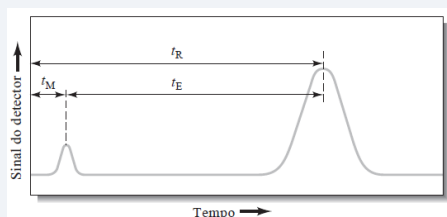


Aula

Introdução às separações cromatográficas



Prof. Jany Hellen Ferreira de Jesus



1

Referências



- ▶ D. Skoog, J. Holler, S. Crouch. Princípios de Análise Instrumental, Bookman, 6ed.
- ▶ D. Skoog, D. West, J. Holler, S. Crouch. Fundamentos de Química Analítica, Thomson, 9ed.
- ▶ Daniel C. Harris, Análise Química Quantitativa, Editora LTC, 9ed.
- ▶ G. D. Christian. Analytical chemistry. John Wiley & Sons, 7ed.

Complementares

- ▶ C. H. Collins, G. L. Braga, P. S. Bonato. Fundamentos de cromatografia, editora UNICAMP.

2

2

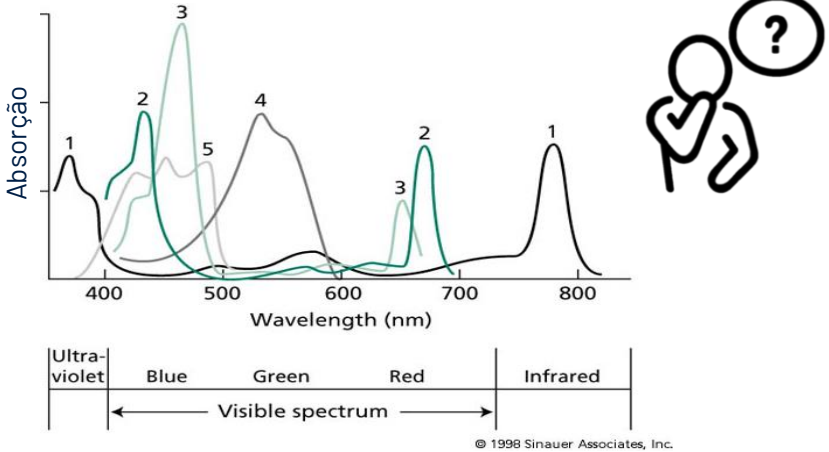
Introdução à cromatografia

1

3

Como analisar?

- ▶ Espectros de absorção de diferentes substâncias



Espectros de absorção diferentes substâncias(1: bacterioclorofila; 2: clorofila a; 3: clorofila b; 4: ficoeritrobilina; 5: beta-caroteno)

4

4

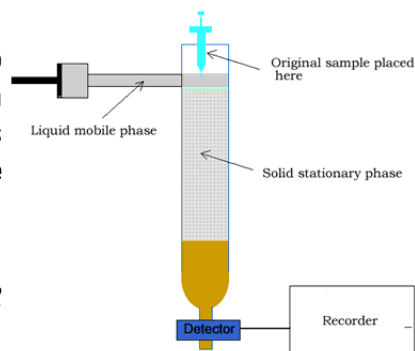
Cromatografia: O que é?



Definição da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

- ▶ Método físico-químico de **separação** no qual os componentes da amostra a serem separados distribuem-se entre duas fases: uma **fase estacionária** e uma **fase móvel**, que flui em uma direção definida.

Pure and Applied Chemistry 65(4)(1993)819-872



5

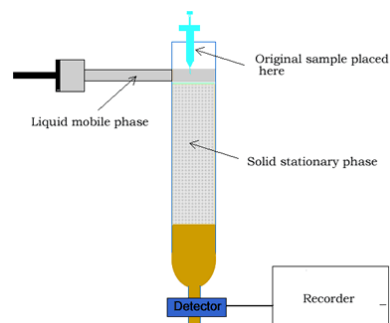
<https://dynamicscience.com.au/solutions1/chemistry/New%20Folder/columnchromatography.htm>

5

Cromatografia: O que é?



- ▶ A **fase que se move** denomina-se **fase móvel**. Gases e líquidos são usados como fases móveis.
- ▶ A **fase que não se move** denomina-se **fase estacionária** ou suporte. Como fase estacionária, são empregados sólidos e líquidos.
- ▶ Passagem da fase móvel sobre a fase estacionária;
- ▶ Componentes da mistura são **distribuídos entre as duas fases**, cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária
- ▶ **Migrações diferentes** destes componentes.



6

6

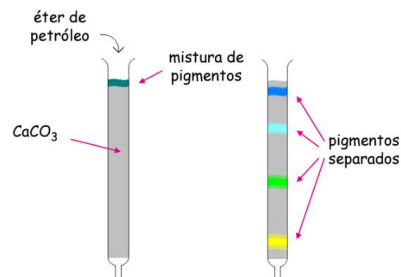
Cromatografia: O que é?



- ▶ Método que permite a **separação** e determinação de componentes químicos em misturas complexas.
- ▶ Nenhum outro método de separação é tão poderoso e de aplicação tão generalizada como a cromatografia.



M. TSWEET (1903): Separação de misturas de pigmentos vegetais em colunas recheadas com adsorventes sólidos e solventes variados.



Cromatografia = kroma [cor] + graph [escrever] (grego)

google.com.br/imagens

7

7

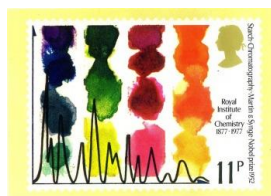
Cromatografia: O que é?



- ▶ Em 1941 – os ingleses A.J.P. Martin e R.L.M. Synge separaram ácidos monoaminoácidos em coluna de sílica contendo adsorvidos alaranjado de metila e clorofórmio – introduzindo a cromatografia de partição líquido-líquido – receberam o prêmio Nobel de Química em 1952



Martin e Synge



Selo lançado em 1977 pelos Correios (Reino Unido) para marcar o centenário da *Royal Society of Chemistry* e comemorar o Prêmio Nobel de Química de Martin e Synge pelo desenvolvimento da cromatografia de partição. ©Stamp Design Royal Mail Group, Ltd.

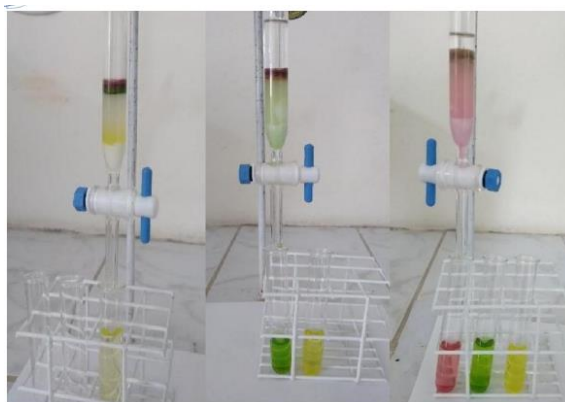
Cromatografia = kroma [cor] + graph [escrever] (grego)

8

Fonte: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160932719300857>

8

Cromatografia: O que é?



