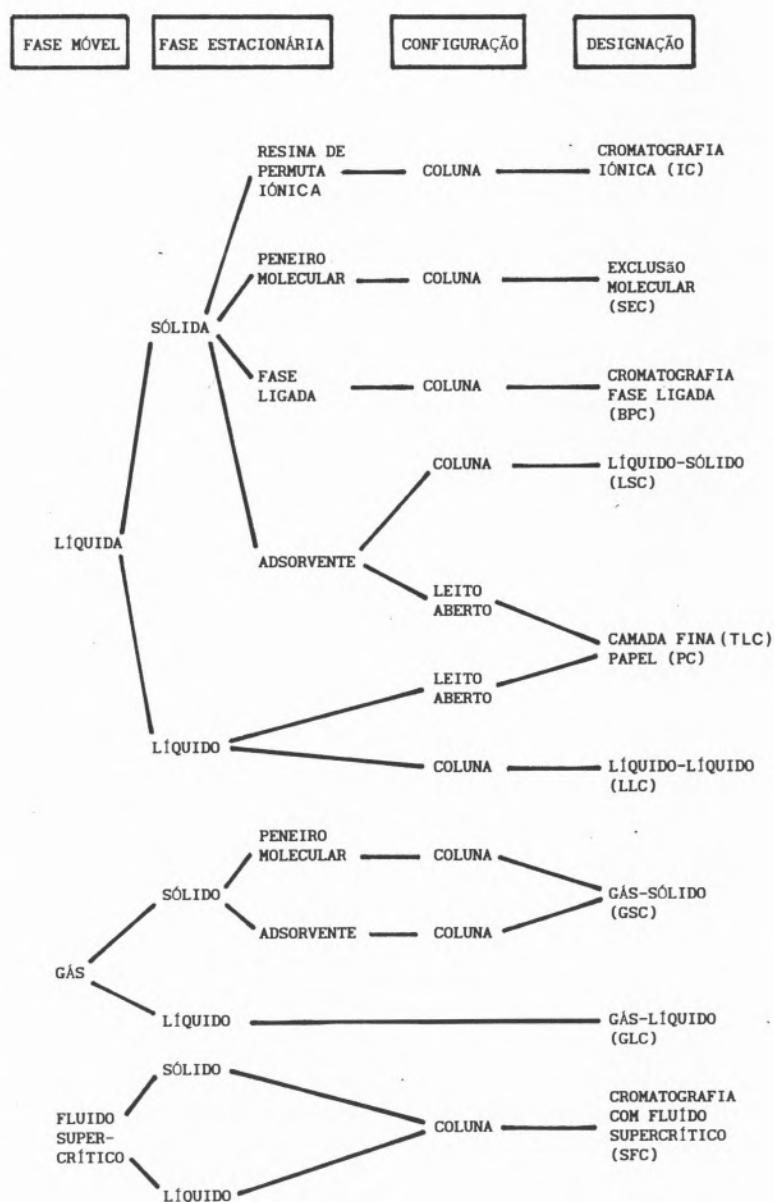
Há diversas maneiras de classificar os métodos cromatográficos, por exemplo:

- (i) — com base na natureza da fase móvel e estacionária,
- (ii) — com base na natureza das interações moleculares envolvidas no

mecanismo de separação,

Na fig. 3 esquematiza-se uma classificação das técnicas cromatográficas quanto à natureza da fase móvel e estacionária.

Na tabela 1 esquematiza-se como se podem classificar os métodos cromatográficos relativamente ao tipo de mecanismo de separação que é predominante.



No desenvolvimento por eluição, uma pequena quantidade de amostra (que corresponde a uma pequena percentagem da capacidade da fase estacionária) é introduzida no topo da coluna (ver. fig. 4). No caso da cromatografia líquida, a fase móvel — eluente — é um solvente (ou mistura de solventes), que é feito passar continuamente através da fase estacionária e que tem menor afinidade por esta que qualquer dos componentes da amostra. A zona contendo a amostra será assim obrigada a deslocar-se ao mesmo tempo que se vai verificando um equilíbrio de distribuição dos vários solutos entre a fase móvel e a fase estacionária.

