

ANÁLISE INSTRUMENTAL

CROMATOGRÁFIA EM COLUNA - CG (TEORIA)

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

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

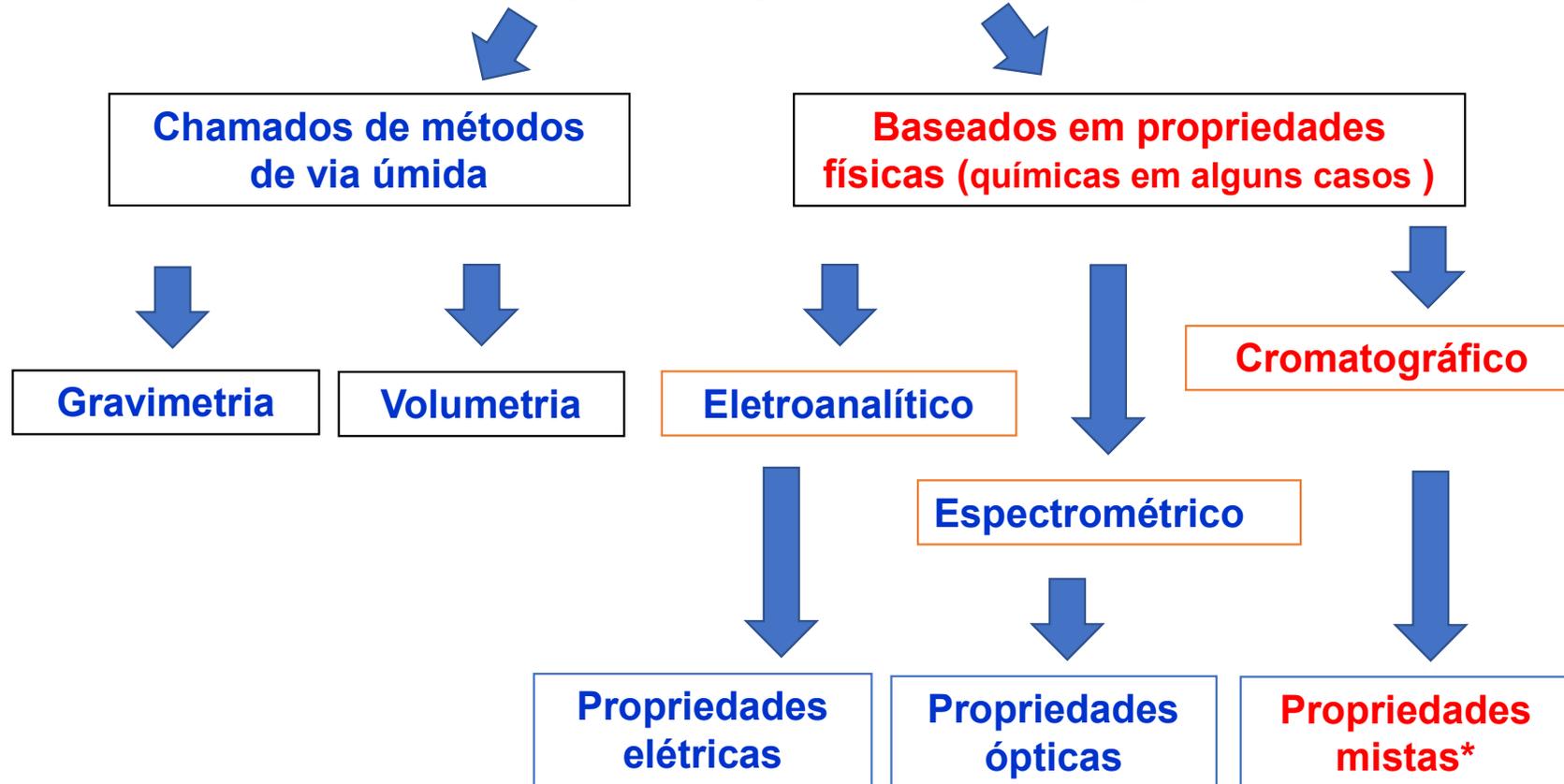
- PLANO DE AULA:

- (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

OBJETIVO

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

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

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

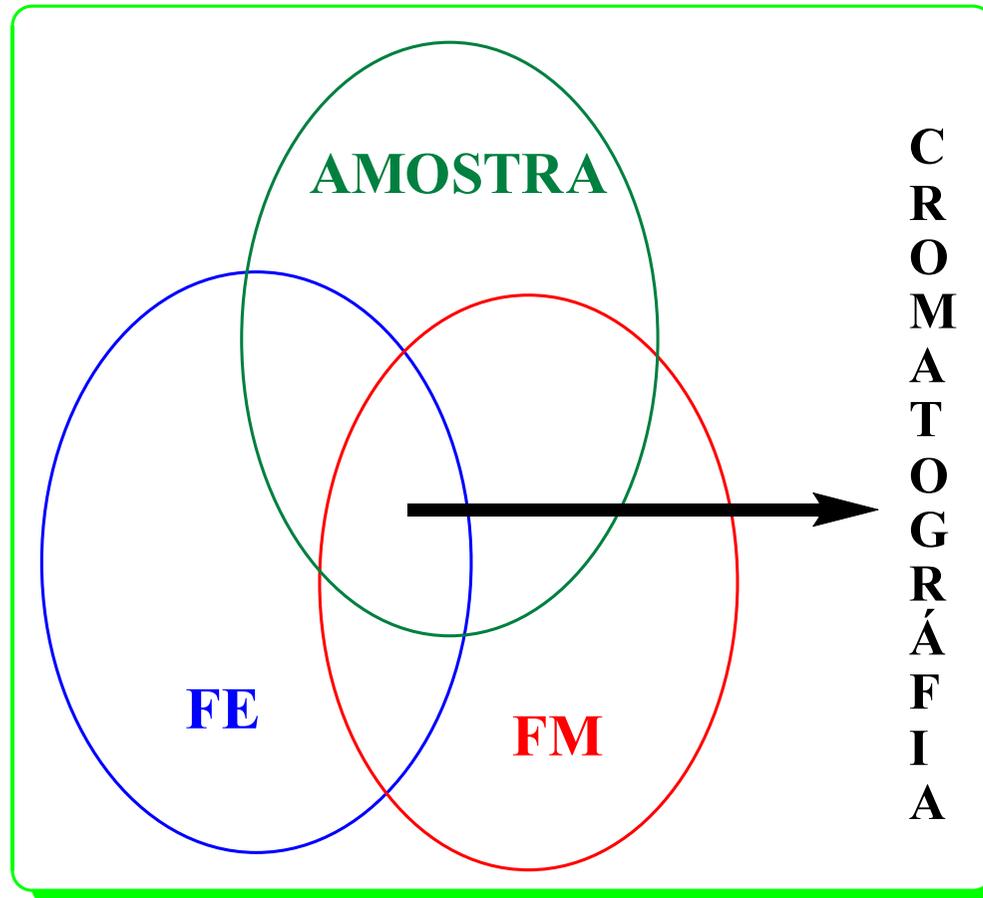
DEFINIÇÃO - PRINCÍPIO BÁSICO

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 EM COLUNA - CG

MECANISMO DE SEPARAÇÃO



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

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/Gravidade/Pressão**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

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 EM COLUNA - CG

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 EM COLUNA - CG

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 EM COLUNA - CG

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 EM COLUNA - CG

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

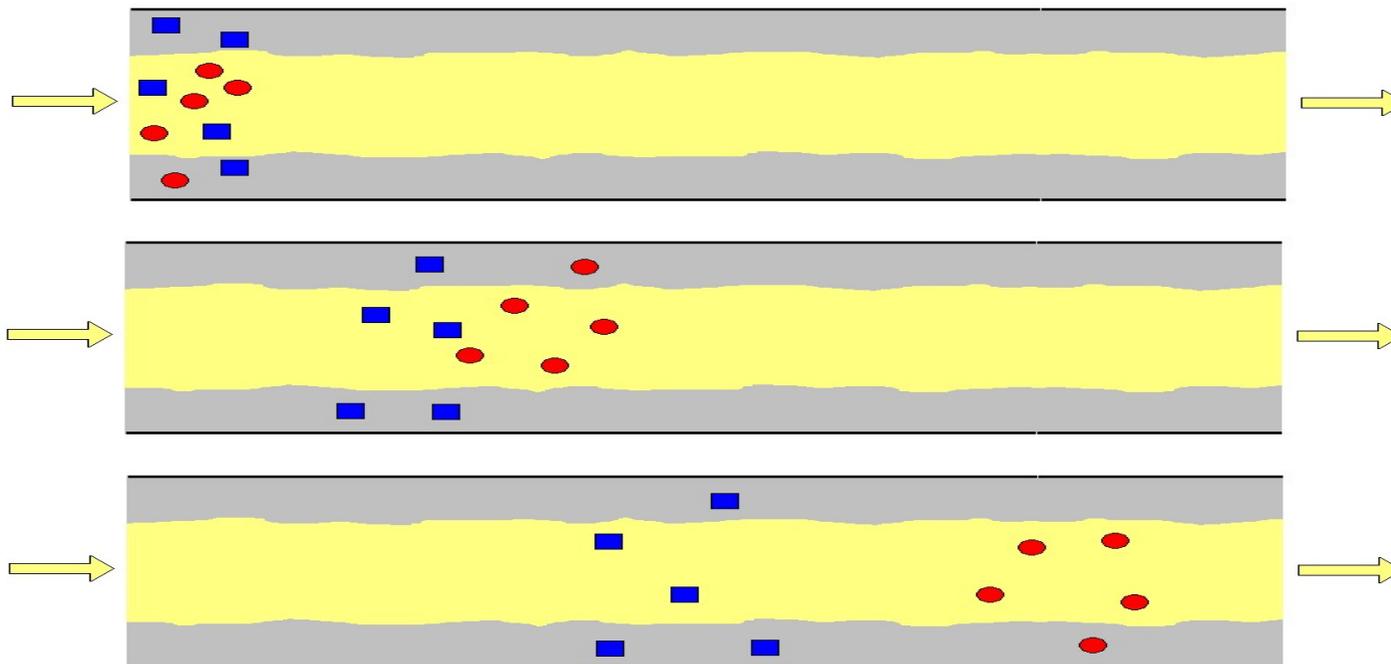


Analitos

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

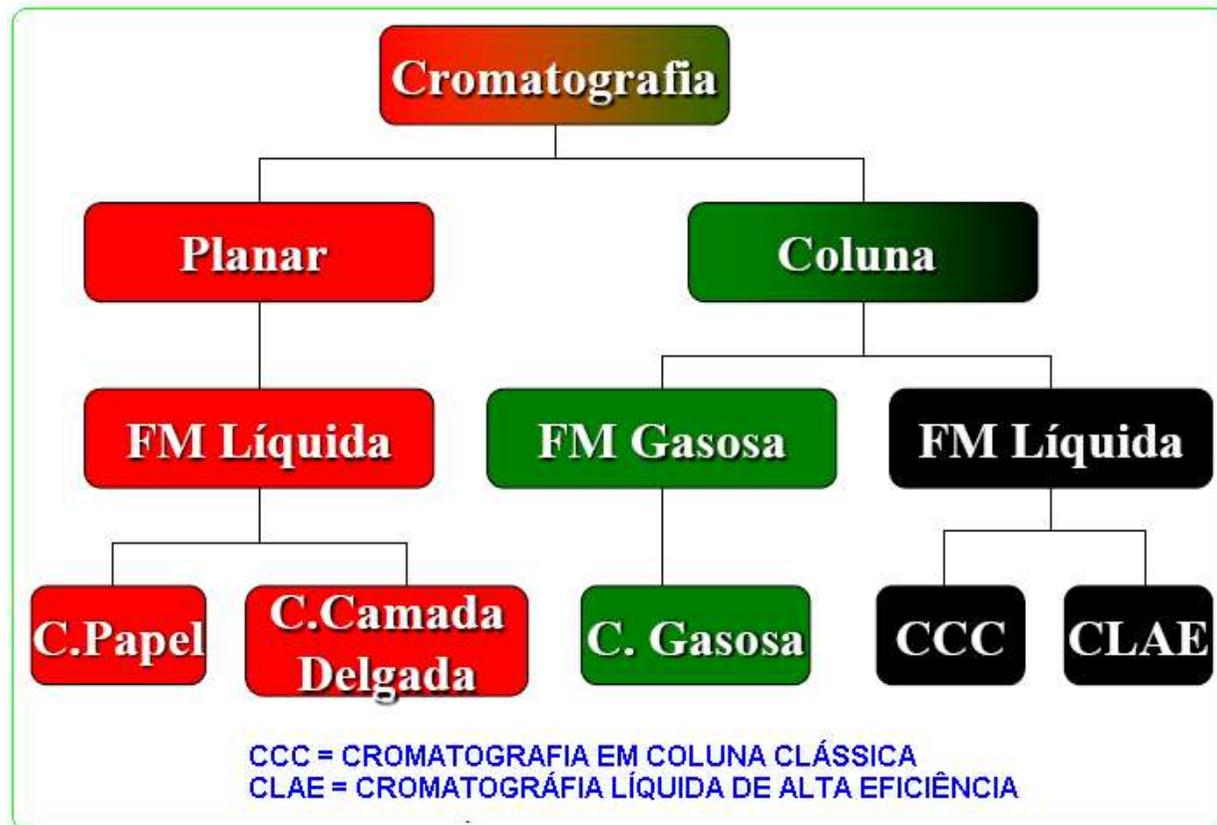
PRINCÍPIO BÁSICO

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



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

PRINCIPAIS TIPOS DE CROMATOGRAFIA



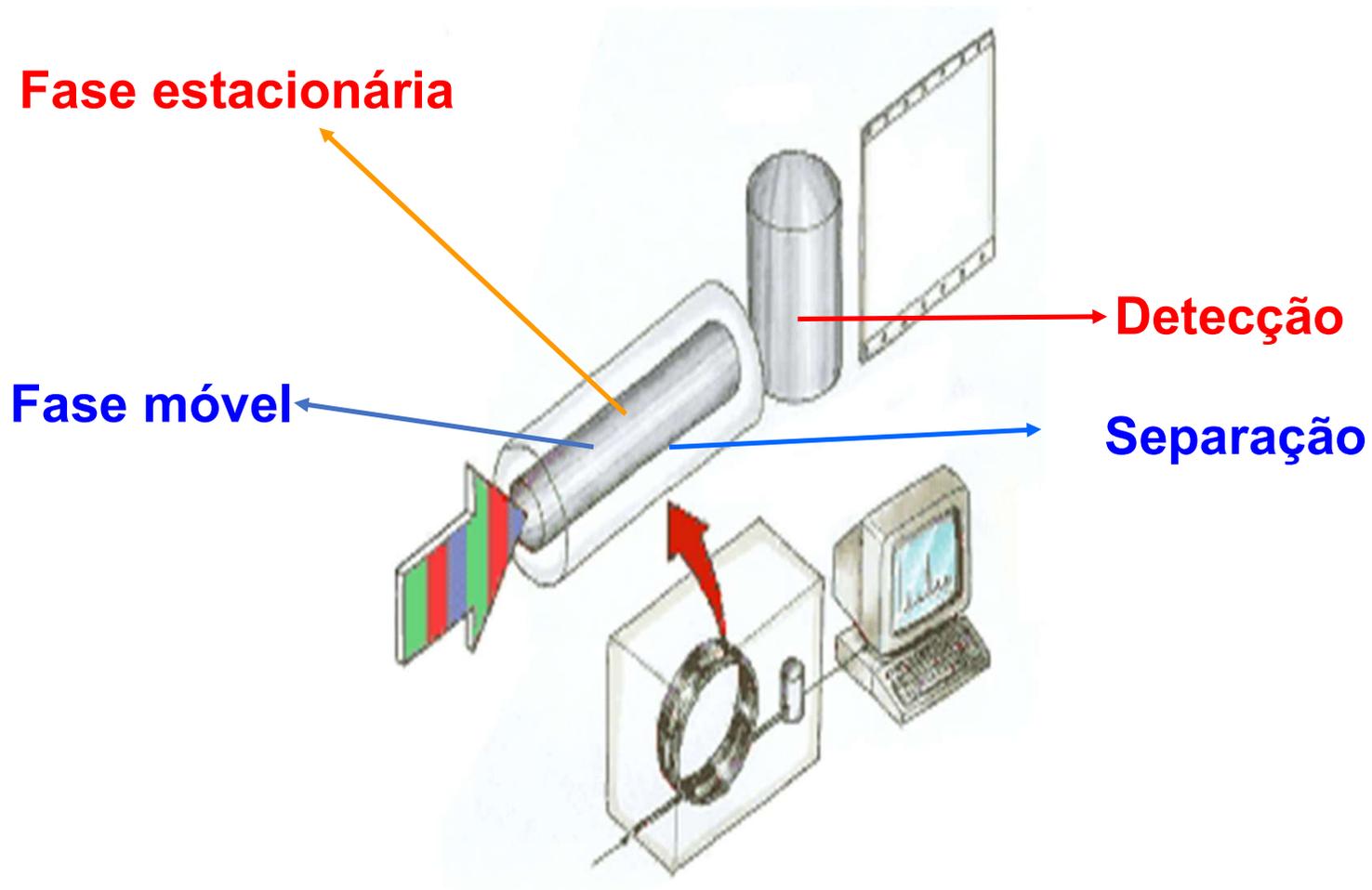
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

CROMATÓGRAFO A GÁS (CG)



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

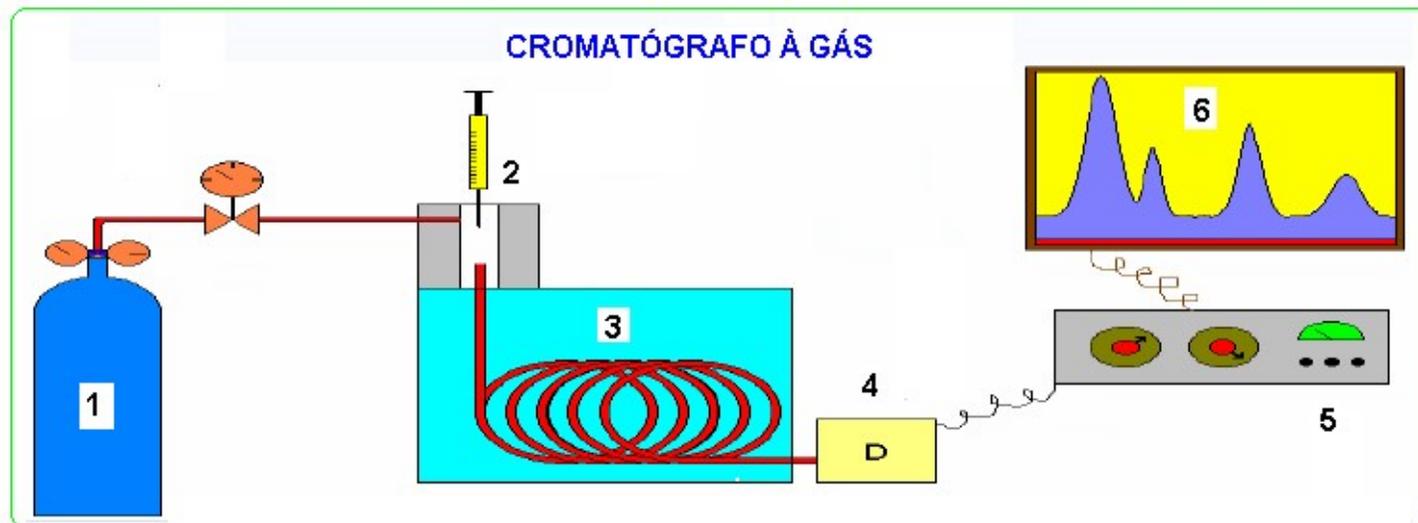
CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

PARTES PRINCIPAIS DO CG

- 1-Reservatório de Gás e Controles de Vazão / Pressão. 2-Injetor (Vaporizador) de Amostra. 3-Coluna Cromatográfica e Forno da Coluna. 4-Detector. 5-Eletrônica de Tratamento (Amplificação) de Sinal. 6-Registro de Sinal (Registrador/Integrador).