Fracionamento da mistura desidratada de cenoura, folhas de couve e beterraba

Cromatografia = **kroma** [cor] + **graph** [escrever] (grego)

9

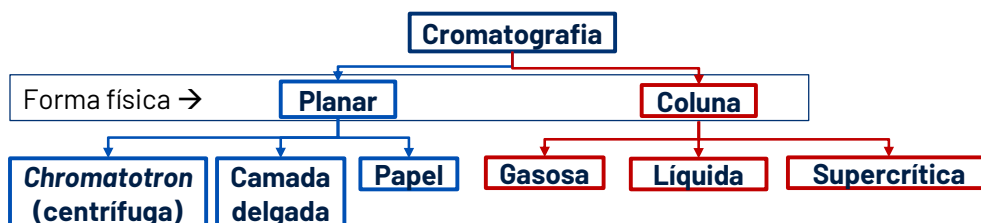
Fonte: Separação de pigmentos naturais por cromatografia em coluna: proposta de um experimento fácil e rápido. L. A. Xavier, E. C. A. de Souza e E. de L. Rebouças

9

Cromatografia: O que é?



- ▶ Todos esses métodos apresentam em comum o uso de uma **fase estacionária (F.E.)** e de uma **fase móvel (F.M.)**.
- ▶ As separações ocorrem com base nas diferentes velocidades de migração dos componentes da amostra entre as fases móvel e estacionária
- ▶ Vários critérios são usados para a **classificação** das diferentes modalidades de cromatografia; em geral são relacionados como **técnica empregada**, o **mecanismo de separação** e o **tipo de fases** utilizado.



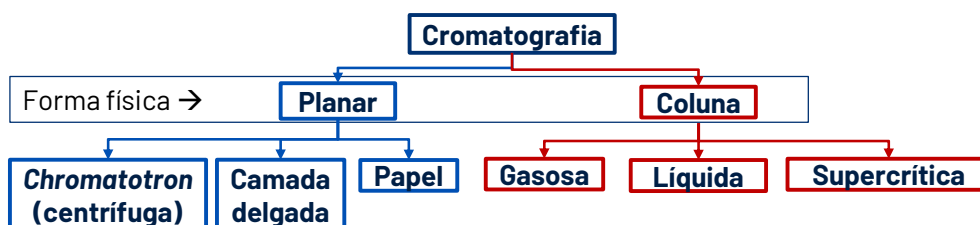
10

10

Cromatografia: O que é?

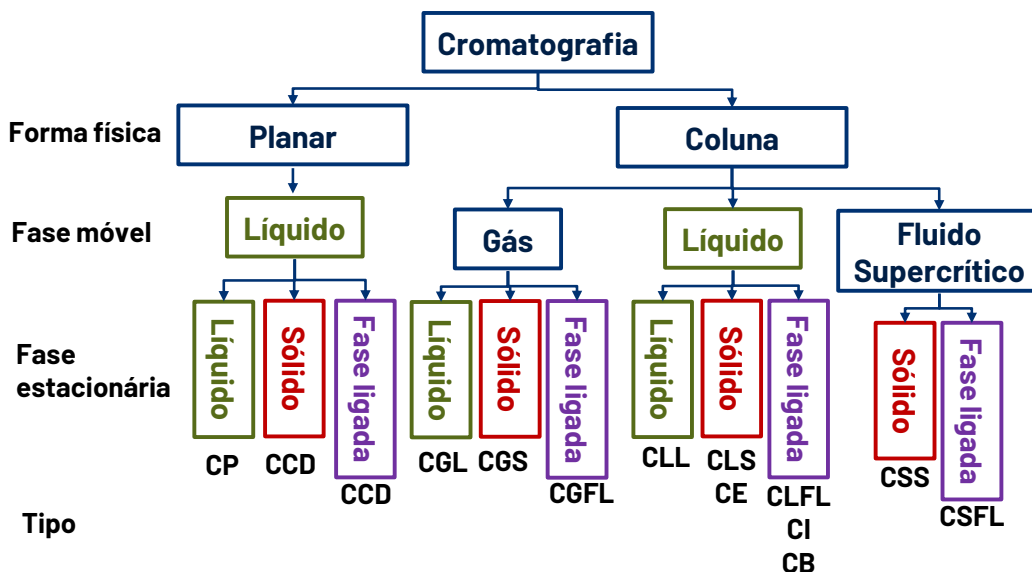


- ▶ A forma física do sistema de cromatografia define a técnica geral: a F.E. pode ser colocada em um **tubo cilíndrico** ou pode ser disposta sobre uma **superfície planar**.
- ▶ Cromatografia em coluna: preparativas (6-50mm); analíticas (2-6mm); microdiâmetro (1-2mm) e capilares (<1mm).



11

11



CP = cromatografia em papel; CCD = cromatografia em camada delgada; CGL = cromatografia gás-líquido; CGS = cromatografia gás-sólido; CGFL = cromatografia gasosa fase ligada; CLL = cromatografia líquido-líquido; CLS = cromatografia líquido-sólido; CE = cromatografia por exclusão; CLFL = cromatografia líquido-fase ligada; CI = cromatografia iônica; CB = cromatografia por bioafinidade; CSS = cromatografia supercrítica com fase estacionária sólida; CSFL = cromatografia supercrítica com fase ligada.

