

Programação dos Experimentos – Bloco 02

- **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC):** Determinação de cafeína em amostras de chá.
- **Cromatografia Gasosa (CG):** Análise de metanol e etanol em biodiesel.
- **Cromatografia Líquida de Troca Iônica:** Separação de íons Cu^{2+} e Co^{2+} .

BLOCO 2

Experimento 1 – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Determinação de cafeína em amostras de chá

1. Objetivo

Determinação de cafeína em amostras de chá utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2. Materiais e reagentes

- Balão volumétrico de 10 mL (6)
- Béquer de 10 mL (2)
- Béquer de 250 mL (1)
- Vidro de relógio (1)
- Chapa de aquecimento
- Pipeta volumétrica 0,5 mL (1)
- Pipeta volumétrica 1 mL (1)
- Pipeta volumétrica 2 mL (1)
- Pipeta volumétrica 3 mL (1)
- Proveta de 250 mL
- Termômetro de 100°C
- Eppendorf de 2 mL (2)
- Bastão de vidro médio
- Micro seringa de vidro
- Bacia com gelo
- Água Milli-Q
- Membrana 0,45 µm di do poro
- Padrão analítico de cafeína
- Amostras de chá

3. Instrumentação

- Cromatógrafo Líquido - Shimadzu
- Detector: Arranjo de Diodo – Modelo: SPDM-10ADVP ($\lambda = 254 \text{ nm}$)
- Injetor Reodyne com Loop (alça de amostragem) de 20 µL
- Coluna: SGE C18: (250 mm x 4,6 mm D.I., diâmetro da partícula 5µm e diâmetro do poro = 120 Å).
- Pressão máxima da coluna: 300 Kgf/cm²
- Microseringa 100 µL.

4. Condições cromatográficas

- Fase móvel- Metanol: solução aquosa ácida pH 3,5 (50:50 v/v)
- Vazão: 1 mL/min

- Alça de amostragem: 20 μL

5. Procedimento experimental

5.1. Solução-padrão da cafeína

Partindo da solução-padrão de cafeína na concentração $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, preparar 5 soluções (10 mL) nas seguintes concentrações: 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 e $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$. Estas soluções diluídas deverão ser preparadas em solução de metanol 50%, $\text{pH}=3,5$. Injetar em triplicata cada uma das concentrações.

5.2. Preparo da amostra de “chá”:

Pesar a massa correspondente a um sachê de chá. Mergulhar a amostra de chá em 200 mL de água (MilliQ) à 80°C por 10 minutos. Após atingir à temperatura ambiente, pipetar 3,0 mL da amostra em balão volumétrico de 10 mL e completar o volume com a solução de metanol 50%, $\text{pH} 3,5$. Filtrar, com auxílio da micro seringa de vidro em membrana com porosidade $0,45 \mu\text{m}$, recolher o filtrado em eppendorf e injetar no CLAE nas condições indicadas no item 4.

6. Questões

1) Traçar a curva analítica para a determinação de cafeína (Área do padrão vs concentração). Determinar a concentração de cafeína na amostra desconhecida. A partir das concentrações de cafeína encontradas pelos grupos, discuta a precisão intra-ensaio do método, ou seja, o coeficiente de variação (CV).

$$CV = s \cdot 100/x, \text{ onde } s \text{ é o desvio padrão e } x, \text{ a média das concentrações.}$$

- 2) Determinar a concentração de cafeína (m/m) em relação a massa do sachê de chá utilizado.
- 3) Discutir o mecanismo de separação em cromatografia líquida em fase reversa.
- 4) Otimizar as condições cromatográficas (proporções dos componentes da fase móvel e comprimento de onda)
- 5) Discutir os modos de eluição por gradiente e isocrática.

Experimento 2 - Cromatografia Gasosa (GC)
Determinação da concentração de Metanol e/ou Etanol em amostras de Biodiesel

OBS: trazer luvas e máscara para essa aula prática

1. Introdução

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis. Esta prática tem como objetivo a familiarização dos alunos com o equipamento assim como a determinação de parâmetros cromatográficos e a quantificação de metanol e/ou etanol em biodiesel.