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- 1-RESERVATÓRIO DE GÁS E CONTROLES DE VAZÃO / PRESSÃO.

FASE MÓVEL (GÁS DE ARRASTE)

Gases mais usados (N_2 , He, H_2 e Ar).

Não deve interagir com o recheio da coluna e ser compatível com o detector e de alta pureza (H_2O/HC)



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- **FASE MOVEL (GÁS DE ARRASTE)**
- **Sua escolha depende:**
 - Do tipo de coluna (empacotada ou capilar).
 - Do tipo de detector que está sendo usado.
 - Da amostra a ser analisada.
- **OBS.: Colunas capilares, normalmente necessita-se um gás auxiliar (make up) para o detector, para obter sensibilidade otimizada.**
- **Coluna capilar – d.i. < 0.32mm**
- **HIDROGÊNIO - Ideal**
- **HÉLIO – aceitável**
- **NITROGÊNIO – menos aceitável**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Características do Gás de Arraste (FM)

INERTE: Não deve reagir com a amostra, nem com a fase estacionária ou superfícies do instrumento.

PURO: Deve ser isento de impurezas que possam degradar a fase estacionária.

Impurezas típicas em gases e seus efeitos:

H_2O, O_2



oxida / hidrolisa algumas FE
incompatíveis com DCE

hidrocarbonetos

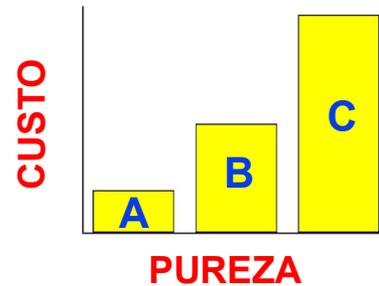


ruído no sinal de DIC

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Características do Gás de Arraste (FM)

CUSTO: Gases de altíssima pureza podem ser muito caros.



A = 99,995 % (4.5)

B = 99,999 % (5.0)

C = 99,9999 % (6.0)

COMPATÍVEL COM DETECTOR: Cada detector demanda um gás de arraste específico para melhor funcionamento.

Seleção de Gases de Arraste em Função do Detector:

DCT → He , H₂

DIC → N₂ , H₂

DCE → He, N₂ (SS), P-5 ou P-10
(P-5 = Argônio + 5% CH₄)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

2-INJETOR (VAPORIZADOR) DE AMOSTRA

- **Parte do cromatógrafo a gás onde a amostra é introduzida no cromatógrafo a gás**
 - Vaporiza amostra (solvente + compostos alvo)
 - Mistura vapor com fase móvel (gás de arraste)
 - Transfere vapor para dentro da coluna
- **Forma mais simples:**
 - Câmara de aquecimento
 - Cobertura do injetor/dispositivo de vidro
 - Linhas de fluxo de gás

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

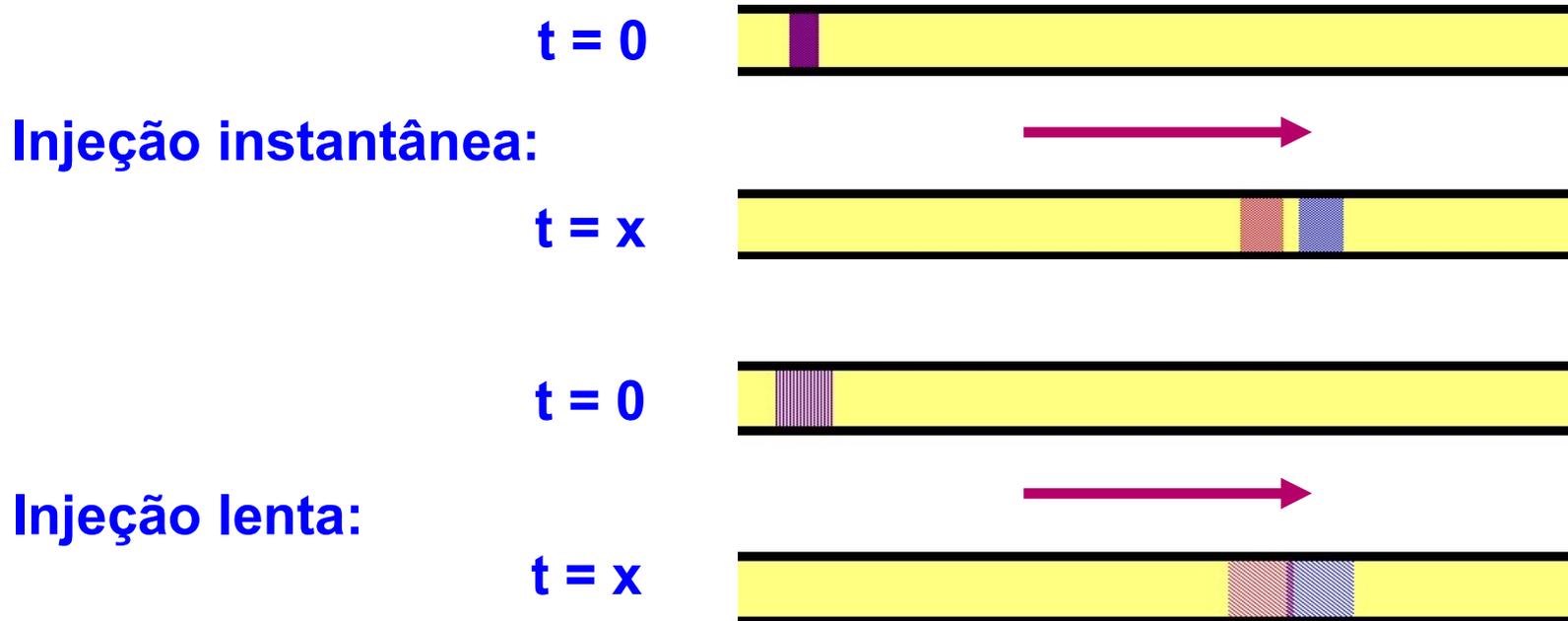
SISTEMA DE INJEÇÃO DA AMOSTRA

- **Injeção (seringas ou válvulas)**
 - Pode injetar líquido, gás, sólido/líquido
 - Gerar banda única e estreita.
 - Quantidade de amostra não deve ultrapassar a capacidade da coluna.
 - **Reprodutível.**
 - Aquecimento para vaporização total da amostra.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

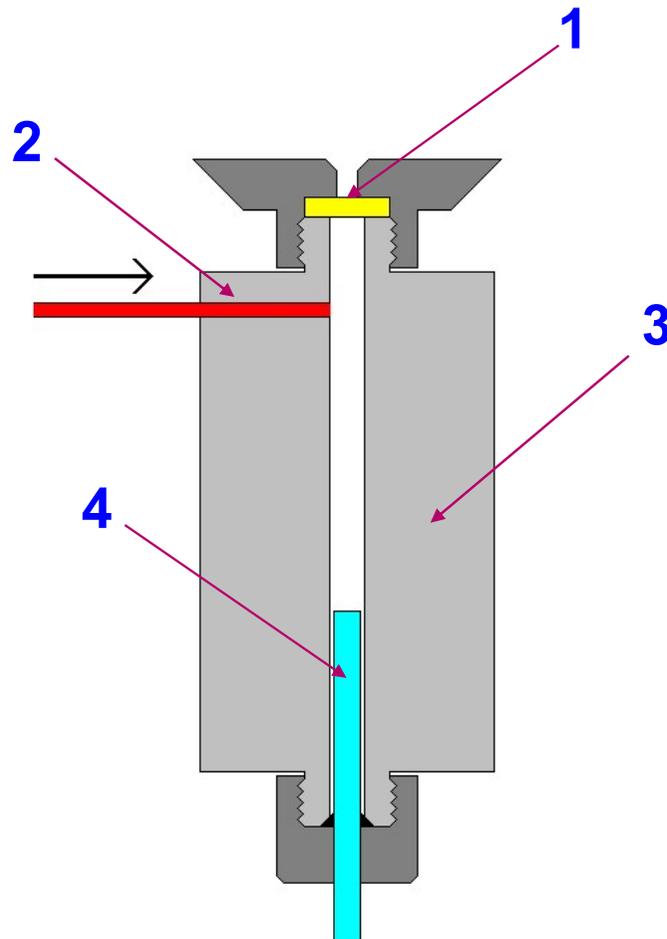
INJETOR

Os dispositivos para injeção (INJETORES ou VAPORIZADORES) devem prover meios de introdução *INSTANTÂNEA* da amostra na coluna cromatográfica



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Injetor “on column”



1 - Septo (silicone)

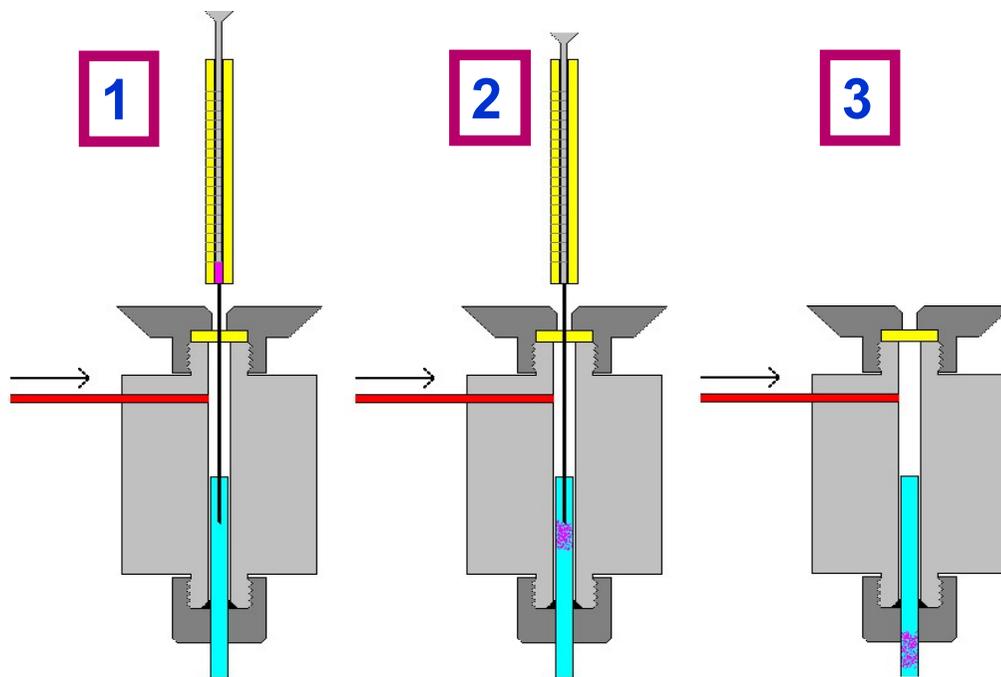
2 - Alimentação de gás de arraste)

3 - Bloco metálico aquecido

4 - Ponta da coluna cromatográfica

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Injetor “on column”



1 - Ponta da agulha da microsseringa é introduzida no início da coluna.

2 - Amostra injetada e vaporizada instantaneamente no início da coluna.

3 - “Plug” de vapor de amostra forçado pelo gás de arraste a fluir pela coluna.

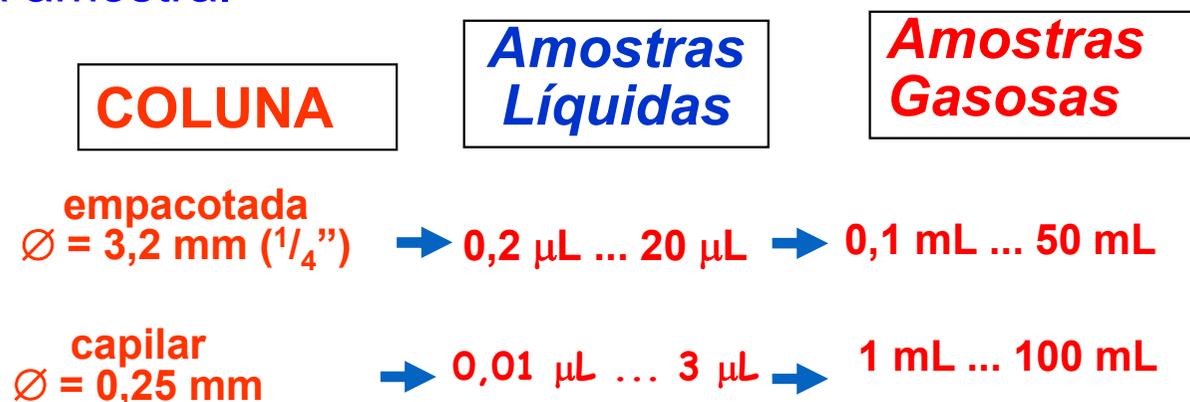
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Parâmetros de injeção

TEMPERATURA DO INJETOR: Deve ser suficientemente elevada para que a amostra vaporize-se imediatamente, mas sem decomposição.

Regra Geral: $T_{inj} = 50^{\circ}\text{C}$ acima da temperatura de ebulição do componente menos volátil.

VOLUME INJETADO: Depende do tipo de coluna e do estado físico da amostra.

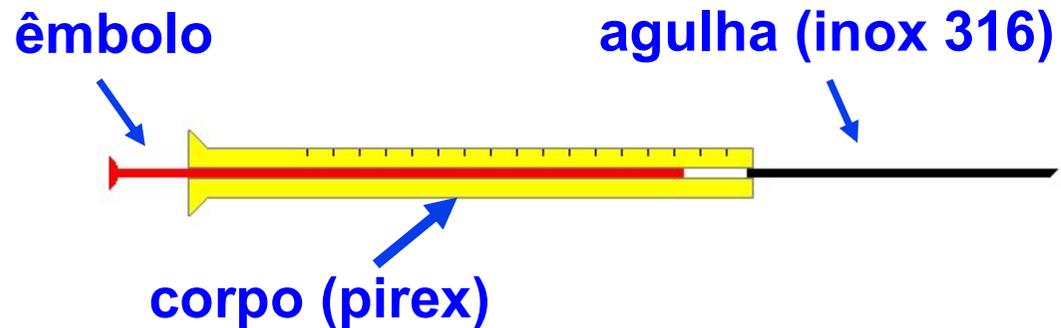


CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

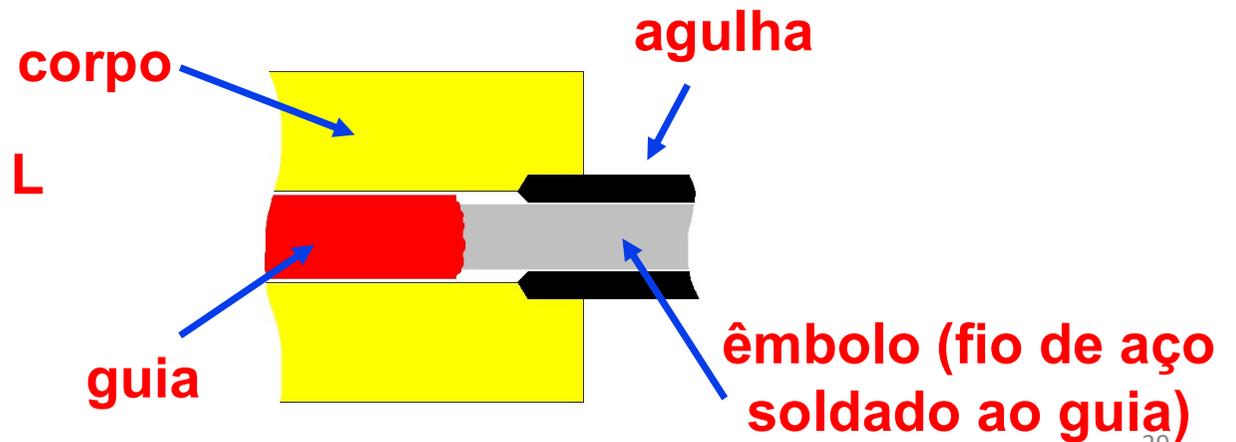
Microsseringas para injeção

LÍQUIDOS: Capacidades típicas: 1 μ L, 5 μ L e 10 μ L

Microsseringa de 10 μ L:



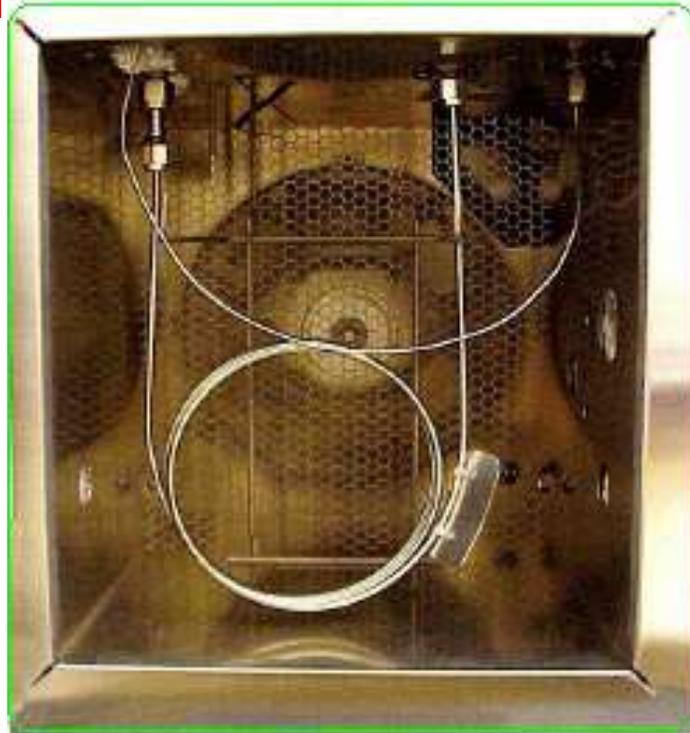
Microsseringa de 1 μ L
(seção ampliada):