Os componentes da amostra movem-se ao longo da coluna a uma velocidade que é determinada pelas suas interações com a fase estacionária e fase móvel. Os componentes são eluídos pela ordem da sua afinidade pela fase estacionária, e a sua velocidade de migração é menor que a do eluente.

Se se representarem graficamente as concentrações de soluto à saída da coluna, as quais podem ser medidas utilizando um detector adequado, pode-se obter uma variação do tipo da que se representa na figura 5. Este tipo de representação corresponde a uma generalização do conceito de cromatograma, que aliás é um dos mais vulgarmente utilizados. Admitindo que durante o ensaio cromatográfico o caudal de eluente se mantém constante, há uma proporcionalidade directa entre volumes escoados e tempos de escoamento, pelo que a representação gráfica da concentração de soluto à saída da coluna em função do tempo de ensaio ou do volume de efluente da coluna são semelhantes.

Alternativamente, se se representarem as concentrações de soluto em função do comprimento da coluna (antes de os componentes saírem), pode-se obter uma representação gráfica do tipo que se apresenta na figura 6.

Em cromatografia pode haver vantagem em mudar o eluente um certo tempo depois do início da eluição. Os eluentes são então escolhidos de maneira a terem um poder de eluição crescente, ou seja, uma maior afinidade da fase móvel pelos componentes que ainda estão retidos (ou pela fase estacionária),

Tabela 1 - Classificação dos métodos cromatográficos de acordo com o tipo de mecanismo de separação predominante.

Mecanismo de retenção	Natureza da fase móvel	Técnica	Designação do método
CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO			
Os solutos ou estão adsorvidos fisicamente nos 'locais activos' de um adsorvente sólido ou estão na fase móvel	GÁS	Coluna	Cromatografia gás-sólido (GC ou GSC)
		LÍQUIDO	Leito aberto
	Coluna		Cromatografia líquido-sólido (LSC e HPLC)
	FLUIDO SUPERCRÍTICO	Coluna	Cromatografia com fluidos supercríticos (SFC)
CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO			
Os solutos ou estão dissolvidos na fase estacionária líquida ou estão na fase móvel	GÁS	Coluna	Cromatografia gás-líquido (GC ou GLC)
		LÍQUIDO	Coluna
	Leito aberto		Cromatografia em camada fina (TLC)
CROMATOGRAFIA EM FASE LIGADA			
Os solutos ou estão 'dissolvidos' numa fase estacionária ligada quimicamente a um suporte sólido inerte ou estão na fase móvel	GÁS	Coluna	Cromatografia gasosa (GC)
		LÍQUIDO	Coluna
	Leito aberto		Cromatografia em camada fina (TLC)
	FLUIDO SUPERCRÍTICO	Coluna	Cromatografia com fluidos supercríticos (SFC)
CROMATOGRAFIA DE PERMUTA IÓNICA			
Os solutos iónicos ou estão ligados a grupos de carga oposta ligados de forma fixa a um suporte sólido ou estão dissolvidos na fase móvel	LÍQUIDO	Coluna	Cromatografia de permuta iónica (IEC e IC)
		Leito aberto	Cromatografia em camada fina (TLC)
			Cromatografia em papel (PC)
CROMATOGRAFIA* DE EXCLUSÃO			
Moléculas que penetram nos poros da fase estacionária atrasam o seu movimento relativamente a outras que permanecem fora dos poros. A separação dá-se por dimensões das moléculas dos solutos	GÁS	Coluna	Cromatografia gasosa (GSC)
	LÍQUIDO	Coluna	Cromatografia de exclusão (EC)
CROMATOGRAFIA* DE AFINIDADE			
Retenção dos solutos por interacções específicas com uma fase estacionária especialmente escolhida para os solutos a reter	LÍQUIDO	Coluna	Cromatografia de afinidade (AC)

* Tratam-se de processos separativos com características gerais distintas dos anteriores. Na cromatografia de exclusão não é suposto haver interacções quícas dos solutos com a fase estacionária. Na cromatografia de afinidade cada fase estacionária é apenas adequada para separar um soluto ou um grupo muito restricto de solutos.