O biodiesel, combustível renovável e biodegradável, constituído de uma mistura de ésteres, é produzido a partir da reação de transesterificação de um triglicerídeo, óleo vegetal, com um álcool de cadeia curta, normalmente, metanol ou etanol. A presença de metanol ou etanol no produto final, em concentrações superiores ao especificado pela legislação vigente, interfere no ponto de fulgor, propriedade importante dos combustíveis, e que está relacionada com o transporte dos mesmos. Pela resolução ANP n.7 de 19/03/ 2008, o teor máximo permitido para álcool (metanol ou etanol), no biodiesel, é de 0,20% m/m.

2. Objetivo

Determinação da concentração de metanol e/ou etanol em amostra de biodiesel utilizando-se à técnica de padronização interna por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.

3. Equipamento

- Cromatógrafo a gás: GC-2010 Shimadzu.
- Coluna: coluna de sílica fundida OV-1 30m x 0.32mm x 3.0 µm – Marca: OHIO Valley.

4. Materiais e reagentes:

- Microseringa de 10 µL
- Frasco de 1,5 mL (6)
- Micropipeta (5-50 µL)

- Micropipeta (100-1000 μL)
- Micropipeta (200 μL)
- Ponteiras para micropipeta
- Padrões: Metanol e Etanol (HPLC)
- Padrão Interno: terc-butanol (99%)
- Solvente: 1-butanol anidro (99,8%)
- Solução estoque: 1% dos padrões de metanol e 1% etanol (m/v) utilizando o 1-butanol anidro (99,8%) como solvente (Preparado pelos técnicos)
- Solução estoque: 1% (m/v) de terc-butanol (Padrão Interno) utilizando o 1-butanol anidro (99,8%) como solvente (Preparado pelos técnicos)

5. Procedimento:

5.1. Condições cromatográficas:

- Programação de temperatura da coluna: Temperatura inicial de 50 °C durante 4 min, aquecendo a rampa de 50°C/min até 100°C. Manter nesta temperatura por 2 min.
- Temperatura do injetor: 175°C
- Temperatura do detector (FID): 260°C
- Gás de arraste: nitrogênio
- Vazão de hidrogênio: 30 mL/min
- Vazão de nitrogênio + Make up: 40 mL/min
- Vazão de ar sintético: 400 mL/min
- Volume injeção da amostra de 0,5 μL (Split de 50)

5.2. Preparação da Curva Analítica

Partindo da solução estoque da **mistura de 1% de metanol e 1% etanol** (m/v), efetuar as diluições nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,20, 0,40 e 0,50 % (m/v) em um frasco de 1,5 mL, conforme indica a Tabela 1 abaixo.

A cada solução diluída dos padrões (metanol e etanol), adicionar um volume fixo de 200 μL da solução padrão 1,0 % do Padrão Interno (terc-butanol).

Tabela 1. Preparar diluições para volume final de 1 mL de 1-Butanol

	1	2	3	4	5
Padrão % (m/v)	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%	0,5%
Metanol e Etanol	50 µL	100 µL	200 µL	400 µL	500 µL
Terc-butanol (PI)	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
1-butanol (solvente)	750 µL	700 µL	600 µL	400 µL	300 µL
Volume Total	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Agitar as soluções vigorosamente. Injetar 0,5 µL cada solução padrão diluída no GC-FID. Identificar os picos de etanol ou metanol, terc-butanol e seus respectivos tempos de retenção. Obter as áreas dos picos de metanol e/ou etanol e terc-butanol (Padrão Interno). Calcular a razão das áreas utilizando a equação a seguir:

$$R_x = \frac{\text{Área } x}{\text{Área PI}}$$

Onde: Rx é a razão de área do componente x

Área x é a área obtida do componente x

Área PI é a área obtida do padrão interno (1-butanol)

Traçar as curvas analíticas (uma para o metanol e outra para o etanol), colocando no eixo das abcissas as concentrações dos analitos nas soluções padrões e no eixo das ordenadas (y), os valores das razões de áreas (Rx).