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

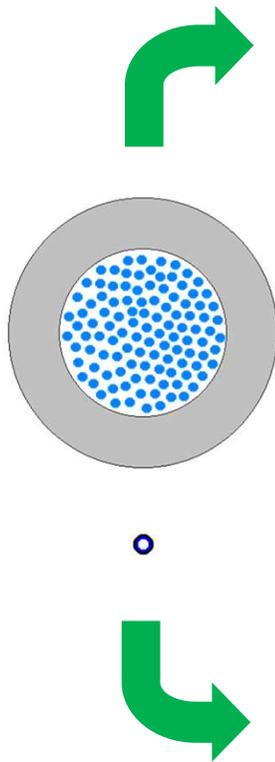
3-COLUNA CROMATOGRÁFICA E FORNO DA COLUNA

- **Forno e Coluna:** Programa de temperaturas (*Isotérmica/ Rampa contínua/ Rampa por patamares*). **O último patamar bem acima do p.e. do menos volátil**



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Colunas



EMPACOTADA

$\varnothing = 3$ a 6 mm

$L = 0,5$ m a 5 m

Recheada com sólido pulverizado (FE sólida ou FE líquida depositada sobre as partículas do recheio)



CAPILAR

$\varnothing = 0,1$ a $0,5$ mm

$L = 5$ m a 100 m

Paredes internas recobertas com um filme fino (fração de μm) de FE líquida ou sólida

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Parâmetro	Coluna empacotada	Coluna capilar
Diam. Int. (mm)	1 – 4	0,15 - 0,75
Compri/o (m)	1 - 3	10 -100
Pratos teóricos	2400	30000
Espessura F.E.(μm)	5	0,5 - 2
Vazão gás (ml/min)	20 - 60	1- 5
Vol. amostra (μl)	0,2 - 20	0,001- 0,5

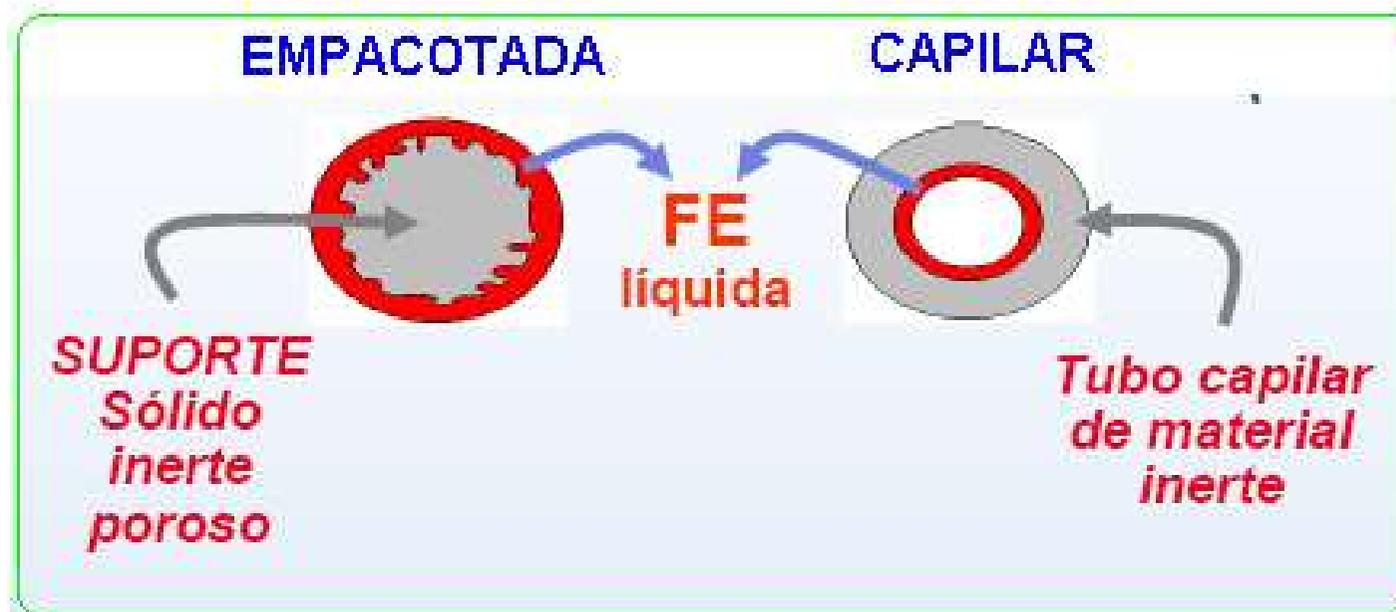
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

FASE ESTACIONÁRIA LÍQUIDA

- → líquido pouco volátil, recobrando um suporte sólido.
- → deve solubilizar seletivamente as substâncias.
- → termicamente estável.
- → quimicamente inerte.
- **Suporte ideal:**
 - Deve ter área superficial específica grande.
 - FE deve espalhar uniformemente, na forma de filme fino.
 - Deve ter partículas com diâmetros regulares e poros uniformes.
 - Deve ser mecanicamente rígido, para evitar quebras.
 - Não deve interagir com as moléculas da amostra.

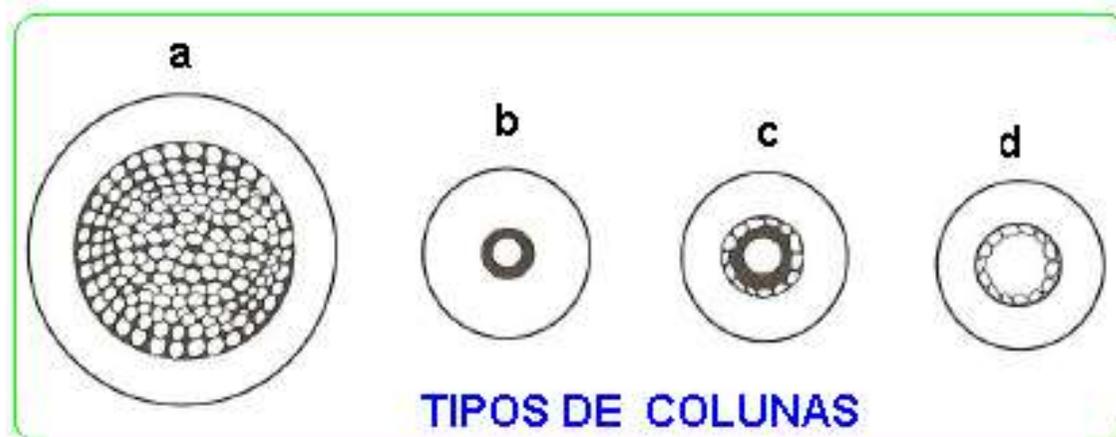
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- **LÍQUIDOS** Depositados sobre a superfície de: sólidos porosos inertes (colunas empacotadas) ou de tubos finos de materiais inertes (colunas capilares).



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

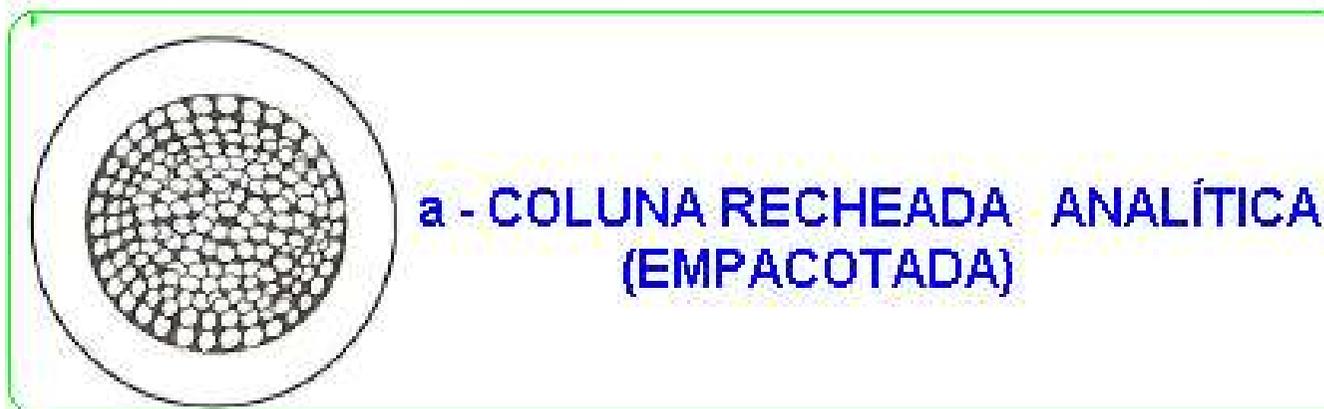
- Colunas cromatográficas: **Tubo longo contendo a FE.**
- Principais materiais para confecção de colunas: **aço inox, vidro, alumínio, teflon, sílica fundida.**



- **a – Coluna Empacotada**
- **b,c,d – Colunas Capilares**

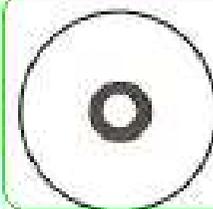
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- **a)** Tubos densamente empacotados com fase estacionária de material uniforme, finamente dividida, ou com suporte sólido que é recoberto com uma fina camada de fase líquida estacionária.



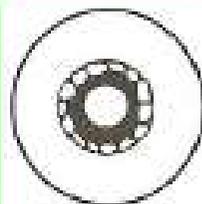
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- **b)** Parede interna do capilar recoberto com uma fina camada de FE.



**b - COLUNA CAPILAR COM
PAREDE RECOBERTA**

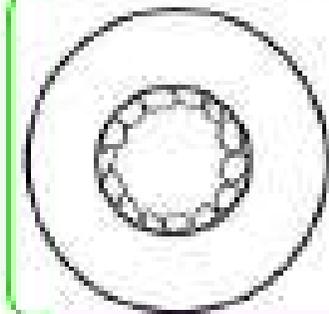
- **c)** Superfície interna do capilar é coberta por um filme fino de um material suporte (adsorvente), como terra diatomácia, sobre o qual a FE líquida encontra-se dispersa.



**c - COLUNA CAPILAR COM
SUPORTE RECOBERTO**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- **d) Parede do capilar recoberta apenas com uma camada de adsorvente, que é a própria FE.**



**d - COLUNA CAPILAR COM
CAMADA POROSA**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS COLUNAS.

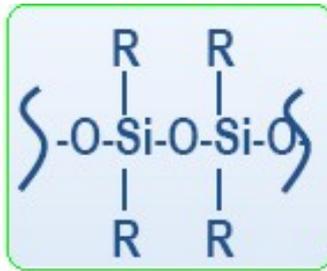
	VANTAGENS	DESVANTAGENS
E M P A C O T A D A S	<ul style="list-style-type: none">•Mais econômica.•Maior capacidade de carga•Maior quantidade de amostra.	<ul style="list-style-type: none">•Se o material de enchimento não for colocado na coluna de forma compacta e uniforme, os espaços vazios resultantes funcionarão como câmaras de diluição da amostra.•Menor eficiência.•Análise mais lenta.
C A P I L A R	<ul style="list-style-type: none">•Maior comprimento=>maior eficiência.•Separação de misturas complexas.•Análise mais rápida.•Maior separação.	<ul style="list-style-type: none">•Capacidade de processamento da amostra inferior.•Satura rapidamente.•Menor quantidade de amostra.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

TIPOS DE FASES ESTACIONÁRIAS

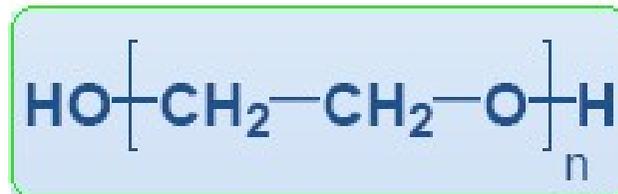
- Cromatografia gás-líquido (~90%)

- **Polisiloxano**



- R= -CH₃; -CH₂CH₂CH₂CN; -CH₂CH₂CF₃; -C₆H₅

- **Polietilenoglicol**



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

TIPOS DE FASES ESTACIONÁRIAS

- **Cromatografia gás-sólido (~10%)**
- **Material sólido adsorvente, por ex.: molecular sieves, alumina, etc.**
- **Uso: hidrocarbonetos muito voláteis (e.g. CH₄), gases inorgânicos (por. ex.: N₂, CO₂)**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

SELEÇÃO DE FASE ESTACIONÁRIA/AMOSTRAS

- **100% dimetil polisiloxano (APOLAR)**
- **Ex. de analitos: solventes, produtos de petróleos, sabores, hidrocarbonetos saturados**
- **5% difenil – 95% dimetil polisiloxano (APOLAR)**
- **Ex. de analitos: aromas, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos**
- **35% difenil – 65% dimetil polisiloxano (Polaridade média)**
- **Ex. de analitos: pesticidas contendo nitrogênio**
- **Polietileno glicol (POLAR)**
- **Ex. de analitos: ácidos graxos, aromas e álcoois.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- Para minimizar a perda de FE líquida por volatilização, normalmente ela é:.
- **A) Entrecruzada:** as cadeias poliméricas são quimicamente ligadas entre si.



- **B) Quimicamente ligadas:** as cadeias poliméricas são “presas” ao suporte por ligações químicas
- **SÓLIDOS** *Colunas recheadas com material finamente granulado (empacotadas) ou depositado sobre a superfície interna do tubo (capilar)*



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

FASE MÓVEL (CG/HPLC)

- **Gasosa** - Na Cromatografia à Gás a Fase Móvel é o próprio Gás de Arraste cuja função é transportar os analitos através do Sistema (Injetor /Coluna /Detector).
 - Os principais Gases de Arraste são o Hélio, Nitrogênio, Hidrogênio e o Argônio.
- **Líquida** – Na Cromatografia Líquida emprega-se uma mistura de solventes, denominada Eluente, como Fase Móvel. Os principais são: metanol, acetonitrila e água.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

PROCESSOS DE SEPARAÇÃO

EXCLUSÃO

PARTIÇÃO

ADSORÇÃO

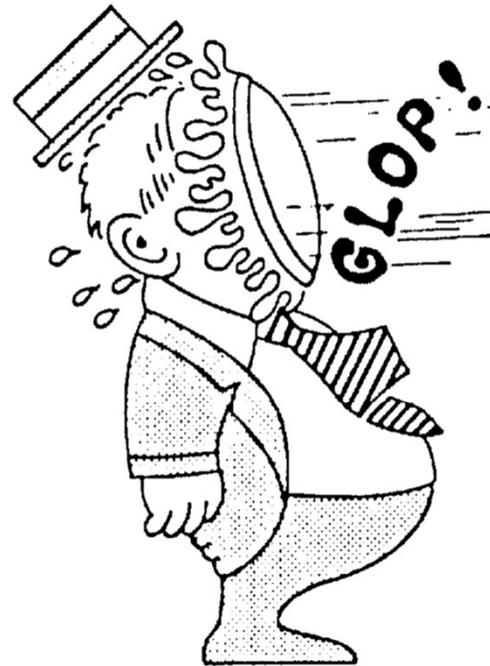
TROCA IÔNICA

AFINIDADE

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG



ABsorção



ADsorção

Diferença entre Absorção e Adsorção

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

ADSORÇÃO GERAL: A função das fases móveis na cromatografia por adsorção tem sentido amplo:

a) Função solvente

- Solubilizar os componentes
- Ter baixo ponto de ebulição

b) Função eluente

- Conduzir os componentes da mistura pela coluna
- Remover ou dessorver estes componentes do adsorvente (FE)

c) Gás

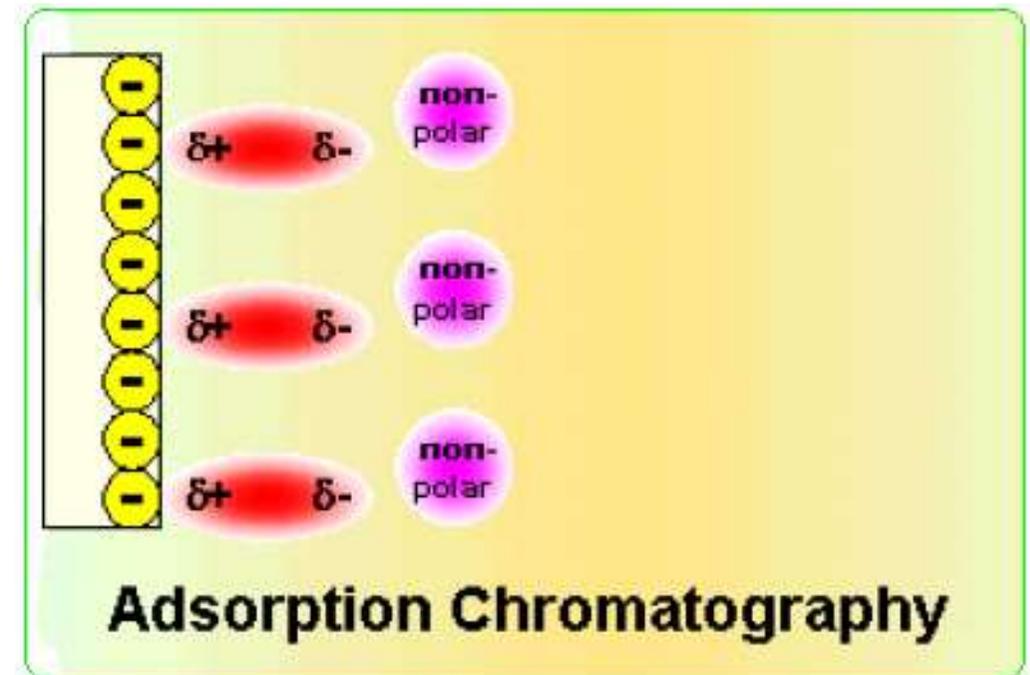
- Conduzir os componentes da mistura pela coluna
- Remover ou dessorver estes componentes do adsorvente (FE)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

MECANISMOS DA CROMATOGRAFIA

SEPARAÇÃO POR ADSORÇÃO

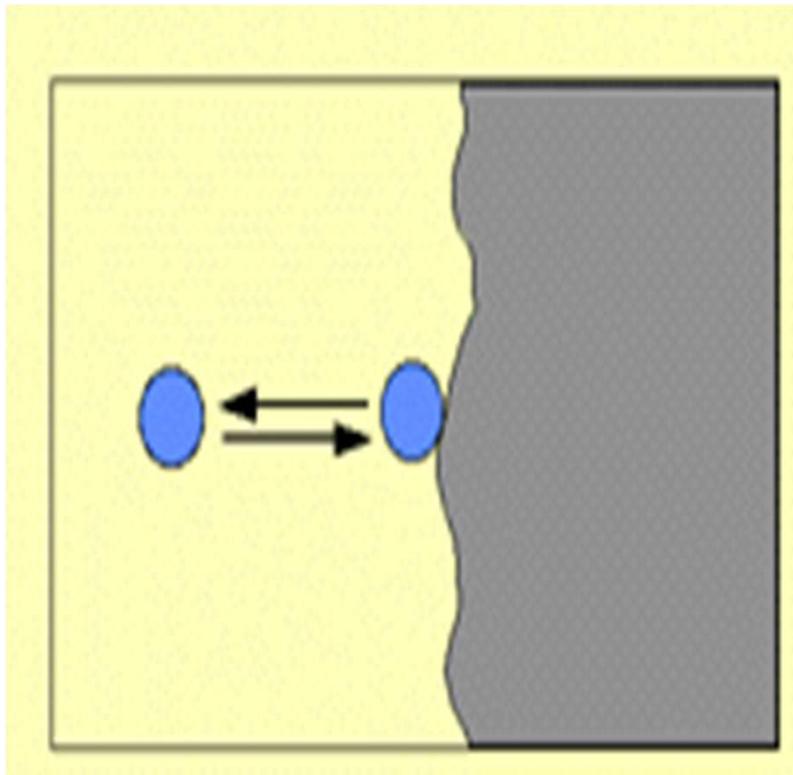
- **Fase Móvel:** Líquida ou Gás
- **Fase Estacionária:** **Sólida**
- **Processo:** Adsorção e Dessorção
- **Forças mais usadas:**
 - Ligação de Hidrogênio e Forças de Van der Waals**



