



NOVA SCHOOL OF
SCIENCE & TECHNOLOGY

DEPARTAMENTO
DE QUÍMICA

DEPARTMENT
OF CHEMISTRY

TÉCNICAS DE LABORATÓRIO 2021/2022

Licenciatura em Bioquímica
Licenciatura em Química Aplicada
Mestrado Integrado em Engenharia Química e Bioquímica

Cristalização

método de purificação de sólidos

Procedimento

1. dissolver o sólido a cristalizar no solvente a quente
2. arrefecer a solução lentamente

se o arrefecimento for lento dá-se a cristalização
se o arrefecimento for rápido dá-se a precipitação

3. filtrar o sólido (a solução depois da filtração denomina-se por “águas mães”)

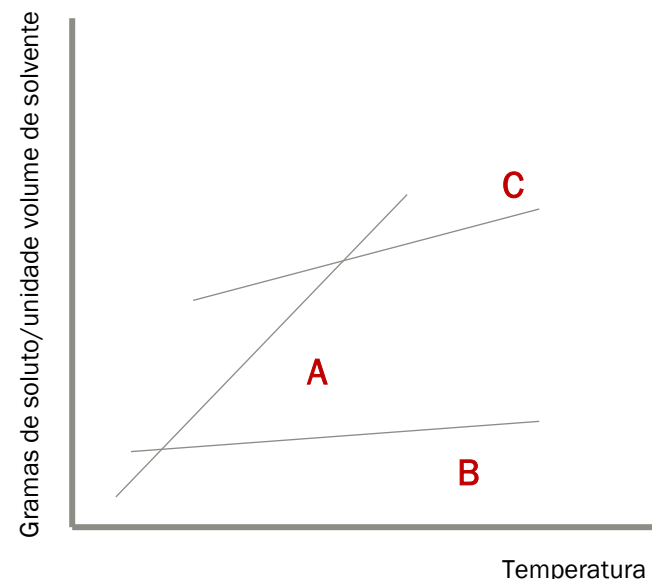


Bom solvente de cristalização

não deve dissolver produto a cristalizar a frio
deve ter elevada solubilidade a quente

A - solvente ideal de cristalização
B e **C** - maus solventes de cristalização

As solubilidades a quente e a frio têm que ser muito diferentes

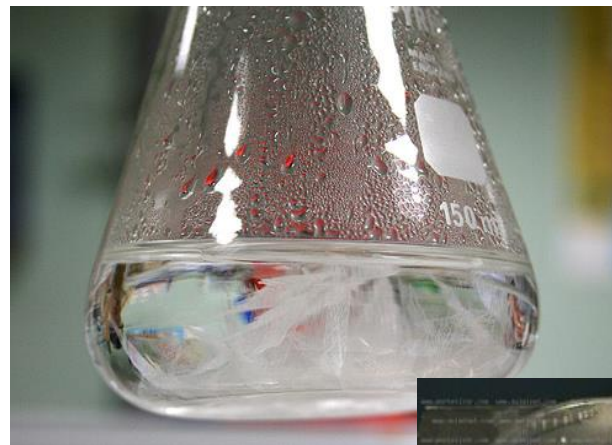


As impurezas devem dissolver-se bem tanto a frio como a quente.

Cristalização

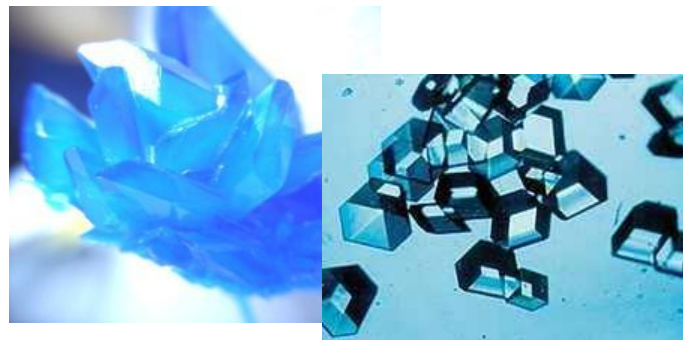
Este método de purificação é eficiente se a quantidade de impurezas for reduzida.

Como caso extremo temos que uma mistura de dois compostos em quantidades aproximadamente iguais e com solubilidades idênticas não se conseguem purificar por cristalização.



Se a cristalização não produz pureza suficiente procede-se a segunda cristalização do sólido – recristalização

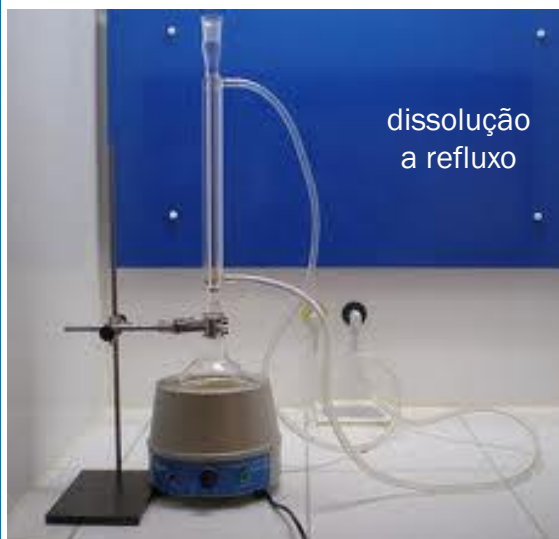
sólido mais puro
menor rendimento



Cristalização

Procedimento

1. dissolver o sólido no solvente seleccionado anteriormente
2. não utilizar quantidades exageradas de solvente que vão dificultar a pp
3. não utilizar quantidades reduzidas de solvente que facilitam a pp das impurezas
4. de preferência fazer a cristalização em balão com refrigerante
5. deixar arrefecer lentamente para a formação de bons cristais
6. filtrar em buchner (filtração a vácuo)



arrefecimento



filtração



Cristalização com filtração a quente

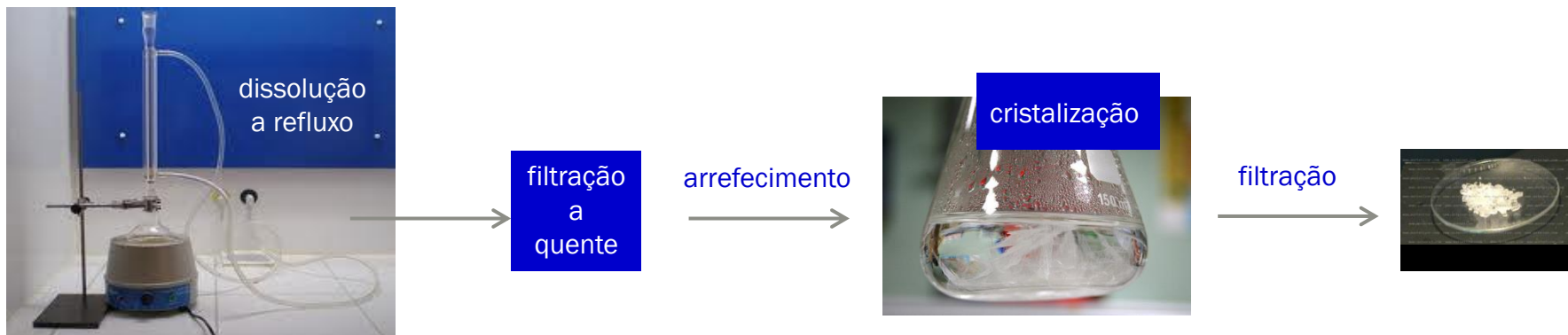
Este método utiliza-se quando se querem separar impurezas sólidas antes que se inicie a cristalização do sólido

1. quando existem impurezas não solúveis a quente

filtra-se a solução a quente em material aquecido (filtração gravítica)
a solução límpida é arrefecida lentamente para se dar a cristalização

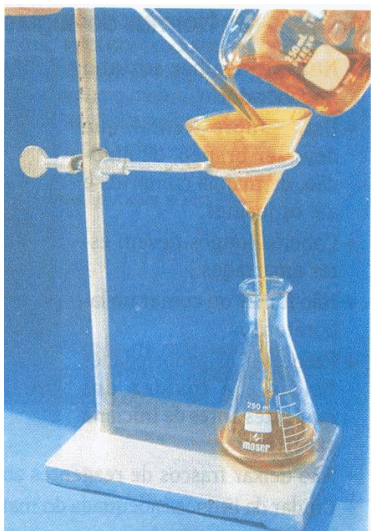
2. quando se utiliza um meio de adsorção de impurezas coradas

adiciona-se o solvente ao sólido
adiciona-se o adsorvente de impurezas sólidas (p.e., carvão activado)
leva-se à ebulição para dissolução completa do composto
filtra-se a solução a quente em material aquecido
a solução límpida é arrefecida lentamente para se dar a cristalização



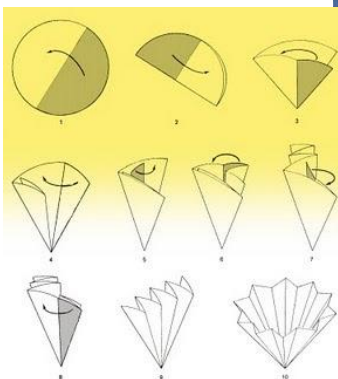
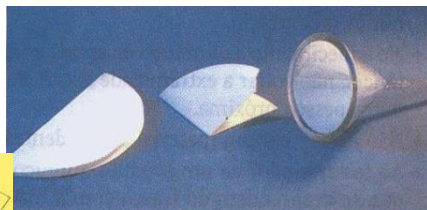
Filtração

simples



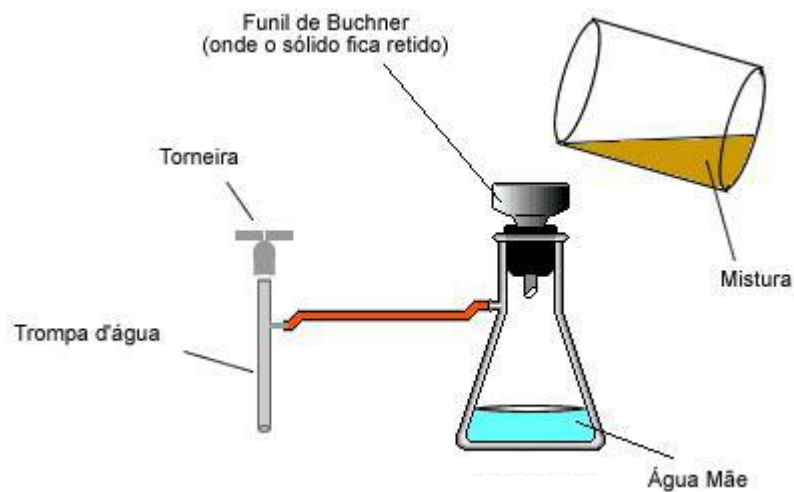
gravítica

filtro simples



filtro de pregas

filtração a vácuo



papéis de filtro



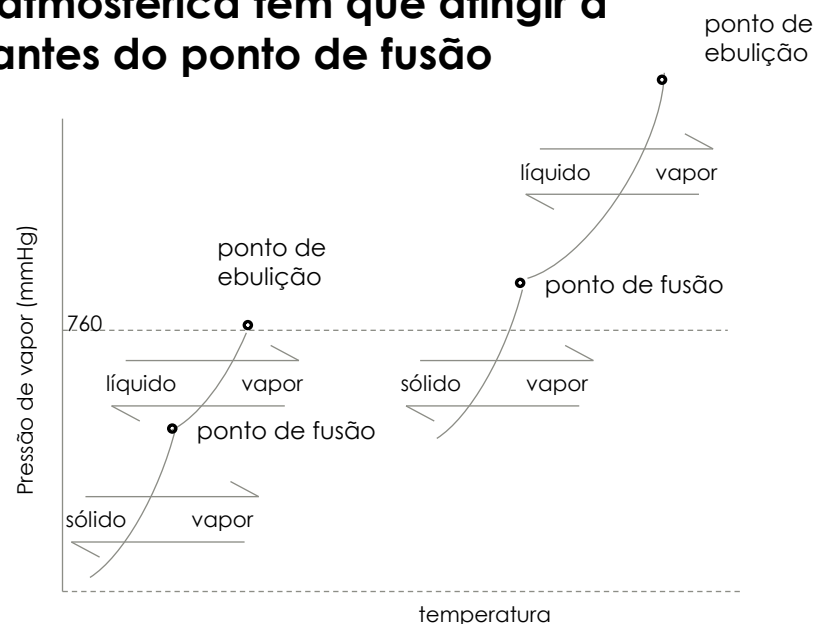
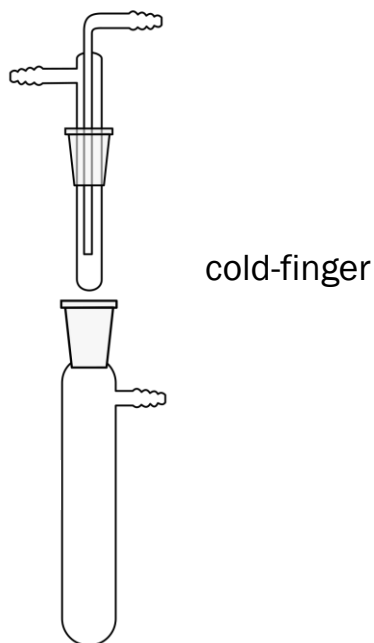
Sublimação

A pressão de vapor de um sólido varia com a temperatura
Os sólidos podem passar directamente para o estado de vapor sem passar pelo estado líquido

O ciclo de vaporização – condensação do sólido é utilizado como método de purificação

Método de purificação eficiente nos casos em que as impurezas tenham pressão de vapor muito inferior ao do sólido a purificar

Para que um sólido sublime à pressão atmosférica tem que atingir a pressão de vapor de 760 mmHg antes do ponto de fusão



Sublimação

Os sólidos que sublimam são relativamente pouco polares e de elevada simetria

i.e., baixo momento dipolar

fracas forças intermoleculares

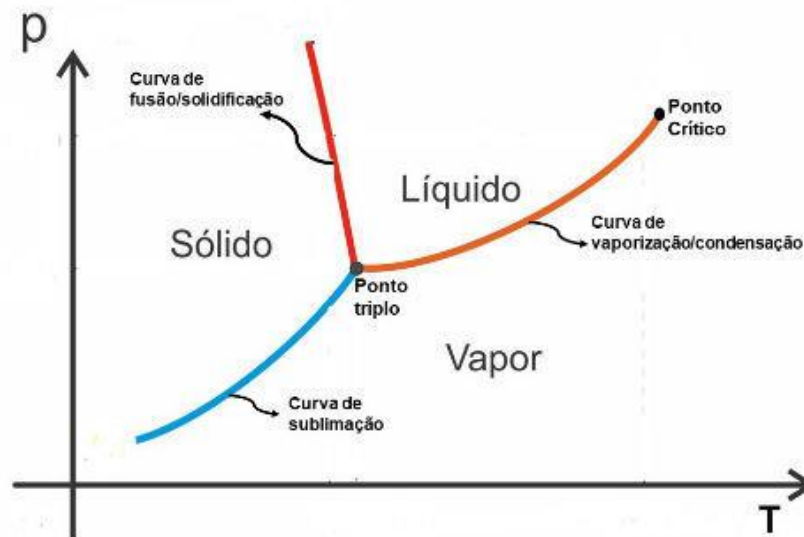
elevada pressão de vapor – facilidade de libertação de moléculas do sólido

Ponto de sublimação

temperatura à qual a pressão de vapor de um sólido iguala a pressão aplicada

Vantagens da sublimação

1. não necessita de solvente
2. libertação de solvente incluso no sólido de partida – sólido sublimado anidro
3. processo mais rápido que a cristalização
4. processo eficiente na separação de sólidos em que um é um sal



