

# **ANÁLISE INSTRUMENTAL**

## **CROMATOGRÁFIA (TEORIA)**

- **Prof. Dr. Antônio Aarão Serra**
- **Profa. Dra. Jayne Carlos de Souza Barboza**

## CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- PLANO DE AULA:

- (1ª PARTE) INTRODUÇÃO
- (1ª PARTE) CROMATOGRAFIA PLANAR
- (1ª PARTE) CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA
  
- (2ª PARTE) CROMATOGRAFIA A GÁS (CG)
  
- (3ª PARTE) CROMATOCRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) OU (HPLC)

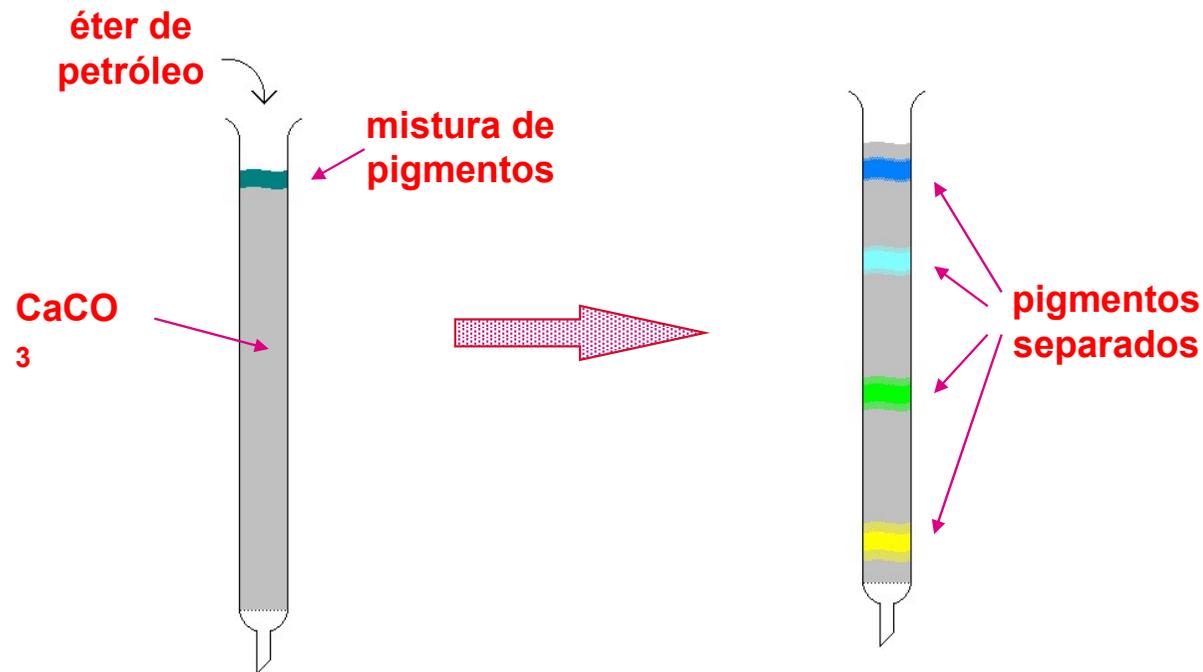
# CLASSIFICAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS CLÁSSICOS E INSTRUMENTAIS



# CROMATOGRAFIA

## Histórico

**Mikhail (Michael, Mikhael) Semenovich Tswett (1903)**, botânico russo: Separação de misturas de pigmentos vegetais em colunas recheadas com adsorventes sólidos e solventes variados.



# **CROMATOGRAFIA**

## **OBJETIVO DA CROMATOGRAFIA PODEM SER:**

- **Separar os componentes de uma mistura;**
- **Purificar um composto;**
- **Isolar um composto;**
- **Quantificar e Qualificar**
- **Auxiliar na identificação de um composto.**

# CROMATOGRAFIA

## APLICAÇÃO

- Agricultura (Pecuária, Veterinária)
- Alimentícia
- Cosméticos (Higiene, Perfumes)
- Farmacêutica (Farmacos)
- Medicina (Hospitais e Clínicas)
- Meio Ambiente (Resíduos, Águas)
- Petroquímica (Derivados)
- Embalagens
- Mineração
- Produtos Naturais (fragâncias, essências, princípios ativos)
- Química (matéria-prima, catalisadores, aditivos)
- Entre outros

# CROMATOGRAFIA

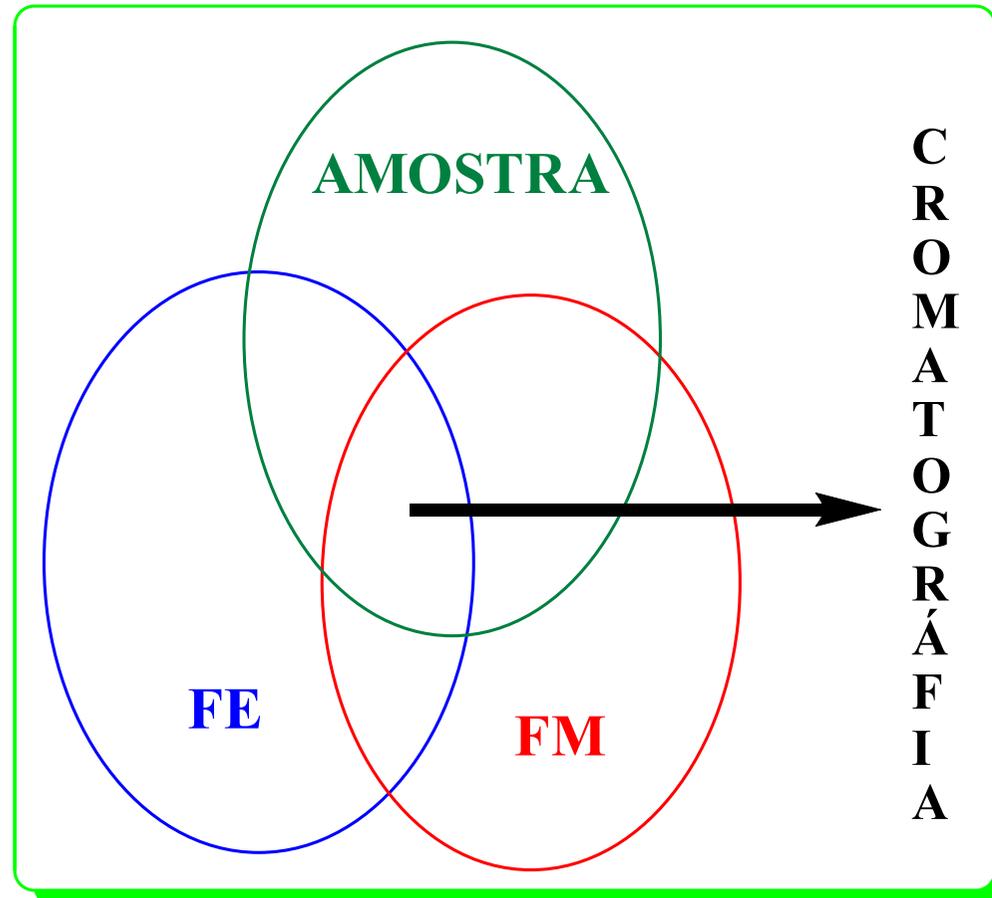
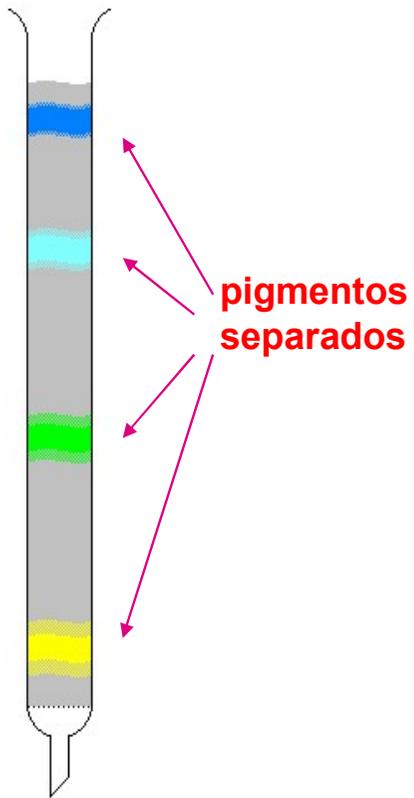
## DEFINIÇÃO - PRINCÍPIO BÁSICO

**DEFINIÇÃO:** Cromatografia é um método físico-químico de separação de misturas, identificação e quantificação de seus componentes.

**PRINCÍPIO BÁSICO:** A separação cromatográfica é realizada a partir de interações diferenciadas entre os analitos componentes da mistura, fase estacionária (FE) e fase móvel (FM).