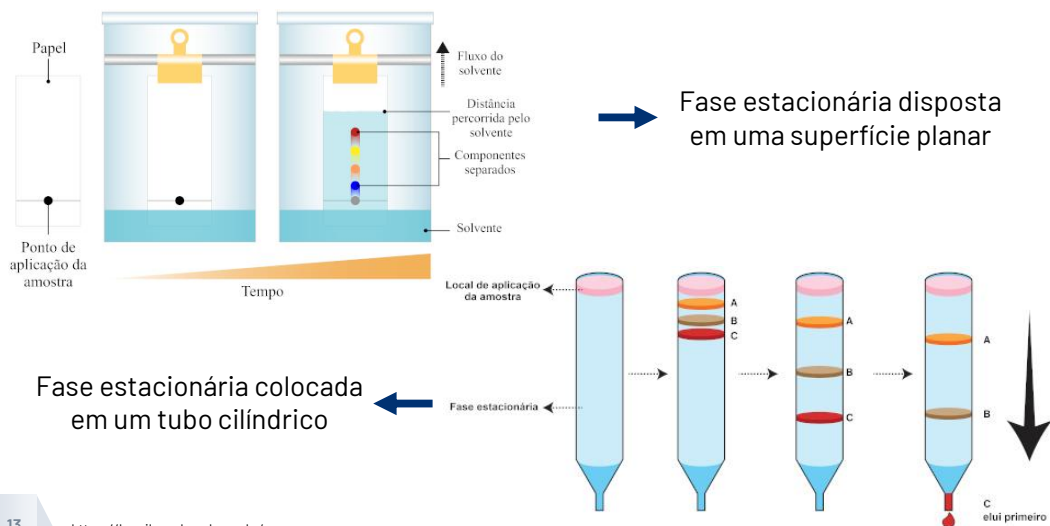
12

12

Cromatografia: Classificação



Cromatografia planar ou cromatografia em coluna

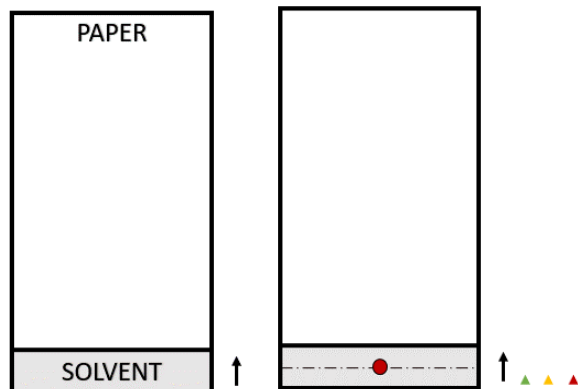


13

<https://brasilescola.uol.com.br/>

13

Cromatografia Planar

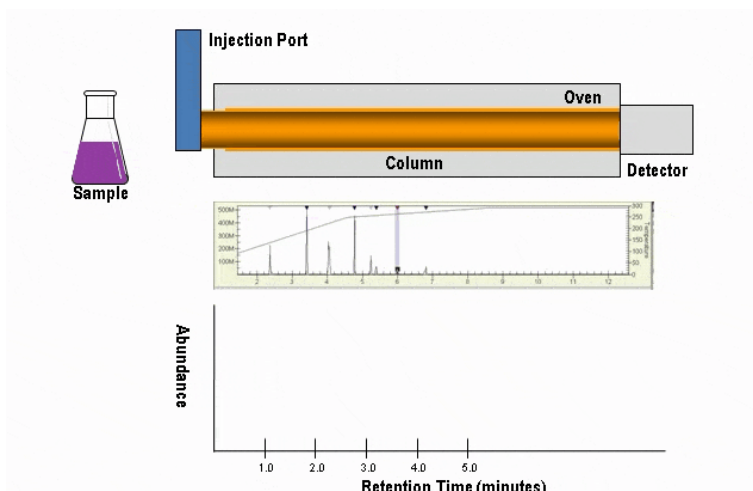


14

<https://chemistrytalk.org/what-is-chromatography/> e <https://h5p.org/h5p/embed/850137>

14

Cromatografia em coluna



15

<https://instrumentationtools.com/working-principle-of-gas-chromatograph/>

15

Cromatografia em coluna



Classificação dos Métodos Cromatográficos em Coluna

Classificação Geral	Método Específico	Fase Estacionária	Tipo de Equilíbrio
Cromatografia gasosa (CG)	Gás-líquido (CGL)	Líquido adsorvido ou ligado à superfície de um sólido	Partição entre o gás e o líquido
Cromatografia líquida (CL)	Gás-sólido	Sólido	Adsorção
	Líquido-líquido ou partição	Líquido adsorvido ou ligado à superfície de um sólido	Partição entre líquidos imiscíveis
	Líquido-sólido ou adsorção	Sólido	Adsorção
	Troca iônica	Resina trocadora de íons	Troca iônica
móvel	Exclusão por tamanho	Líquido nos interstícios de um sólido polimérico	Partição/penetração
	Afinidade	Líquido específico para determinado grupo ligado a uma superfície sólida	Partição entre líquido superficial e o líquido
Cromatografia supercrítica (CS) (fase móvel é um fluido supercrítico)		Espécies orgânicas ligadas a uma superfície sólida	Partição entre o fluido supercrítico e a fase ligada

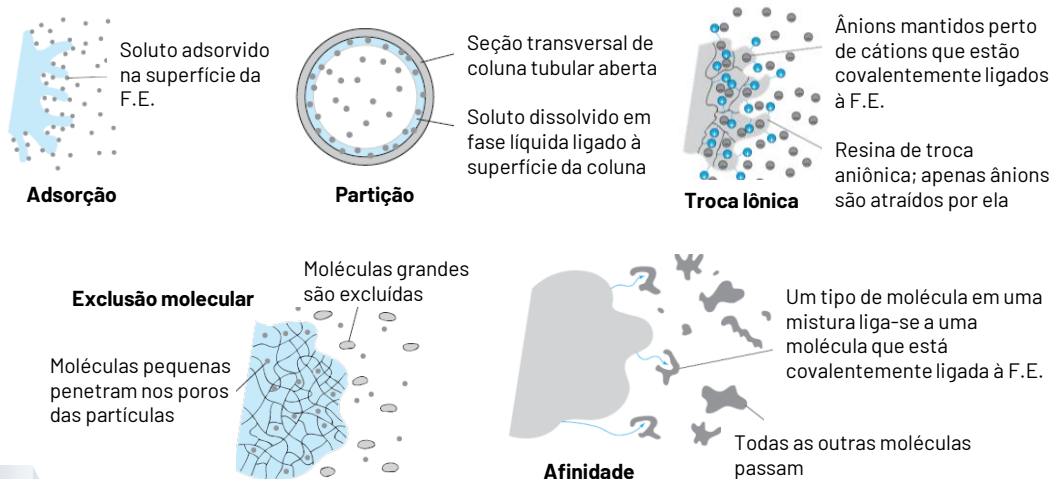
16

16

Cromatografia - Classificação



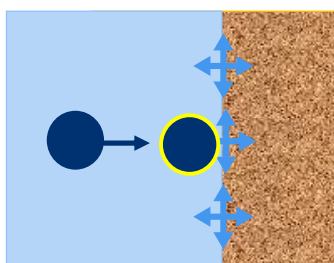
- ▶ Dividida em categorias com base no mecanismo de interação do soluto com a F.E.:



17

17

Cromatografia - Adsorção



- ▶ Interações eletrostáticas que ocorrem entre grupos ativos presentes na superfície da fase estacionária **SÓLIDA** e a fase móvel
- ▶ Dipolo-dipolo, Van de Waals ou ligações de hidrogênio



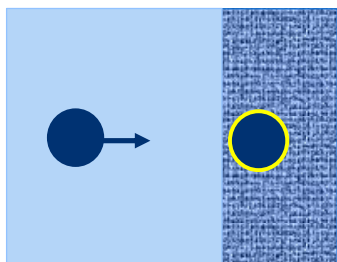
- ▶ Combinação de processos de **adsorção/dessorção**.