Figura 3 — Classificação das técnicas cromatográficas de acordo com a natureza das fases móvel e estacionária

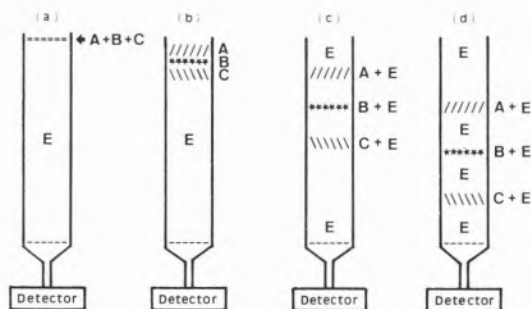


Figura 4 — Desenvolvimento por eluição e formação do cromatograma

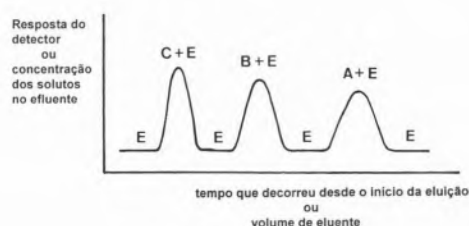


Figura 5 — Cromatograma apresentado como representação gráfica da resposta do detector (que se admite ser proporcional às concentrações dos solutos no efluente) em função do tempo que decorreu desde que a amostra foi introduzida na coluna (ou, o que é equivalente, do volume de efluente gasto desde o início da sua eluição)

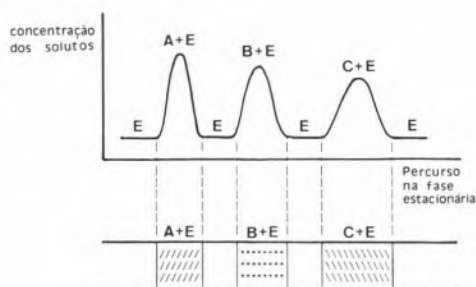


Figura 6 — Cromatograma apresentado como representação gráfica de concentrações de soluto em função da distância percorrida ao longo da coluna. Este tipo de representação pode ser o mais adequado no caso das técnicas cromatográficas em leito aberto: cromatografia em papel e cromatografia em camada fina

promovendo assim o movimento dos solutos ao longo da coluna.

É mais frequente proceder-se a uma mudança gradual na composição do eluente. Isto pode ser essencial para conseguir a separação de solutos com uma ampla variedade de afinidades pela fase estacionária num tempo razoável. Para isso a proporção de mistura de dois ou mais solventes é modificada gradualmente para que se dê um aumento progressivo no poder de eluição da fase móvel.

Em cromatografia gasosa, o gás de arrastamento (que não tem afinidade pela fase estacionária) passa continua-

mente através da coluna, a qual está dentro de um forno aquecido a temperatura adequada. A amostra (gasosa ou um líquido volatilizado) é introduzida no fluxo gasoso e é transportada ao longo da coluna onde se vai processar a separação. Cada um dos componentes da mistura distribui-se entre a fase móvel e a estacionária de acordo com a sua volatilidade e afinidade pela fase estacionária, emergindo da coluna em tempos diferentes. Durante o processo cromatográfico a temperatura do forno pode ser aumentada de maneira a obter-se uma separação num tempo razoável.

4 - TEORIA DA CROMATOGRAFIA POR ELUIÇÃO

4.1 - Introdução

Um dos objectivos importantes de qualquer teoria de cromatografia é prever o que vai suceder aos solutos da amostra a analisar à medida que se vão deslocando ao longo da coluna. Nomeadamente interessa determinar qual a localização e forma dos picos correspondentes aos vários componentes da amostra, ou seja, o respectivo cromatograma. Interessa também prever a eficiência das separações e de que modo essa eficiência pode ser melhorada por modificação das condições experimentais.

Tentemos imaginar o comportamento de uma molécula de soluto numa coluna cromatográfica. Durante o seu movimento, esta molécula vai ter um grande número de transferências entre a fase móvel e a estacionária. A molécula só se desloca ao longo da coluna quando está na fase móvel. O tempo que fica em cada fase depois de uma transferência depende em primeiro lugar da sua afinidade para cada uma das fases. Em segundo lugar depende de acidentalmente ganhar energia cinética suficiente para efectuar a transferência inversa; nestas condições, dada a variedade de tempos de permanência em cada fase, as velocidades a que as moléculas de um mesmo soluto se movem variam consideravelmente. Algumas deslocam-se rapidamente por permanecerem na fase móvel por um tempo relativamente grande; outras podem-se atrasar por ficarem retidas na fase estacionária por um intervalo de tempo maior do que a média. A consequência destes processos individuais de movimento é um alargamento das bandas de cada soluto.