# CROMATOGRAFIA

## MECANISMO DE SEPARAÇÃO



# CROMATOGRAFIA

## FORÇAS INTERIÔNICAS QUE ATUAM NA CROMATOGÁFIA

- A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e portanto a separação dos solutos individuais.
- As principais forças elementares que agem sobre as moléculas são de cinco tipos:
  - 1) Forças de dispersão de London ou forças e de Van der Waals;
  - 2) Interações de dipolo induzido;
  - 3) Ligações de hidrogênio;
  - 4) Interações dielétricas;
  - 5) Interações eletrostáticas e coulombianas.
- Outra forças: Capilaridade e Gravidade

# CROMATOGRAFIA

## CLASSIFICAÇÃO DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

- De acordo com o sistema cromatográfico
  - Coluna
    - Cromatografia Líquida
    - Cromatografia Gasosa
    - Cromatografia Supercrítica
  - Planar
    - Cromatografia em Camada Delgada (CCD)
    - Cromatografia em Papel (CP)
    - Centrífuga (Chromatotron®)

# CROMATOGRAFIA

## CLASSIFICAÇÃO DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

- De acordo com a fase móvel
  - Utilização de Gás
    - Cromatografia Gasosa (CG)
    - Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (CGAR)
  - Utilização de Líquido
    - Cromatografia Líquida Clássica (CLC)
    - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)
  - Utilização de Gás Pressurizado
    - Cromatografia Supercrítica (CSC)

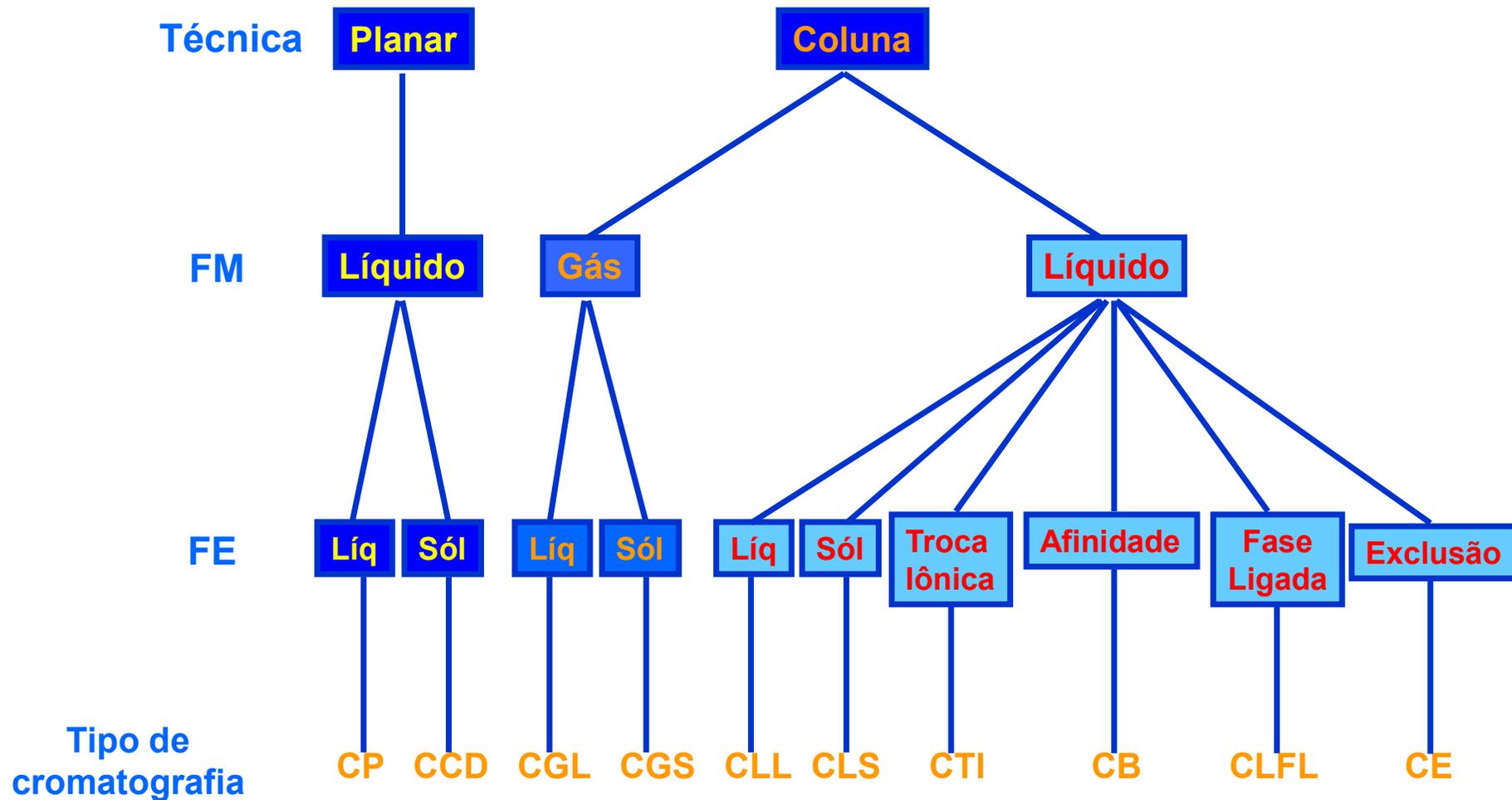
# CROMATOGRAFIA

## CLASSIFICAÇÃO DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

- **De acordo com a Fase Estacionária**
  - Líquida
  - Sólida
  - Quimicamente Ligadas
- **De acordo com o modo de separação**
  - Por Adsorção
  - Por Partição
  - Por Troca Iônica
  - Por Afinidade

# CROMATOGRAFIA

## CLASSIFICAÇÃO DAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS



# CROMATOGRAFIA

## ANALOGIA

O processo cromatográfico pode ser comparado a um grupo de abelhas e moscas sobrevoando uma certa região. Ao passarem por uma flor, espera-se algum efeito sobre as moscas e abelhas.



**Fase estacionária**



**Analitos**

# CROMATOGRAFIA

## ANALOGIA

Para uma mesma mistura, a simples troca da fase estacionária pode ser suficiente para alterar completamente a ordem de eluição de componentes da mistura.



**Fase estacionária**

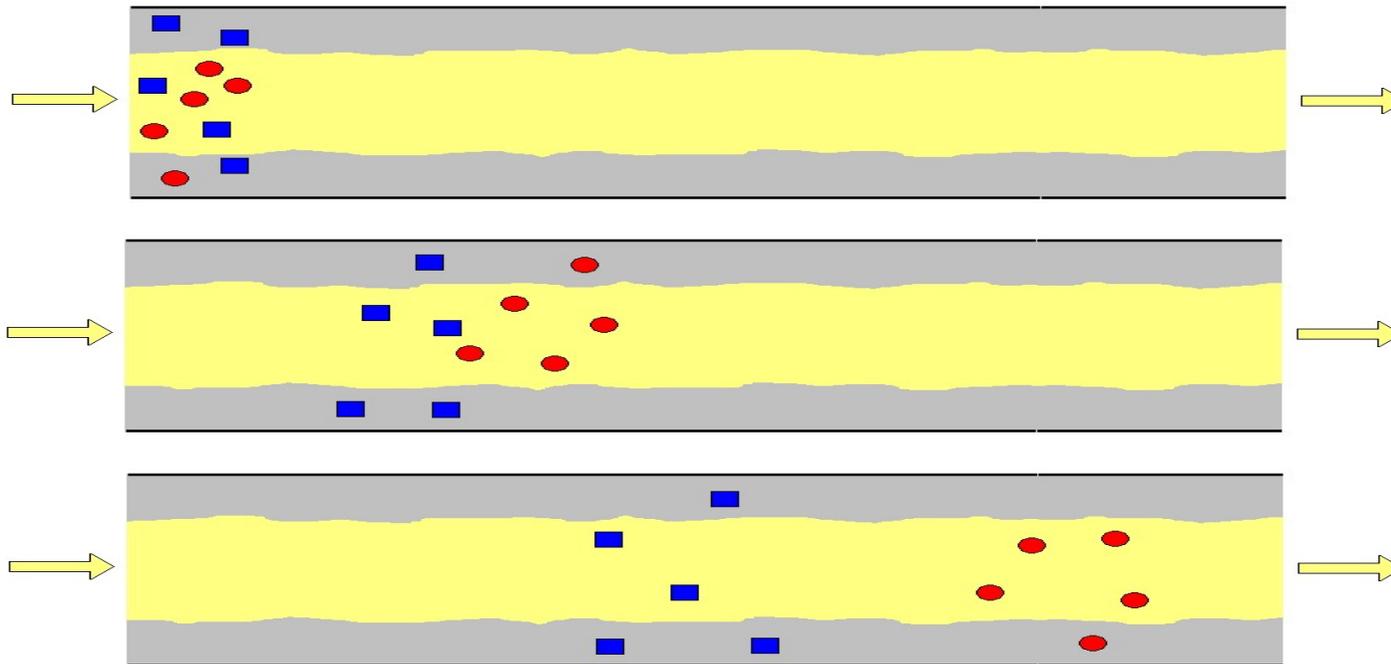


**Analitos**

# CROMATOGRAFIA

## PRINCÍPIO BÁSICO

Separação de misturas por interação diferencial dos seus componentes com uma **FASE ESTACIONÁRIA** (líquido ou sólido) e uma **FASE MÓVEL** (líquido ou gás).