Em processos cromatográficos, a adsorção é sempre reversível

18

18

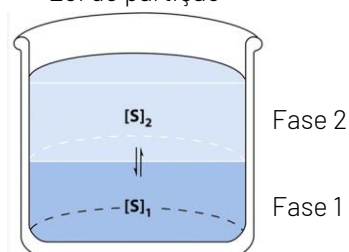
Cromatografia - Partição



- ▶ Ocorre quando a fase estacionária é um líquido espalhado na superfície de um sólido inerte.
- ▶ Baseada nas **diferenças de solubilidade** dos componentes da amostra (analitos) em uma mistura de líquidos.



Lei de partição



Partição: soluto (analito) se "dissolve" na fase estacionária

19

19

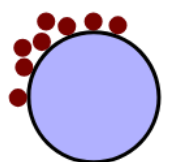
Cromatografia - Classificação



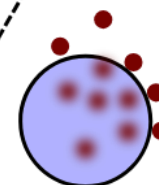
Adsorção
Moléculas aderem à superfície



Absorção
Moléculas penetram



Adsorption



Absorption

20

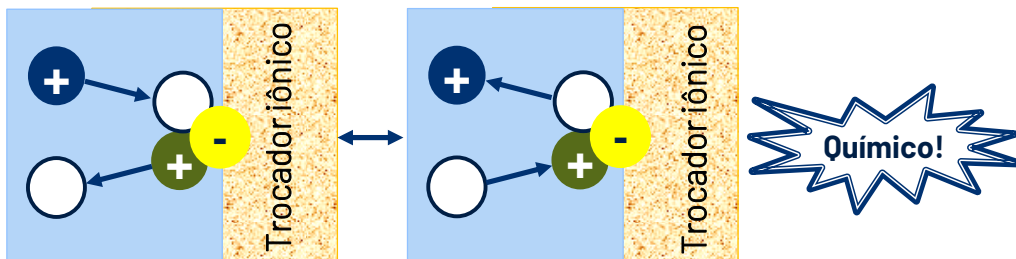
<https://www.energyvanguard.com/blog/the-experts-discuss-hygrothermal-analysis/attachment/attachment-adsorption-vs-absorption/>

20

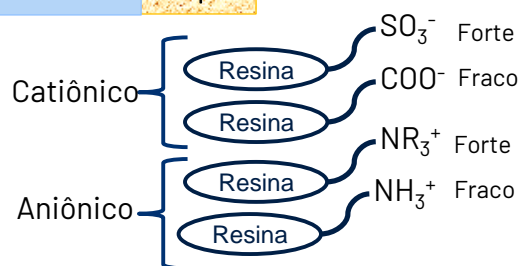
Cromatografia - Troca Iônica



Quimissorção: há interação química, transferência de elétrons e ligações químicas



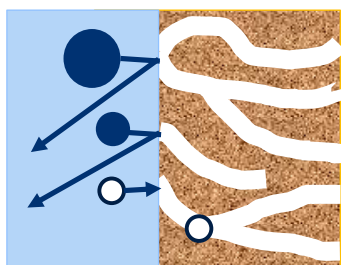
- Troca entre os íons da fase móvel e o trocador iônico
- Maior interação: íons de alta carga e menor tamanho
- Diferenças de afinidade podem ser controladas por pH e força iônica



21

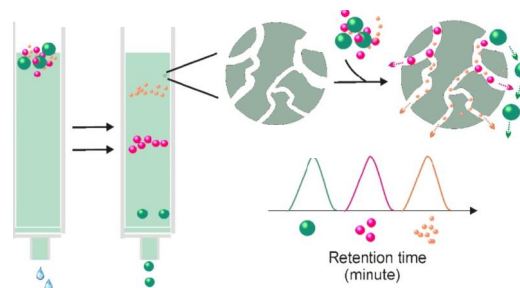
21

Cromatografia - Exclusão Molecular



Gel: Inércia Química, Estabilidade, baixo teor de íons (dextrano, poliacrilamida)

- ▶ A fase estacionária tem estrutura similar a uma peneira e **separa** os componentes da amostra com base no **tamanho** das moléculas



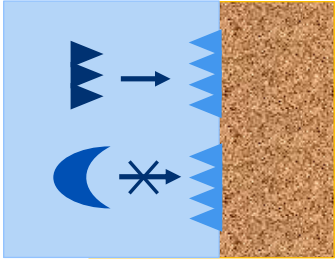
- ▶ Moléculas maiores são eluídas mais rapidamente da coluna e moléculas menores penetram nos poros da fase estacionária, ficando mais tempo retidas.

22

22

Cromatografia - Bioafinidade

Quimissorção: há interação química e ligações químicas

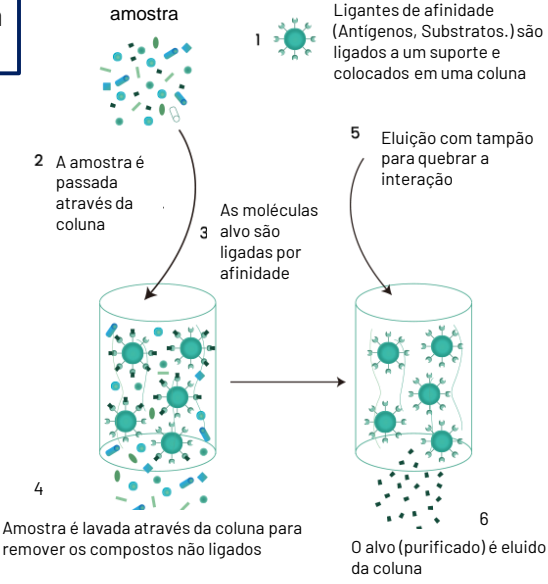


Químico!