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

ADSORÇÃO

Fase Estacionária Sólida: Polar



Aumento da Atividade

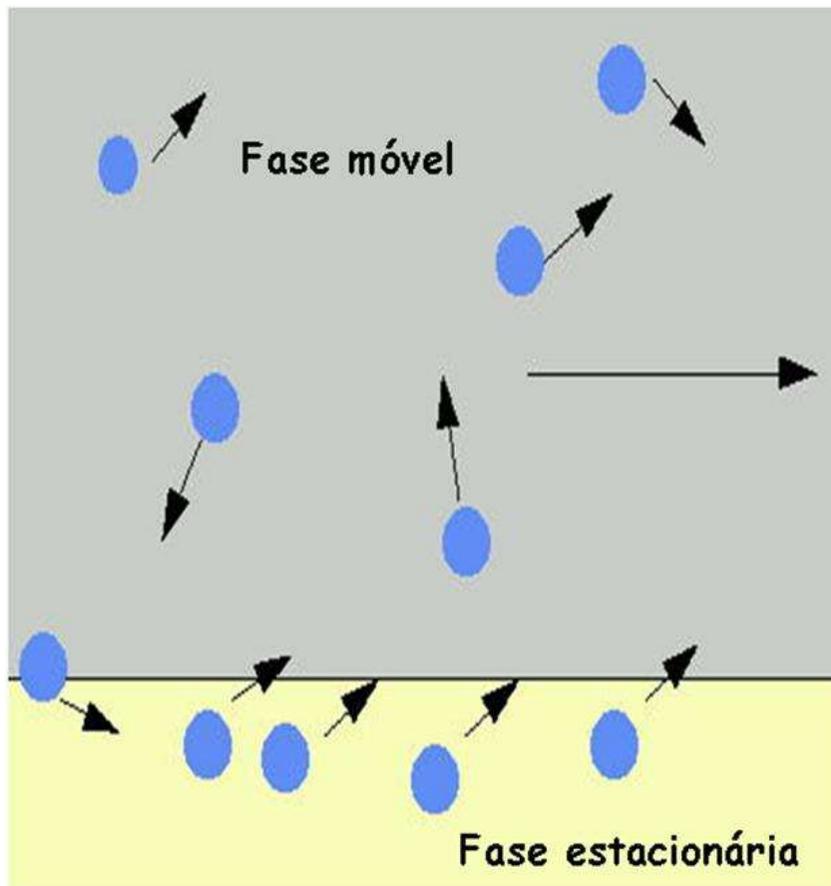
$-\text{CO}_2\text{H} > -\text{OH} > -\text{NH}_2 >$

$-\text{SH} > -\text{CHO} > -\text{C}=\text{O} >$

$-\text{CO}_2\text{R} > -\text{OCH}_3 > -\text{CH}=\text{CH}-$

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

PARTIÇÃO



Fase Móvel Gasosa

Fase Estacionária Líquida

Processos de Solubilidade

O processo de partição é intrafacial e a volta de cada componente para a fase móvel depende da sua volatilidade.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

MECANISMOS DA CROMATOGRAFIA

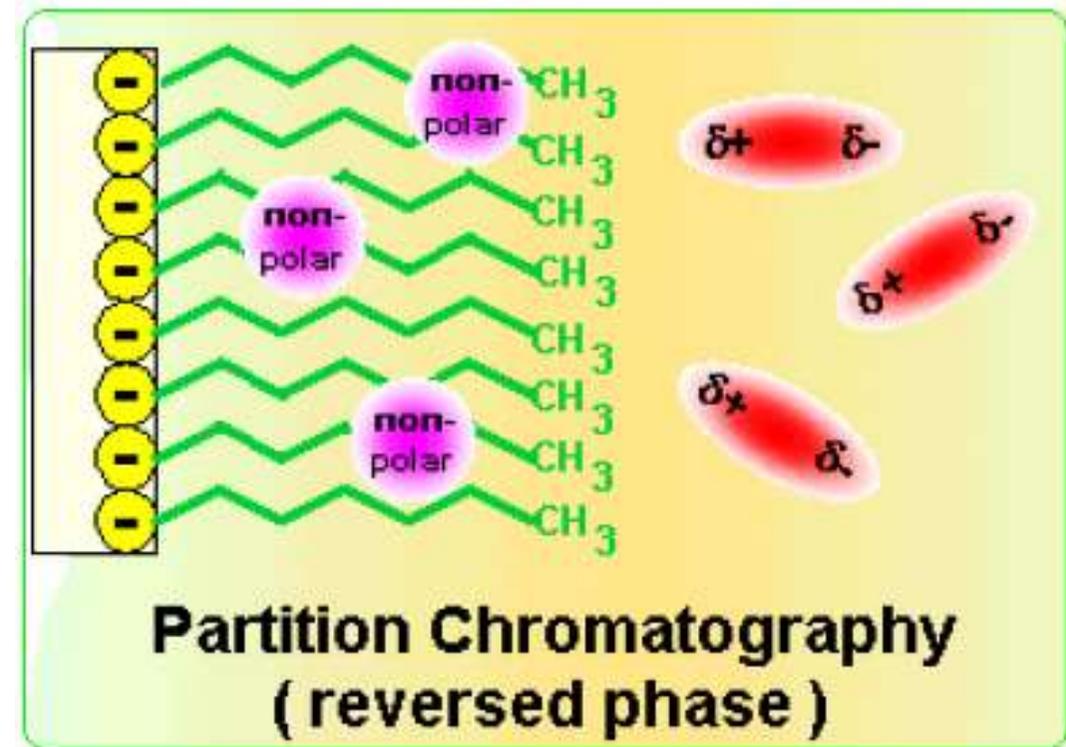
SEPARAÇÃO POR PARTIÇÃO

Fase Móvel e Fase Estacionária

Líquidas

Processos de Solubilidade

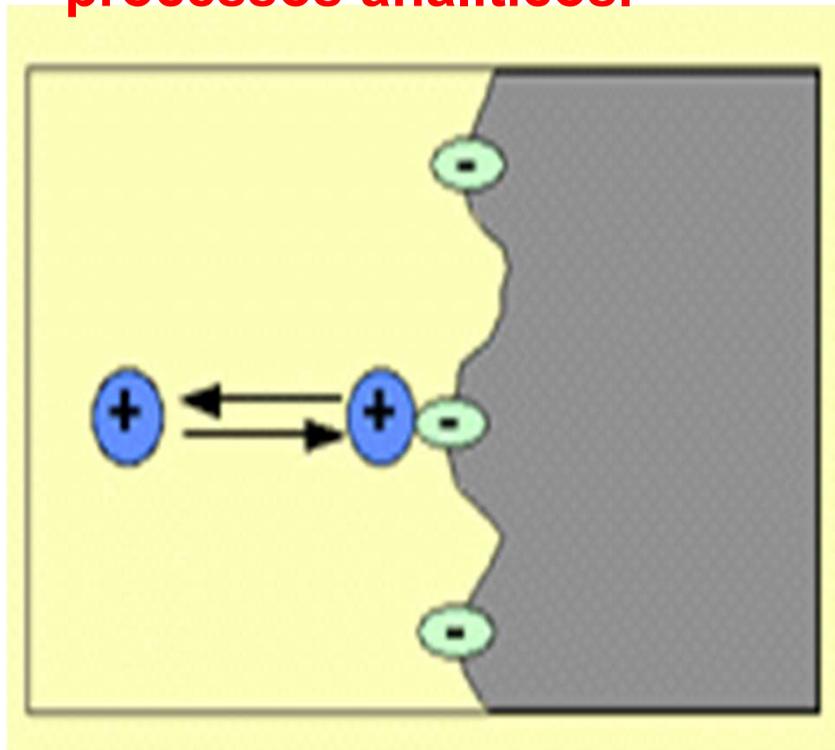
O processo de partição é intrafacial e a volta de cada componente para a fase móvel depende da sua solubilidade.



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

TROCA IÔNICA

Por volta de 1935 começaram a ser fabricadas resinas de troca iônica orgânicas, muito eficientes, passando a constituir um meio químico de extraordinário valor em processos analíticos.



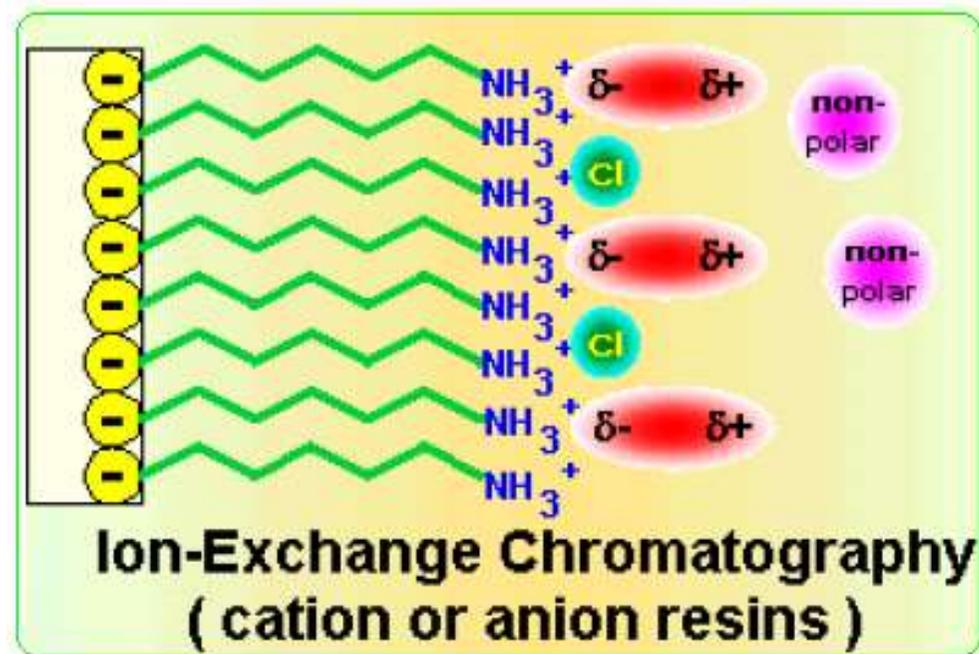
Fase Móvel: Líquida

Fase Estacionária: Sólida

Processos de Troca Iônica
Adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz

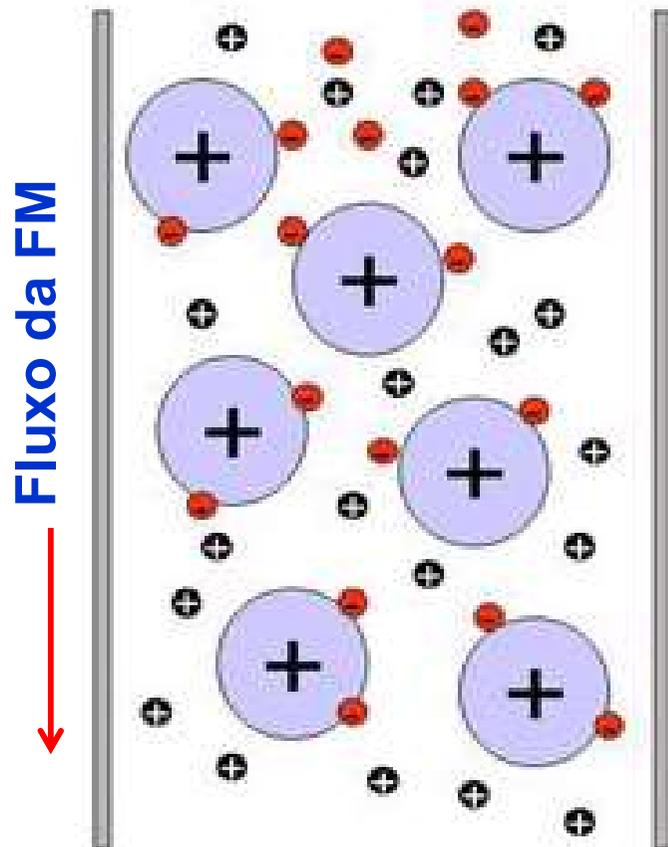
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

MECANISMOS DA CROMATOGRAFIA



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

TROCA IÔNICA



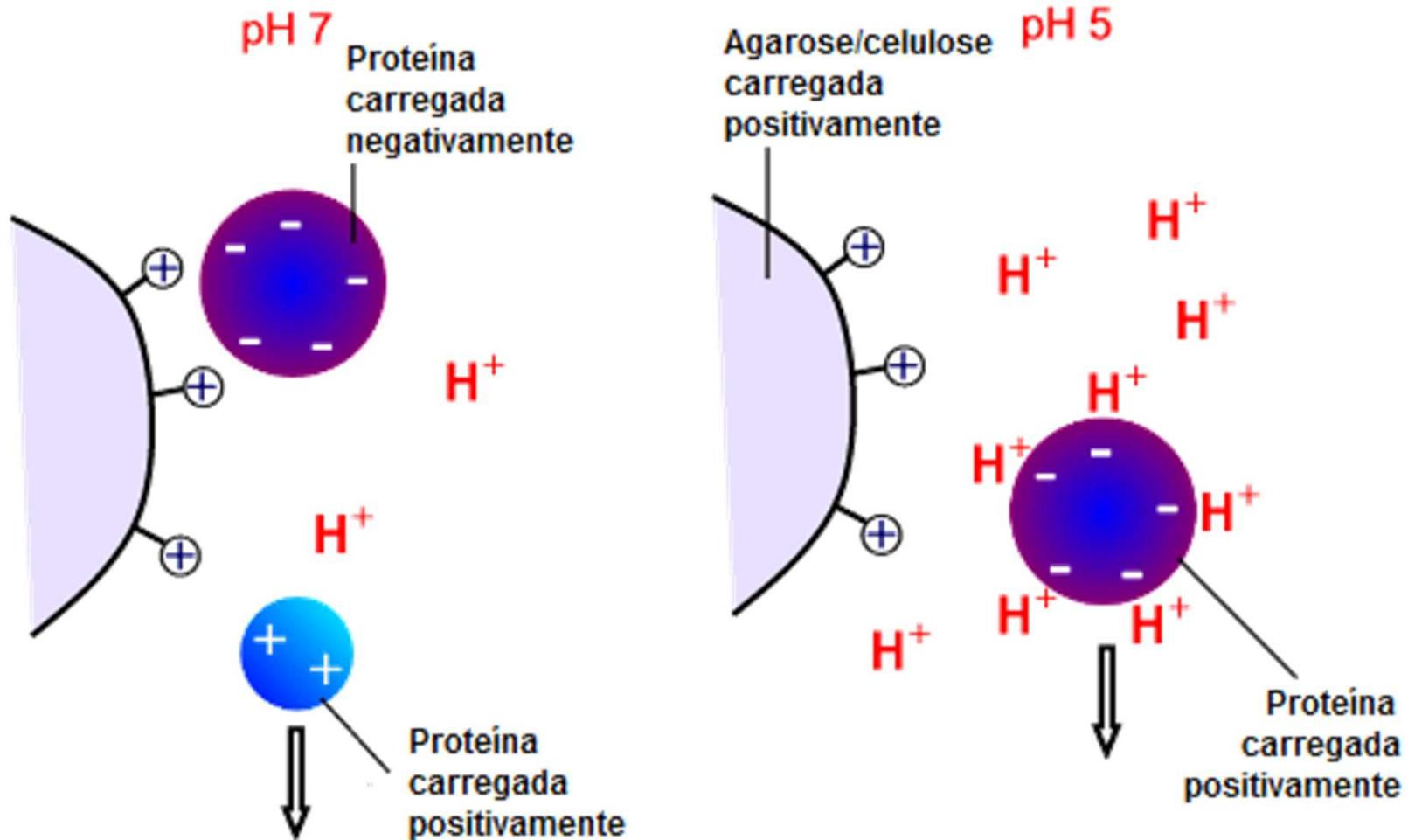
**Resinas Catiônicas
e Aniônicas
(FE altamente carregada)**

Maior Interação

- **Íons de alta carga**
- **Íons de menor tamanho**

**A diferença de afinidade entre os
íons da FM pode ser controlada
por pH e força iônica**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG



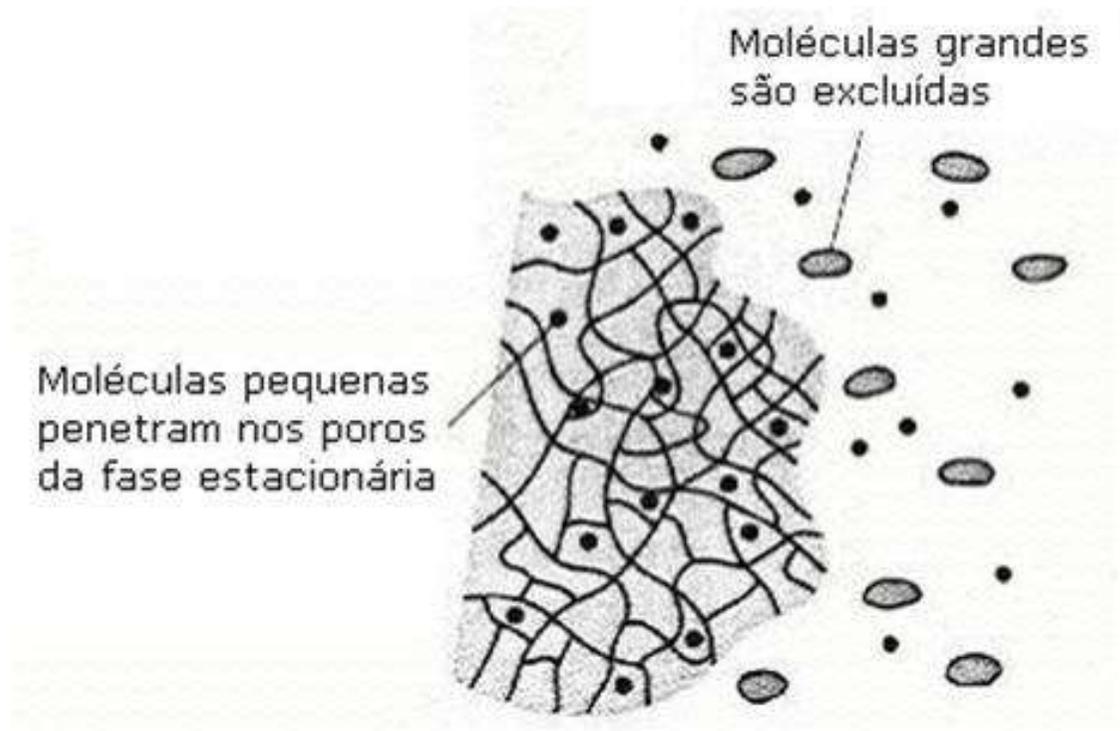
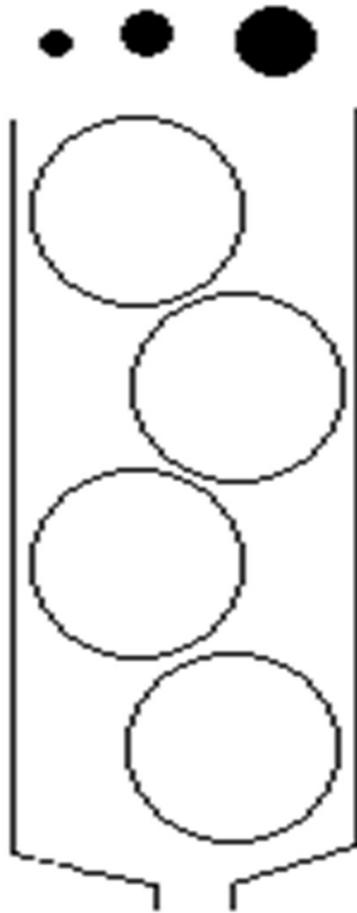
O ajuste do pH proporciona a separação das duas proteínas