Sublimação

Equipamento para sublimação

1. cold-finger
2. forno de sublimação



forno de sublimação



cold-finger



cristais purificados
por sublimação

Purificação de líquidos

destilação

Destilação

é a técnica utilizada para:

remover um solvente,

purificar um líquido,

separar os componentes de uma mistura de líquidos miscíveis

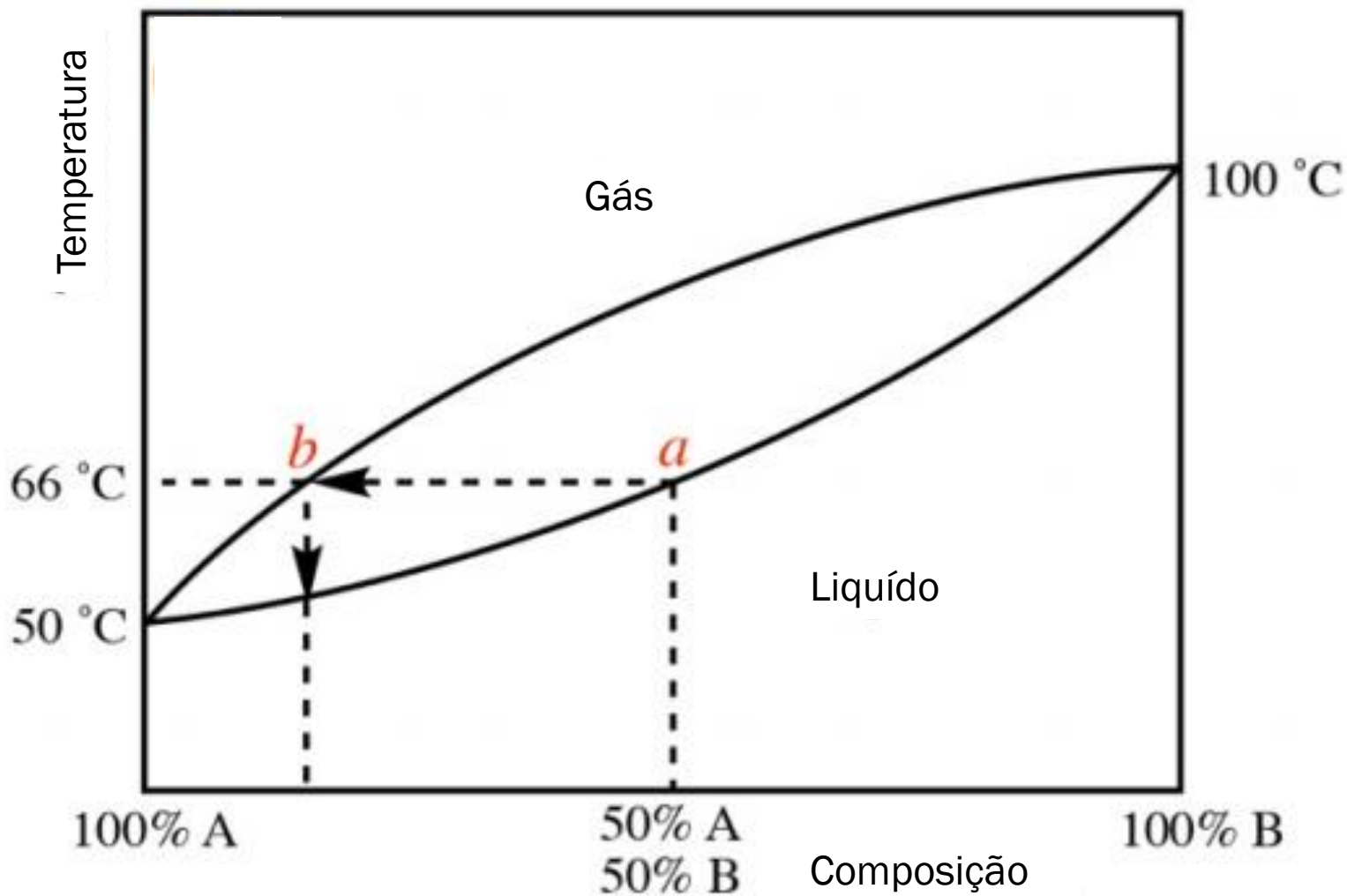
Os tipos mais comuns de destilação

destilação simples, destilação fracionada, destilação a pressão reduzida, destilação por arrastamento de vapor e destilação azeotrópica

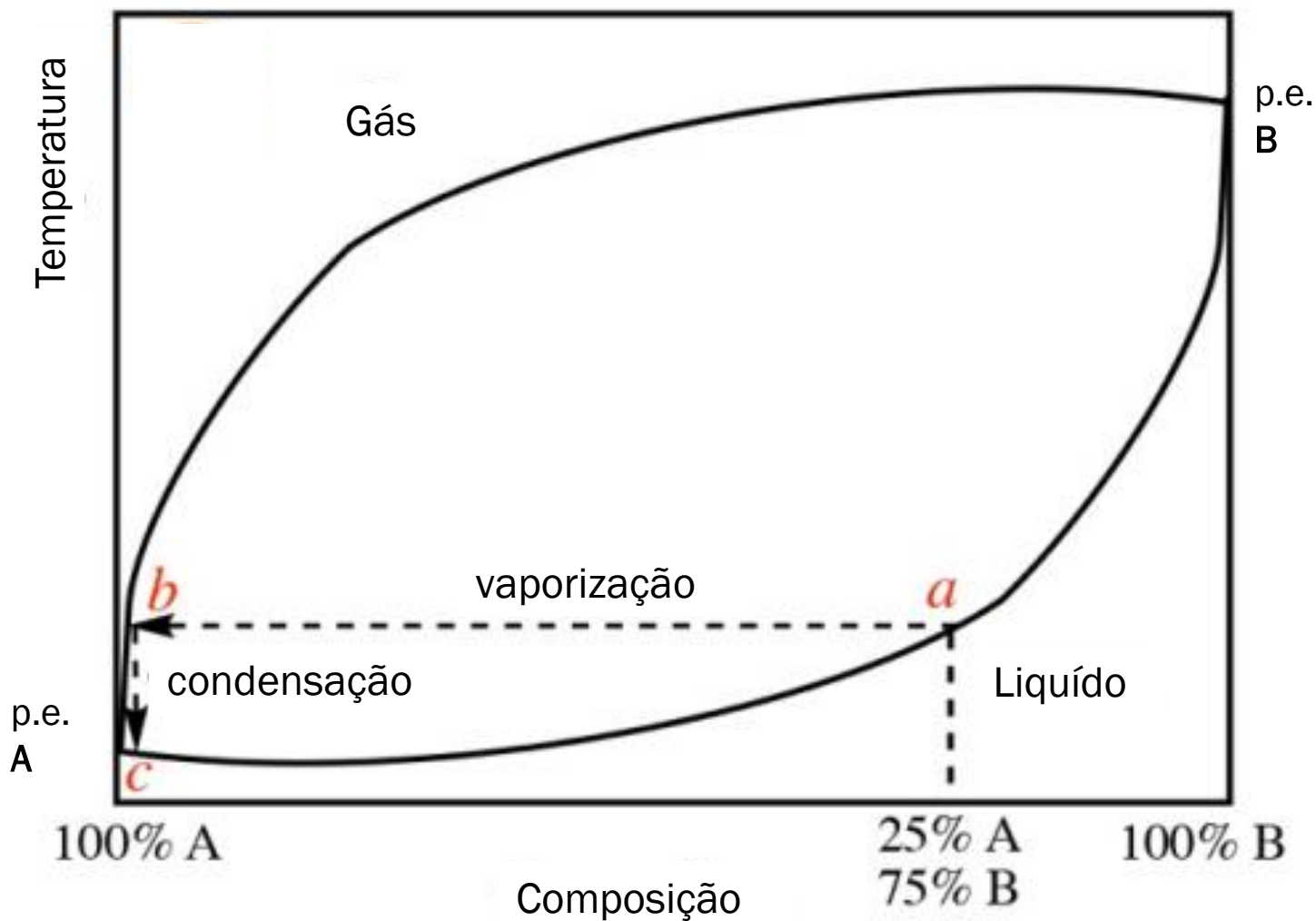
Propriedade física fundamental

ponto de ebulição do líquido - temperatura à qual a pressão de vapor do composto iguala a pressão exterior

destilação



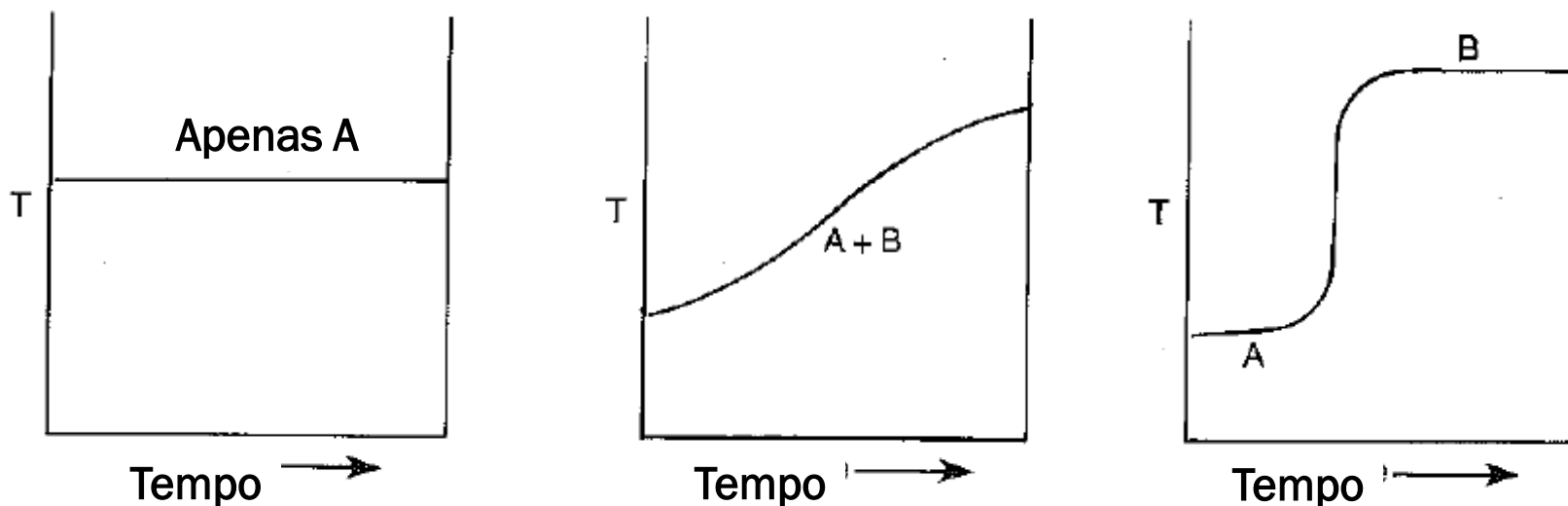
destilação



Purificação de líquidos

destilação

Comportamento de líquidos A e B durante uma destilação



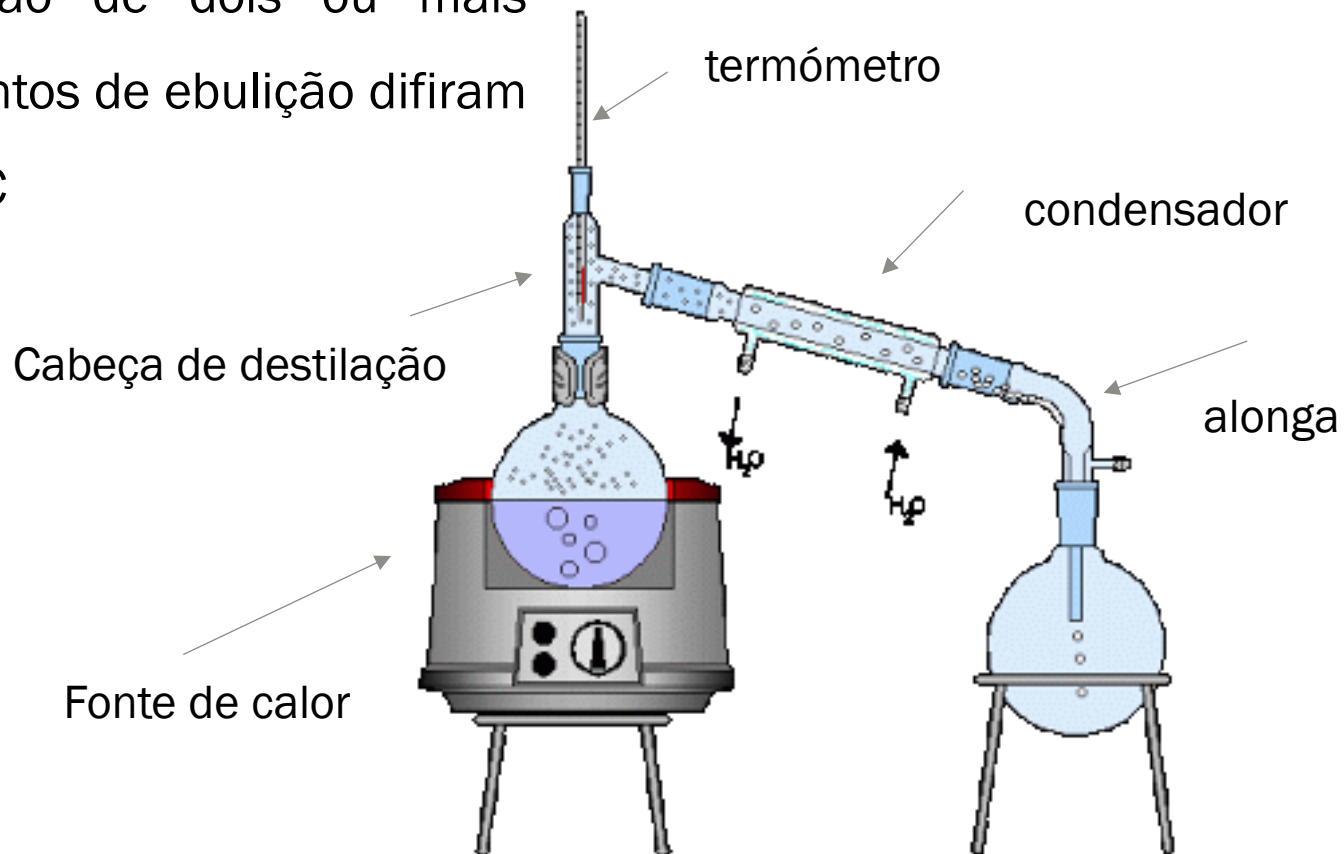
Apenas a primeira e a terceira situação permitem boas destilações

Para a separação de líquidos de uma mistura - com líquidos de pontos de ebulição muito próximos, o destilado será uma mistura destes líquidos com composição e ponto de ebulição variáveis, contendo um excesso do componente mais volátil (menor ponto de ebulição).

destilação

Destilação simples

para a separação de dois ou mais líquidos cujos pontos de ebulição difiram em mais de 80 °C



destilação

Destilação fracionada

para a separação de dois ou mais líquidos cujos pontos de ebulição difiram menos de 80 °C

A montagem de destilação é muito semelhante à destilação simples, mas inclui uma coluna de fracionamento.