- Antígeno → Anticorpo
- Substrato → Enzima
- Lectinas → Açúcares

23

23



<https://www.sinobiological.com/resource/protein-review/protein-purification-by-ac>

Cromatografia Planar

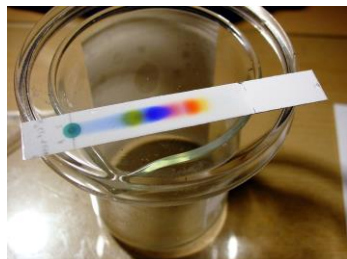
2

24

Cromatografia Planar

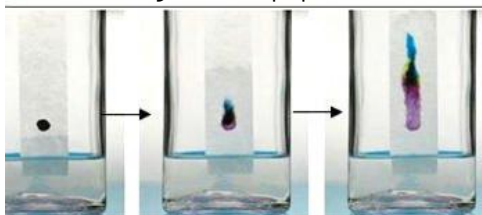


Cromatografia em camada delgada (CCD)



Chromatotron

Cromatografia em papel (CP)

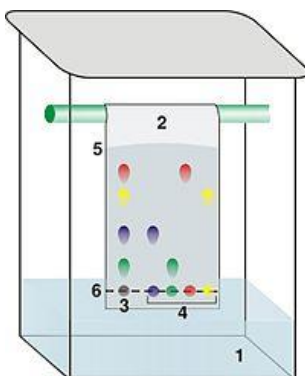


25

https://www.wikiwand.com/pt/Cromatografia_em_camada_delgada, <https://www.sbwave.com/chromatotron/>, <https://www.todamateria.com.br/cromatografia/>

25

Cromatografia Planar



1. Solvente (fase móvel)
2. Fase estacionária
3. Amostra
4. Padrões
5. Linha de chegada do solvente
6. Linha de amostragem

Ex: Separação de mistura de pigmentos



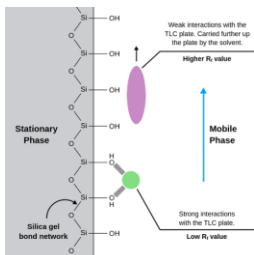
26

26

Cromatografia em Camada Delgada



Fase estacionária: Sílica gel, alumina, celulose, poliamida... (principalmente adsorção)



Fase móvel:

- Mistura de solventes pouco polares com solventes mais polares
+ polar = + forte
- Ordem de eluição:
Menos polares → mais polares

Adsorvente polar (ex.: sílica ou alumina): afinidade por substâncias polares.

- Substâncias apolares (ex.: hidrocarbonetos) não terão afinidade pelo adsorvente → não serão retidas, deslocando-se com a fase móvel.
- Substâncias polares (ex.: substâncias que possuem oxigênio na molécula) → serão retidas pela fase estacionária polar, não se deslocando.

27

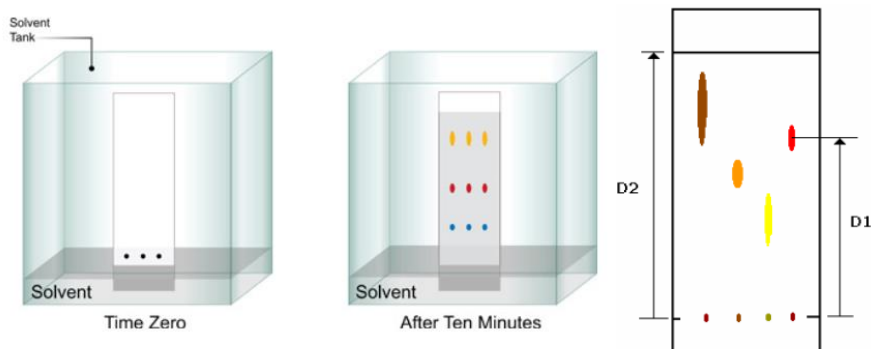
27

Cromatografia em Camada Delgada



Análise quantitativa:

- Comparação com valores de R_f tabelado;
- Comparação com padrão eluído em conjunto;
- Extrato e aplicação de métodos instrumentais

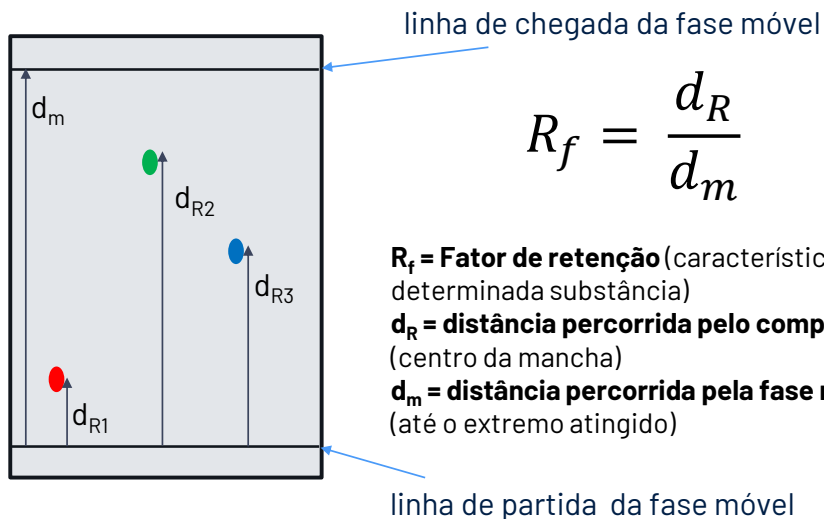


28

Fonte: <http://www.ufsm.br/larp>

28

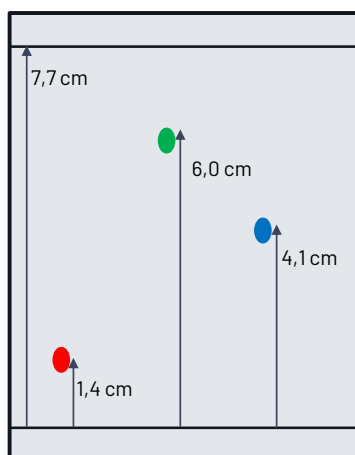
Cromatografia em Camada Delgada



29

29

Cromatografia em Camada Delgada



$$\text{spot } R_f = \frac{1.4 \text{ cm}}{7.7 \text{ cm}} = 0.18$$

$$\text{spot } R_f = \frac{6.0 \text{ cm}}{7.7 \text{ cm}} = 0.78$$

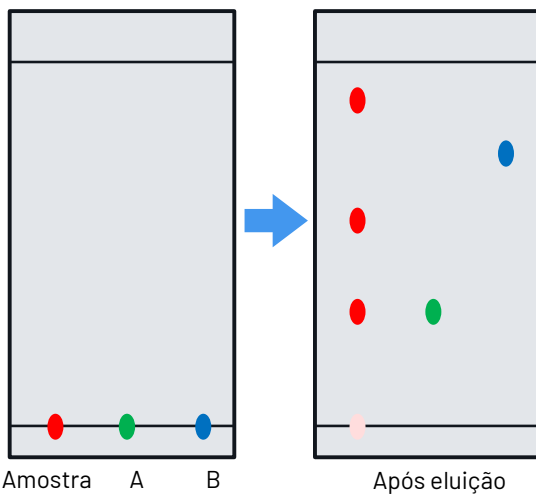
$$\text{spot } R_f = \frac{4.1 \text{ cm}}{7.7 \text{ cm}} = 0.53$$

Dica: trabalhar com o padrão e a amostra de forma mais semelhante possível e fazer a análise nas mesmas condições (papel, fase móvel, temperatura...)