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

EXCLUSÃO

Fase Móvel Líquida

Fase Estacionária em Gel



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

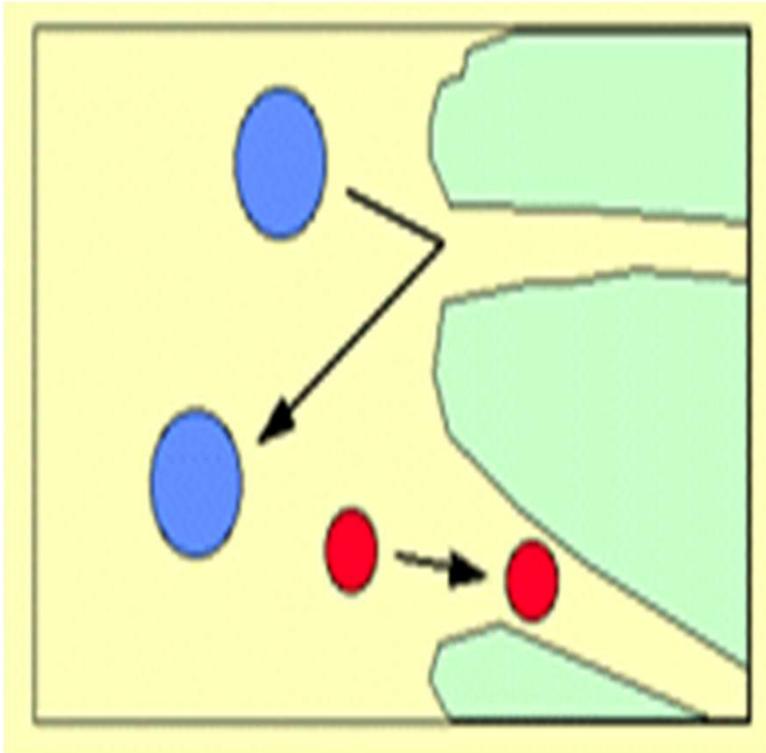
EXCLUSÃO

A propriedade que distingue a cromatografia de exclusão, introduzida por volta de 1960, de outros tipos de cromatografia é que o recheio (FE) é um gel não carregado constituído de macromoléculas que têm ligações cruzadas, com afinidade pelos solventes, mas que neles são insolúveis.

- **Separação de tamanhos específicos**
- **Separação de polímeros e proteínas**
- **Determinação de Massa Molar**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

EXCLUSÃO



Características desejáveis para os Géis

-Inércia Química:

Não pode haver uma interação química entre a matriz e o soluto.

-Estabilidade:

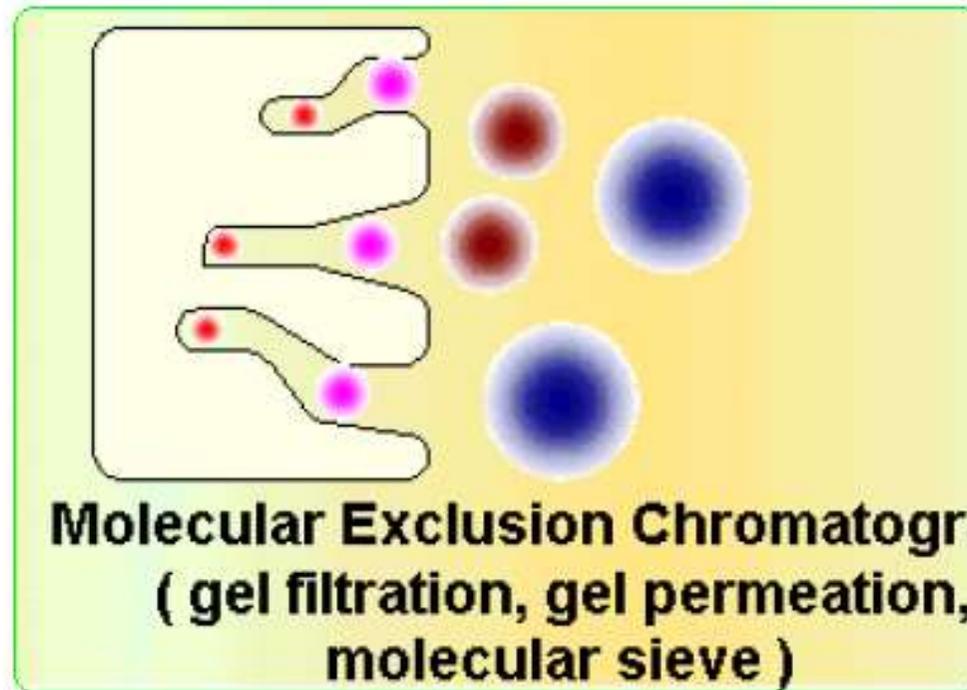
O gel deve suportar uso contínuo quanto mantido em condições brandas de temperatura e pH.

-Baixo teor de íons:

Grupos carregados interferem no processo de separação.

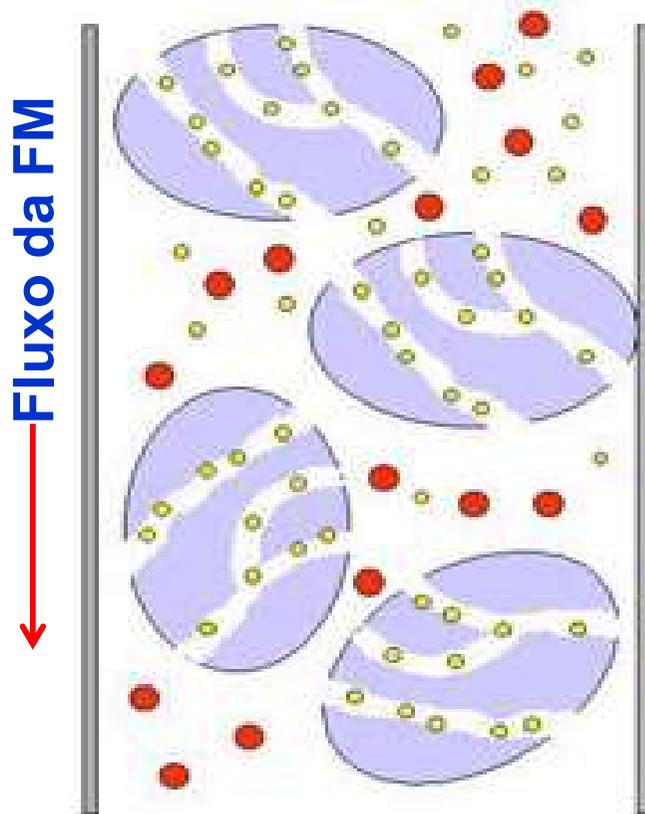
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

MECANISMOS DA CROMATOGRAFIA



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

EXCLUSÃO



Tipos de Géis

Dextrano (Sephadex)

Poliacrilamida

Ágar e Agarose

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

AFINIDADE

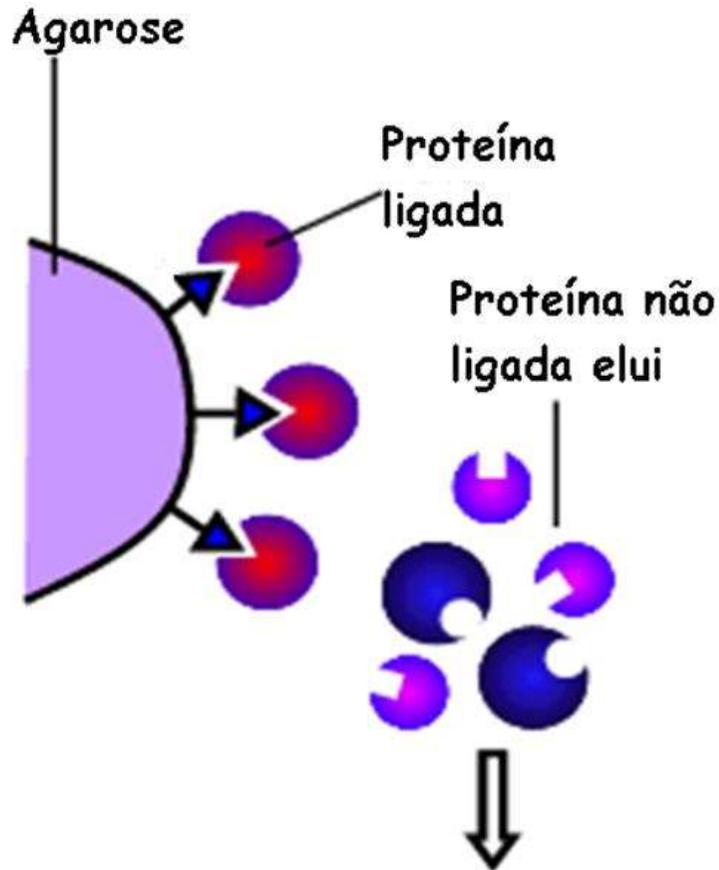
Fase Móvel Líquida

Fase Estacionária Sólida

Propriedades

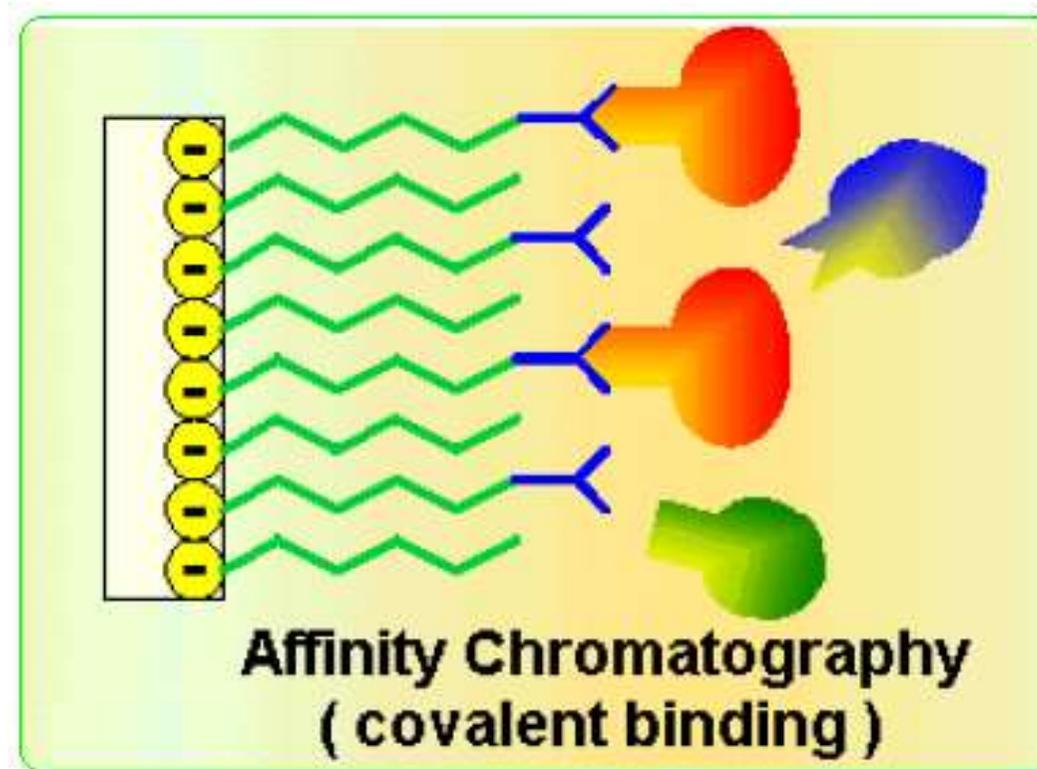
Biológicas e

Funcionais



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

MECANISMOS DA CROMATOGRAFIA



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Calculo do número de pratos teóricos de uma coluna

Coluna cromatográfica: série de estágios independentes onde acontece o equilíbrio entre o analito dissolvido (sorvido) na fase estacionária e na fase móvel:



Ocorre um “quase-equilíbrio” entre o analito sorvido na FE e dissolvido na FM.

$$K_C = \frac{[A]_{FE}}{[A]_{FM}}$$

K_C = Constante de Distribuição

$[A]_{FE}$ = concentração do analito na FE

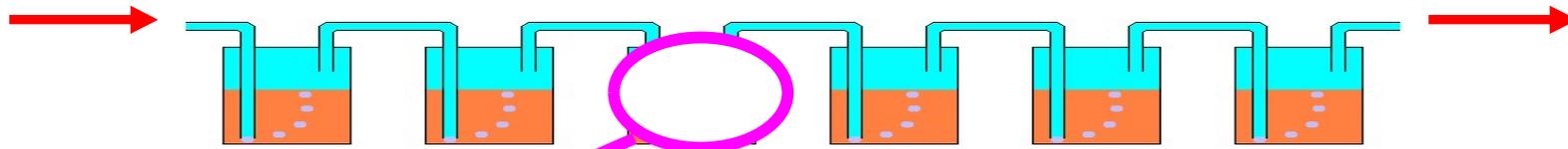
$[A]_{FM}$ = concentração do analito na FM



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Calculo do número de pratos teóricos de uma coluna

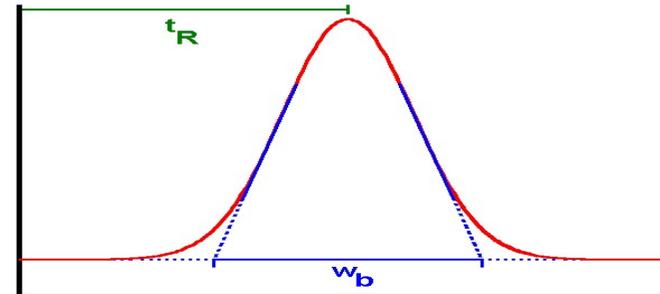
Supondo a coluna cromatográfica como uma série de estágios separados onde ocorre o equilíbrio entre o analito, a FE e a FM:



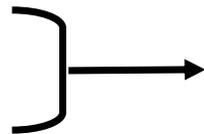
Cada “estágio” de equilíbrio é chamado de **PRATO TEÓRICO**

O número de pratos teóricos de uma coluna (N) pode ser calculado por:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2$$



↑ t_R
↓ w_b



↑ **N**



Coluna mais eficiente

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Calculo do número de pratos teórico de uma coluna (Quantificação da eficiência)

ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO TEÓRICO = (H)

“Tamanho” de cada estágio de equilíbrio

$$H = \frac{L}{N} \quad (L = \text{comprimento da coluna})$$

Capilares, L = 30 m →

d_c = diâmetro da coluna em mm

d_f = espessura da fase estacionária em mm

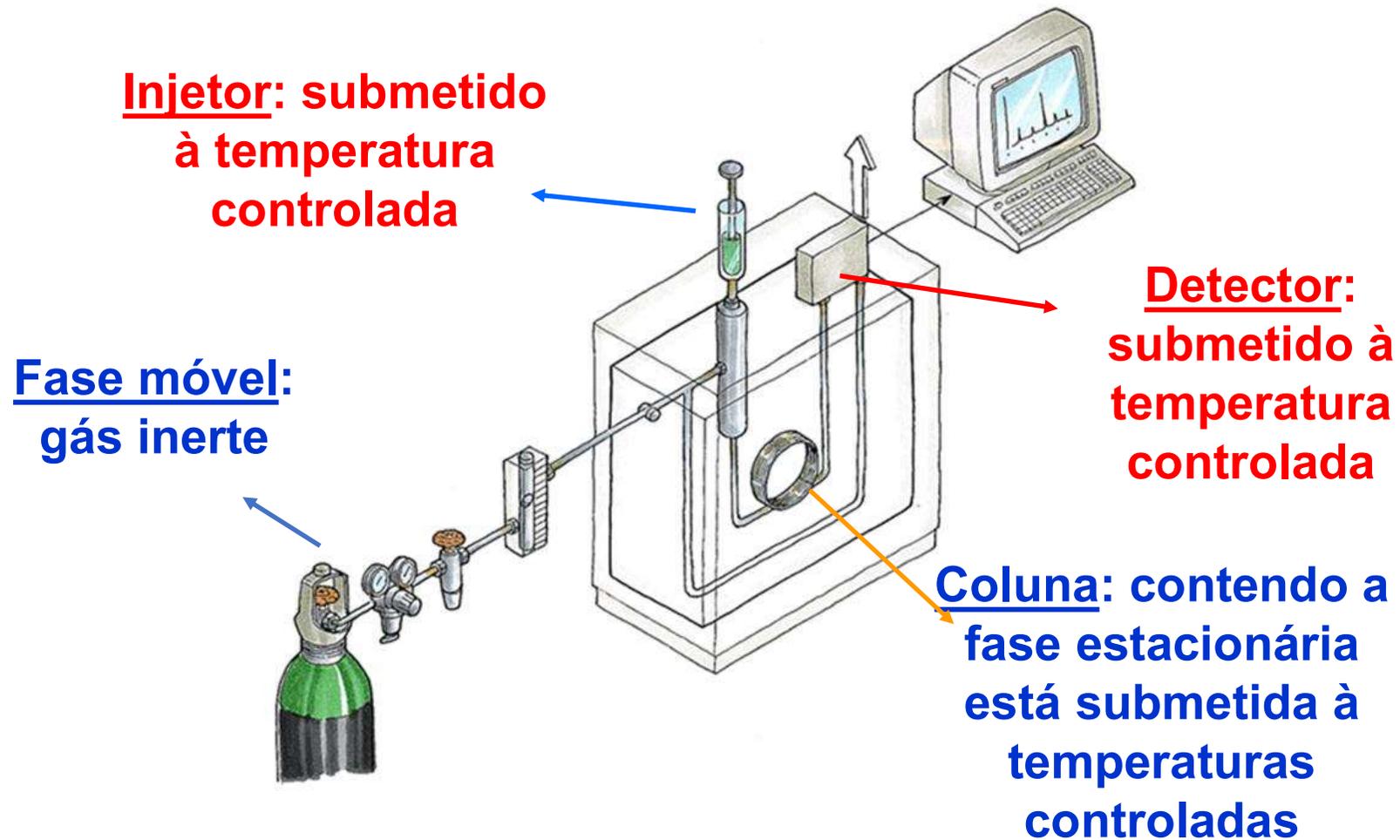
Empacotadas, L = 2 m →

Valores típicos de H e N:

d_c	d_f	H	N
0,10	0,25	0,081	370370
0,25	0,25	0,156	192308
0,32	0,32	0,200	150000
0,32	0,50	0,228	131579
0,32	1,00	0,294	102041
0,32	5,00	0,435	68966
0,53	1,00	0,426	70423
0,53	5,00	0,683	43924
2,16	10%	0,549	3643
2,16	5%	0,500	4000

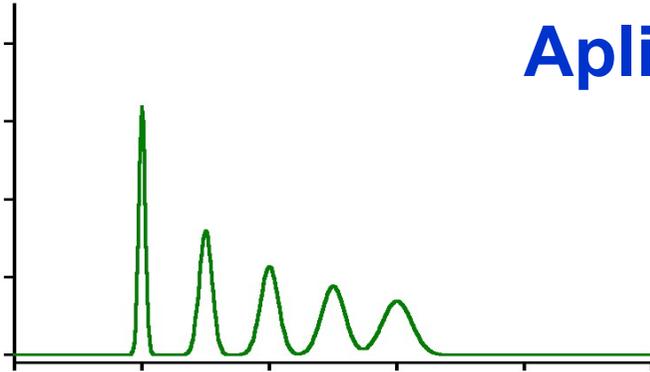
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Cromatografia em fase gasosa



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Aplicabilidade

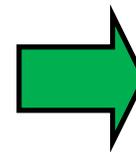


Quais misturas podem ser separadas por CG ?