O alargamento de uma banda aumenta à medida que esta se desloca ao longo da coluna. Isto sucede porque decorreu mais tempo para permitir o alargamento da banda e se terem dado um maior número de transferências. Identicamente solutos que sejam mais retidos e que, portanto, demorem mais tempo a saírem da coluna, correspondem a bandas mais largas do que os menos retidos e que saíem mais rapidamente da coluna.

Desde que os processos de alargamento das bandas sejam determinados por factores aleatórios, que durante o processo cromatográfico as interações tenham a mesma ordem de grandeza

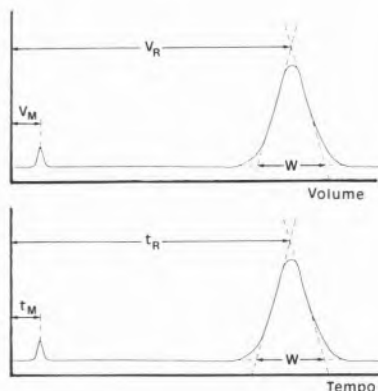


Figura 7 — Cromatograma de uma amostra com um componente para ilustrar as definições de volume e tempo de retenção

para todas as moléculas de um mesmo soluto e que o número de transferências de fase seja suficiente grande, as bandas serão simétricas e terão uma forma gaussiana.

Considerem-se os cromatogramas representados na figura 7, que correspondem a uma amostra contendo apenas um soluto. O volume de eluente necessário para se atingir o máximo de concentração do soluto designa-se por *volume de retenção* — V_R . Se a banda for simétrica, V_R corresponde ao volume total de eluente necessário para eluir metade da quantidade de soluto.

Se o cromatograma corresponder a uma representação de concentrações em função do tempo do ensaio, ou seja, o tempo que decorreu desde a introdução da amostra, define-se de maneira semelhante o *tempo de retenção*, que se representa por t_R (fig. 7).

O tempo de retenção para qualquer componente que não seja retido na coluna será designado por t_M . Já se referiu que o correspondente volume de retenção se designa por volume "morto" (ou volume vazio) e corresponde ao volume ocupado pela fase móvel dentro da coluna (V_M).

4.2 - Distribuição do soluto entre a fase móvel e a estacionária

A separação por cromatografia resulta das diferenças de afinidade dos componentes pela fase móvel e fase estacionária e o volume de retenção (ou o tempo de retenção) de um soluto vai depender do equilíbrio de distribuição desse soluto entre a fase móvel e a estacionária.

Vamos admitir que uma substância solúvel no eluente e representada genericamente por A é introduzida na coluna cromatográfica. Algumas moléculas desta substância poderão ligar-se momentaneamente à fase móvel. Estabelecer-se-á assim um equilíbrio:



Designando por $[A]_S$ a concentração de A na fase estacionária e por $[A]_M$ concentração de A na fase móvel, a constante de equilíbrio — K — que se pode considerar como sendo a constante de distribuição entre a fase estacionária e a móvel, será dada por:

$$K = \frac{[A]_S}{[A]_M}$$

A utilização de uma constante de equilíbrio nas teorias de cromatografia pressupõe que o sistema está em equilíbrio. No entanto, estando a fase móvel em movimento nunca se atinge o equilíbrio químico. Em muitas circunstâncias está-se perto de uma situação de equilíbrio e a utilização de K pode considerar-se aproximadamente válida.

4.3 - Teoria de equilíbrio ou teoria dos pratos

Considera-se que a coluna cromatográfica é constituída por uma sequência de pequenas colunas — os pratos teóricos ou andares teóricos — onde se supõe que se atinge o equilíbrio de distribuição do soluto entre a fase móvel e a estacionária. Cada prato teórico encontra-se em comunicação com o que o precede e com o seguinte. Em cada prato pressupõe-se que se atinge o equilíbrio

de distribuição instantaneamente. Admitindo que a amostra contendo um soluto é introduzida no primeiro prato, uma vez distribuído entre as duas fases, o soluto que ficou na fase móvel desloca-se ao longo da coluna para o prato seguinte, onde se irá dar o equilíbrio de distribuição com uma nova secção de fase estacionária (fig. 8). Como a concentração de soluto na fase móvel no 1º prato diminuiu, parte do que estava na fase estacionária passa para a fase móvel, ou seja, vai-se estabelecer uma nova situação de equilíbrio nesse "prato".