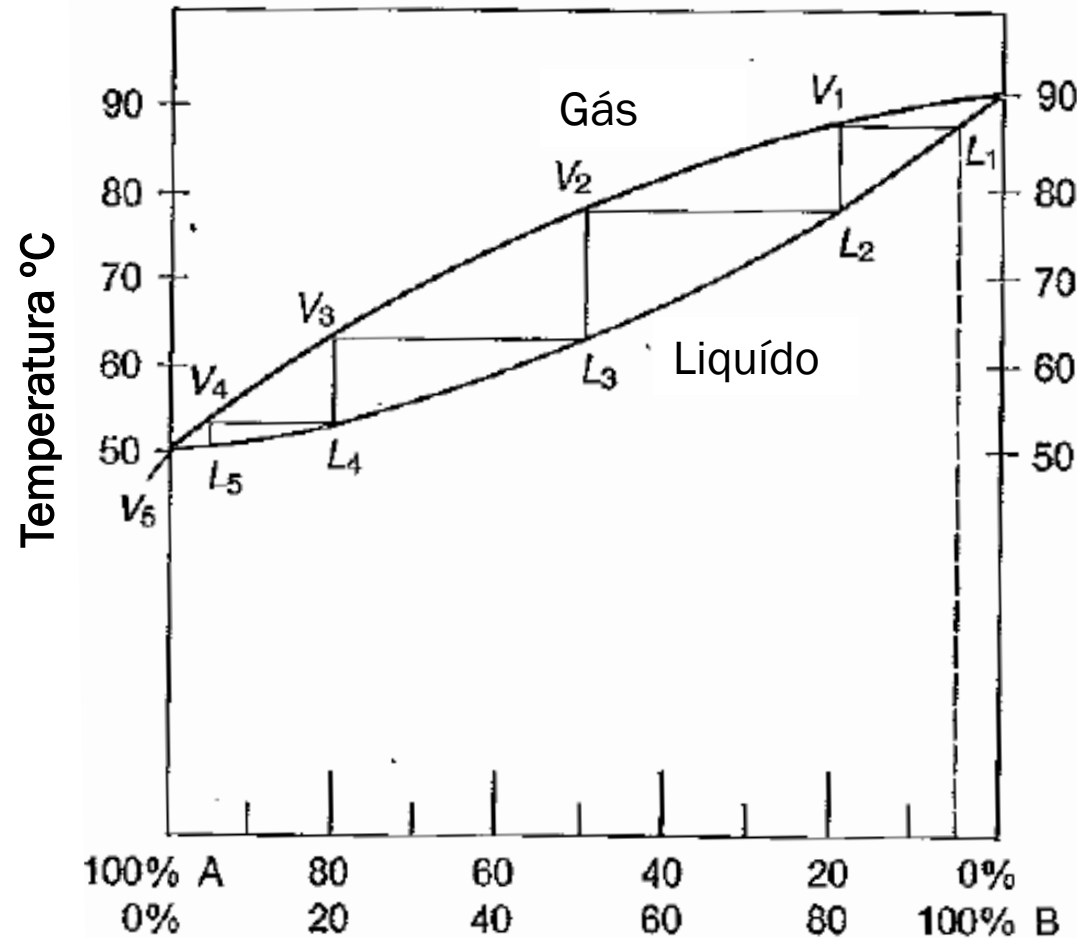
É um tubo longo vertical com enchimento através do qual o vapor ascendente é parcialmente condensado

O condensado escorre ao longo da coluna e retorna ao balão

Dentro da coluna, porém, o líquido que escorre contacta directamente com o vapor ascendente e ocorre uma permuta de calor, na qual o vapor é enriquecido com o componente mais volátil

destilação

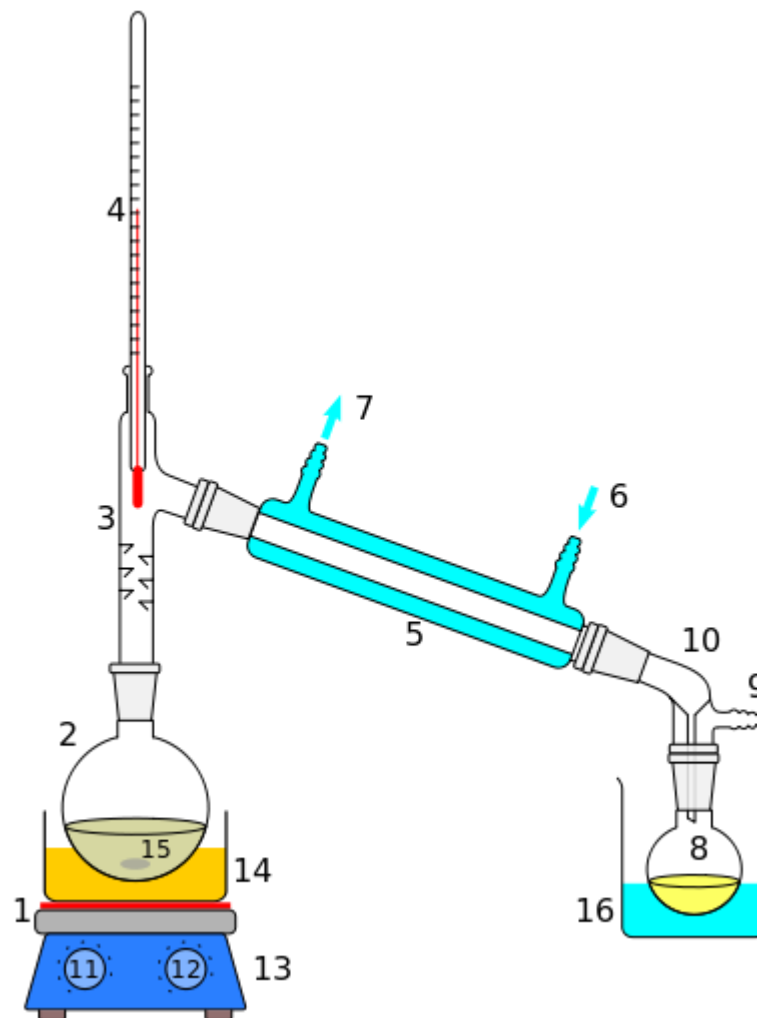
Destilação fracionada



destilação

Destilação fracionada

Uma coluna de fracionamento é desenhada para fornecer uma série contínua de condensações parciais de vapor e vaporizações parciais do condensado e o seu efeito é realmente comparável a várias destilações simples separadas



destilação

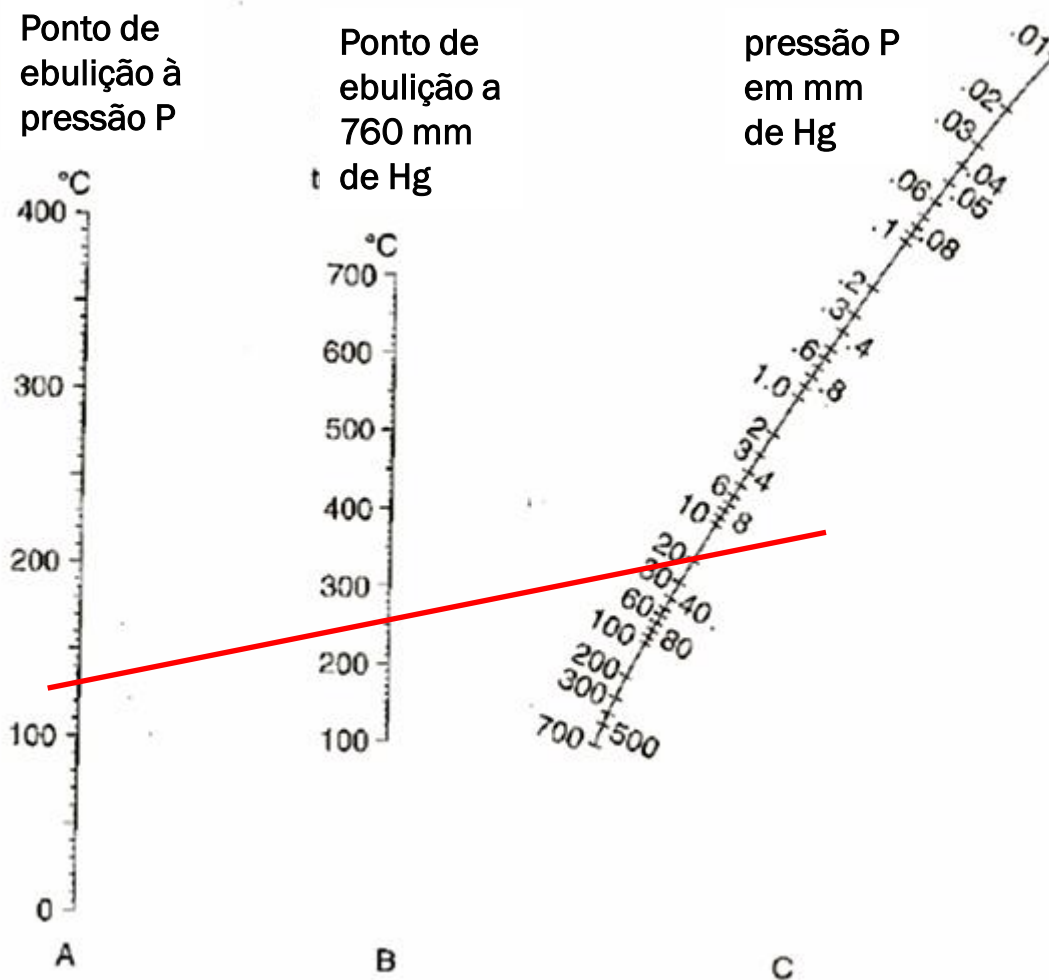
Destilação pressão reduzida

É utilizada quando os líquidos a serem destilados possuem altos pontos de ebulição atmosférica ou se alteram quimicamente a temperaturas próximas aos seus pontos de ebulição atmosféricos. Os compostos sensíveis à temperatura também requerem destilação a vácuo para remover solventes da mistura sem danificar o produto.

A segurança é um aspeto importante ao usar o material de vidro **Todos os componentes de vidro devem ser cuidadosamente examinados para arranhões e rachaduras que podem resultar em implosões quando o vácuo é aplicado.**

destilação

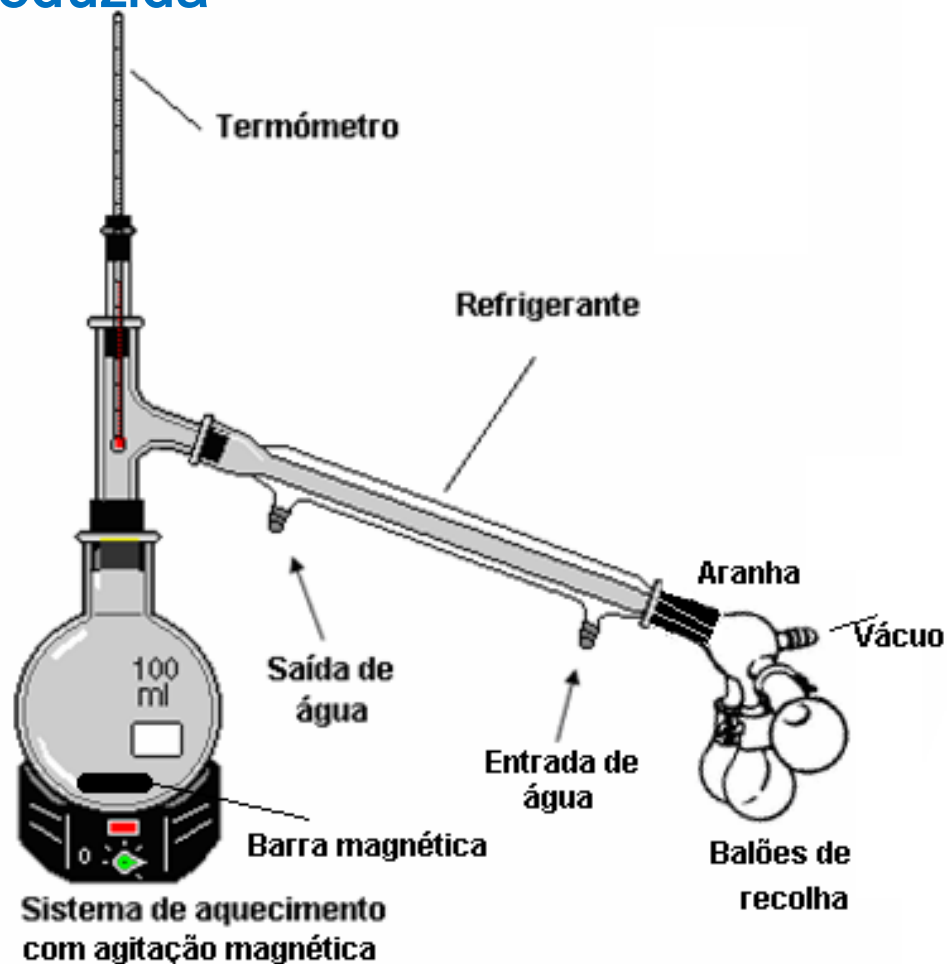
Destilação pressão reduzida



Purificação de líquidos

destilação

Destilação pressão reduzida



Purificação de líquidos

destilação

Destilação pressão reduzida



Evaporador rotativo

destilação

Destilação por arrastamento de vapor

Para destilar líquidos imiscíveis em que um deles é água

A mistura de dois líquidos imiscíveis entra em ebulição a uma temperatura inferior às dos pontos de ebulição dos componentes quando puros

A vantagem desta técnica consiste na destilação do material desejado a uma temperatura inferior a 100 °C

As substâncias instáveis, ou com ponto de ebulição muito elevado, podem ser separadas evitando a decomposição na destilação

Como todos os gases são miscíveis as duas substâncias podem misturar-se no estado de vapor e co-destilar

Por arrefecimento após a condensação do destilado o componente desejado, que é imiscível com a água, separa-se formando-se duas fases

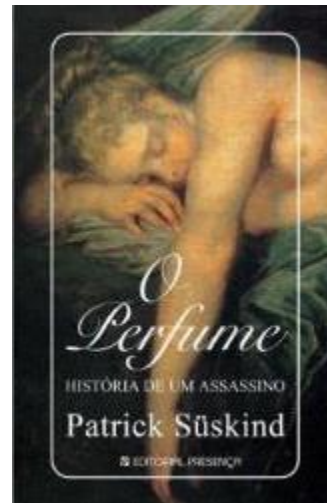
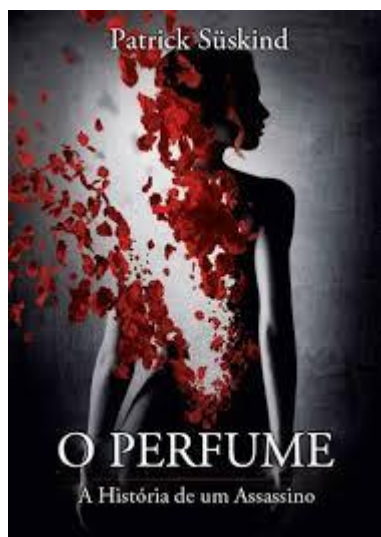
destilação

Destilação por arrastamento de vapor

É uma destilação de misturas imiscíveis, ou seja, que não se dissolvem na água devido a serem substâncias

apolares como compostos orgânicos e a água em forma de vapor.