➔ para uma substância qualquer poder ser “arrastada” por um fluxo de um gás ela deve dissolver-se, pelo menos parcialmente, nesse gás.



Misturas cujos constituintes sejam VOLÁTEIS



pressão de vapor < 60 torr (0,079atm)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Temperatura da coluna

Além da interação com a FE, o tempo que um analito demora para percorrer a coluna depende de sua **PRESSÃO DE VAPOR (p^0)**.

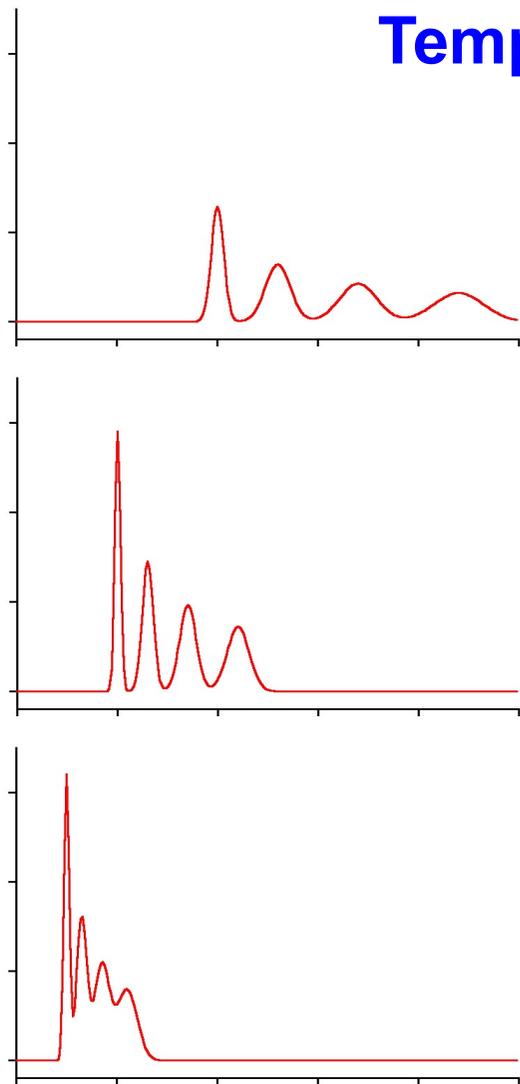
$$p^0 = f \left\{ \begin{array}{l} \text{Estrutura química do analito} \\ \text{Temperatura da coluna} \end{array} \right.$$



ANALITO ELUI MAIS RAPIDAMENTE (MENOR RETENÇÃO)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

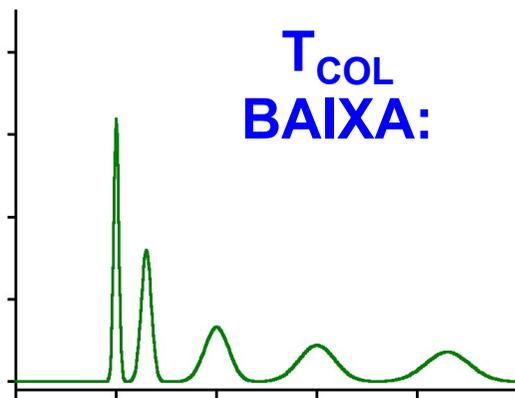
Temperatura da coluna



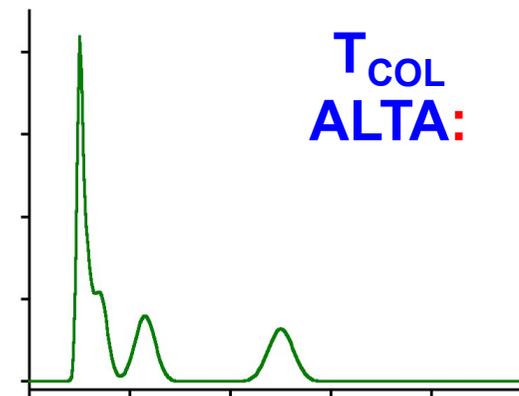
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Programação linear de temperatura

Misturas complexas (constituíntes com volatilidades muito diferentes) separadas ISOTERMICAMENTE:



- Componentes mais voláteis são separados
- Componentes menos voláteis demoram a eluir, saindo como picos mal definidos

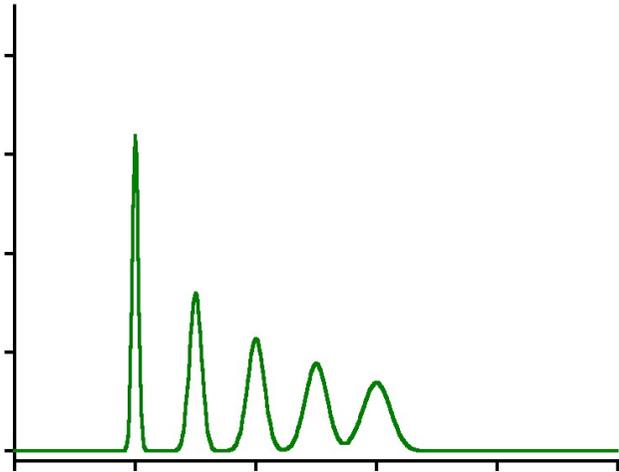


- Componentes mais voláteis não são separados
- Componentes menos voláteis eluem mais rapidamente

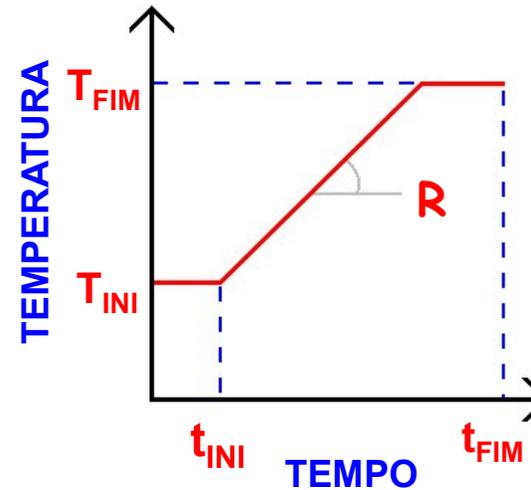
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Programação linear de temperatura

A temperatura do forno pode ser variada linearmente durante a separação:



Consegue-se boa separação dos componentes da amostra em menor tempo



T_{INI} - Temperatura Inicial

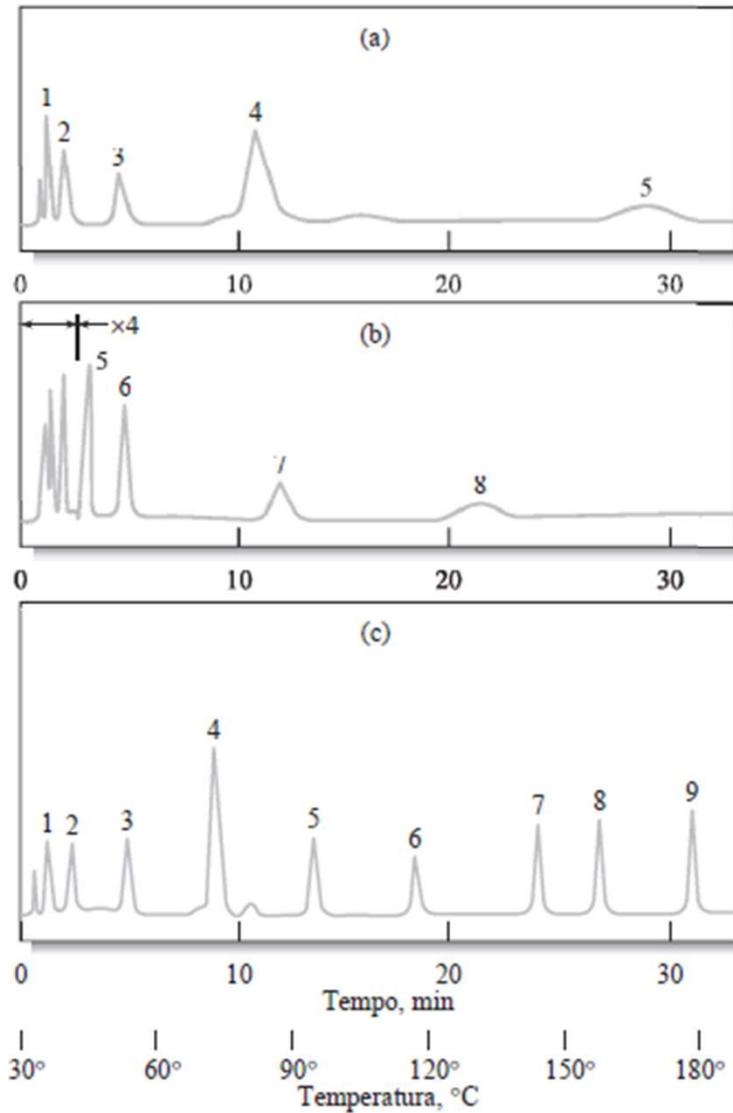
T_{FIM} - Temperatura Final

t_{INI} - Tempo Isotérmico Inicial

t_{FIM} - Tempo Final do Programa

R - Velocidade de Aquecimento

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG



Programação linear de temperatura

- a) Isotérmico a 45 °C;
- b) isotérmico a 145 °C;
- c) programado de 30 °C a 180 °C

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

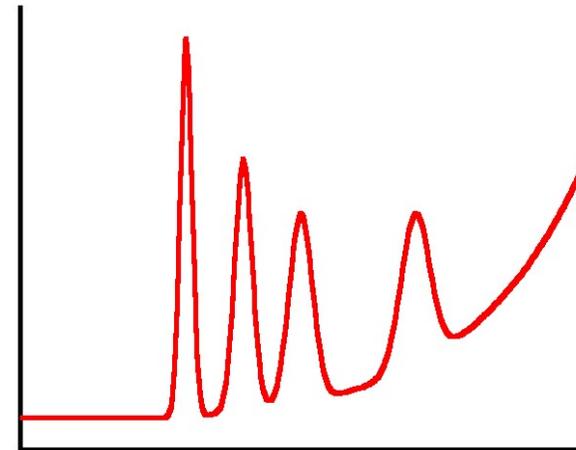
Programação linear de temperatura (PLT)

Possíveis problemas associados à PLT:

➔ VARIAÇÕES DE VAZÃO DO GÁS DE ARRASTE: A *viscosidade de um gás aumenta com a temperatura.*



➔ DERIVA (“DRIFT”) NA LINHA DE BASE: *Devido ao aumento de volatilização de FE líquida*

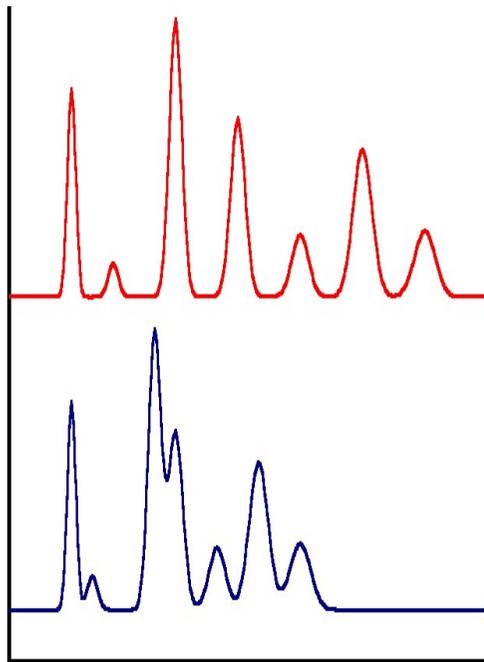


CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Fase Estacionária



FE SELETIVA (ideal): Deve interagir diferencialmente com os componentes da amostra.



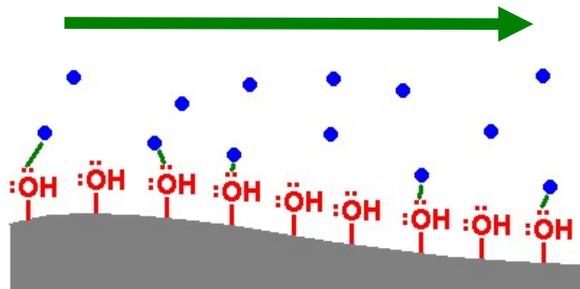
FE Seletiva: Separação adequada dos constituintes da amostra

FE pouco Seletiva: Má resolução mesmo com coluna de boa eficiência

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Fase estacionária sólida

- O fenômeno físico-químico responsável pela interação analito + FE sólida é a **ADSORÇÃO**



A adsorção ocorre na interface entre o gás de arraste e a FE sólida

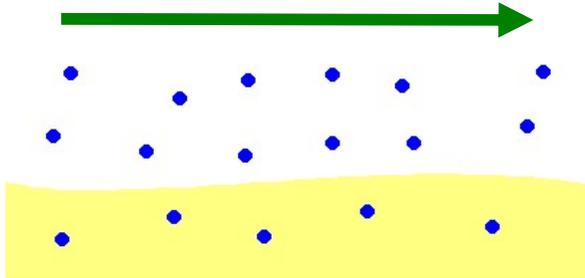
 **ADSORÇÃO**

- Sólidos com grandes áreas superficiais (partículas finas, poros)
- Solutos polares
- Sólidos com grande número de sítios ativos (hidroxilas, pares de elétrons...)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Fase estacionária líquida

- O fenômeno físico-químico responsável pela interação analito + FE líquida é a **ABSORÇÃO**



A absorção ocorre no interior do filme de FE líquida (fenômeno **INTRAFACIAL**)

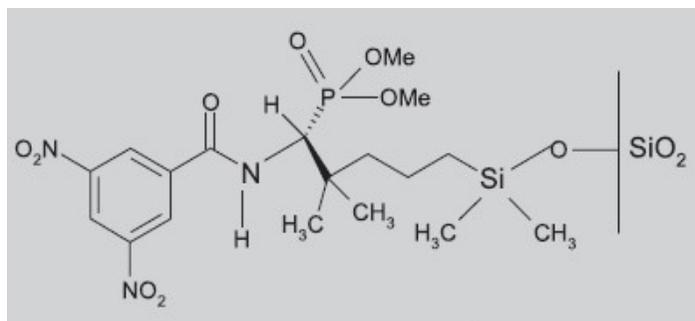
↑ **ABSORÇÃO**

- Filmes espessos de FE líquida
- Grande superfície líquida exposta ao gás de arraste
- Interação forte entre a FE líquida e o analito (grande solubilidade)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Fase estacionária quirais

- As propriedades físico-químicas dos isômeros óticos são **MUITO SIMILARES** → FE convencionais não interagem diferencialmente com os isômeros óticos.



- ◆ **PRODUTOS BIOLÓGICOS** - Distinção entre produtos de origem sintética e natural (**natural** = normalmente substâncias oticamente puras; **sintético** = muitas vezes são misturas racêmicas).
- ◆ **FÁRMACOS** - Em muitos fármacos apenas um dos isômeros óticos têm atividade farmacológica.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

4-DETECTOR.