30

30

Cromatografia em Camada Delgada



Conclusões

Amostra não contém a espécie "B"

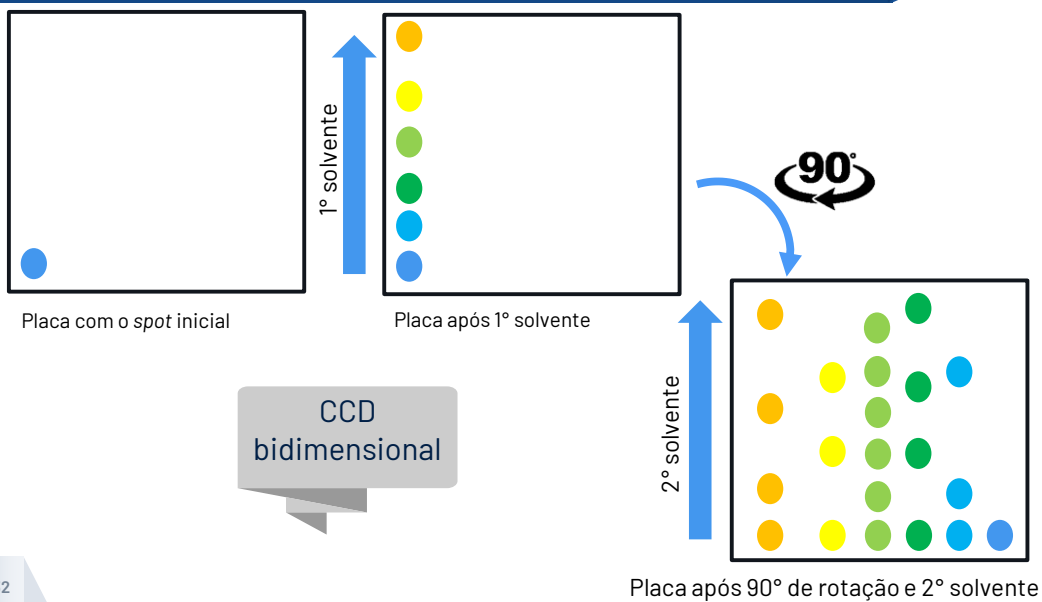
A amostra pode conter a espécie "A"

Para se certificar: eluir em outros solventes

31

31

Cromatografia em Camada Delgada



32

32

Cromatografia em Camada Delgada



Os compostos orgânicos geralmente aparecem incolores em uma placa de CCD
 → Não conseguimos ver!!! É necessário convertê-los em algo visível.

Os métodos de visualização (**reveladores**): **não destrutivos** (ex. luz ultravioleta) ou **destrutivos** (ex. usar uma coloração química).

Visualização de uma placa CCD sob luz ultravioleta



33

<https://chem.libretexts.org/>

33

Cromatografia em Camada Delgada



- O p-anisalaldeído e a vanilina são de uso geral e funcionam para muitos nucleófilos fortes e fracos (álcoois, aminas) e para muitos aldeídos e cetonas. As placas necessitam de leve aquecimento.

Spot 1: 4-Heptanone
 Spot 2: acetophenone
 Spot 3: cinnamaldehyde
 Spot 4: ethyl benzoate

- Outros exemplos: EtOH-H₂SO₄ 8:2 revelador universal (forte agente oxidante), ninidrina para aminoácidos, vapor de cristais de I₂ para substâncias com duplas ligações (inclusive aromáticas).

34

<https://chem.libretexts.org/>

34

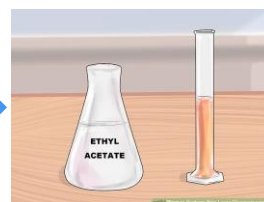
Cromatografia em Camada Delgada



Corte uma placa



Marque a placa



Escolha o solvente



Pressione levemente a ponta da pipeta no ponto marcado



Pegue uma pequena quantidade de solução (pipeta)



Prepare a solução

35

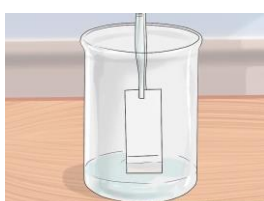
<https://www.wikihow.life/Perform-Thin-Layer-Chromatography>

35

Cromatografia em Camada Delgada



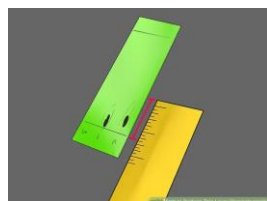
Coloque delicadamente a placa no frasco de solvente. Não mova o sistema.



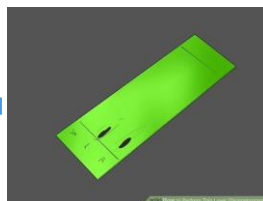
Esperre o solvente chegar ao topo da placa



Remova a placa



Calcule o fator de retenção



Visualize



Seque a placa

36

<https://www.wikihow.life/Perform-Thin-Layer-Chromatography>

36

Cromatografia Planar – Pontos importantes



- **Placas pré-fabricadas:** são mais uniformes e homogêneas do que as feitas no laboratório, melhorando a separação e tornando os valores de R_f mais reprodutíveis.
- Colocação da amostra **exatamente na linha de partida**, para não ocorrem variações nos valores de R_f .
- **Seleção da fase móvel:** o solvente ou mistura de solventes usados como fase móvel devem ser escolhidos cuidadosamente, pois vai haver uma competição entre as moléculas da fase móvel e da amostra pela superfície do adsorvente.
- **Dissolução das amostras** as amostras devem ser dissolvidas em solventes bastante voláteis (conc. entre 0.1 a 1%). Aplicação com pipeta automática ou tubos capilares de vidro.
- **Documentação:** Fotografar as placas reveladas quimicamente e desenhar em folha de papel de seda ou papel vegetal.

37

37

Cromatografia em Papel



Partição: dois líquidos, sendo um fixado em um suporte sólido (papel)

Fase estacionária: algum solvente (ex. água, solv. pouco polar)

Fase móvel: Solventes com polaridade oposta àquela da fase estacionária

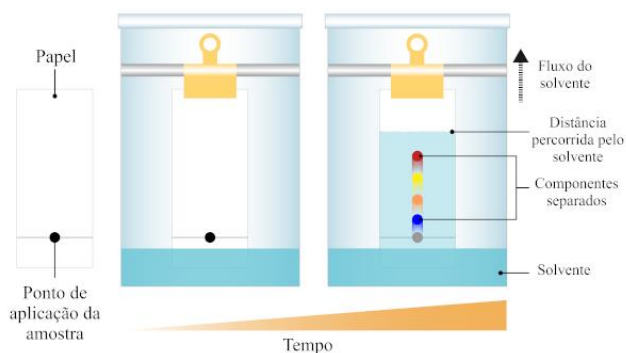
Ordem de eluição:

FE polar = Menos polares → mais polares

FE pouco polar = Mais polares → menos polares

CELULOSE
É APENAS O SUPORTE!