Os componentes de uma mistura imiscível "fervem" a temperaturas menores do que os pontos de ebulição dos componentes individuais. Assim, uma mistura de compostos de alto ponto de ebulição e água pode ser destilada a uma temperatura menor que 100°C , que é o ponto de ebulição da água



Livro 1985

Filme 2006

A destilação por arrastamento de vapor é muito utilizada no isolamento de líquidos a partir de fontes naturais (ex. óleos e aromas essenciais)

destilação

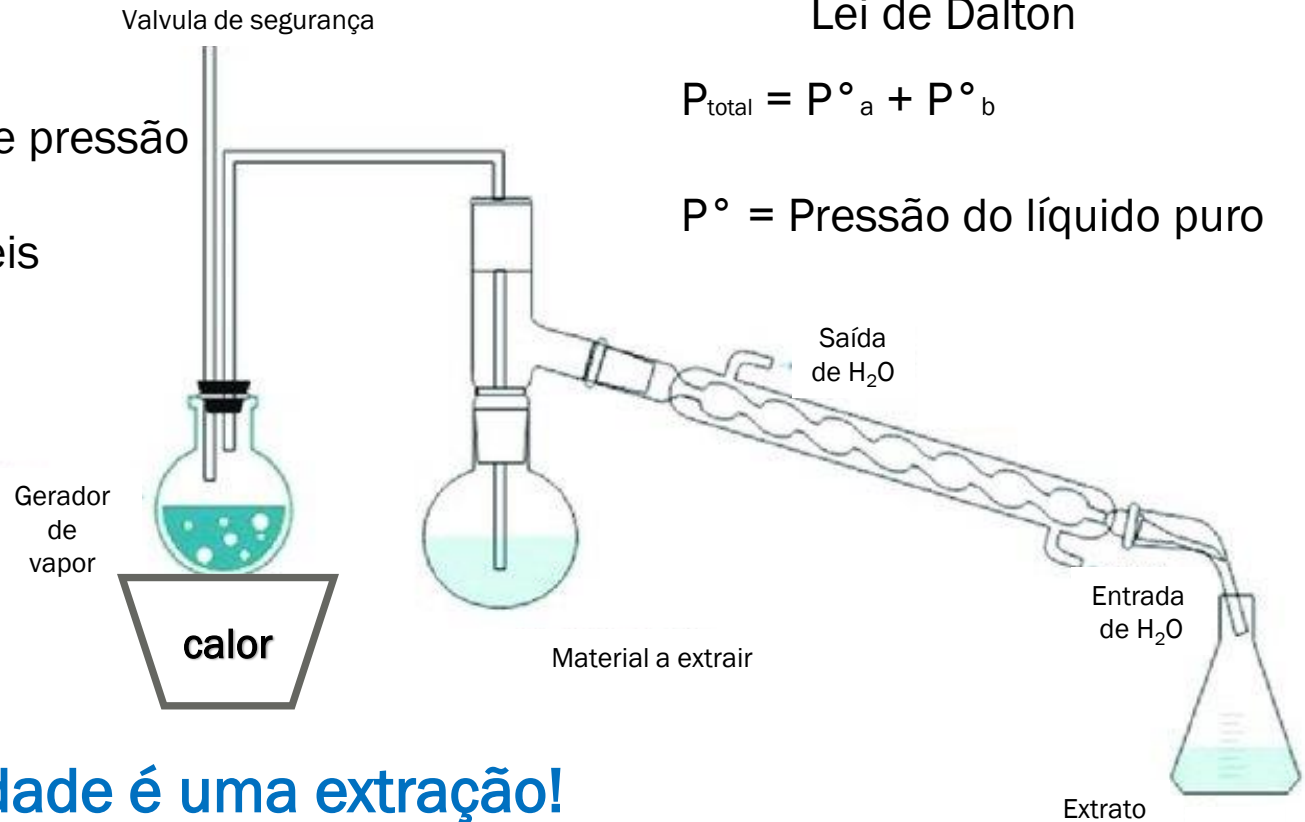
Destilação por arrastamento de vapor

A água é promotora de pressão de vapor para destilar componentes imiscíveis

Lei de Dalton

$$P_{\text{total}} = P^{\circ}_a + P^{\circ}_b$$

P° = Pressão do líquido puro

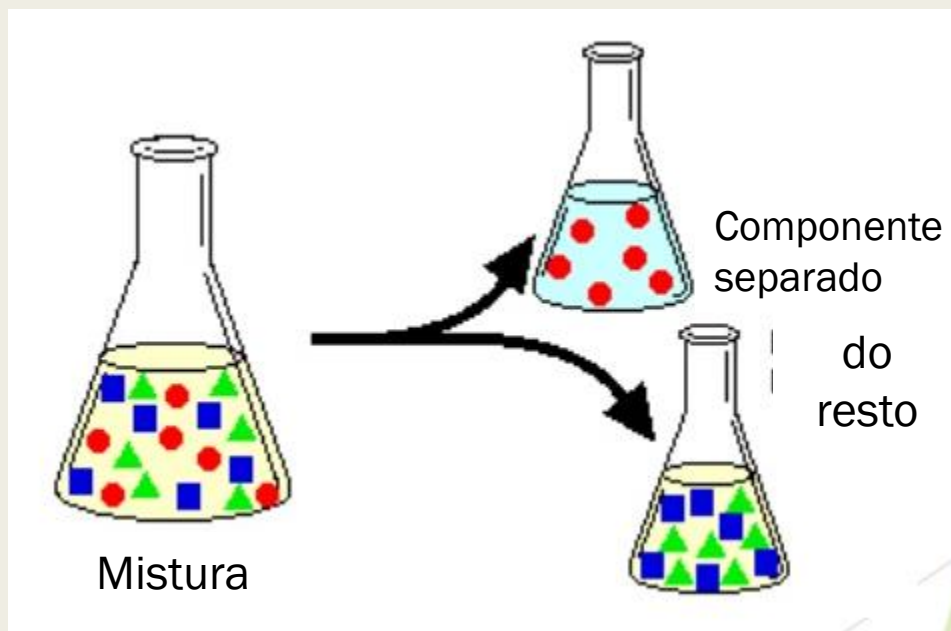


Na realidade é uma extração!



Extração líquido-líquido

1. Para separação e isolamento de componentes de uma mistura

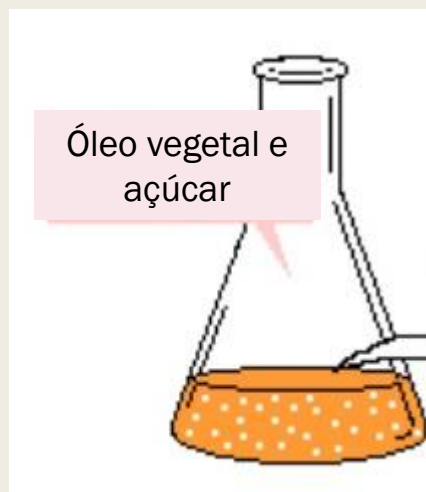


2. Para remoção de impurezas solúveis indesejáveis (lavagem)

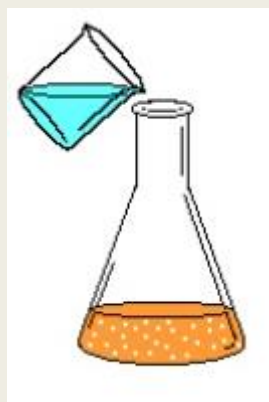
O sucesso da separação depende da diferença de solubilidade do composto nos dois solventes.

Extração líquido-líquido

Imaginemos uma mistura de óleo vegetal e açúcar:



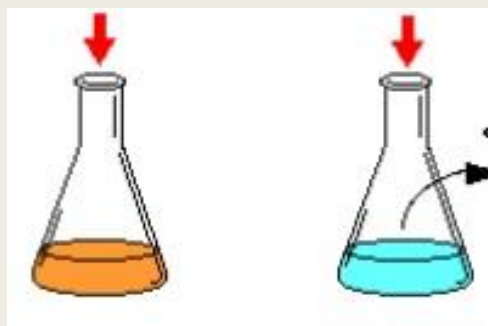
Se for adicionada água



Agitada



E separadas a fase oleosa da fase da água, apenas esta fica doce!

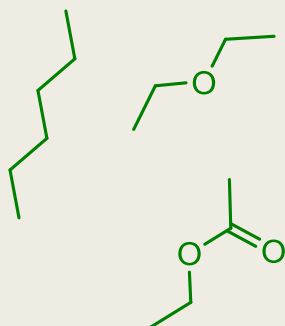


Acúcar passou para a fase aquosa

Extração líquido-líquido

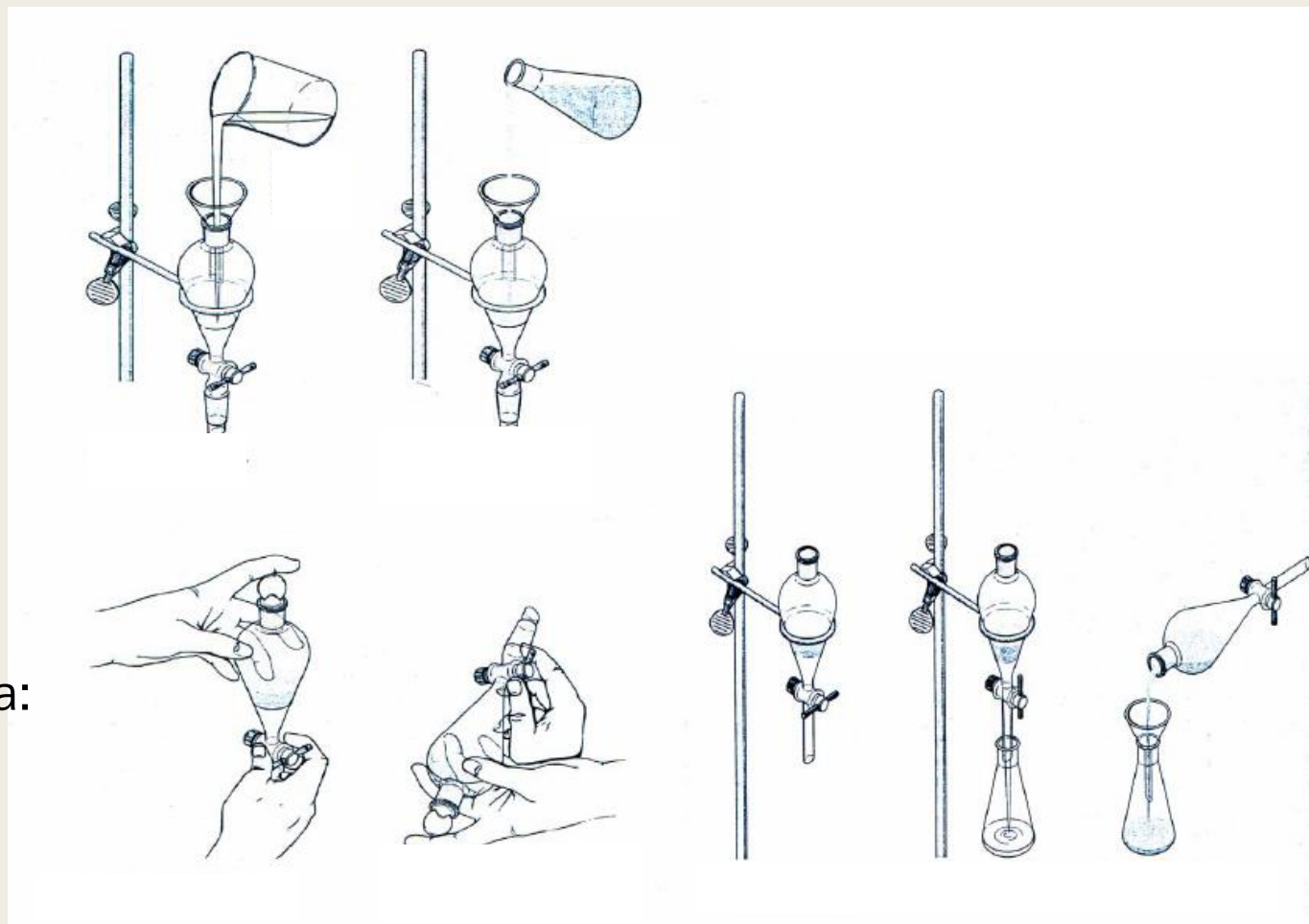
Solventes **menos**
densos que a água:

acetato de etilo
éter etílico
n-hexano



Solventes **mais**
densos que a água:

cloróformio
diclorometano

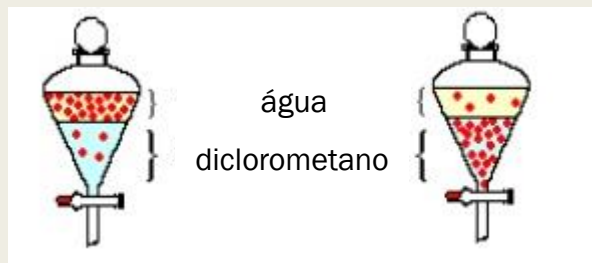


Extração líquido-líquido

Coeficiente de distribuição ou de partição K_D

Quando um composto é agitado com dois solventes imiscíveis o composto vai repartir-se entre os dois solventes de acordo com a sua afinidade por estes

Composto mais solúvel
em água



água
diclorometano

Composto mais solúvel
em diclorometano

A razão entre as concentrações do soluto em cada solvente é denominada coeficiente de distribuição ou de partição K_D

Para o caso em que um solvente orgânico A é utilizado para extrair um soluto de uma **solução aquosa B**, tem-se:

$$K = C_A / C_B.$$

Extração líquido-líquido

Como calcular C_A (fase orgânica) e C_B (fase aquosa)?

S = quantidade inicial em gramas do soluto no solvente B;

V_A = volume do solvente A (em mL);

V_B = volume do solvente B (em mL);

X = quantidade, em gramas do soluto não extraído

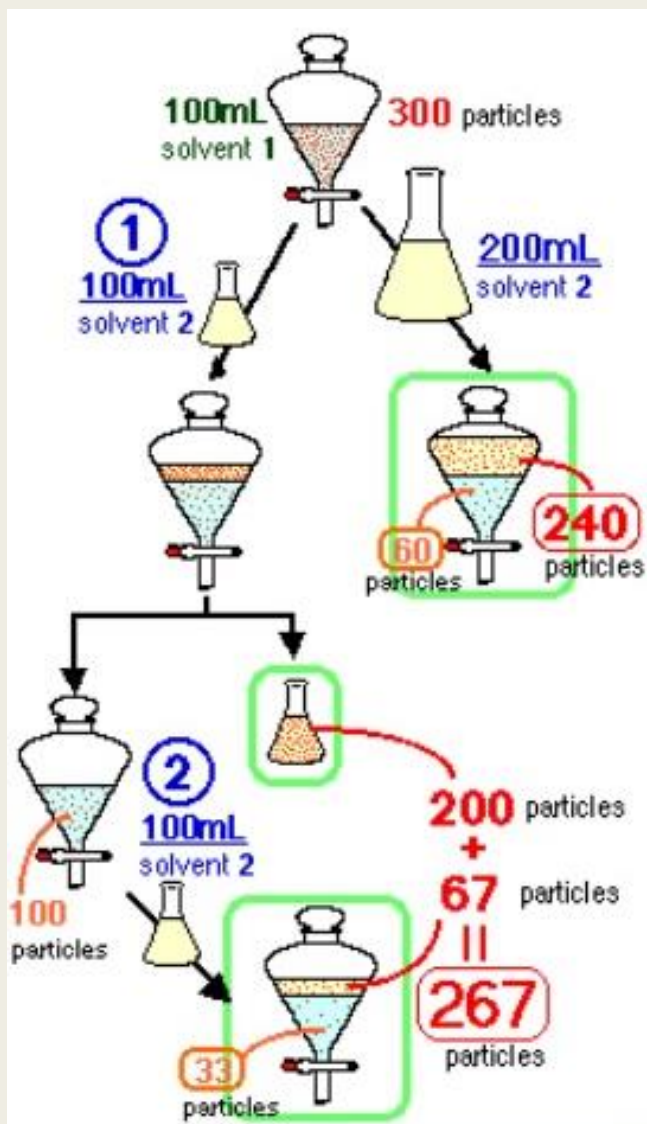
$$C_A = \frac{S - X}{V_A} \quad C_B = \frac{X}{V_B}$$

Conhecendo o valor de K_D é possível calcular a % de soluto extraído com uma extração de 30 mL ou 3 extrações de 10 mL cada.

Supondo um valor de $K_D = 2$ significa que se os volumes dos 2 solventes forem iguais e existirem 300 unidades de soluto 200 destas ficam na fase orgânica e 100 na fase aquosa.

Extração líquido-líquido

Uma ou várias extrações?



Verifica-se que é mais eficiente efectuar várias extracções sucessivas, isto é, dividir o volume V_A em n fracções. Designa-se por extracção múltipla sendo mais eficiente do que a extracção simples.