À medida que este processo decorre, ao fim de algum tempo já praticamente não haverá soluto no 1º prato e o máximo de concentração de soluto está num dos pratos subsequentes, isto é, dá-se um movimento efectivo do soluto e um alargamento da zona onde este existe na coluna.

Encarado sob esta perspectiva, o processo cromatográfico corresponde à existência de uma série de passos discretos, cada um deles equivalente a um processo de extracção simples. Sucede que a cromatografia é um fenómeno dinâmico e não uma série de passos estáticos. No entanto, se estes passos ou pratos forem muito pequenos, os processos estáticos e dinâmicos tornam-se praticamente equivalentes.

O comprimento da coluna correspondente a cada um destes "pratos imaginários" ou "pratos teóricos" é designado por altura equivalente a um prato teórico, ou abreviadamente por HETP (do inglês: Height Equivalent to a Theoretical Plate) ou simplesmente por H. Quanto mais pequeno for H mais passos de equilíbrio de distribuição haverá nessa coluna e mais eficiente se considera essa coluna. Na prática isto significa que a coluna deverá ser melhor para separar

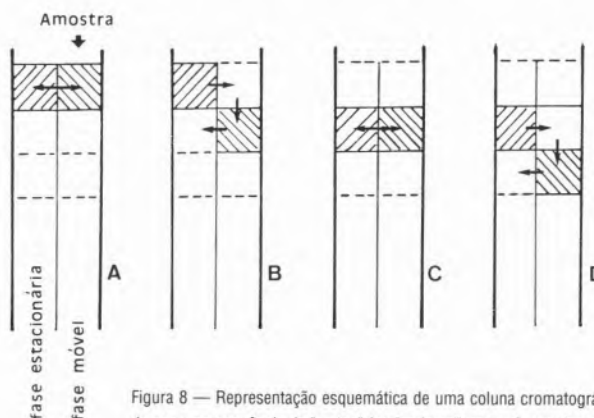


Figura 8 — Representação esquemática de uma coluna cromatográfica constituída por uma sequência de "pratos" (ou "andares") em cada um dos quais se atinge instantaneamente o equilíbrio de distribuição de solutos

os componentes de uma mistura.

Uma coluna cromatográfica de comprimento L pode então considerar-se formada por uma justaposição de um número N de pequenas colunas de secção igual à da coluna cromatográfica e de altura H . Tanto N como H são uma medida da eficiência da coluna e existirá a relação:

$$H = \frac{L}{N}$$

Para que a coluna seja eficiente interessa portanto que o valor de H seja pequeno, ou seja, que o valor de N seja grande.

Note-se que a designação número de pratos teóricos para N é utilizada à semelhança do que é feito na destilação fraccionada.

4.4 - Teorias de velocidade

Embora a teoria dos pratos (teoria de equilíbrio) tenha sido bastante útil na compreensão dos processos cromatográficos e permita visualizar facilmente o conceito de prato teórico, deve notar-se que um "prato teórico" não tem realidade física. Assim, este e o conceito de altura equivalente a um prato teórico devem apenas ser encarados como critérios de eficiência de colunas e é como tal que são encarados nas teorias de velocidade.

A teoria dos pratos permite ter em conta as variáveis que afectam a velocidade de deslocamento de um soluto, mas não é possível utilizá-la para um tratamento teórico dos factores responsáveis pelo alargamento das bandas, nomeadamente a sua relação com os diâmetros das partículas do enchimento, coeficientes de difusão dos solutos ou constantes de distribuição.

Nas teorias de velocidade o processo cromatográfico é considerado como sendo essencialmente dinâmico pelo que o equilíbrio de distribuição do soluto entre as fases móvel e estacionária não é atingido. O alargamento das bandas é devido principalmente a que os diversos processos de transferência de massa que ocorrem quando um soluto se desloca ao longo da fase estacionária se dão a uma velocidade finita e não instantânea.