Características ideais:

1. **Alta sensibilidade: 10^{-8} a 10^{-15} g de soluto/s.**
2. **Boa estabilidade e reprodutibilidade.**
3. **Resposta linear para solutos que se estenda por várias ordens de grandeza.**
4. **Faixa de temperatura desde a ambiente até pelo menos 400 °C.**
5. **Tempo de resposta curto e independente da vazão.**
6. **Alta confiabilidade e facilidade de uso.**
7. **Similaridade de resposta para todos os solutos.**
8. **Não destrutivo.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

DETECTORES

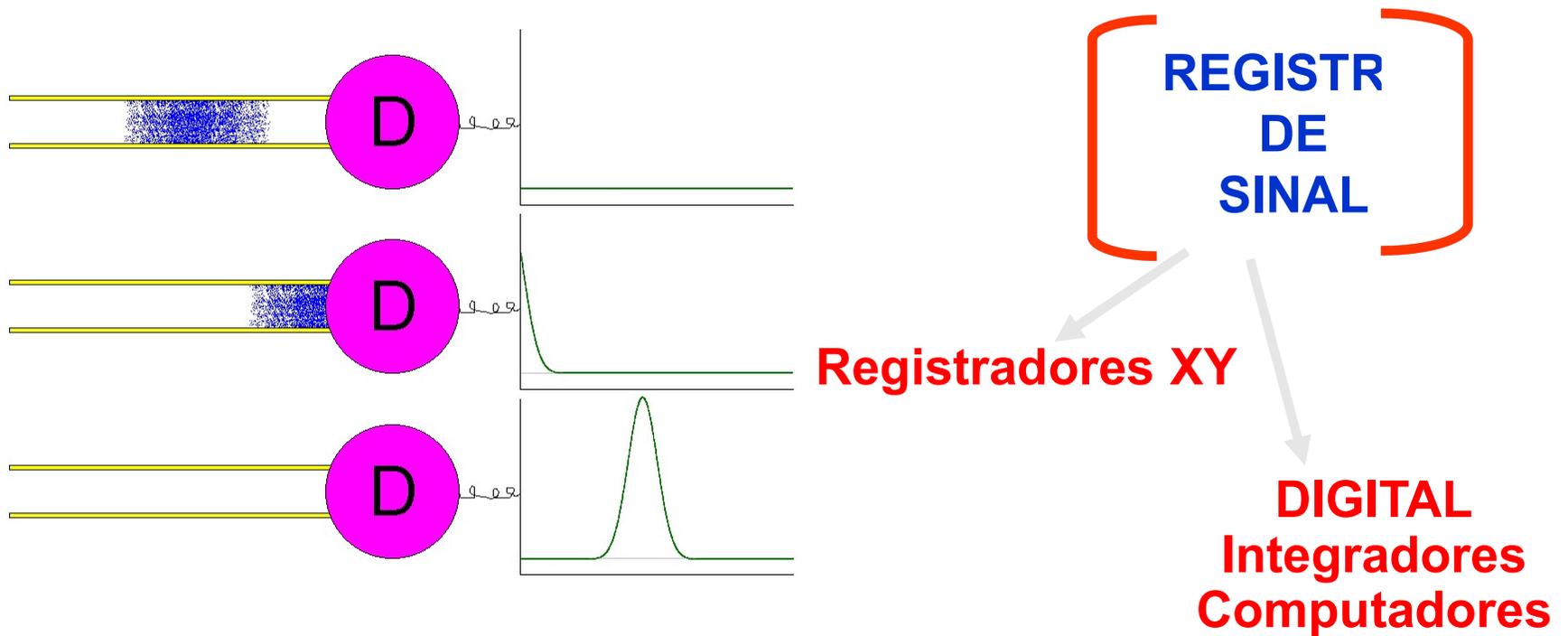
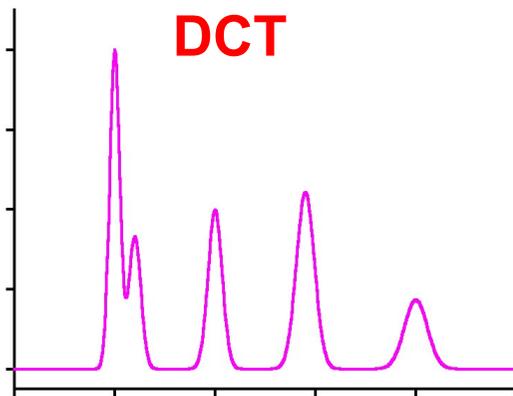


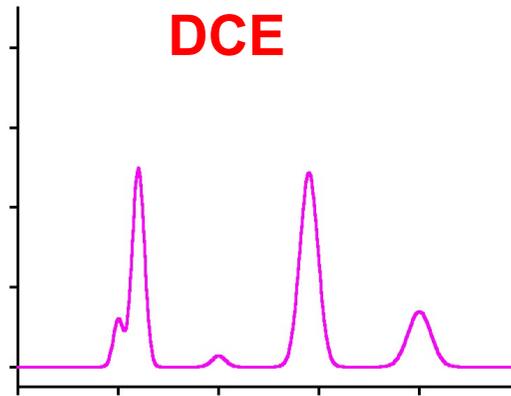
Gráfico Sinal x Tempo = CROMATOGRAMA

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

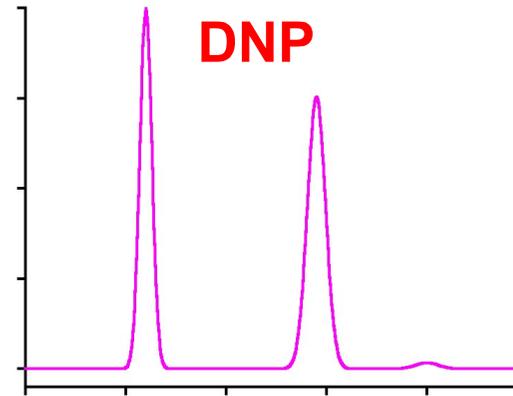
DETECTORES



UNIVERSAIS:
Geram sinal para
qualquer
substância eluída.



SELETIVOS:
Detectam apenas
substâncias
com determinada
propriedade
físico-química.



ESPECÍFICOS:
Detectam substâncias que
possuam determinado
elemento
ou grupo funcional em suas
estruturas

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Detectores - Funcionamento

- ✦ DETECTOR POR CONDUTIVIDADE TÉRMICA (DCT OU TCD):
Variação da condutividade térmica do gás de arraste.
- ✦ DETECTOR POR IONIZAÇÃO EM CHAMA (DIC OU FID): *Íons gerados durante a queima dos eluatos em uma chama de H_2 + ar.*
- ✦ DETECTOR POR CAPTURA DE ELÉTRONS (DCE OU ECD):
Supressão de corrente causada pela absorção de elétrons por eluatos altamente eletrofílicos.
- ✦ DETECTOR TERMOIÔNICOS (DNP OU NPD): *Modificação do DIC. Os eluatos queimados na chama H_2 + ar passam por uma superfície de silicato de rubídio onde se formam íons de moléculas com N e P.*

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Detectores – Limites de detecção



DETECTOR POR CONDUTIVIDADE TÉRMICA (DCT OU TCD): *Universal. Observa-se para qualquer substância eluída. Sensibilidade: 0,4 a 1 ng com linearidade até dezenas de mg (10^4).*



DETECTOR POR IONIZAÇÃO EM CHAMA (DIC OU FID): *Quase-universal. Detecta qualquer substância que contenha ligações C-H. Não responde a gases nobres, H_2 , O_2 , N_2 , CX_4 , SiX_4 (X =halogênio), CO , CO_2 , CS_2 , H_2O , NO , N_2O , NO_2 , NH_3 . Sensibilidade: 10 a 100 pg com linearidade até mg ($10^7 - 10^8$).*



DETECTOR POR CAPTURA DE ELÉTRONS (DCE OU ECD): *Seletivo. Responde muito bem a halogenetos orgânicos, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos e organometálicos. Sensibilidade: 0,01 a 1 pg com linearidade até ng. (10^4)*



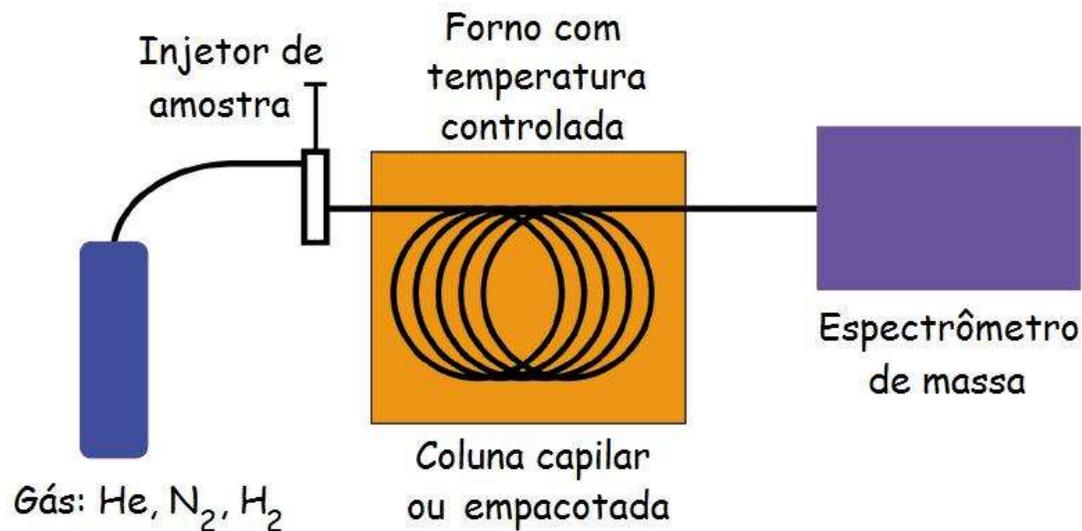
DETECTOR TERMOIÔNICO (DNP OU NPD): *Específico. Responde a compostos orgânicos com N e P. Sensibilidade: 0,1 a 1 pg (P) e 0,4 a 10 pg (N) com linearidade até ng. ($10^3 - 10^5$)*

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Detectores – Espectrometria de massas



CG-EM (GC-MS): [Universal / Seletivo / Específico]. Um dos detectores mais poderosos para a cromatografia gasosa é o espectrômetro de massas.



Detecção

TIC

Universal

Similar a DCT

SIM

Seletivo

Maior Sensibilidade

CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Detectores – Espectrometria de massas

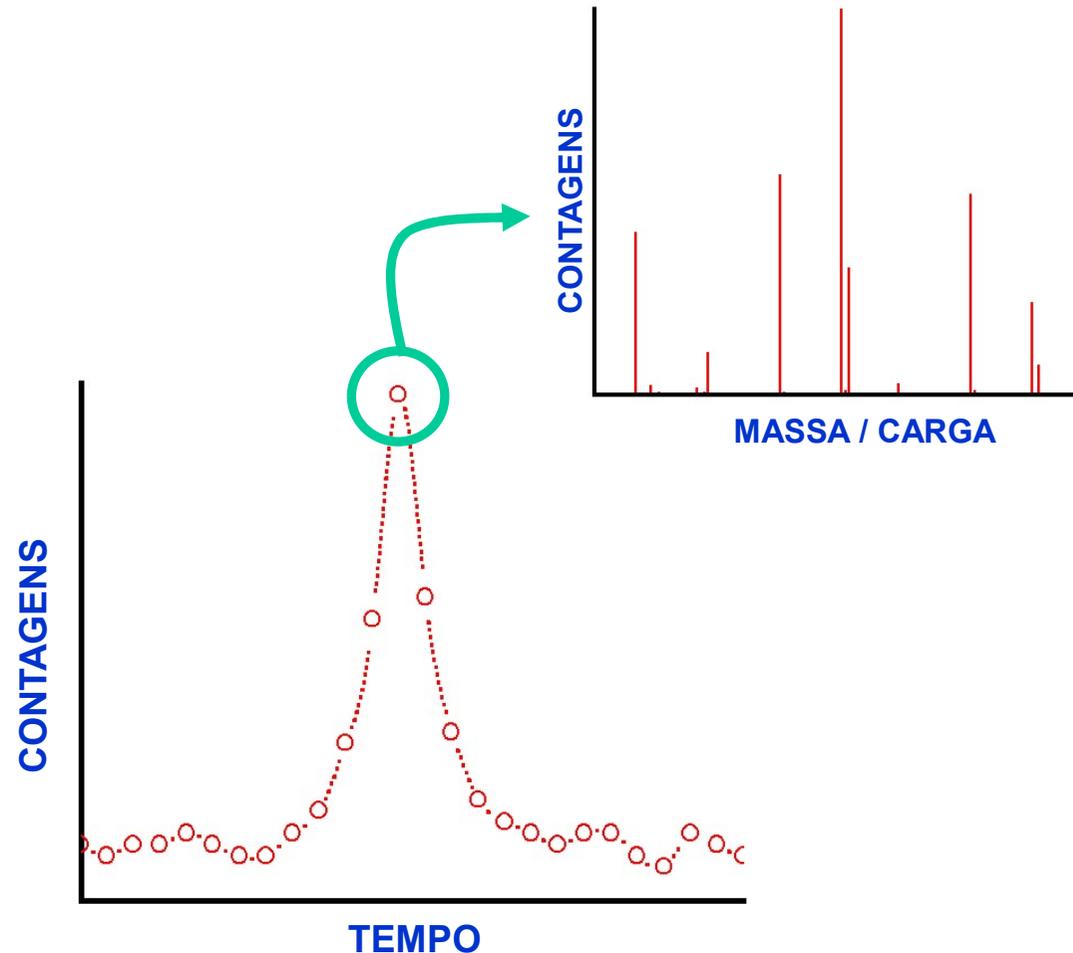


CG-EM (GC-MS): *Universal / Seletivo / Específico.*

Cromatograma de íons totais: SIM ou TIC

Em cada posição do cromatograma tem-se um espectro de massa.

TIC



CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

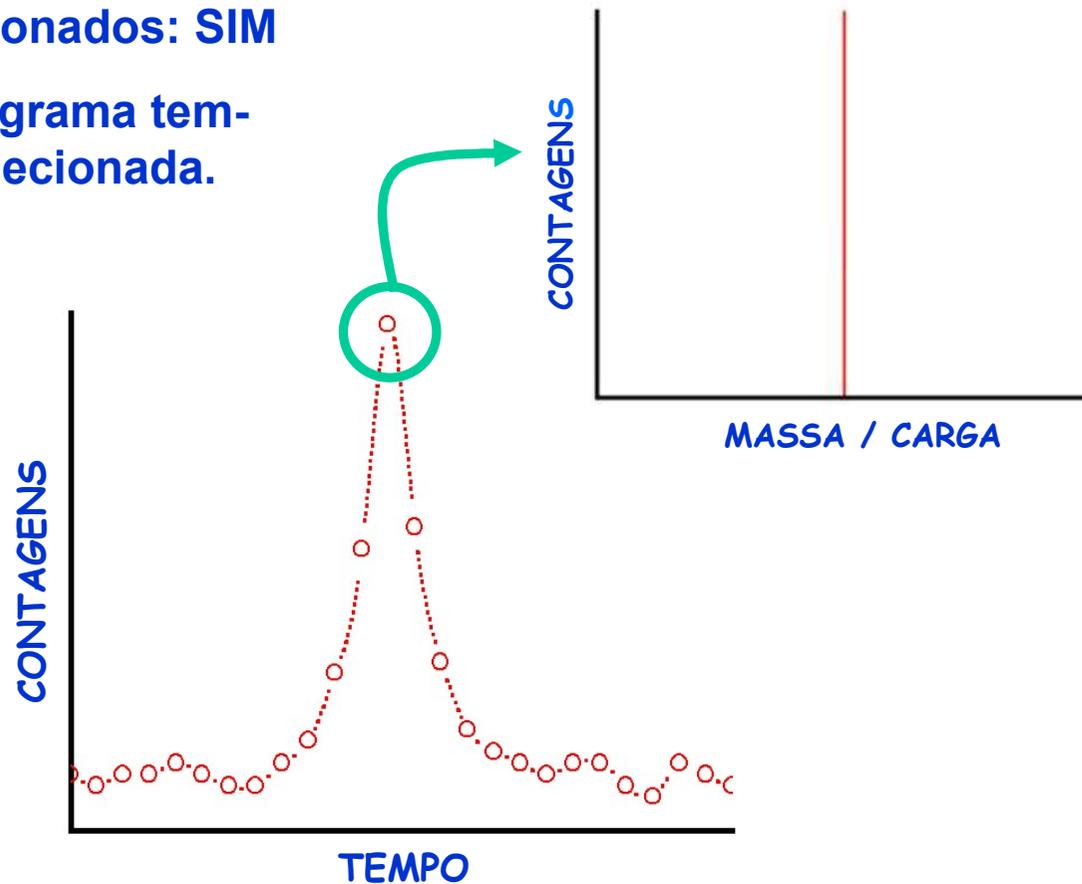
Detectores – Espectrometria de massas

★ CG-EM (GC-MS): Universal / Seletivo / Específico.

Cromatograma de íons selecionados: SIM

Em cada posição do cromatograma tem-se o sinal somente da m/z selecionada.

Oferece a vantagem de registrar somente o sinal do constituinte de interesse, sendo “cego” para os demais.

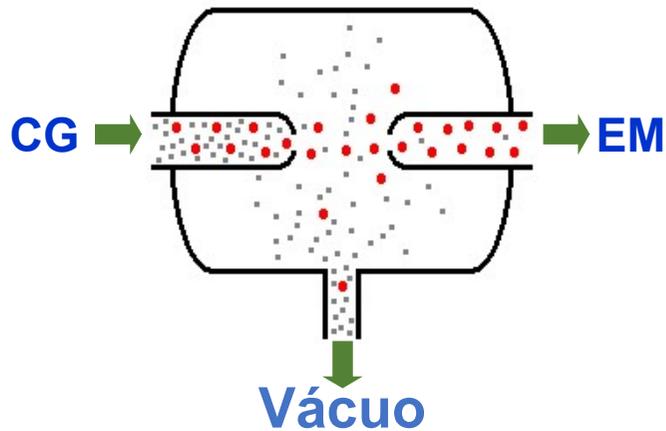


CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Detectores – Espectrometria de massas

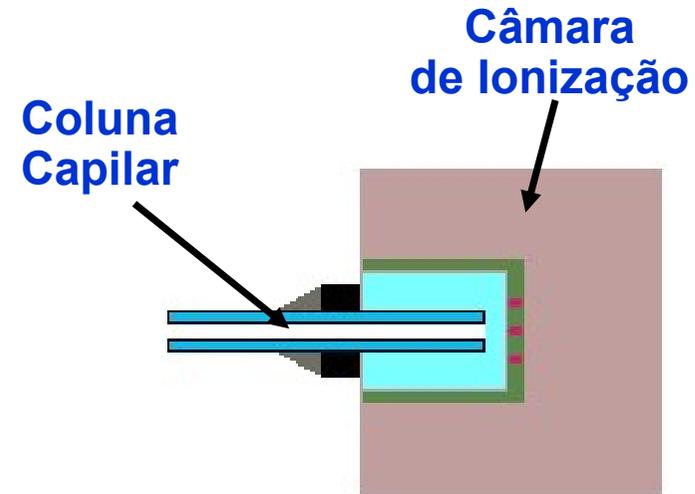


CG-EM (GC-MS): Interface CG-EM.



Separador Molecular

O gás de arraste leve (He) difunde mais rapidamente que o analito e tende a ser drenado para o vácuo.



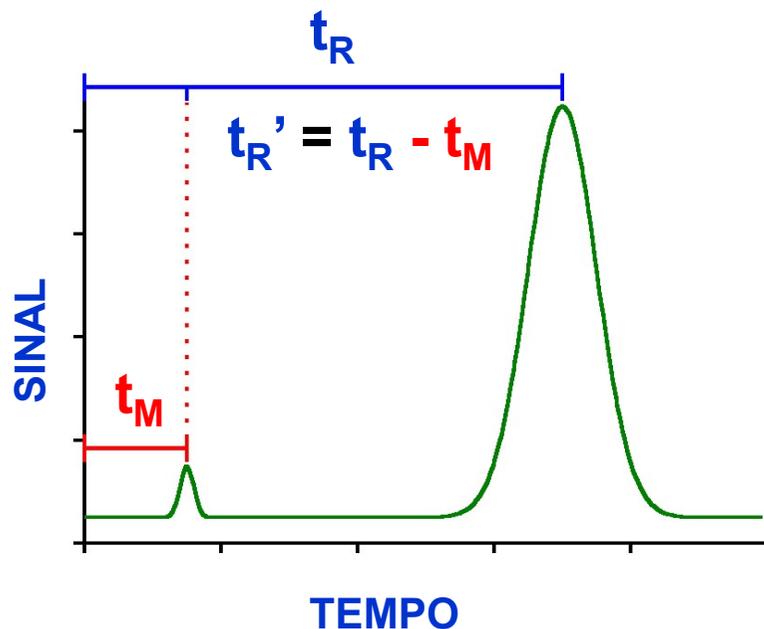
Interface Capilar Direta

Com colunas capilares a vazão baixa de gás de arraste pode ser drenada pelo sistema de vácuo.