Ainda supondo um valor de $K_D = 2$

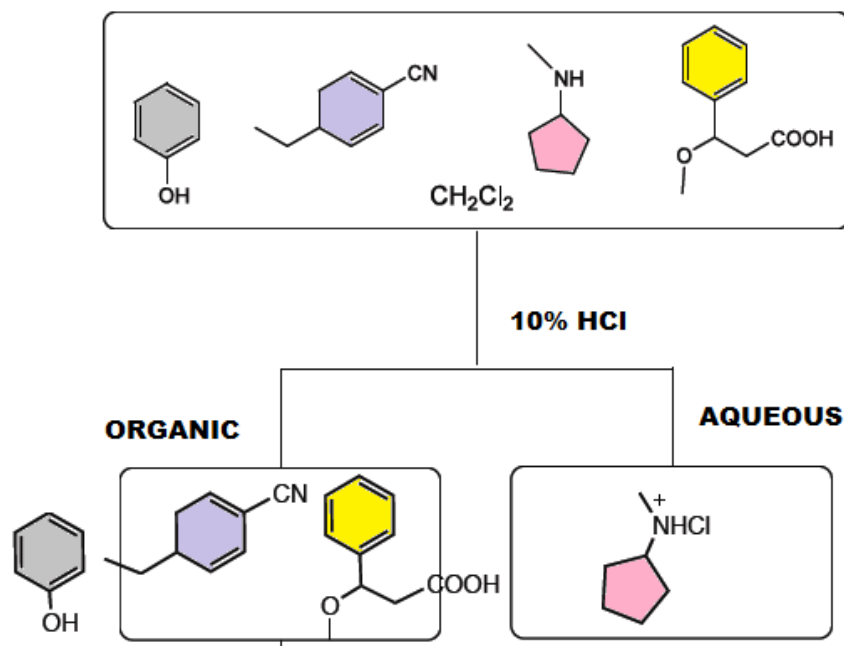
Extração líquido-líquido

Utilização de soluções ácidas ou básicas

Reagem quimicamente com o composto a ser extraído.

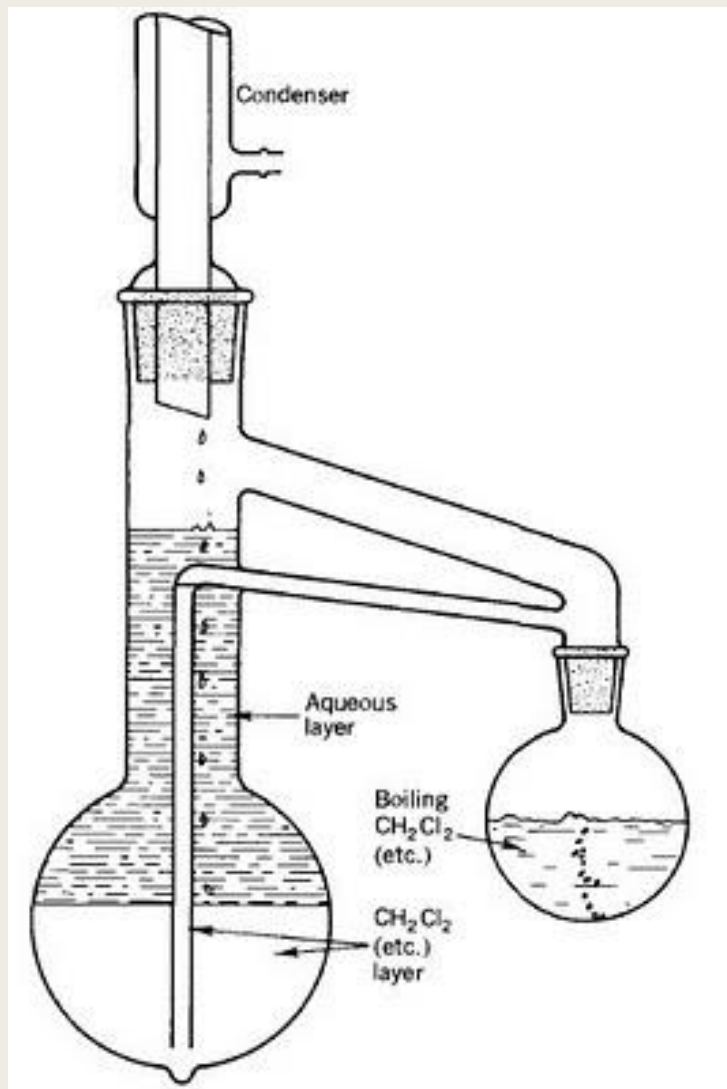
1. Para remover pequenas quantidades de impurezas
2. Para separar os componentes de uma mistura

Compostos ácidos são removidos por soluções básicas
Compostos básicos são removidos por soluções ácidas



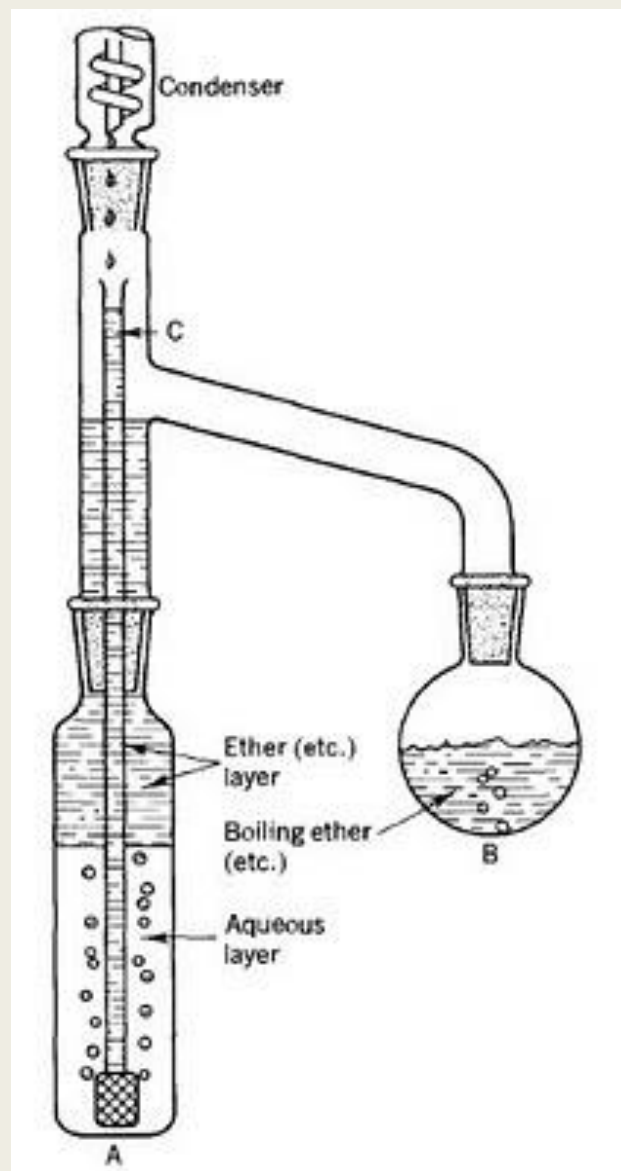
Extração líquido-líquido

Extração contínua com
solvente orgânico mais denso
que a água



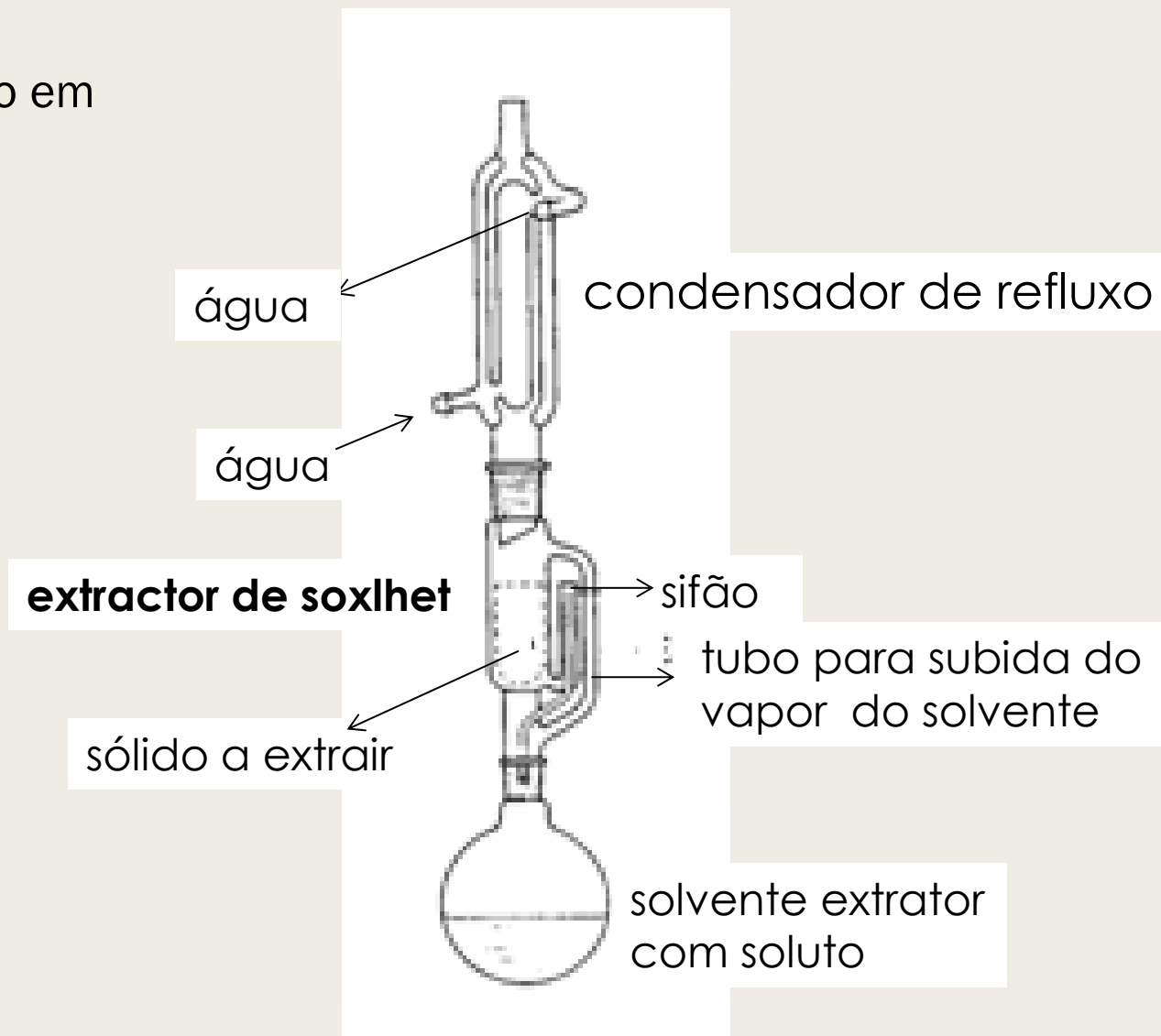
Extração líquido-líquido e sólido-líquido

Extração contínua com
solvente orgânico menos
denso que a água

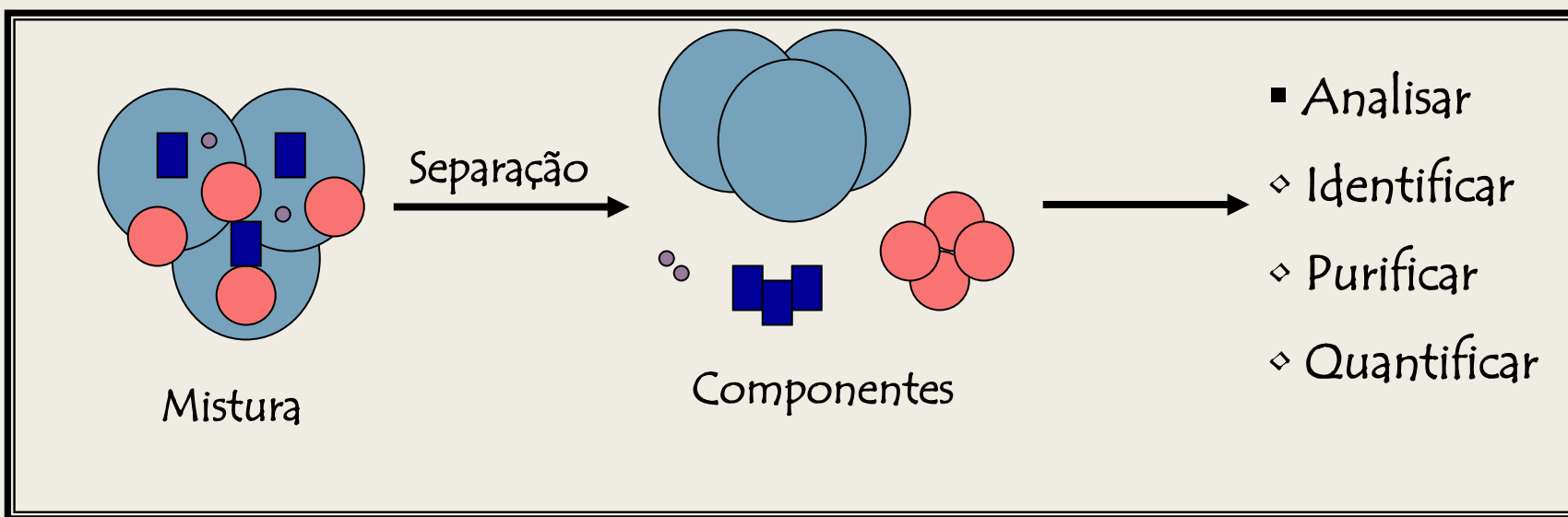


Extração sólido-líquido

Extração sólido-líquido em
extrator de Soxhlet



Cromatografia



Uso

1. Análise da composição de misturas (cromatografia analítica)
2. Separação de misturas (cromatografia preparativa)

Há duas fases que contactam mutuamente

Fase estacionária (sólida ou líquida)

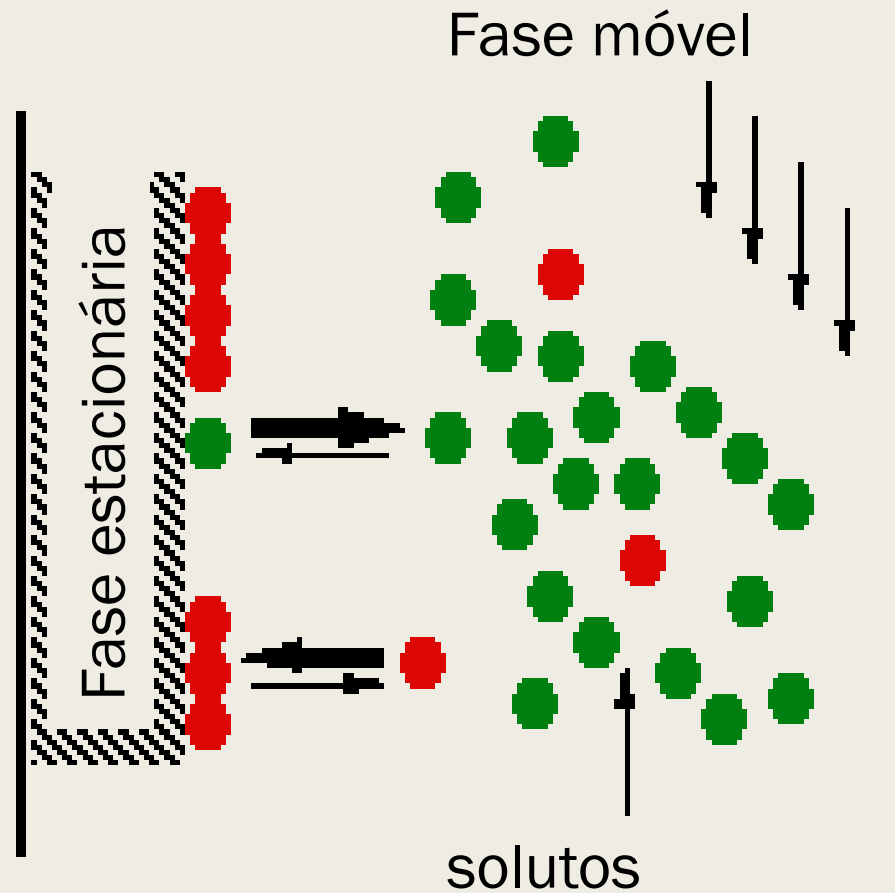
Fase móvel (líquida ou gasosa ou supercrítica)

A separação depende da diferença entre o comportamento dos **analitos** entre a fase móvel e a fase estacionária. A interação dos componentes da mistura com estas duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares, incluindo iónica, polar, apolar, e efeitos específicos de afinidade e solubilidade.