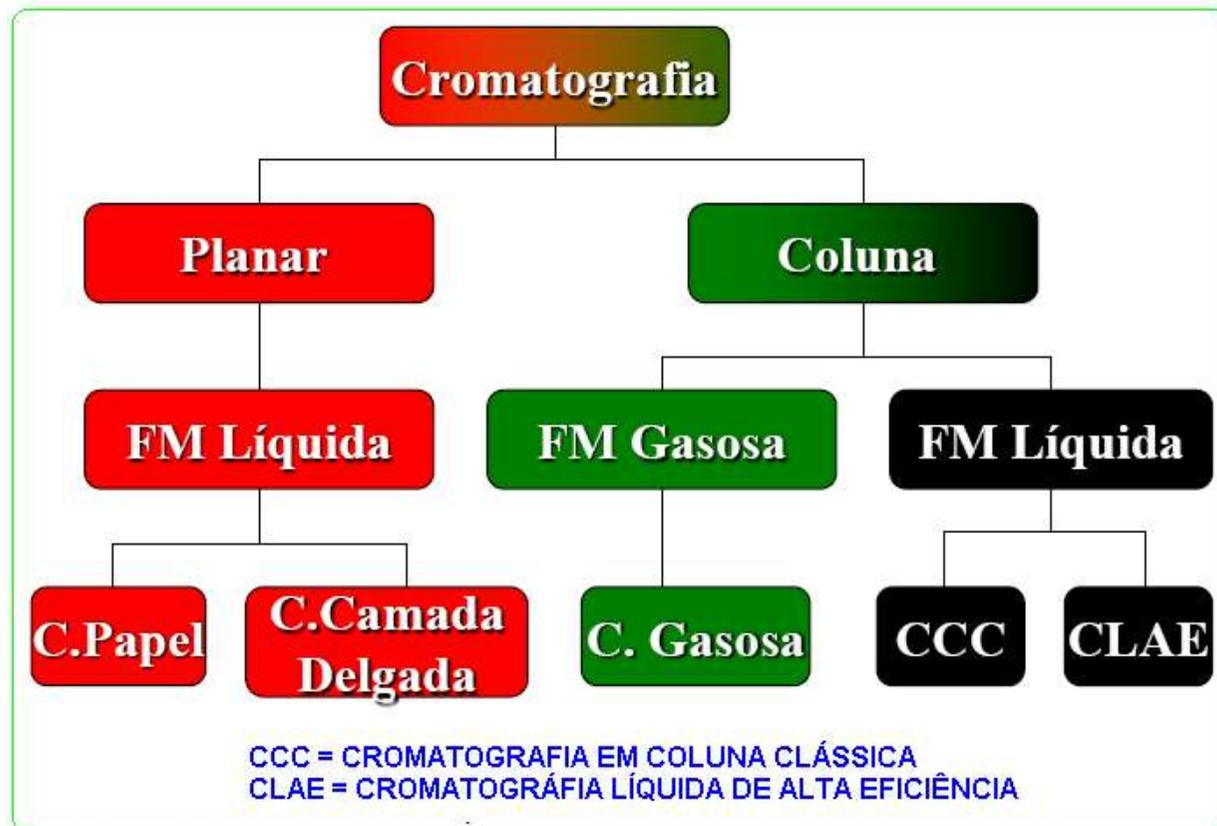
# **CROMATOGRAFIA**

## **CROMATOGRAFIA PLANAR**

**(BAIXO CUSTO)**

# CROMATOGRAFIA PLANAR

## PRINCIPAIS TIPOS DE CROMATOGRAFIA



## **CROMATOGRAFIA PLANAR**

**Cromatografia em Papel  
(CP) ou (CC)**

**Cromatografia em Camada Fina  
(CCF) ou (TLC)**

**Chromatotron (Força centrífuga)  
(CFC)**

## CROMATOGRAFIA PLANAR

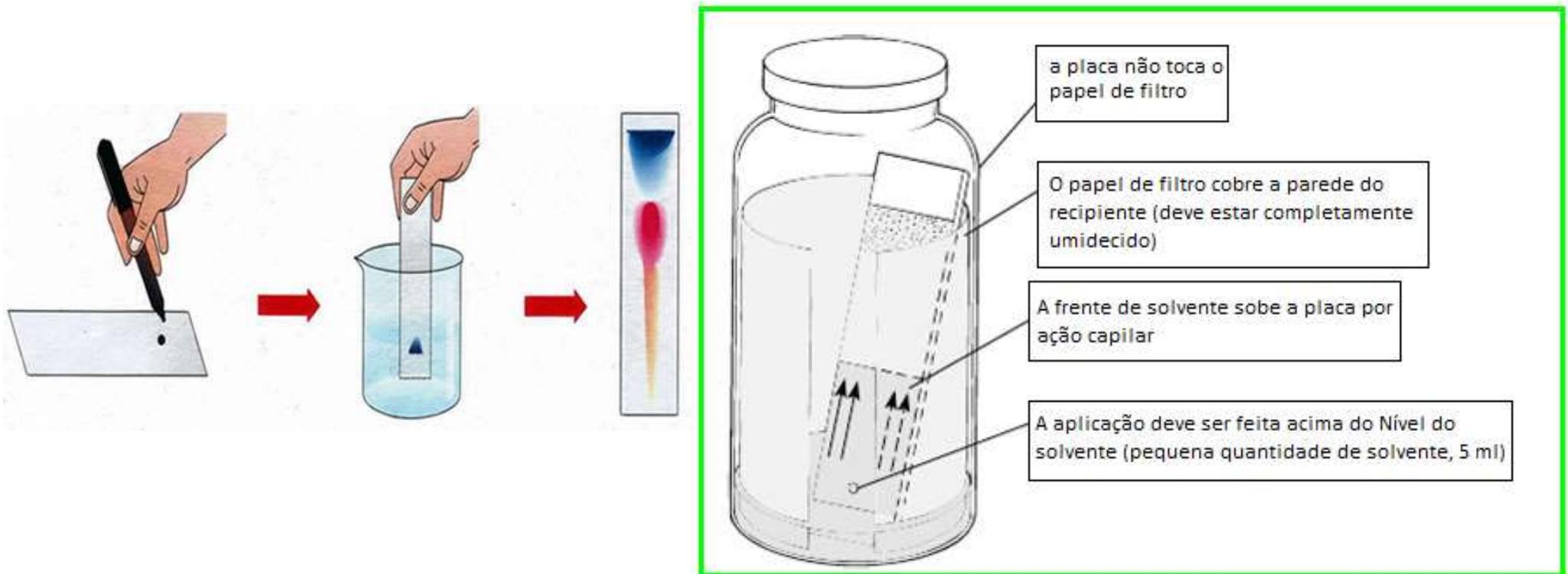
- **OBJETIVO:**
- O objetivo da Cromatografia Planar é empregar um método de baixo custo para:
  - Separar os componentes de uma mistura;
  - Purificar um composto;
  - Isolar um composto;
  - Auxiliar na identificação de um composto.
  - Quantificar e Qualificar

## CROMATOGRAFIA PLANAR

- A forma física do sistema de cromatografia define a técnica geral:
- Cromatografia planar: Fase Estacionária (FE) disposta sobre superfície plana:
  - Thin Layer Chromatography (TLC) - em português conhecida como, Cromatografia de Camada Delgada (CCD) ou Cromatografía em Camada Fina (CCF)
  - Cromatografia em Papel (CP): Fase Estacionária é a próprio papel (celulose).
  - Cromatografia em Placa Preparativa (CPP): Camada de fase estacionária em maior quantidade.