5.3. Preparação da amostra

Em um frasco de 1,5 mL, previamente tarado, pesar **100 µL** da amostra de biodiesel, acrescentar **200 µL** da solução estoque terc-butanol (PI) e **700 µL** de solvente 1-butanol (Volume Total 1000 µL). **(CUIDADO PARA NÃO DEIXAR**

CAIR BIODIESEL NA BALANÇA). Injetar 0,5 μL da amostra de biodiesel com o padrão interno no GC-FID.

6. Cálculos e resultados

Aplicar os valores obtidos para cada injeção da amostra na equação da curva analítica. Obter os valores de concentração dos componentes de interesse para cada injeção.

7. Questões

- 1) Calcular o fator de retenção, resolução cromatográfica, números de pratos teóricos, altura equivalente a um prato teórico e retenção relativa (α) dos analitos.
- 2) Discutir a resolução cromatográfica em relação à variação da temperatura da coluna, no modo isotérmico e empregando a temperatura programada.
- 3) A escolha do padrão interno empregado nesta análise foi adequada? Discutir.
- 4) Descrever os princípios teóricos do detector de ionização de chama (FID).

Experimento 3 – Troca Iônica

Separação dos íons Co^{2+} e Cu^{2+}

1. Objetivo

O principal objetivo deste experimento será separar os íons Cu^{2+} e Co^{2+} por cromatografia de troca iônica e construir o cromatograma correspondente à separação usando espectrofotometria na região do VIS.

2. Materiais e reagentes

- Bureta de 10 mL (1)
- Suporte universal mL (2)
- Garra para bureta (2)
- Pipeta de Pasteur (2)
- Béquer de 50 mL (2)
- Espectrofotômetro (2)
- Par de cubetas.
- Tubos de ensaio de capacidade 3 mL (30)
- Resina Troca Iônica Dowex 50WX4-200- Sigma/Aldrich;
- Amostra: Soluções de concentração $0,05 \text{ mol. L}^{-1}$ de $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- Solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico $0,2 \text{ mol/L}$ $\text{pH}=5,5$;
- Solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico $0,2 \text{ mol/L}$ $\text{pH}=3,5$; (contendo $\text{NaCl } 0,3 \text{ mol/L}$)

3. Procedimento Experimental

3.1. Preparo da coluna cromatográfica

Para o preparo da coluna cromatográfica, pesar aproximadamente 10g de resina íon-exchange resin Dowex 50WX4-200 hydrogen form (Sigma-Aldrich), transferir para um béquer e lavar com 100 mL de água deionizada durante 2 minutos. Descartar o sobrenadante e repetir este procedimento de lavagem mais duas vezes. Adicionar 50 mL da solução tampão citrato de sódio/ácido cítrico $0,20 \text{ mol. L}^{-1}$ de $\text{pH}= 5,5$ ao béquer que continha a resina e reservar.

Utilizando uma bureta de 10 mL, adicionar uma pequena porção de lã de vidro em sua extremidade, percolar um pouco da solução tampão para a fixação da

lã no fundo da bureta (acima da torneira) e em seguida, adicionar 10 mL da solução tampão na bureta.

Em seguida, transferir à bureta a solução que continha resina. Adicionar pouco a pouco, agitando constantemente o béquer, de modo que toda a resina fique suspensa para ser transferida à coluna. Controlar a vazão para 1,0 mL/min (20 gotas correspondem a ~1 mL). Nunca deixe a coluna secar.

O preparo da coluna será previamente realizado pelo técnico.