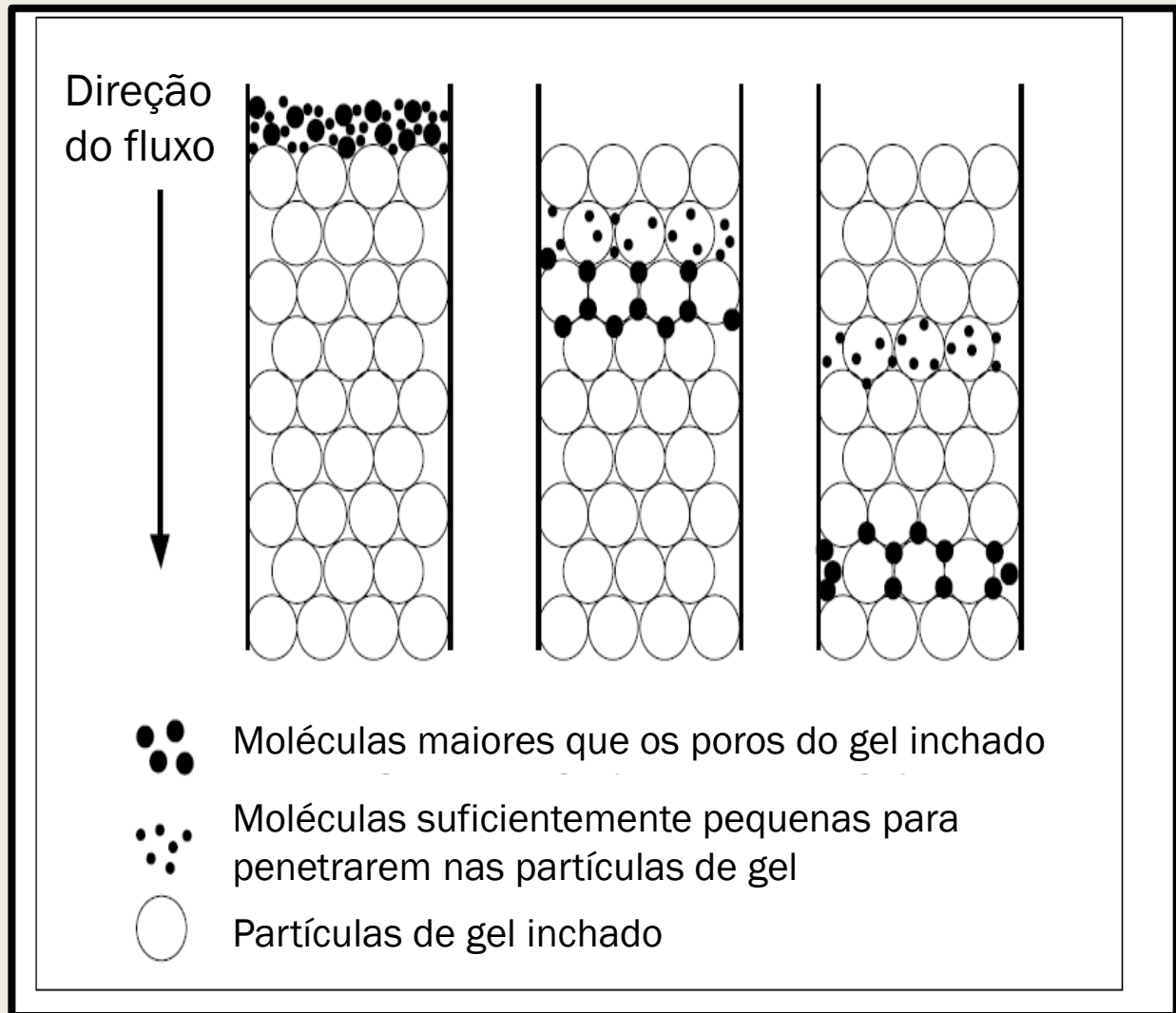
Cromatografia

Classificação geral	Método	Fase estacionária	Tipo de equilíbrio
Cromatografia Líquida (fase móvel líquida)	Líquido-Líquido ou partição	Líquido adsorvido a um sólido	Partição entre líquidos imiscíveis
	Fase líquida ligada	Moléculas orgânicas ligadas a uma fase sólida	Partição entre a fase líquida e a fase ligada
	Líquido-sólido ou adsorção	Sólido	Adsorção
	Troca iónica	Resina de troca iónica	Permuta iónica
	Exclusão molecular	Líquido nos interstícios de um polímero sólido	Peneiração
Cromatografia gasosa (fase móvel gasosa)	Gás-líquido	Líquido adsorvido a um sólido ou reveste um capilar	Partição entre gás e fase estacionária
	Gás-Sólido	Empacotamento sólido	Partição entre o gás e a fase estacionária
		Sólido	Adsorção

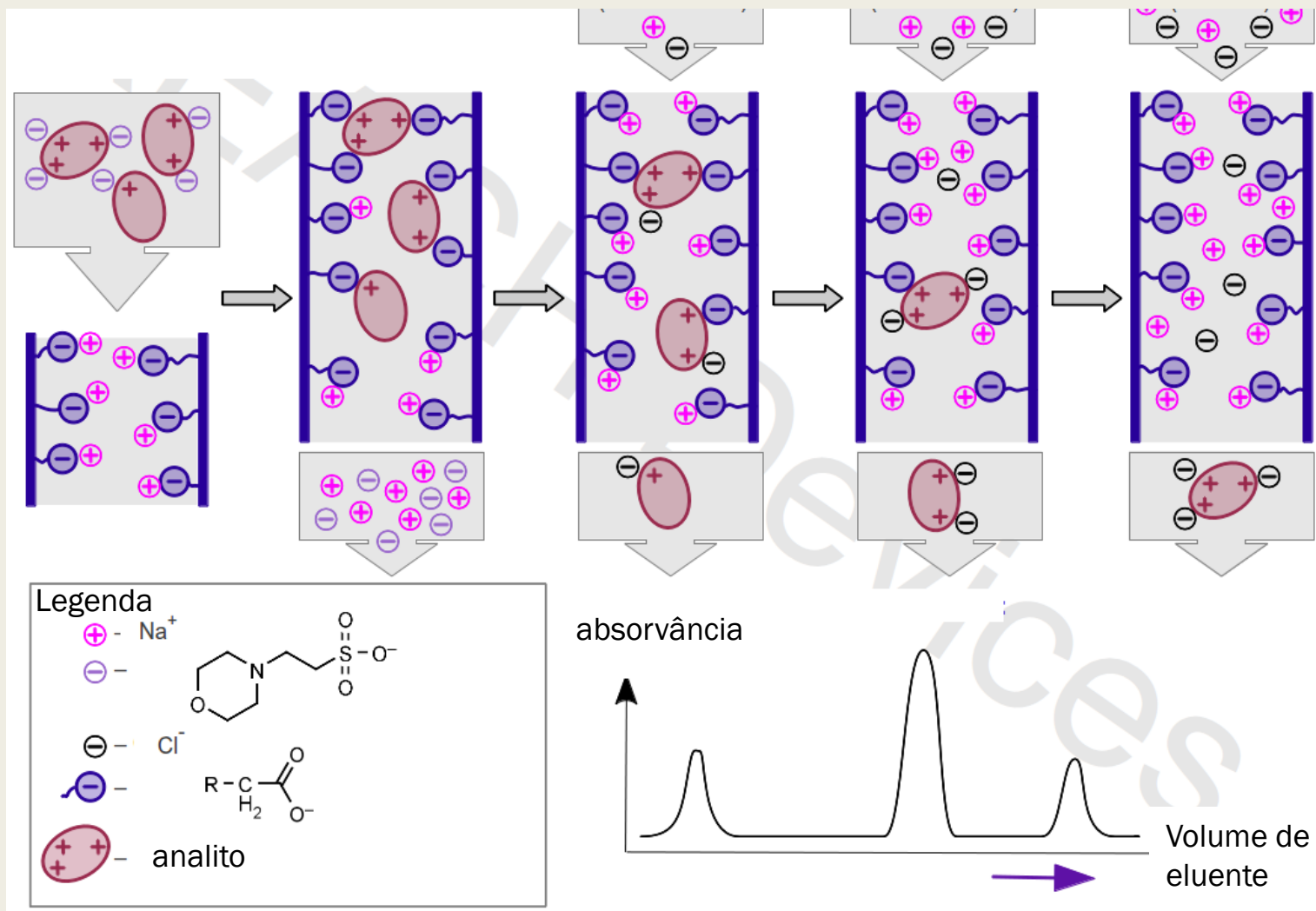
Partição e adsorção



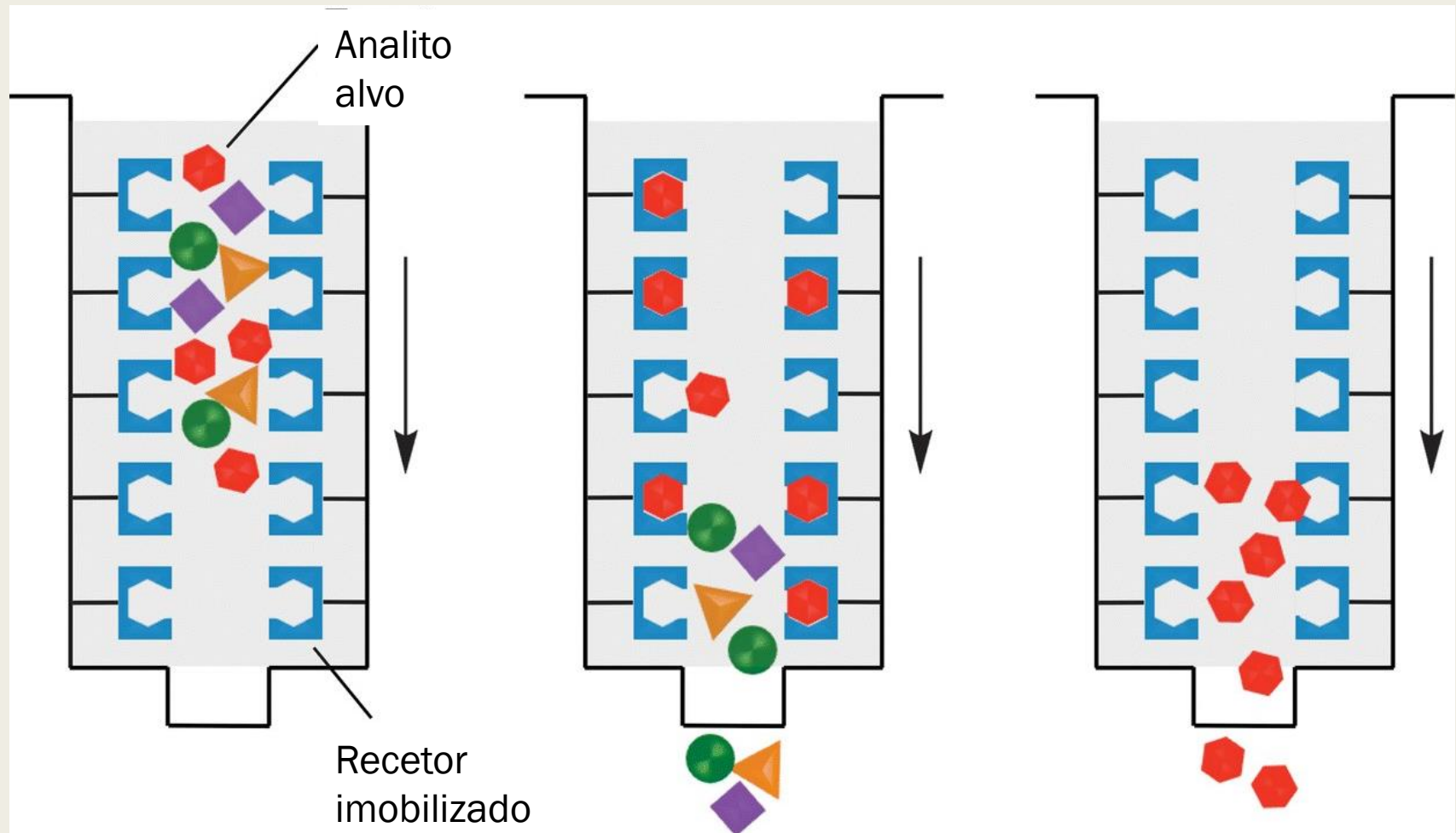
Exclusão molecular



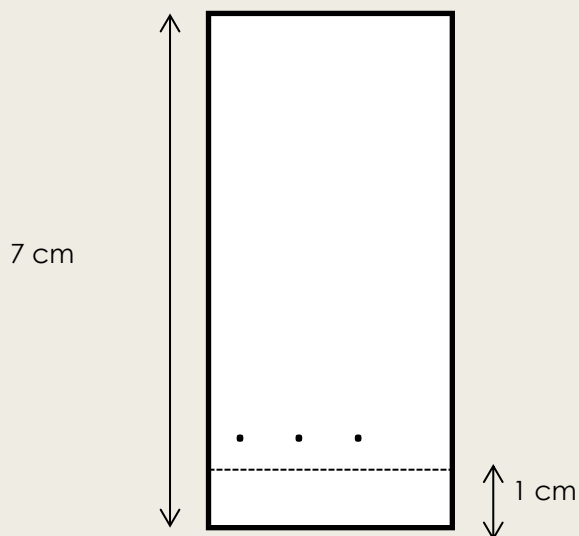
Troca iónica



Afinidade



Cromatografia de camada fina (ccf - TLC)



É uma cromatografia de partição ou de adsorção, feita sobre uma placa de vidro, plástico ou **folha de alumínio**, revestida com uma fina camada de material adsorvente, geralmente **sílica-gel**, óxido de alumínio ou celulose. Esta camada de adsorvente é a fase estacionária.

A amostra é aplicada sobre a placa e um solvente ou mistura de solventes (chamada de fase móvel) percorre a placa através de **acção capilar**. Os diferentes componentes da mistura percorrem a placa de maneira diferentes, sendo possível a separação.

TLC pode ser usada para monitorizar a evolução de uma reação química, identificar os compostos presentes numa mistura ou determinar a pureza de uma substância.