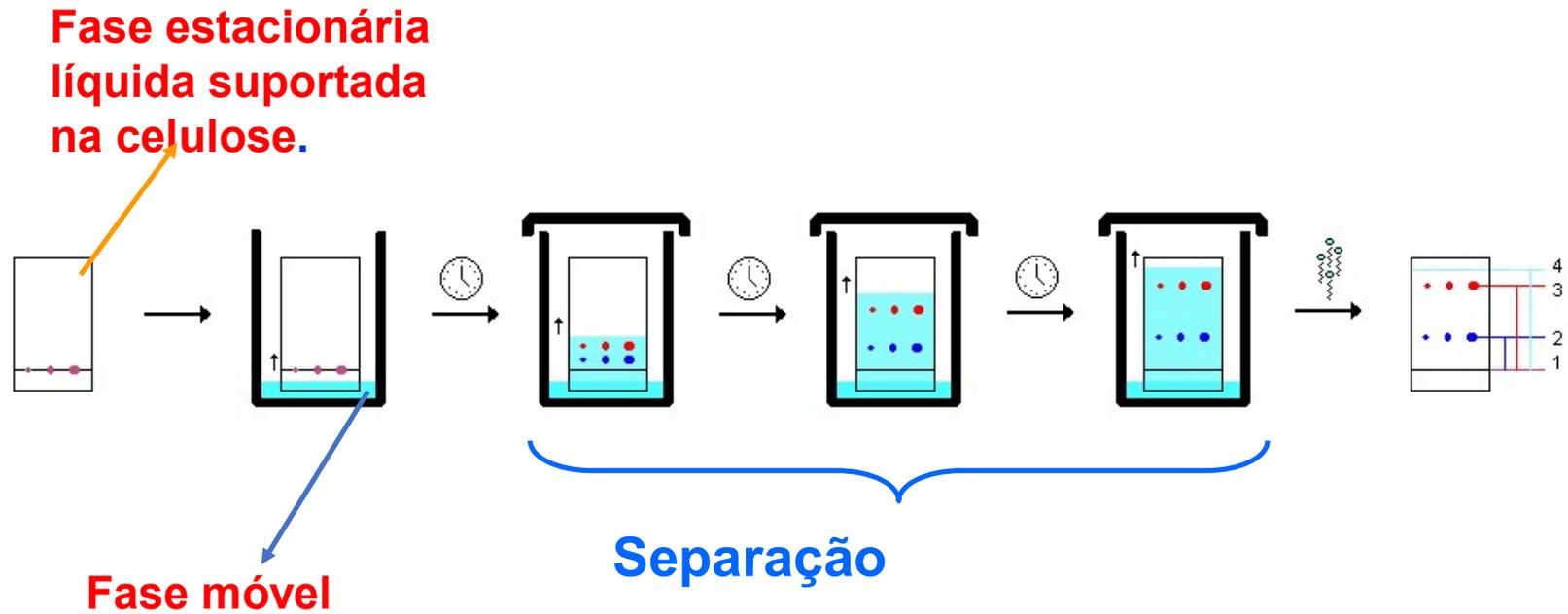
## CROMATOGRAFIA PLANAR

- EXEMPLO DE APLICAÇÃO DO SPOT:



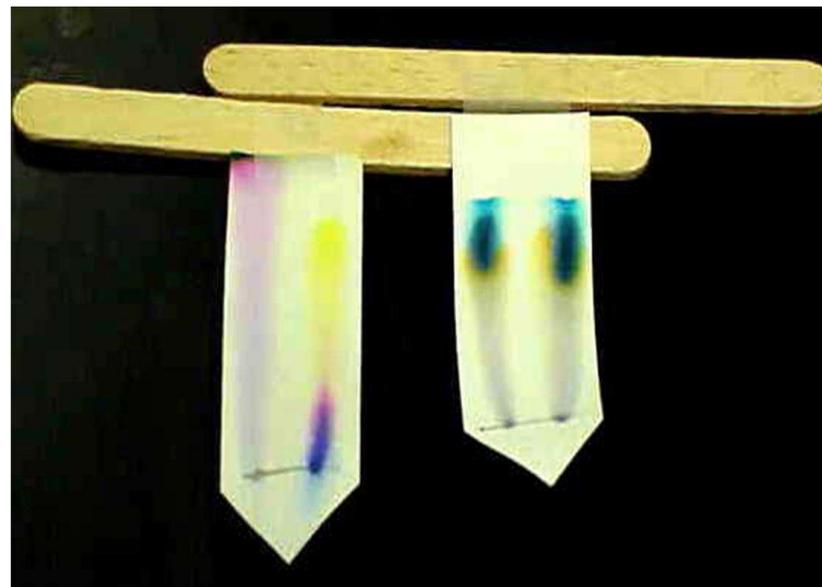
# CROMATOGRAFIA PLANAR

## Cromatografia em papel – CP (Separação)



# CROMATOGRAFIA PLANAR

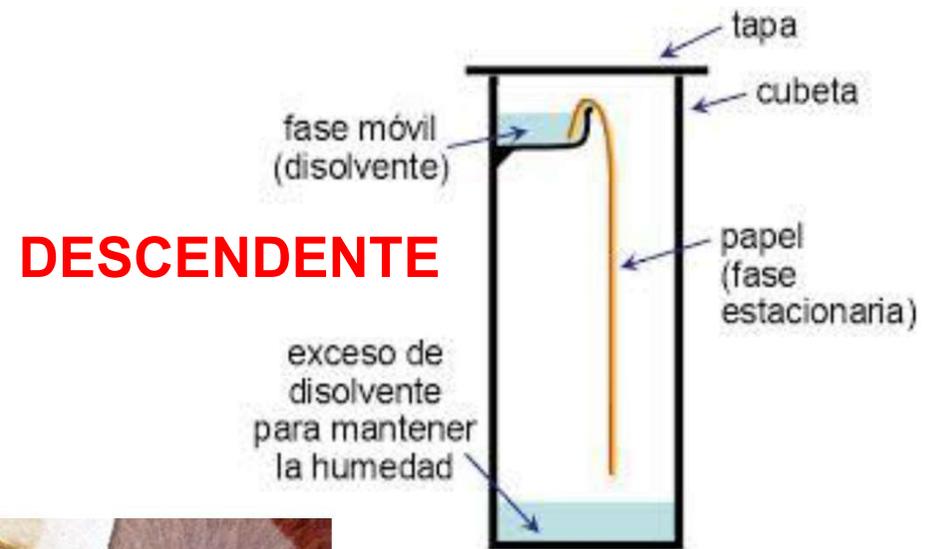
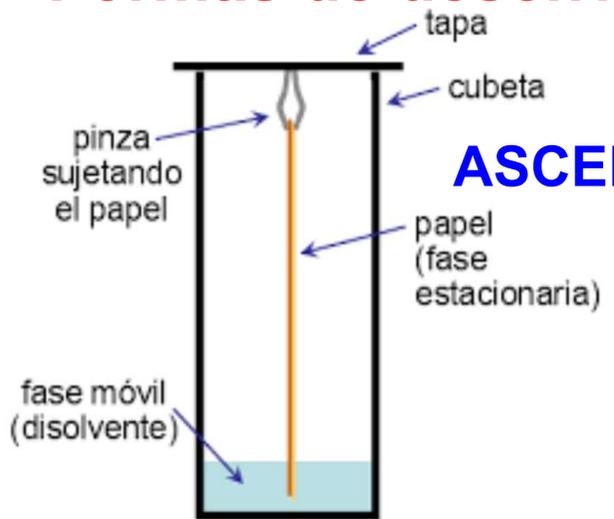
## Cromatografia em papel - CP