Sendo o alargamento das bandas um fenómeno inevitável em cromatografia e intimamente ligado ao conceito

de eficiência do sistema cromatográfico, interessa examinar quais os principais factores que originam a dispersão progressiva do soluto ao longo da coluna. Nas teorias de velocidade o fenómeno de alargamento da banda é considerado como resultando da combinação aditiva de todos os processos que para ele contribuem e procura-se quantificar cada um. Uma vez identificados e contabilizados cada um destes factores cinéticos, o alargamento da banda é quantificado através de uma expressão de H (altura equivalente a um prato teórico) em função da velocidade linear da fase móvel.

Nas teorias de velocidade o significado físico de H é diferente do considerado na teoria dos pratos pois é definido em termos da variância por unidade de comprimento da coluna, podendo no entanto mostrar-se que as expressões para N e H da teoria dos pratos também são válidas nas teorias de velocidade.

REFERÊNCIAS

1. M. S. Tswett, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **24** (1906) 316
2. M. S. Tswett, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **24** (1906) 384.
3. A. J. P. Martin e R. L. M. Synge, *Biochem. J.*, **37** (1943), proc. xiii e refs. aí citadas.
4. J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg e A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.*, **5** (1956) 271.
5. R. Consden, A. H. Gordon e A. J. P. Martin, *Biochem. J.*, **38** (1944) 224.
6. Ref. em L. S. Ettre e A. J. Zlatkis (eds.) "75 Years of Chromatography — A Historical Dialog", *J. Chromat. Library*, Vol. 17, Elsevier, Amsterdam, (1979), p. 413-417.
7. E. Stahl, *Pharmazie*, **11** (1956) 633.
8. E. Stahl (ed.), *Thin Layer Chromatography*, Academic Press, New York (1962).
9. F. H. Spedding, A. F. Voight, E. M. Gladrow e N. R. Sleight, *J. Am. Chem. Soc.*, **69** (1947) 2859.
10. E. R. Tompkins e S. W. Mayer, *J. Am. Chem. Soc.*, **69** (1947) 2859.
11. G. T. Seaborg, "The Transuranium Elements", em *Encyclopedia of the Chemical Elements*, Reinhold, New York, (1968) e refs. aí citadas.
12. J. E. Salmon e D. K. Hale, "Ion Exchange, a Laboratory Manual",

Academic Press, New York, (1959) e refs. aí citadas

13. S. Moore e W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **176** (1948) 367.
14. S. Moore e W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **192** (1951) 663.
15. P. Flodin e J. Porath, *Nature*, **183** (1959) 1657.
16. A. T. James e A. J. P. Martin, *Biochem. J.*, **50** (1952) 679.
17. E. Klesper, A. H. Corning e D. A. Turner, *J. Org. Chem.*, **27** (1962) 700.

BIBLIOGRAFIA GERAL

1. R. Stock e C. B. F. Rice, "Chromatographic Methods", Chapman and Hall, London, 3ª Ed., 1974. Livro geral de cromatografia incidindo sobre os vários métodos cromatográficos e suas aplicações.
2. A. Braithwaite e F. J. Smith, "Chromatographic Methods", Chapman and Hall, 4ª Ed., London, 1985. Livro com características semelhantes ao anterior. Sendo mais recente incide menos sobre os fundamentos das técnicas.
3. J. M. Miller, "Chromatography: Concepts and Contrasts", John Wiley & Sons, New York, 1988. Bom livro para cromatografia gasosa, líquida e em camada fina.
4. J. Willett, "Gas Chromatography", ed. ACOL, John Wiley & Sons, Chichester, 1987. Livro de cromatografia gasosa relativamente elementar.
5. S. Lindsay, "High Performance Liquid Chromatography", ed. ACOL, John Wiley & Sons, Chichester, 1987. Livro de cromatografia líquida relativamente elementar.
6. "Supercritical Fluid Chromatography", ed. por R. M. Smith, RSC Chromatography Monographs, Royal Society of Chemistry, London, 1988. Bom livro para cromatografia com fluidos supercríticos mas de nível evoluído.

* Departamento de Engenharia Química, IST