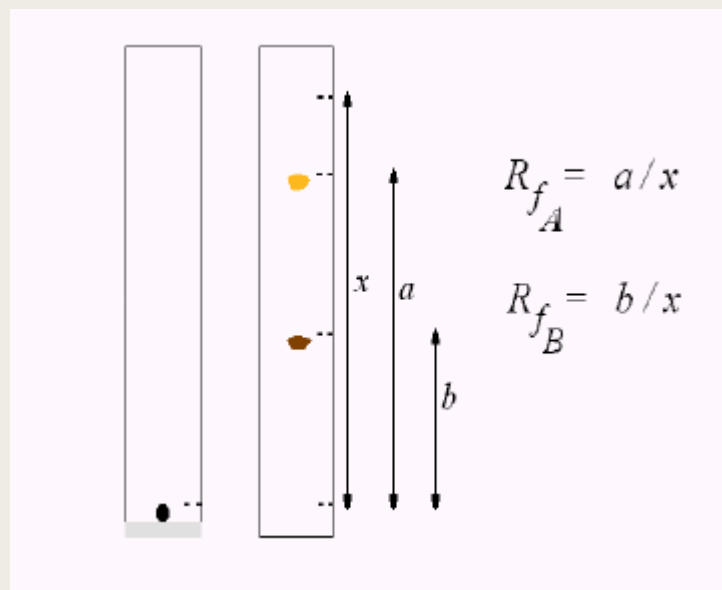
Cromatografia

Cromatografia de camada fina (ccf)

A grandeza que permite caracterizar a eluição designa-se por factor de retenção (R_f)

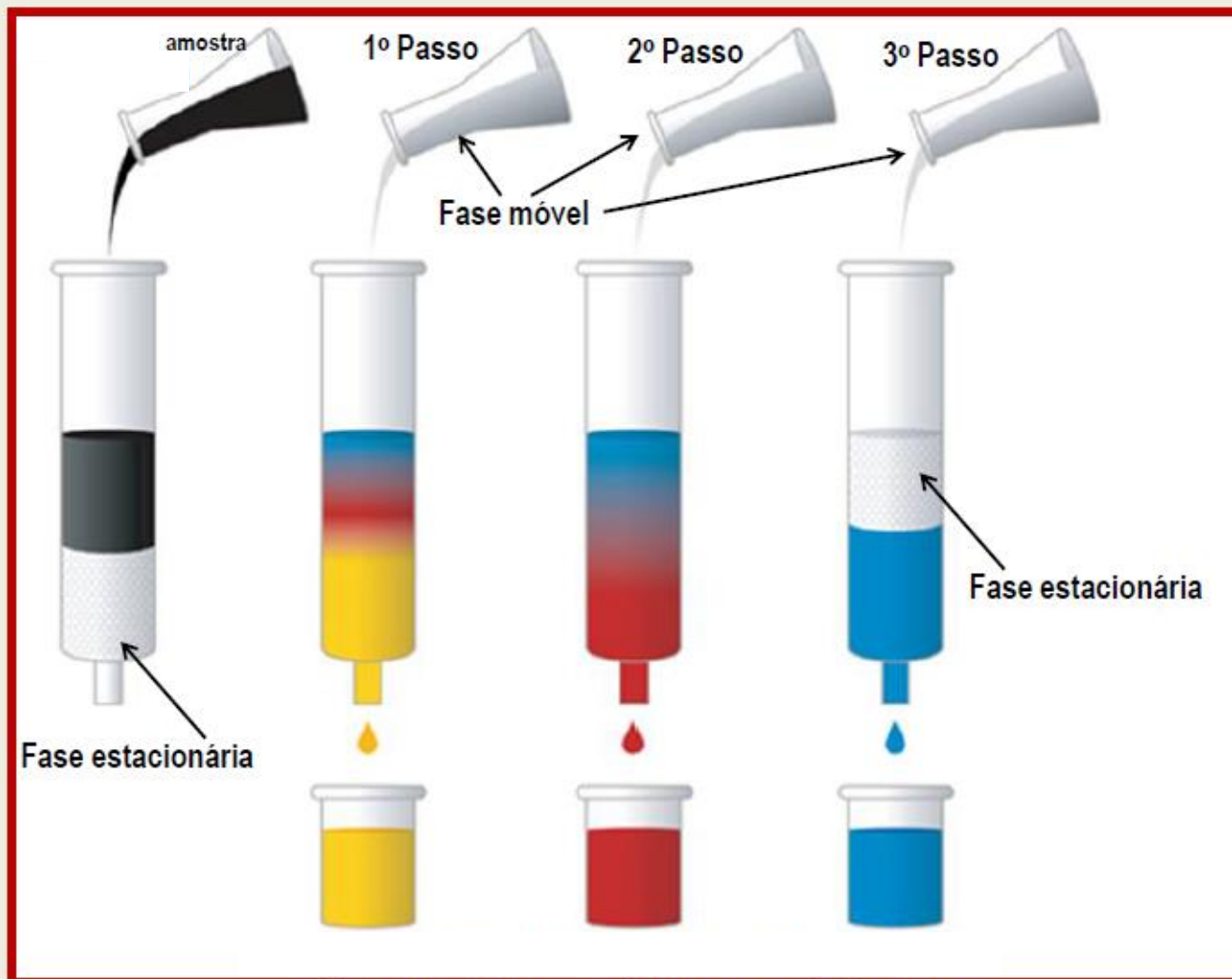
Em TLC esse valor é calculado da seguinte forma:

$$R_f = \frac{\text{Distância percorrida pela mancha de analito (cm)}}{\text{Distância percorrida pela frente do eluente (cm)}}$$



Cromatografia

Cromatografia em coluna (cc)



Cromatografia

Cromatografia em coluna (cc)

- A cromatografia líquida “clássica” é uma técnica de adsorção iniciada nos primeiros anos do século XX .
- Fase estacionária (sólida): colocada numa coluna de vidro de diâmetro variado;
- Amostra: colocada no topo da coluna;
- Fase móvel (eluente): passa através dela. Pode ser usada para fins preparativos, dependendo do tamanho da coluna.

Cromatografia em coluna (cc)

Fases estacionárias: ex: sílica gel, óxido de alumínio, silicato de magnésio, carvão ativado, celulose microcristalina.

Fases móveis (eluentes): são selecionadas de acordo com o seu poder de eluição. Os eluentes são ordenados em séries eluotrópicas

Série eluotrópica para a sílica

menos polar

ciclo-hexano

n-pentano

tolueno

clorofórmio

diclorometano

éter dietílico

acetato de etilo

mais polar

metanol

ácido acético

Cromatografia

Cromatografia em coluna (cc)

Enchimento da coluna:

Por via húmida: mistura-se a fase móvel ao adsorvente até formar uma pasta. Preenche-se a coluna com essa pasta. Coloca-se a amostra em solução no topo da coluna. Faz-se passar a fase móvel (eluente).

Por via seca: coloca-se o adsorvente na coluna. Adiciona-se o eluente. Coloca-se a amostra em solução no topo da. Faz-se passar a fase móvel (eluente).

Para cada mistura a separar há que ensaiar qual a melhor mistura de solventes para otimizar a separação dos analitos

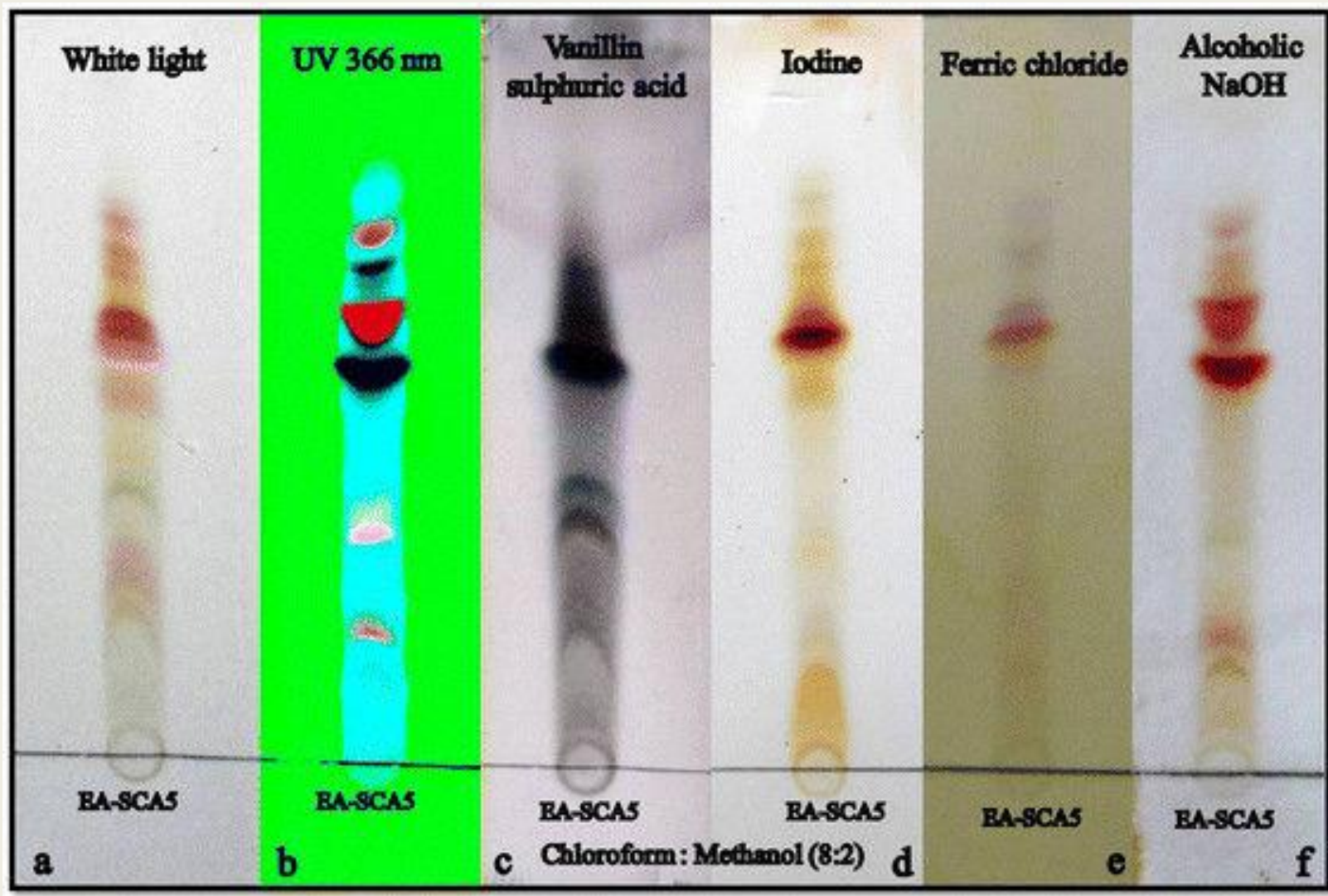
Conclusão da cromatografia

Revelação cromatográfica para visualizar a separação

1. Visualização sob radiação UV a 254 nm e/ou 366 nm*
2. Reacção corada com revelador universal ou específico

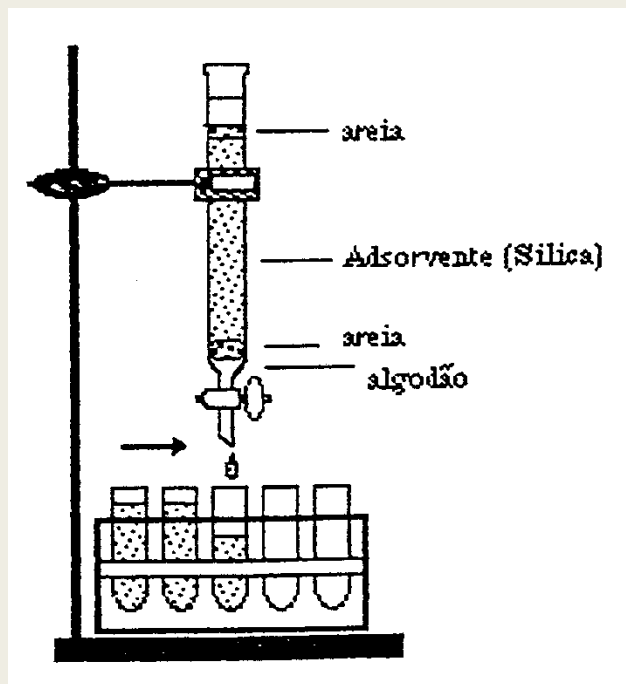
* As placas de sílica e de alumina podem estar impregnadas com uma substância fluorescente (sulfito de zinco)

Cromatografia

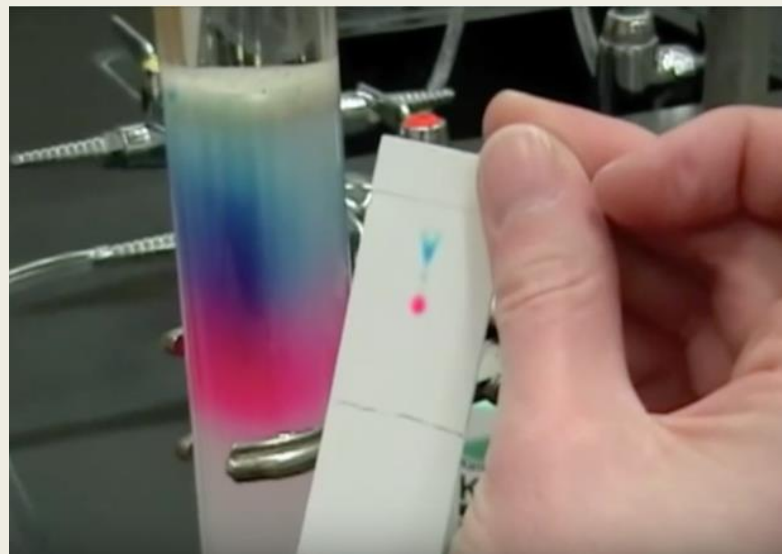
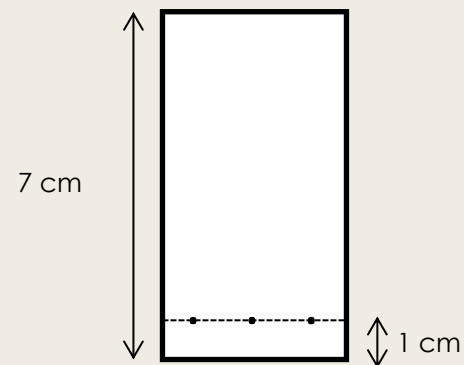


Cromatografia

Cromatografia preparativa



Cromatografia analítica



Doseamento usando a lei de Lambert-Beer

O que é?

Para determinar a concentração de uma determinada solução pode ser usada espectrofotometria para medir a transmitância e determinar a concentração da solução, aplicando a lei de Lambert-Beer.

Esta lei estabelece que a concentração de um soluto é proporcional à sua absorvância.

O espectrofotómetro permite que a luz passe através de uma cuvete contendo uma amostra da solução que absorve parte do feixe de radiação que a atravessa. Quando o raio de luz de um determinado comprimento de onda e intensidade (I_0) entra em contato perpendicular com a solução de um composto químico, o composto absorverá parte da radiação de luz (I_a).

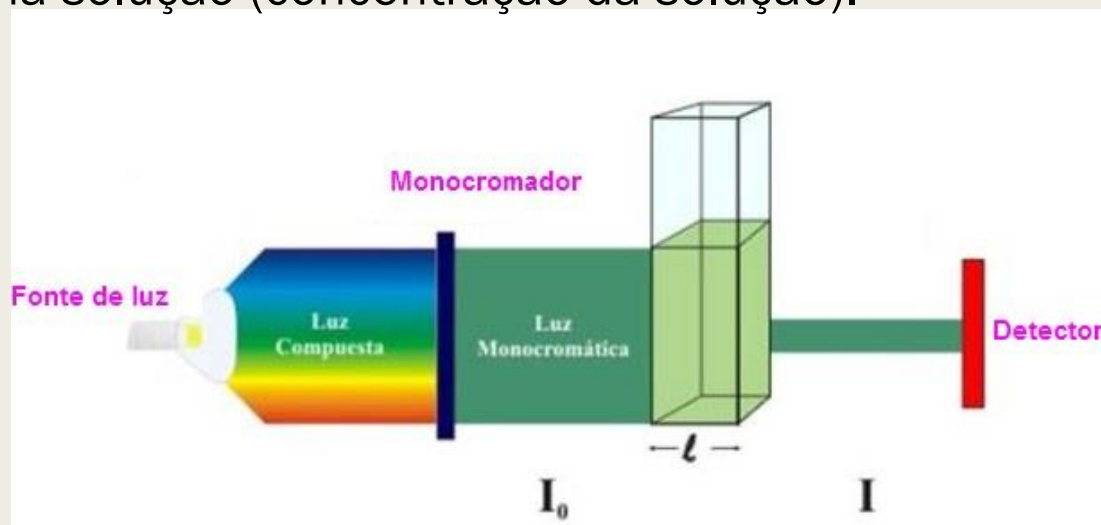
A luz restante (I_b) passará pela solução e chegará o detetor.