# CROMATOGRAFIA PLANAR

## Cromatografia em papel

**Formas de desenvolvimento: ascendente/descendente/circular**

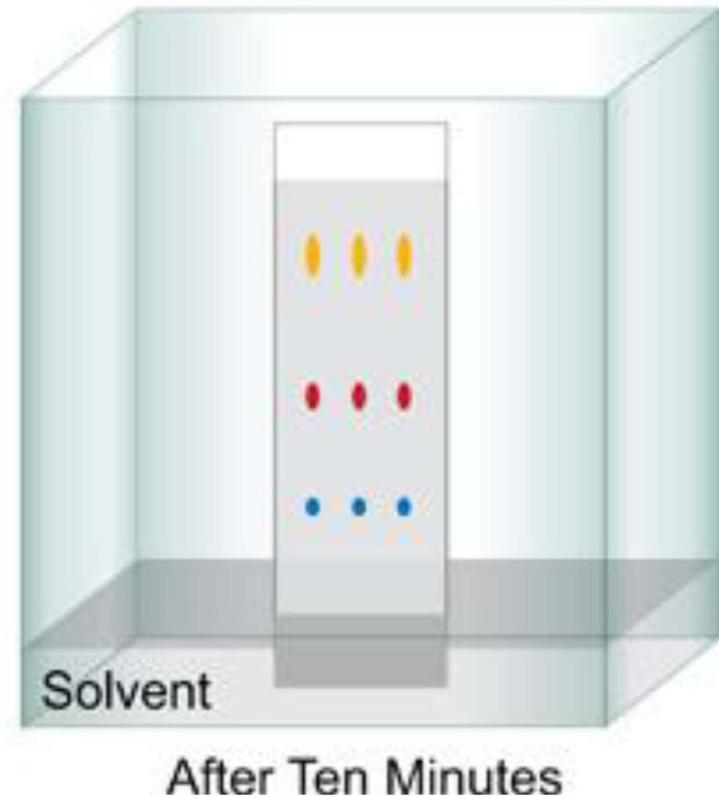
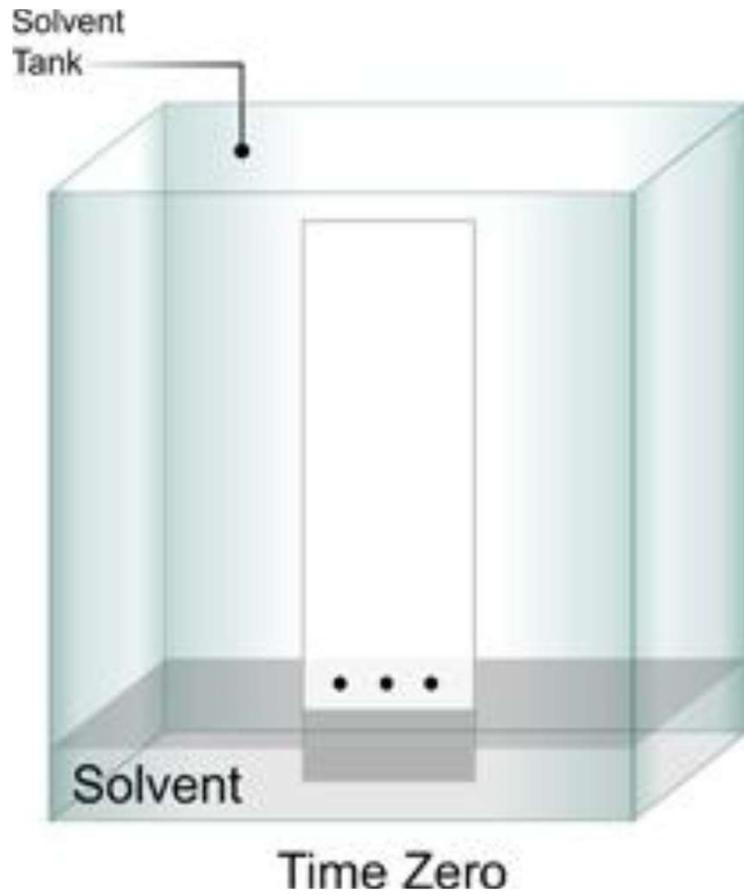


**CIRCULAR**



# CROMATOGRAFIA PLANAR

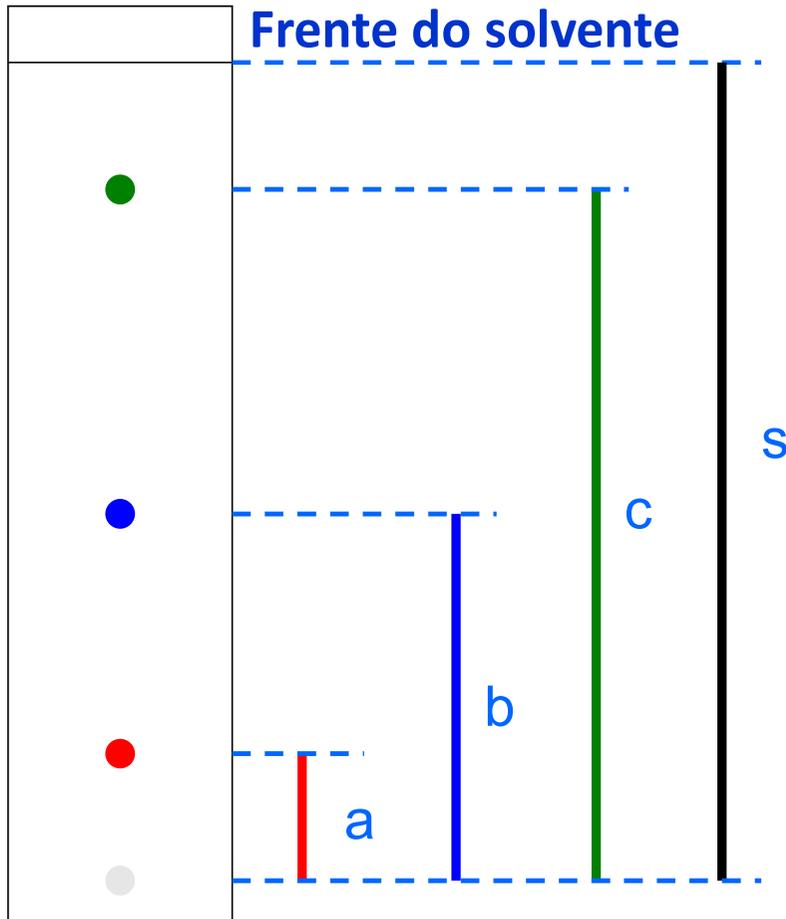
## Cromatografia de Camada Delgada – CCD ou TLC



# CROMATOGRAFIA PLANAR

## Cromatografia de Camada Delgada - CCD

### Termos e parâmetros técnicos



$$R_f = \frac{\Delta S_{mancha}}{\Delta S_{solvente}}$$



$$R_{f_a} = \frac{a}{s}$$

$$R_{f_b} = \frac{b}{s}$$

$$R_{f_c} = \frac{c}{s}$$

# CROMATOGRAFIA PLANAR

## Cromatografia de Camada Delgada - CCD

### FASES ESTACIONÁRIAS

Sílica ( $\text{SiO}_2$ )

Alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )

Celulose

Poliamida

Ativação de 30 a 60 min  
de 105 a 110 °C

Ativação de 10 min  
a 105 °C

# **CROMATOGRAFIA PLANAR**

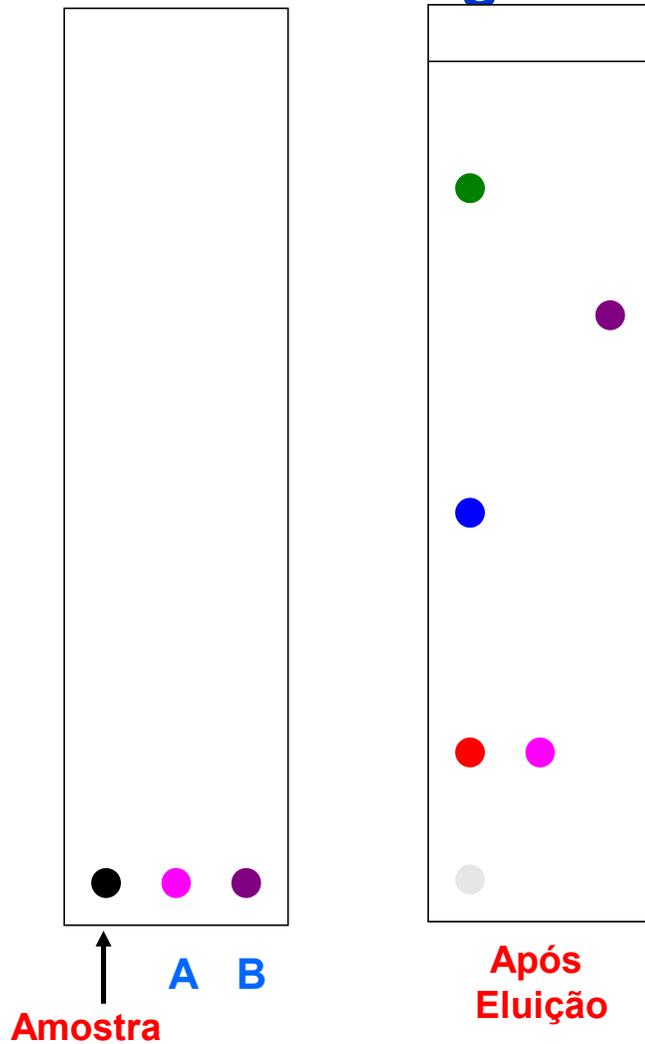
## **Cromatografia de Camada Delgada - CCD**

### **ANÁLISE QUALITATIVA**

- **Comparação com valores de  $R_f$  tabelados**
- **Comparação com padrão eluído em conjunto**
- **Extração e aplicação de métodos instrumentais**