3.2. Aplicação e eluição da amostra

Adicionar à coluna cromatográfica, com o auxílio de uma micropipeta, 0,5 mL da amostra contendo os íons Co^{2+} e Cu^{2+} . Ao aplicar a amostra, o nível do tampão deve estar pouco acima da resina, aproximadamente 2 mm. **ESTA ETAPA DEVE SER FEITA CUIDADOSAMENTE PARA NÃO REVOLVER A RESINA.** Após a amostra adentrar na resina, iniciar a eluição dos analitos utilizando a solução tampão de pH 5,5.

Coletar as alíquotas de 2,0 mL em tubos de ensaio identificados (2,4, 6, mL) para posterior análise no espectrofotômetro.

Cada alíquota deverá ser analisada nos comprimentos de ondas de 510 nm e 680 nm. Utilizar a solução tampão como branco de referência.

O mesmo procedimento deverá ser realizado utilizando tampão citrato de sódio/ácido cítrico 0,20 mol. L⁻¹ de pH 3,5 (contendo NaCl 0,3 mol/L).

IMPORTANTE: a coluna cromatográfica NUNCA deverá ficar sem solução, para que esta não resseque.

3.3. Análise espectrofotométrica dos cátions

Fazer as leituras das absorvâncias de todas as frações recolhidas, utilizando o tampão citrato como branco.

A absorção em 510 nm para o íon Co^{2+} e em 680 nm para o íon Cu^{2+} .

4. Tratamento dos resultados

Montar uma tabela com os valores de absorvância obtidos para cada comprimento de onda e para cada um dos valores de pH;

Construir cromatogramas com os valores de absorvância obtidos em função das diferentes frações e discutir os resultados.

5. Questões

1) Um exemplo clássico da aplicação da cromatográfica líquida por troca iônica é a separação do níquel, manganês, cobalto, cobre, ferro e zinco utilizando-se uma coluna de troca aniônica. A eluição foi realizada com HCl em concentrações, que variaram de 12,0 a 0,005 mol L⁻¹. A Figura 1 abaixo ilustra essa separação:

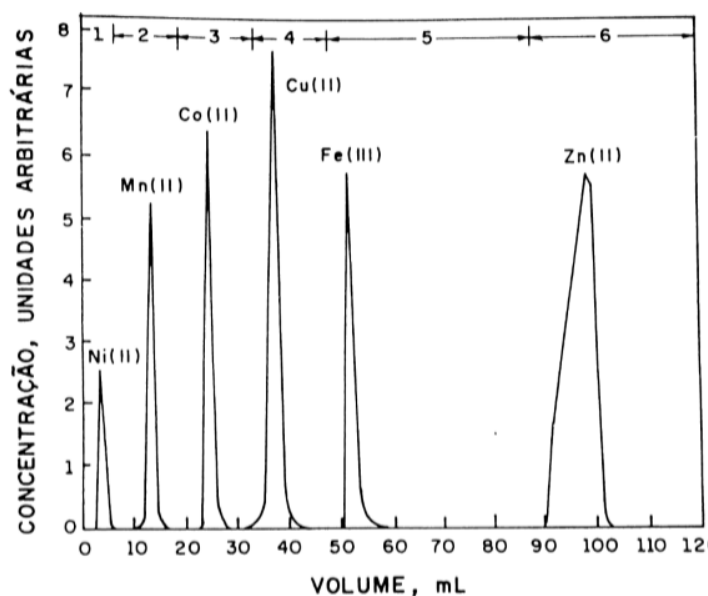


Figura 1. Separação de metais de transição (Mn a Zn) a concentrações variáveis de HCl. Coluna Dowex 1,26 x 0,29 cm, operada a uma vazão de 30 mL h⁻¹. Concentrações de HCl: 1 = 12 mol L⁻¹; 2 = 6 mol L⁻¹; 3 = 4 mol L⁻¹; 4 = 2,5 mol L⁻¹; 5 = 0,5 mol L⁻¹; 6 = 0,005 mol L⁻¹.

a) Explique a ordem de eluição dos cátions

6. Bibliografia

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L; BONATO, P.S. Fundamentos de Cromatografia. Editora da Unicamp, Campinas-SP, 2006.