Mais simples de todas!!!



38

<https://brasilecola.uol.com.br/quimica/cromatografia.htm>

38

Cromatografia Planar

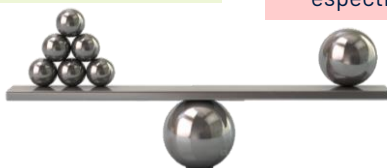


Vantagens

- Barata e acessível
- Simples para comparações qualitativas
- Diversas amostras simultâneas
- Boa para triagem
- Acompanhamento de reações em síntese
- Utilizada em processos de purificação

Desvantagens

- Bandas alargadas
- Relativamente lenta
- Difícil de automatizar
- Difícil de acoplar com espectrometria de massas



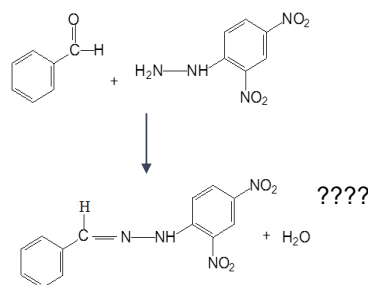
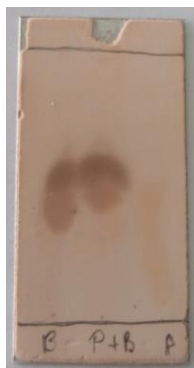
39

39

Cromatografia Planar - Aplicações



- Acompanhamento de reações em síntese



CCD do reagente (benzaldeído) à esquerda, do produto à direita e da mistura no centro.

40

40

Cromatografia Planar - Aplicações



JOURNAL OF
CHEMICAL EDUCATION

Communication
pubs.acs.org/jchemeduc

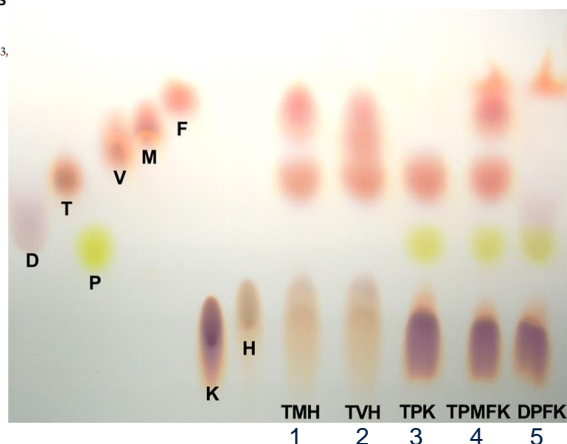
CCD

Ion Exchange and Thin Layer Chromatographic Separation and Identification of Amino Acids in a Mixture: An Experiment for General Chemistry and Biotechnology Laboratories

Linda S. Brunauer,^{*} Katelyn E. Caslavka,[†] and Karinne Van Groningen

Department of Chemistry and Biochemistry, Santa Clara University, Santa Clara, California 95053,

- As frações eluídas de uma coluna foram analisadas por CCD em placas de sílica gel juntamente com padrões dos aminoácidos.
- Revelação com ninidrina.



41

41

Cromatografia Planar - Aplicações



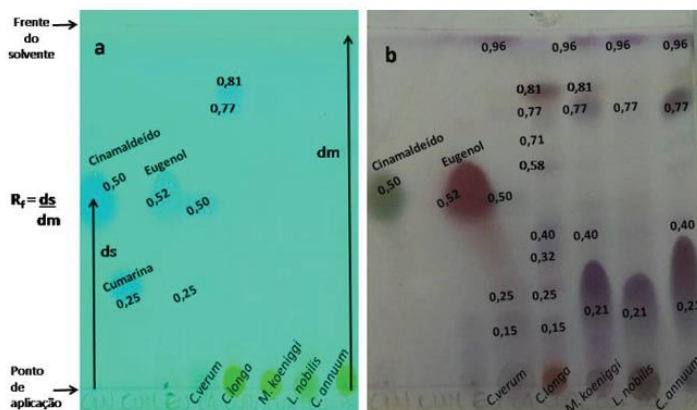
<http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170405>

Quim. Nova, Vol. 42, No. 8, 962-970, 2019

APLICAÇÃO DE CONDIMENTOS NA REVELAÇÃO DE IMPRESSÕES DIGITAIS LATENTES: UM EXPERIMENTO NO ENSINO DE QUÍMICA

Caroline Nicolodi^a, Bruno Nunes da Rosa^a, Caroline Carapina da Silva^a, Lucas Moraes Berneira^a, Bruna S. Pacheco^a, Tais Poletti^b, Dalila Venzke^a, Kristiane C. Mariotti^{b,c} e Claudio M. P. Perreira^{a,c,*}

Figura: a) Revelação da CCD utilizando luz UV a 254nm. b) Revelação da CCD utilizando como revelador anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento.



42

42

Princípios das Separações Cromatográficas

3

43

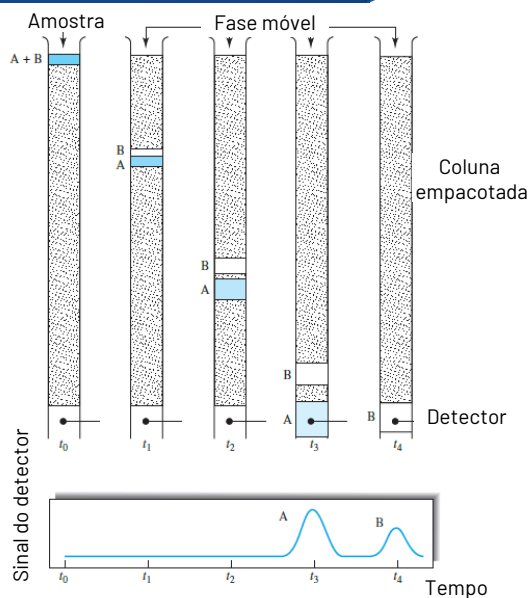
Cromatografia: Eluição



A e B, são resolvidos por **eluição (processo)**: processo no qual os solutos são lavados através da **F.E.** pelo movimento de uma **F.M.**

Eluente é o solvente empregado para transportar os componentes de uma mistura através de uma F.E. **Eluato** é o fluido que emerge ao final da coluna.

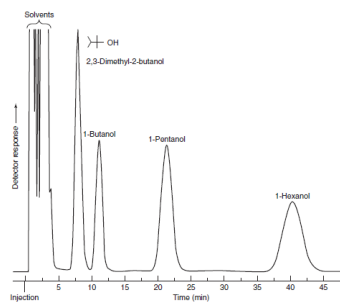
Detector apropriado: sinal registrado em função do tempo → série de picos → **Cromatograma**.