# CROMATOGRAFIA PLANAR

## Cromatografia de Camada Delgada - CCD



### CONCLUSÕES:

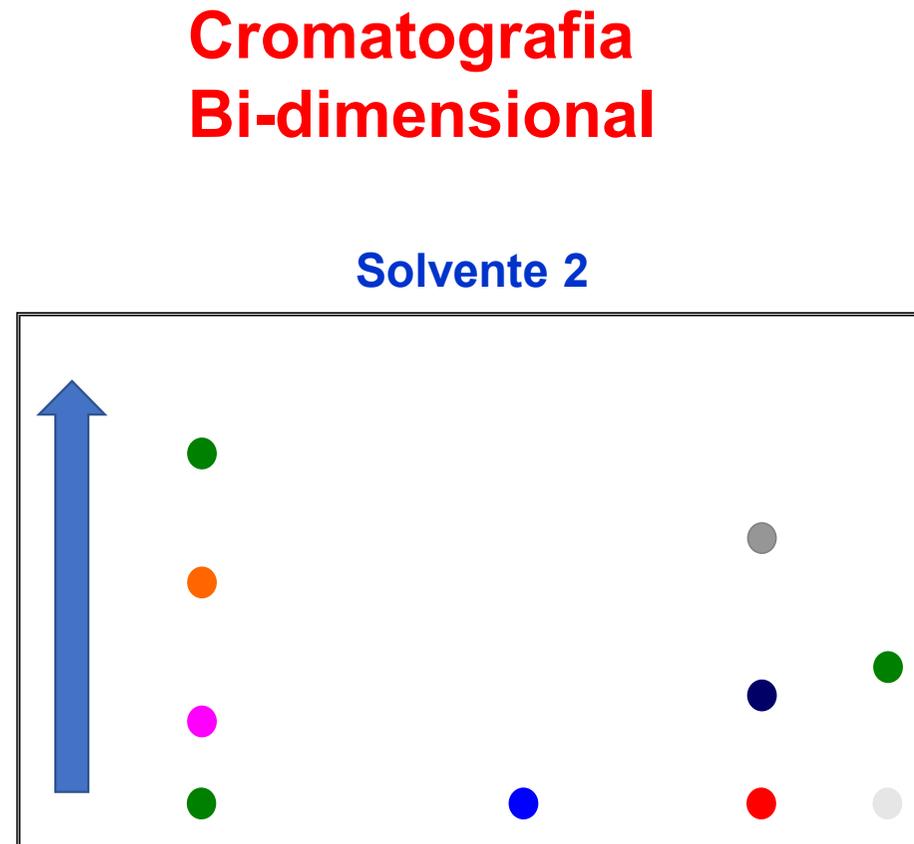
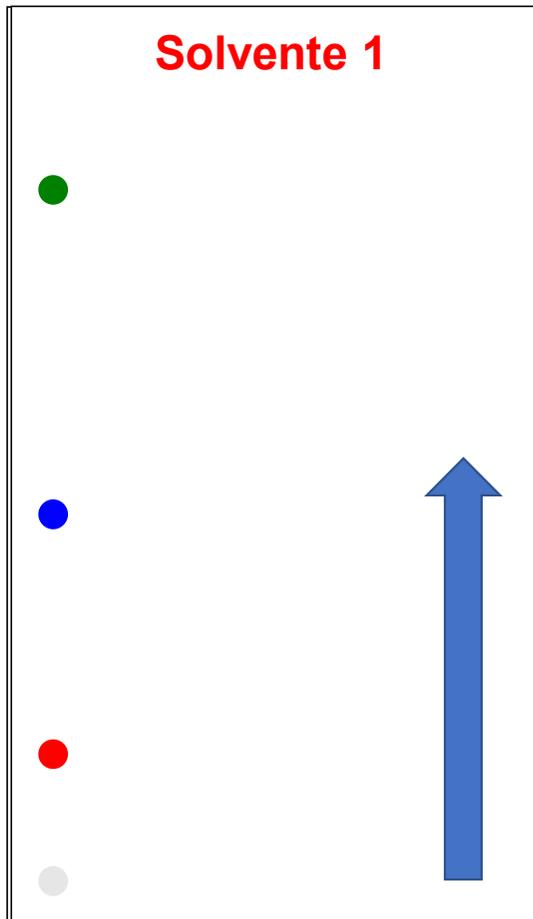
Amostra não contém a espécie B

Amostra pode conter a espécie A

Para se certificar da presença,  
eluir em outros solventes

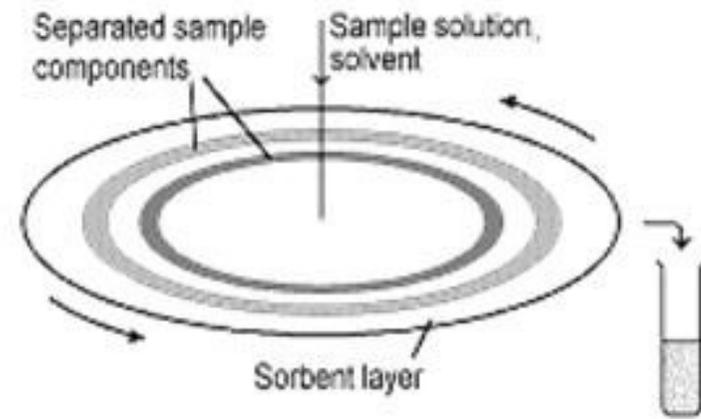
# CROMATOGRAFIA PLANAR

## Cromatografia de Camada Delgada - CCD



# CROMATOGRAFIA PLANAR

## Chromatotron



**CHROMATOTRON** é uma cromatografia de camada fina preparativa acelerada centrifugamente. Pode substituir pequenas colunas e HPLC.

## CROMATOGRAFIA PLANAR

### REVELADOR (DETECÇÃO):

- **Revelação:** É uma maneira de tornar as manchas visíveis (pode ser líquido, gás e luz).

### Reveladores que não destroem a amostra

- **Placas com indicador de fluorescência:**  
Lâmpada de Ultravioleta.
- **lôdo ressublimado:** Vapor de lôdo

# **CROMATOGRAFIA PLANAR**

## **REVELADOR (DETECÇÃO)**

**Revelação com destruição das amostras:  
(aquecimento ~110° C)**

**(BORRIFA SOBRE A PLACA)**

- **Solução especial de Ácido Molibidico**
- **Solução especial de Nitrato de Prata**
- **Solução especial de Ninidrina**
- **Solução especial de 2,4-dinitrofenilhidrazina**
- **Solução especial de ácido sulfúrico.**
- **Entre outra centenas**

# CROMATOGRAFIA PLANAR

## VANTAGENS DA CCD:

- Fácil execução;
- Maior rapidez;
- Menor trajeto da fase móvel ;
- Boa resolução;
- Manchas em geral menos difusas;
- Baixo custo;
- Versatilidade.

# CROMATOGRAFIA PLANAR

## DESVANTAGENS DO CCD

- **Difícil reprodutibilidade:** é muito difícil a confecção de duas placas idênticas, com a mesma quantidade de amostra, etc;
- **Difícil determinação exata do  $R_f$ .**

## CROMATOGRAFIA PLANAR

- Quais misturas podem ser separadas por **cromatografia planar**?
- Qualquer composto que poder ser “arrastado” por solvente, por capilaridade.

# CROMATOGRAFIA PLANAR

## TERMOS EMPREGADOS EM CCD

- **Eluição:** Processo de carregamento do soluto
- **Soluto:** Mistura dos componentes da amostra
- **Fase Estacionaria (FE):** Líquido ou sólidos que permanece dentro da coluna ou sobre as placas ou o próprio papel.
- - **Cromatografia em Fase normal:** FE mais polar que a FM
- - **Cromatografia em Fase Reversa:** FM mais polar que a FE
- **Fase Móvel (FM) (Eluente):** Líquido ou gás que se move através da coluna ou sobre as placas.