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Análise qualitativa

O parâmetro diretamente mensurável de retenção de um analito é o **TEMPO DE RETENÇÃO AJUSTADO, t_R'** :



t_R = Tempo de Retenção (tempo decorrido entre a injeção e o ápice do pico cromatográfico)

t_M = Tempo de Retenção do Composto Não-Retido (tempo mínimo para um composto que não interaja com a FE através da coluna)

t_R' = Tempo de Retenção Ajustado (tempo médio que as moléculas do analito passam sorvidas na FE)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Análise qualitativa

Coluna HP-Innowax (PEG – altamente polar): 30 m x 0,25 mm x 0,25 mm

Detector FID: 250 °C

Injetor com divisão de fluxo 1:25: 250 °C

Volume injetado: 1 mL

Mistura de benzeno, n-propanona, n-propanol, n-butanol, isobutanol e n-pentanol.

Analitos	t_r (min)	PE (°C)	ϵ
<i>n</i> -propanona	2,319	56,05	21,01
benzeno	2,734	80,09	2,28
<i>n</i> -propanol	3,147	97,20	20,80
isobutanol	3,562	107,89	17,93
<i>n</i> -butanol	4,089	117,73	17,84
<i>n</i> - pentanol	5,449	137,98	15,13

Como se explica esta ordem de eluição?

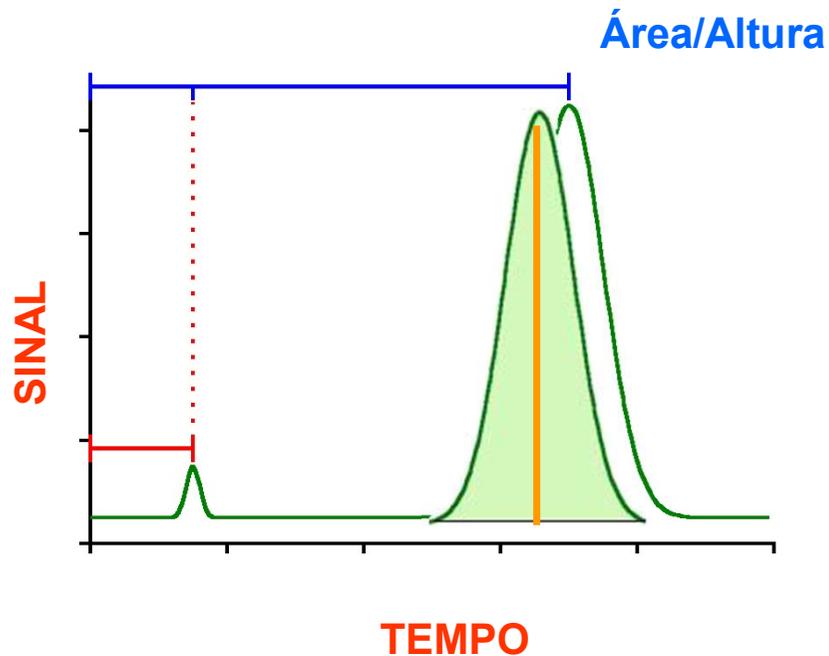
- 1. A n-propanona elui primeiro devido à sua maior volatilidade.**
- 2. O benzeno em segundo devido sua natureza apolar (menor ϵ) e maior volatilidade que os demais.**
- 3. Para os demais compostos, cujas diferenças de polaridade não são elevadas, a volatilidade se torna o principal parâmetro que define a ordem de eluição.**

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

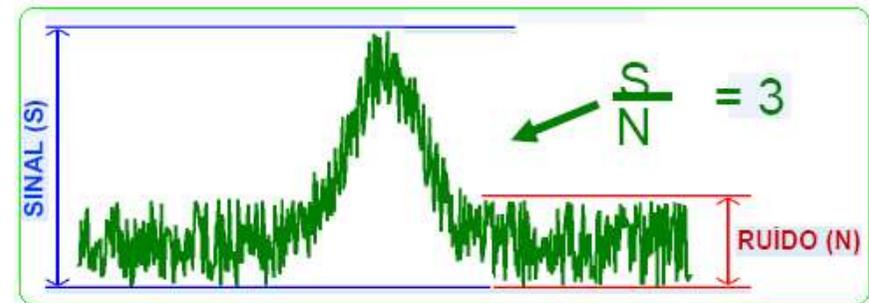
Análise quantitativa

O parâmetro diretamente relacionado à quantidade de analito é:

- **Altura da banda cromatográfica:** não recomendado, pois a banda necessita ser perfeitamente simétrica.
- **Área da banda cromatográfica.**

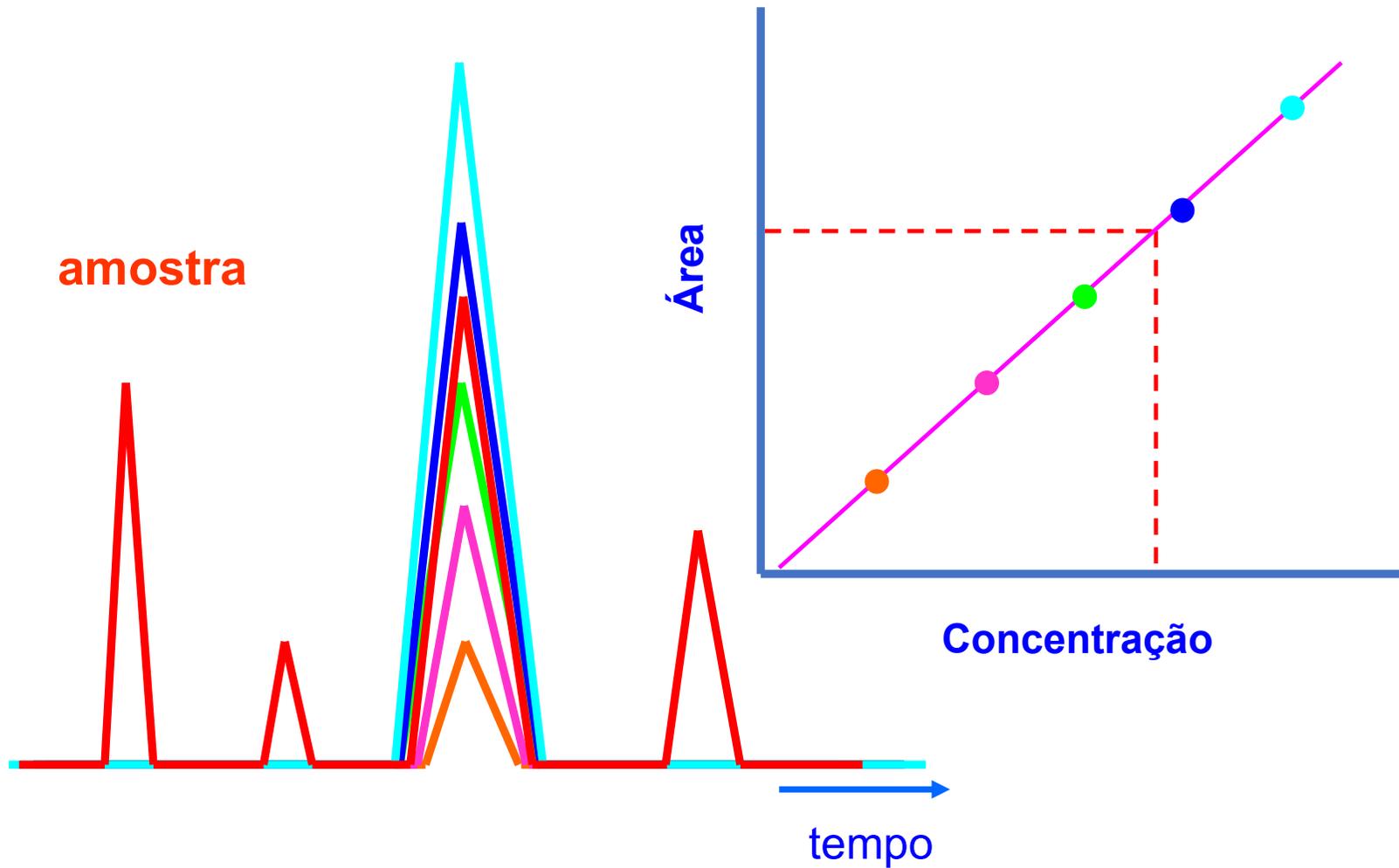


(Três Vezes o Nível do Ruído)



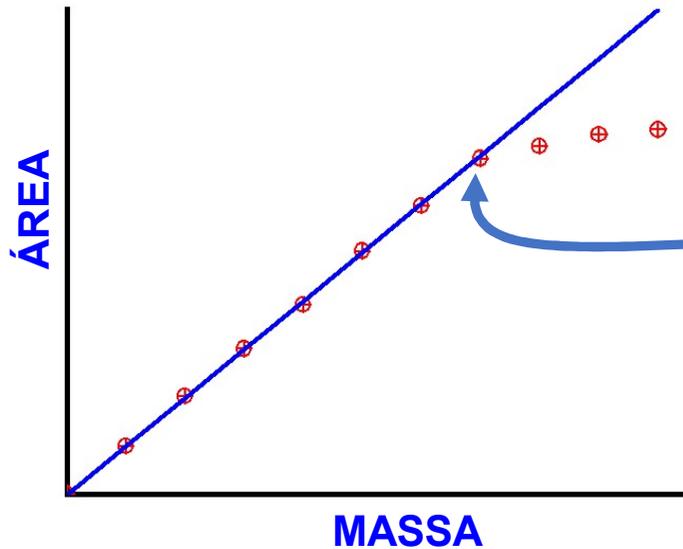
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Análise quantitativa

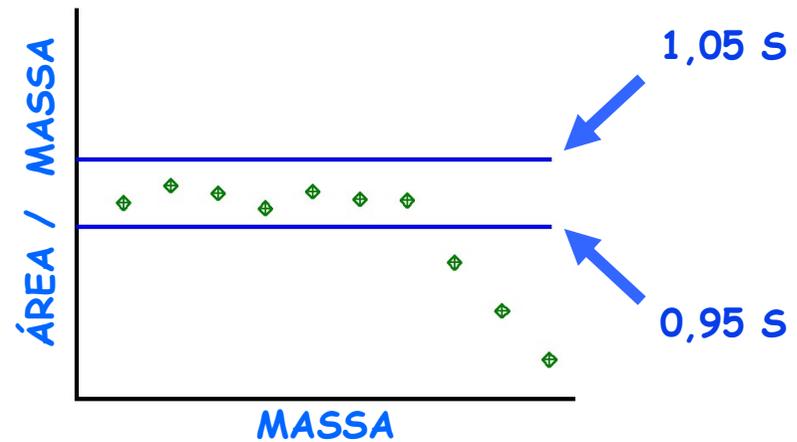


CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

Análise quantitativa

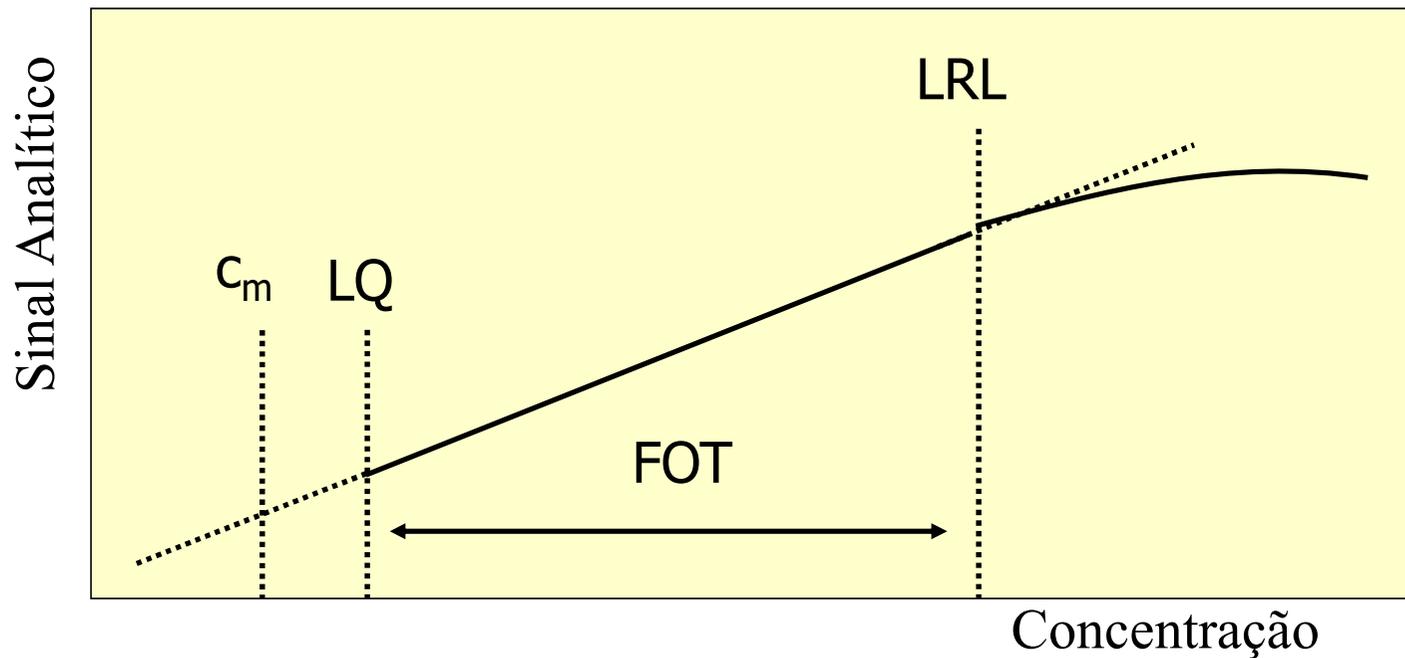


A partir de certo ponto o sinal não aumenta mais linearmente



CROMATOGRÁFIA/TERMOS USUAIS

- **Limite de quantificação (LQ):** Considera-se ser a concentração para a qual o sinal analítico excede em 10 desvios padrões o sinal do branco.
- **Limite de resposta linear (LRL):** Concentração limite a partir da qual não é mantida a linearidade.



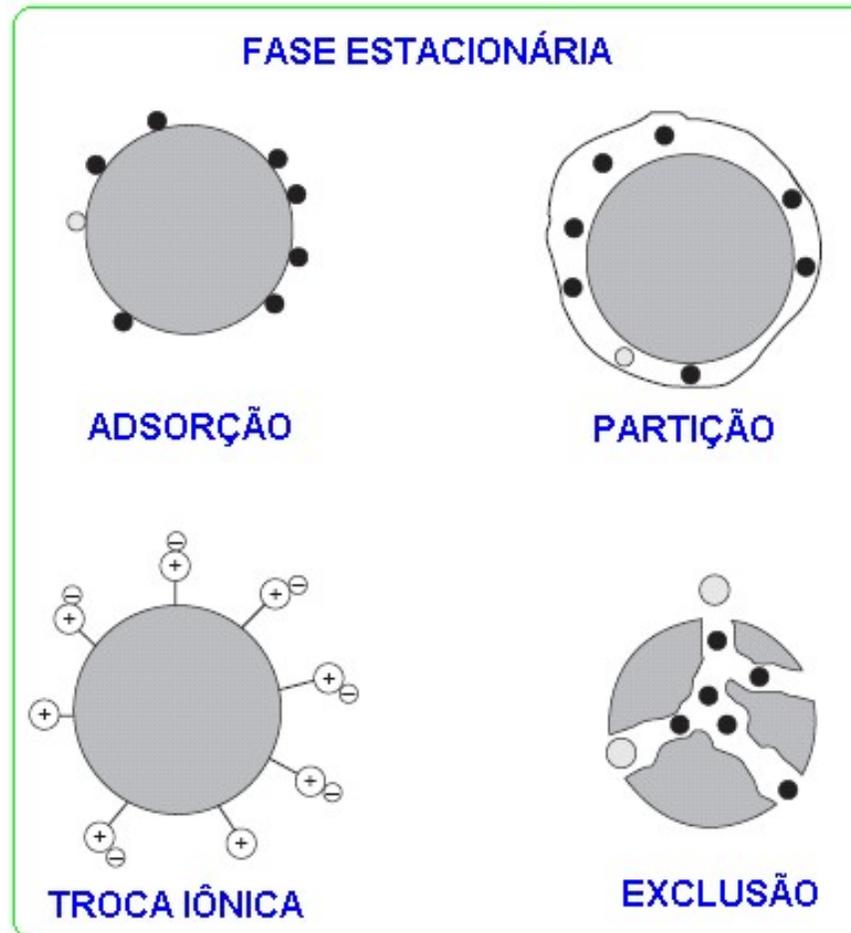
CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

COMPARAÇÃO CG/HPLC

FATOR	CG	HPLC
Requisito da amostra	Amostra volátil Estáveis na temperatura de trabalho	Amostra solúvel na FM
Tipo de amostra	Gases, líquidos e sólidos (Baixo peso molecular)	Líquidos e sólidos Iônicos ou covalentes Baixo e alto Peso Molecular
Tempo de análise relativo	Em geral mais rápida que HPLC	Mais lenta que CG
Pratos teóricos (Eficiência)	Até 300.000	Até 30.000
Capacidade relativa	Pobre	Boa
Sensibilidade	10^{-12} DIC / DCE	10^{-9} (UV) 10^{-12} (Coulométrica)

CROMATOGRAFIA EM COLUNA - CG

- FE.



CROMATOGRAFIA - BIBLIOGRAFIA

- HARRIS, D. C. . *Análise Química Quantitativa*, Sétima Edição, Itc (Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda), Rio de Janeiro, (Tradução de 7th ed Quantitative Chemical Analysis), 2008.
- COLLINS, C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7ª Edição, Campinas- SP, Editora da UNICAMP, 1997.

CROMATOGRAFIA - BIBLIOGRÁFIA

- ENGEL, R. G.; KRIZ, G. S.; LAMPMAN, G. M.; PAIVA, D. L. . ***Química Orgânica Experimental***. Tradução da 3ª Edição, Cengage Learning, São Paulo, 2013. Técnica 19 (Cromatografia em coluna); Técnica 20 (Cromatografia em Camada Delgada); Técnica 21 (Cromatografia Líquida de alta eficiência); Técnica 22 (Cromatografia Gasosa).
- SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. ***Princípios de análise instrumental***. 5ª. Ed., 2002.

CROMATOGRAFIA - BIBLIOGRAFIA

- RANDERATH, K. . *Chromatographie sur couches minces*, 2ª Édition, Gauthier- Villar Éditeur, Paris, 1971.
- VOGEL, A. I. . *Química Orgânica: Análise Orgânica Qualitativa*, Editora Ao Livro Técnico S. A. Universidade de São Paulo, SP, 1971.

CROMATOGRAFIA - BIBLIOGRÁFIA

- **Videos:**

- <https://www.youtube.com/watch?v=5HX901YGNNg&t=871s> (Introdução)

- <https://www.youtube.com/watch?v=uoBAKoNpPv0>
(Cromatografia a Gás)

- <https://www.youtube.com/watch?v=NHjv8EsZxHQ>
(Cromatografia Líquida)

ATÉ A PRÓXIMA AULA

CROMATOGRAFIA EM COLUNA

FIM ATÉ PRÓXIMA AULA