Verifica-se a seguinte equação:

$$I_0 = I_a + I_b$$

Doseamento usando a lei de Lambert-Beer

A absorvância da luz está relacionada com o número de moléculas presentes na solução (concentração da solução).



A lei Lambert-Beer define a relação entre a concentração de uma solução e a quantidade de luz absorvida pela solução:

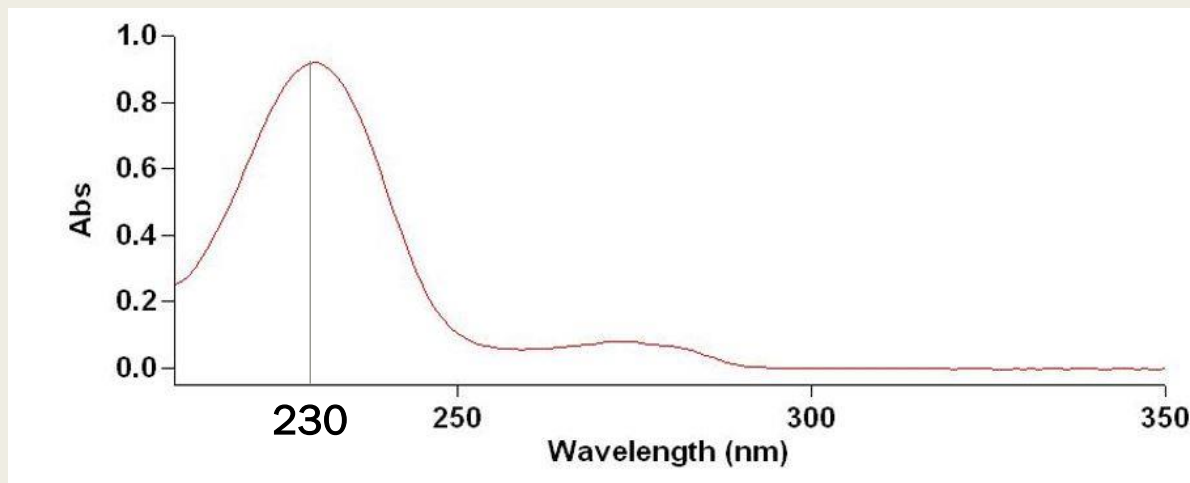
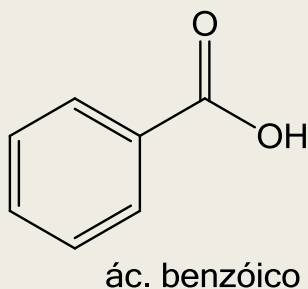
$$A = \epsilon l C$$

A = Absorvância ϵ = absortividade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l = comprimento cuvette contendo a amostra (cm)

C = Concentração do composto na solução (mol L^{-1})

Doseamento usando a lei de Lambert-Beer



$$\text{H}_2\text{O}: \lambda_{\text{max}} = 230\text{nm}, \epsilon_{\text{max}} = 10\,000$$

Como a lei de Lambert-Beer só é aplicável para valores de A entre 0 e 1

e as cuvetes têm em geral 1 cm de comprimento óptico a concentração máxima que poderemos determinar é $10^{-4} \text{ molL}^{-1}$

Como fazer?

Análise de uma solução do analito segundo um dado parâmetro e comparação com os valores correspondentes de um conjunto de soluções de concentrações conhecidas do mesmo analito – soluções padrão

Medida da absorvância da solução do analito ao $\lambda_{\text{máx}}$ na gama do UV-VIS e comparação deste valor com os dados de absorvância das soluções padrão.

Para tal traça-se uma recta padrão de $A = f(\text{conc})$ das soluções padrão. Com a equação da recta determina-se a concentração do analito na solução preparada a partir do seu valor lido de absorvância.

Doseamento usando a lei de Lambert-Beer

Cálculo da massa de ácido benzóico a utilizar para preparação da solução mãe:

1. Concentração $5 \times 10^{-3} \text{ M}$

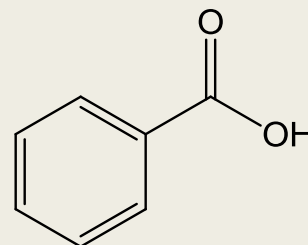
PM (ác benzóico – $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$) = 122

uma solução $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ terá 0,61 g em 1000 ml

para um balão de 100 ml são necessários

0,0610 g e para um balão de 50 ml são

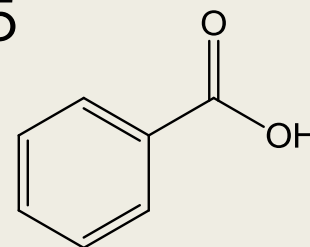
necessários **0,0305 g**



ác. benzóico

Doseamento usando a lei de Lambert-Beer

A partir da solução mãe $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ preparação de 5
soluções padrão
entre 10^{-4} M e $5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

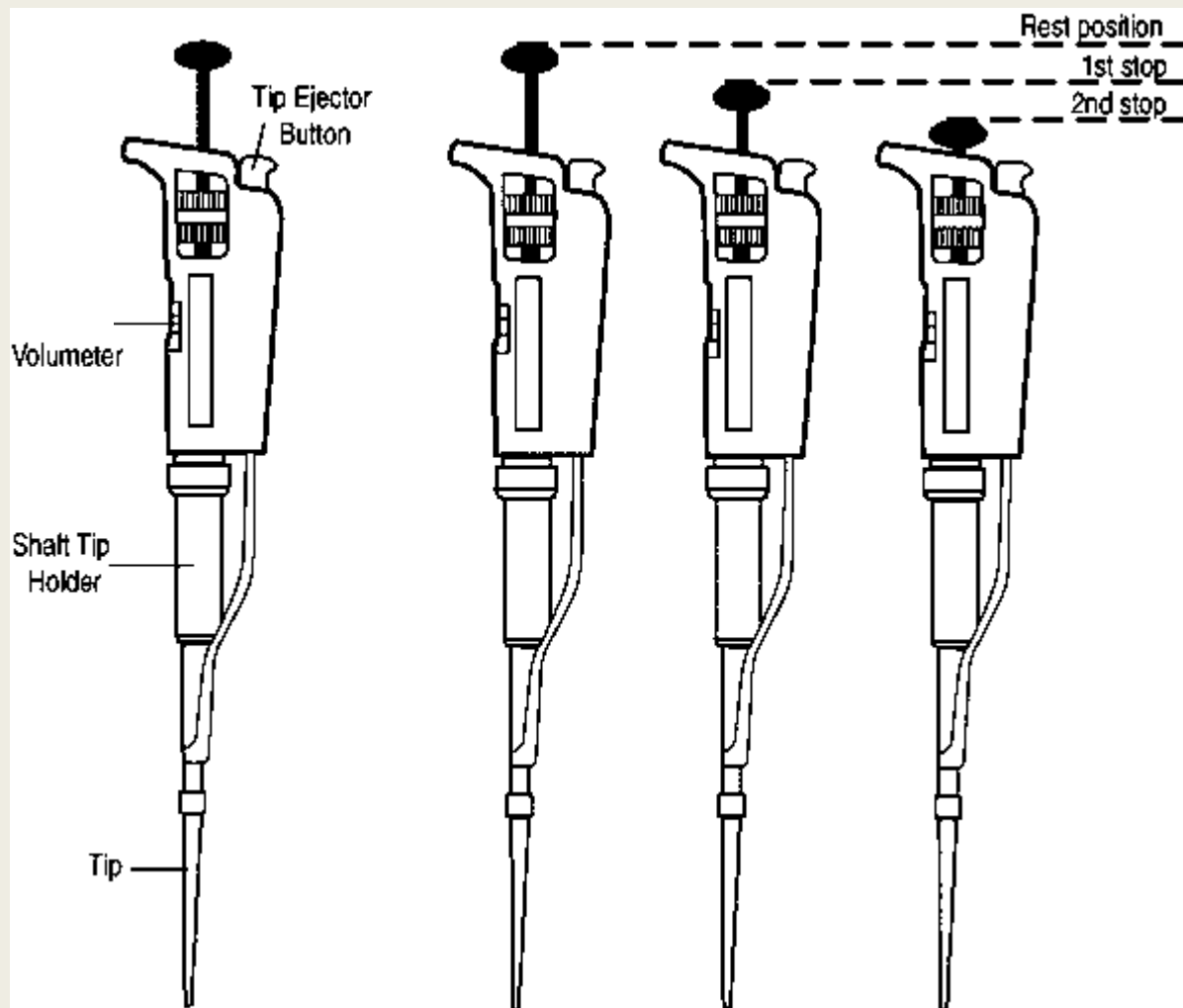


ác. benzóico

Concentração (M)	Volume (mL)	Diluição	Volume a pipetar (μL)
10^{-4}	50 mL	1:50	1000
5×10^{-5}	50 mL	1:100	500
$2,5 \times 10^{-5}$	50 mL	1:200	250
10^{-5}	50 mL	1:500	100
5×10^{-6}	50 mL	1:1000	50

Micropipetas

Material de precisão
para medir volumes
inferiores a 1 mL



Micropipetas

Trate as micropipetas com delicadeza, pois são instrumentos de precisão.

Quando em uso mantenha a pipeta na vertical para evitar que fluam líquidos dentro do eixo da pipeta.

Não deixe pipetas deitadas na bancada, onde podem ser danificadas.

Não permita que pipetas entrem em contato com produtos químicos corrosivos.

Doseamento usando a lei de Lambert-Beer

Micropipetas

Antes de usar, verifique se o volume foi configurado corretamente. Ajuste o volume antes de usar.

Verifique se as pontas estão bem ajustadas para a pipeta.

Aspire o líquido.

Verifique se o líquido aspirado atingiu o nível esperado na ponta e não há bolhas de ar na ponta.

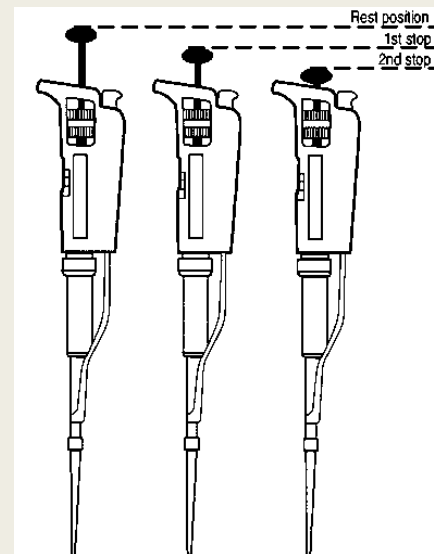
Se necessário, expulse o líquido e reaperte as pontas na pipeta.

Repita o processo.

Micropipetas

Têm 3 posições:

- a. Posição de repouso
- b. Primeiro obstáculo
- c. Segundo obstáculo



- 2. Coloque a ponta no final do eixo. Pressione e gire ligeiramente para garantir uma vedação hermética.
- 3. Segure a pipeta na posição vertical. Pressione o êmbolo até ao primeiro obstáculo. O ar igual ao volume da configuração (por exemplo, 100 μL) é deslocado.

Micropipetas

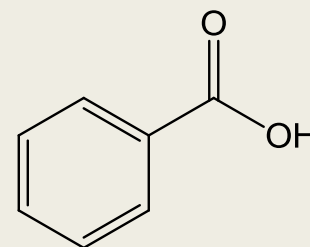
4. Mergulhe a ponta no líquido. Solte o êmbolo de volta para a posição de descanso. Aguarde um segundo para que o líquido seja aspirado na ponta. O volume de líquido na ponta será igual ao volume da configuração da micropipeta.
5. Coloque a ponta num ângulo (10° a 45°) contra a parede do recipiente que recebe o líquido, por exemplo, um balão volumétrico. Pressione o êmbolo até ao primeiro obstáculo, espere um segundo, pressione o êmbolo até ao segundo obstáculo para expulsar todo o líquido
6. Afaste o final da ponta do líquido. Solte o êmbolo na posição de descanso.

Doseamento usando a lei de Lambert-Beer

como $l = 1$ cm (espessura da célula)

então

$$A = \epsilon \cdot c$$



ác. benzóico

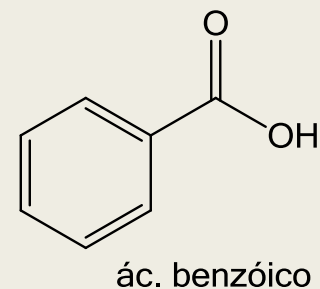
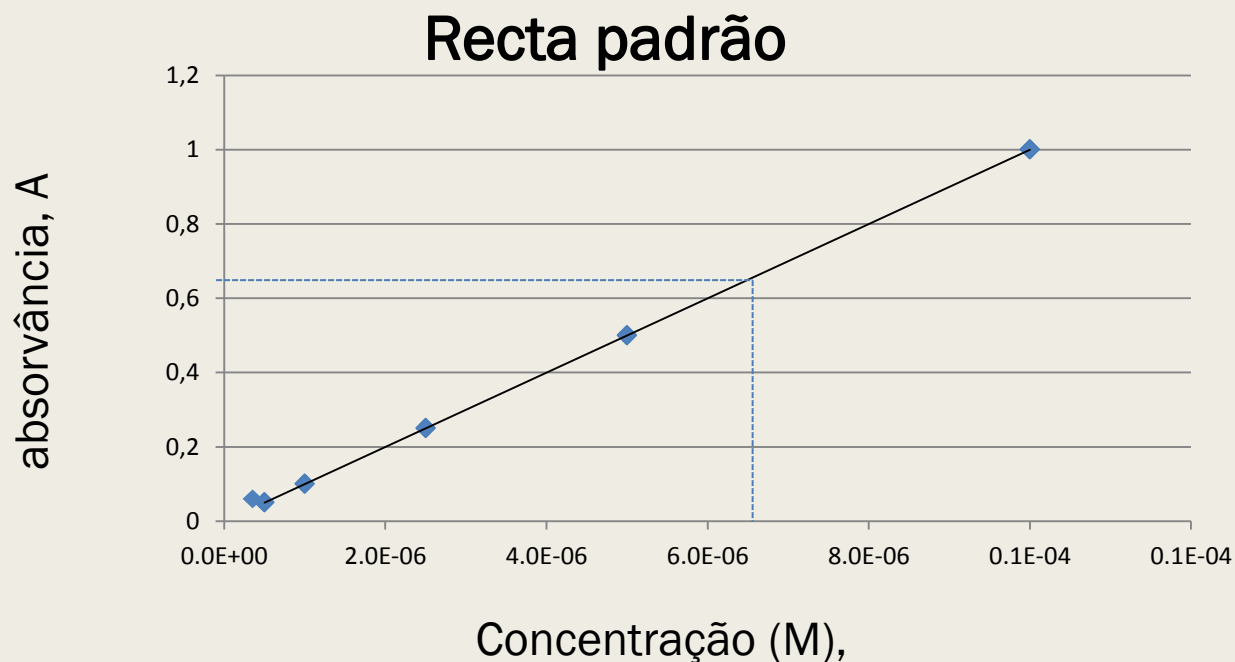
e a absorvância A a um λ fixo é directamente proporcional à concentração do analito na solução contida na célula

numa relação linear o valor de ϵ corresponde ao declive da recta

para um dado analito pode traçar-se a recta de calibração a λ fixo por medição das absorvâncias das soluções padrão de concentrações conhecidas

A medição da absorvância da solução em estudo permite o cálculo da concentração do analito através da equação da recta

Doseamento usando a lei de Lambert-Beer



Representação de uma reta de calibração de absorvância A, a um $\lambda_{\text{máx}}$, em função da concentração de soluções padrão.



...por hoje!!!!