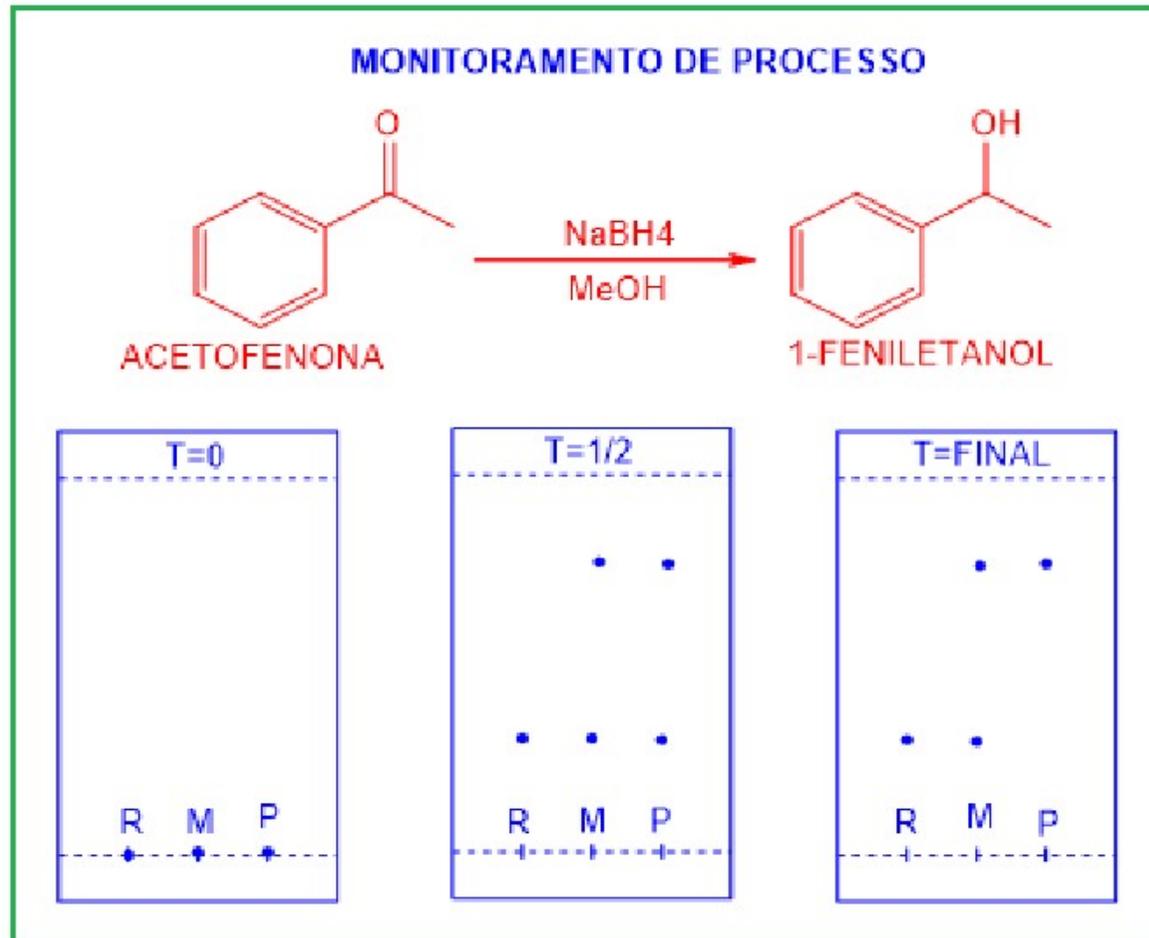
# CROMATOGRAFIA PLANAR

- **MATERIAIS : (Cromatografia Planar)**
  - **Cuba de vidro = [20cm (altura) X 20cm (largura) X espessura 3mm]**
  - **Cuba de vidro = [10cm (altura) X 5cm (largura) X espessura 3mm]**
  - **Aplicador do spot: Capilar de vidro = (~1mm de diâmetro) ou pipeta de Pasteur ou agulha de injeção, com ponta fina.**
  - **FE = Placa de sílica ou alumina ou celulose depositada sobre vidro ou alumínio.**
  - **FE = Papel celulose para cromatografia**
  - **FM = Solventes**
  - **Papel de Filtro (Saturação)**

# CROMATOGRAFIA PLANAR

- **Materiais: (Cromatografía Planar)**
  - **Suporte:** Placa de alumínio/SG(outros) ou Placa de vidro/SG (outros)
  - **FE:** Sílica, alumina, Carbonato, etc...
  - **FE:** Papel para cromatografia (Papel especial)
  - **Solventes** : Hexano, Acetato de etila, metanol, etanol, etc...
  - **Reveladores:** Vapores de iôdo, Solução de ácido sulfúrico, solução de ácido molibdico, etc....

# CROMATOGRAFIA PLANAR



# **CROMATOGRAFIA PLANAR**

**FIM DA**

**CROMATOGRAFIA PLANAR**

# **CROMATOGRAFIA EM COLUNA**

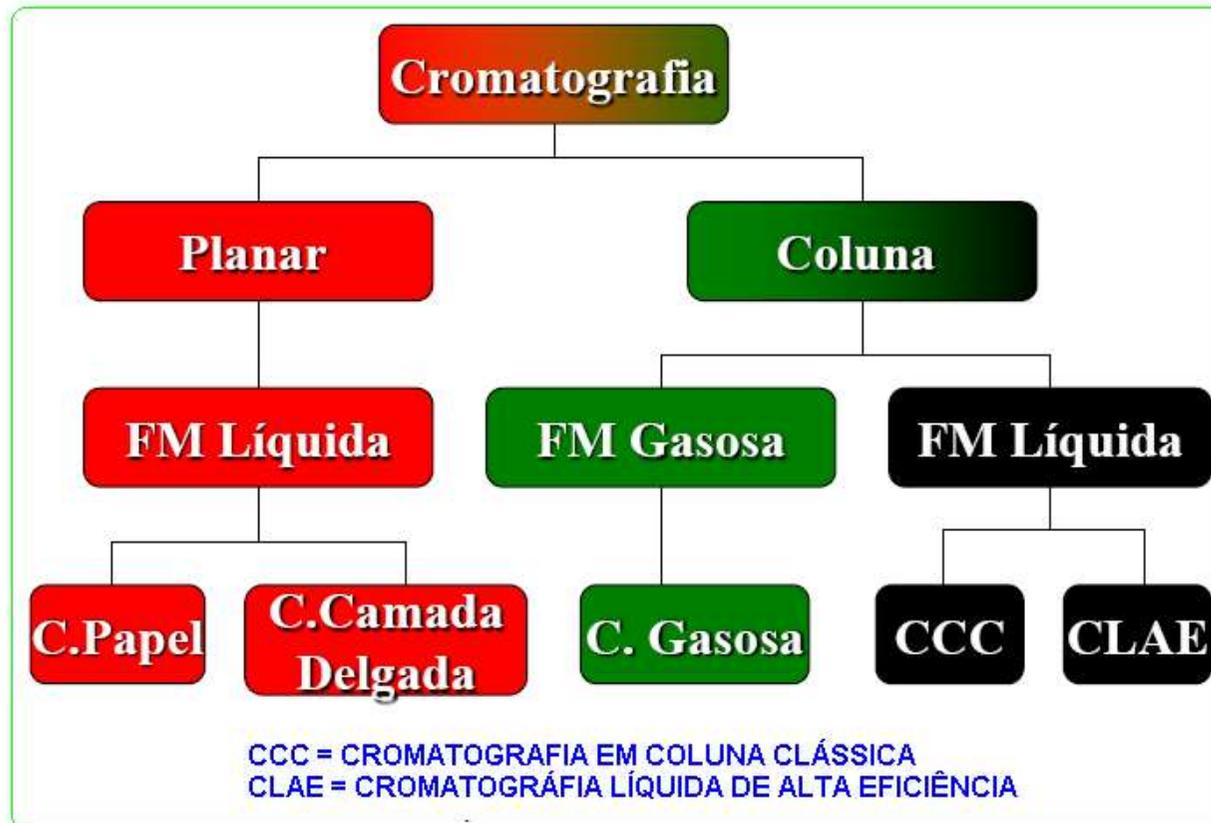
**CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CLÁSSICA  
(CLC)**

**OU**

**CROMATOGRAFIA EM COLUNA CLÁSSICA  
(CCC)  
(BAIXO CUSTO)**

# CROMATOGRAFIA EM COLUNA

## PRINCIPAIS TIPOS DE CROMATOGRAFIA



## CROMATOGRAFIA EM COLUNA

- Quais misturas podem ser separadas por **cromatografia em coluna de vidro (CLC)** a pressão atmosférica?
- Qualquer composto que poder ser “arrastado” pelo solvente por **gravidade**.

## CROMATOGRAFIA EM COLUNA

- **CARACTERÍSTICAS DO CCC:**
- **Cromatografia Líquida Clássica (CLC):** fase estacionária (FE) colocada em tubo de vidro cilíndrico (Vários diâmetros).
- De acordo com a quantidade de amostra determina-se o **diâmetro** e **altura da coluna**:
  - **Preparativa (Maior diâmetro)**
  - **Analítica (Diâmetro médio)**
  - **Micro (Diâmetro pequeno)**

# CROMATOGRAFIA EM COLUNA

## APLICAÇÃO:

- Agricultura (Pecuária, Veterinária)
- Alimentícia
- Cosméticos (Higiene, Perfumes)
- Farmacêutica (Farmacos)
- Medicina (Hospitais e Clínicas)
- Meio Ambiente (Resíduos, Águas)
- Petroquímica (Derivados)
- Embalagens
- Mineração
- Produtos Naturais (fragâncias, essências, princípios ativos)
- Química (matéria-prima, catalisadores, aditivos)
- Entre outros

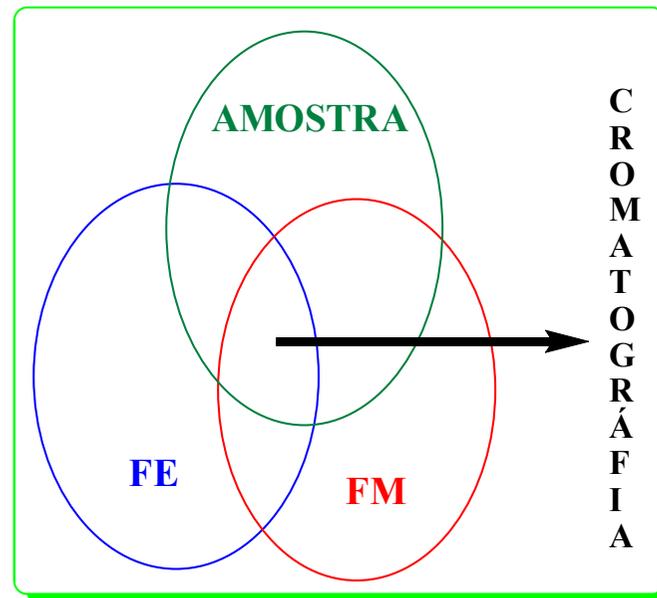
## CROMATOGRAFIA EM COLUNA

- **Cromatografia Líquida Clássica (CLC):** Coluna de vidro a pressão atmosférica, fluxo de Fase Móvel (FM) devido a **gravidade**.
- **Coluna Flash (CF):** Além da **gravidade** é auxiliado por um fluxo de nitrogênio ou ar. (MUITO USADA).
  - **FM** = Líquida (qualquer solvente ou misturas deles) Ex. Acetato de etila, diclorometano, hexano, metanol, etc....
  - **FE** = Sílica Gel, Alumina, etc....

# CROMATOGRAFIA EM COLUNA

## MECANISMO DE SEPARAÇÃO

- A separação cromatográfica é realizada a partir de interações diferenciadas entre os **analitos** componentes da mistura, fase estacionária e fase móvel



# CROMATOGRAFIA EM COLUNA

## FORÇAS INTERIÔNICAS QUE ATUAM CLC:

- A diferença na magnitude dessas forças que determina a resolução e portanto a separação dos solutos individuais.
- As forças elementares que agem sobre as moléculas são de **cinco tipos**:
  - 1) Forças de dispersão de London ou forças de Van der Waals;
  - 2) Interações de dipolo induzido;
  - 3) Ligações de hidrogênio;
  - 4) Interações dielétricas;
  - 5) Interações eletrostáticas e coulombianas.
- **OBS.: Gravidade**

# CROMATOGRAFIA EM COLUNA

## DESVANTAGENS DA CCC

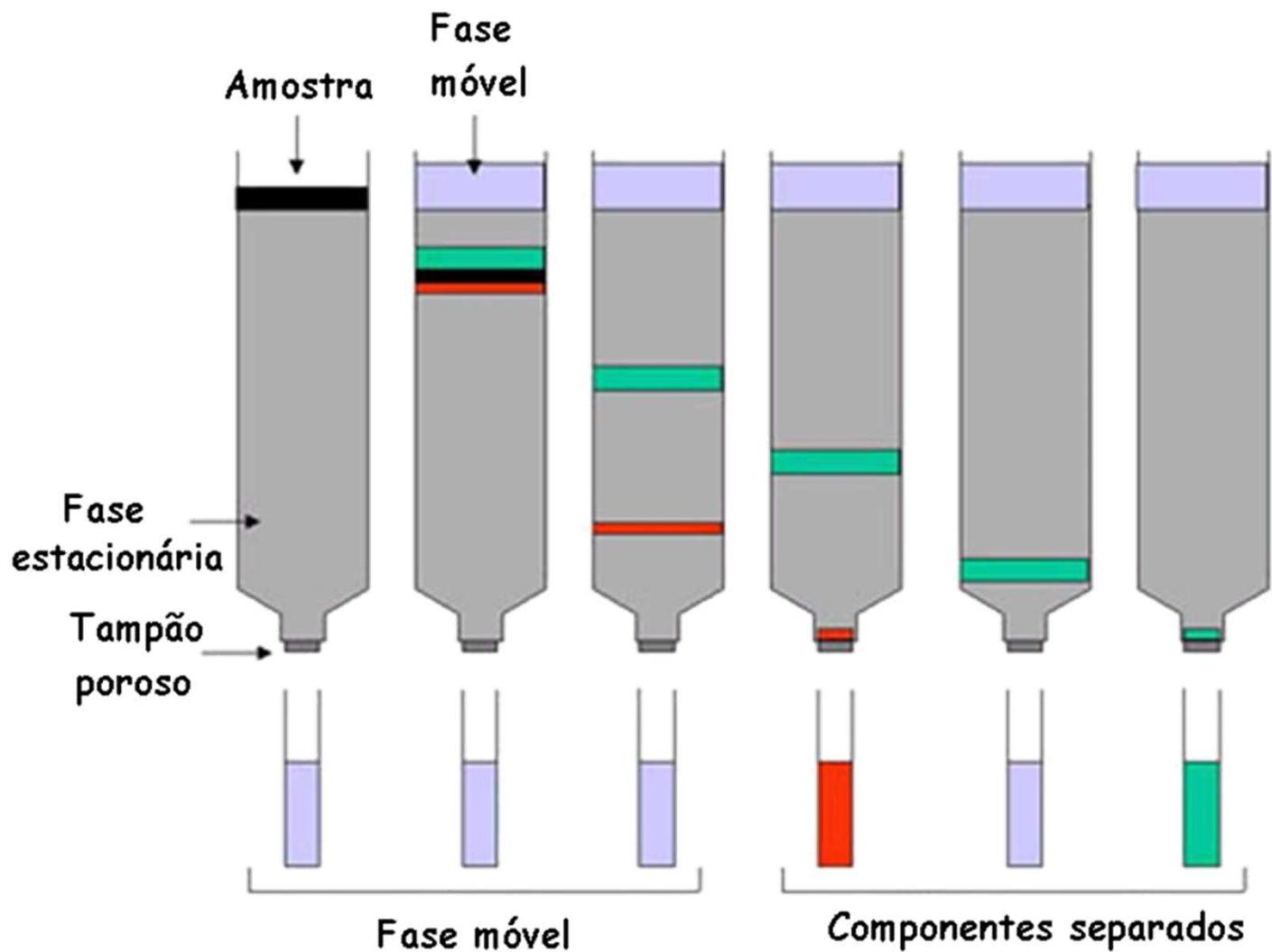
- Na Cromatografia Líquida Clássica (CLC) o **recheio** da coluna é utilizado geralmente **uma só vez**, porque parte da amostra usualmente se adsorve de forma irreversível.
- O **enchimento** da coluna deve ser repetido para **cada separação**.
- **Não repetibilidade no recheio da CCC**

# CROMATOGRAFIA EM COLUNA

## DETALHAMENTO CCC

- Coluna de vidro de vários diâmetros e vários tamanhos depende da quantidade de amostra e qual a finalidade.
- Algodão ou vidro sinterizado adaptado a coluna.
- **PROPORÇÃO FE/ AMOSTRA**
- Ex.: Geralmente utiliza-se: 1g da amostra /80g de sílica gel para purificações difíceis.

# CROMATOGRAFIA EM COLUNA



# CROMATOGRAFIA EM COLUNA

## ELUENTES: SÉRIE ELUOTRÓPICA

- - pentano
- - éter de petróleo
- - ciclohexano
- - benzeno
- - clorofórmio
- - éter etílico aumento da polaridade
- - acetato de etila
- - acetona
- - propanol
- - etanol
- - metanol
- - água

## **CROMATOGRAFIA EM COLUNA**

### **ISOLAR/ANÁLISAR**

- **Após a separação (Diversos Frascos) evaporamos o solvente e analisamos por IV, AE, RMN, Massa, CG e HPLC cada frasco.**
- **Caso não tenha separado, fazemos uma nova coluna e o processo todo é repetido, até obter o composto puro e identificado.**

# CROMATOGRAFIA

**FIM DA CROMATOGRAFIA PLANAR  
E  
CCC**