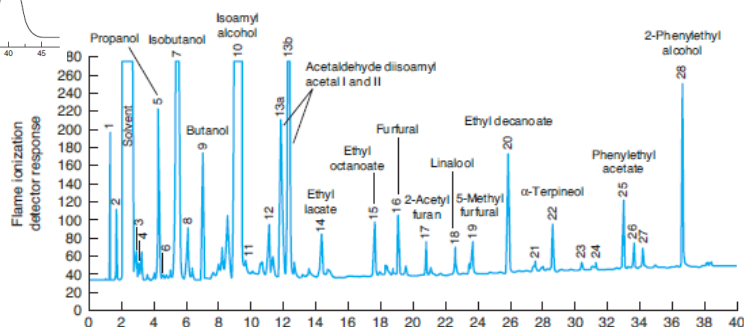
44

44

Cromatograma



Cromatograma: gráfico mostrando a resposta do detector em função do tempo de eluição.



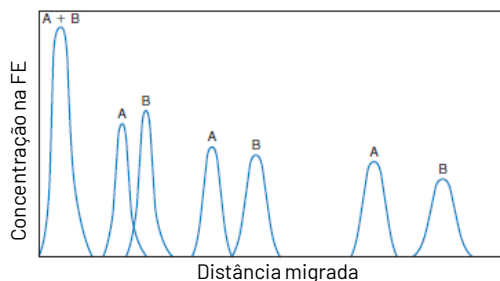
45

45

Cromatografia: Princípios



- ▶ B é mais retido pela F.E. que A \rightarrow B se atrasa durante a migração;
- ▶ Distância entre os dois aumenta à medida que eles se movem pela coluna;
- ▶ Ocorre o alargamento das bandas \rightarrow diminui a eficiência da coluna;
- ▶ Variáveis influenciam as velocidades de separação das bandas e o seu alargamento \rightarrow melhores separações podem ser obtidas pelo controle das variáveis que **umentam a velocidade de separação** das bandas ou **diminuem a velocidade de alargamento** delas.



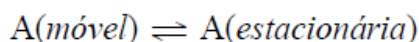
46

46

Cromatografia: Princípios



- ▶ A eficiência de uma coluna cromatográfica em separar dois solutos depende em parte das velocidades relativas segundo as quais as duas espécies são eluídas.
- ▶ Essas velocidades são determinadas pelas razões das concentrações dos solutos em cada uma das fases.



Constante de distribuição $K_c = \frac{(a_A)_E}{(a_A)_M} \rightarrow K_c = \frac{c_E}{c_M}$

$a_{A(E)}$ = atividade de A na fase estacionária

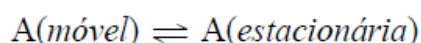
$a_{A(M)}$ = atividade de A na fase móvel

C_E e C_M são as concentrações de A nas fases estacionária e móvel, respectivamente

47

47

Cromatografia: Princípios



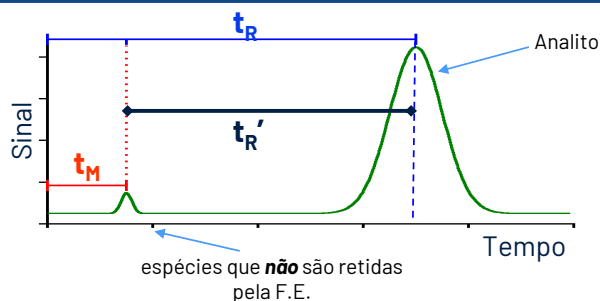
Constante de distribuição $K_c = \frac{(a_A)_E}{(a_A)_M} \rightarrow K_c = \frac{c_E}{c_M}$

- ▶ K_c depende da temperatura, da composição química do analito, da fase estacionária e da fase móvel.
- ▶ Quanto maior o valor de K_c para um dado componente, mais fortemente este composto é retido pela fase estacionária

48

48

Cromatografia: Princípios



$$t_R' = t_R - t_M$$

ou

$$V_R = t_R \cdot F$$

t_M : injeção da amostra e o aparecimento desse pico: **tempo morto** ou **tempo de retenção da fase móvel**.

t_R : **tempo de retenção** – Tempo para que o composto alcance o detector.

t_R' : **tempo de retenção do analito na F.E.**

V_R : **volume de F.M. necessário para eluir o analito em uma coluna.**

F : **vazão da fase móvel**

49

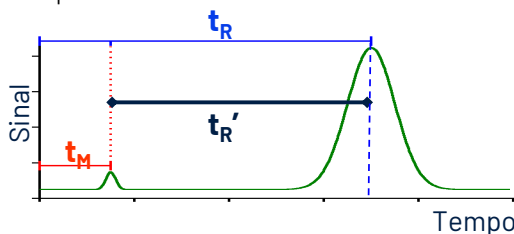
O analito foi retido porque permanece por um tempo t_E na F.E.

49

Cromatografia: Princípios



- ▶ **Fator de Retenção** ou **Fator de Capacidade (k)**: é relacionado à razão dos tempos que as moléculas ficam na F.E e na F.M.
- ▶ t_R' e k são característicos para um dado componente e são usados para fins qualitativos.



$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t_R'}{t_M}$$

Se $k < 1$ o analito é eluído tão rapidamente que dificulta a determinação do tempo de retenção.

Se $k > 20$ os tempos de eluição são muito longos

Idealmente k entre 1 e 5

50

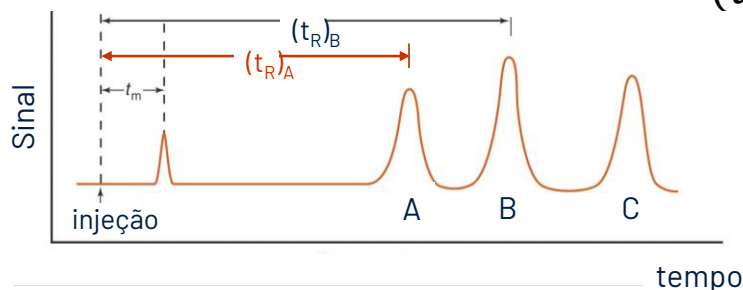
50

Cromatografia: Princípios



- ▶ O fator de seletividade α (ou fator de separação ou retenção seletiva) de uma coluna para dois solutos A e B é definido como:

$$\alpha = \frac{(t_R')_B}{(t_R')_A}$$



em que $(t_R')_B$ é tempo de retenção ajustado de B (a espécie mais fortemente retida) e $(t_R')_A$ é tempo de retenção ajustado de A (a espécie que é eluída mais rapidamente).

51

51

Cromatografia: Princípios



$$\alpha = \frac{(t_R')_B}{(t_R')_A}$$

- ▶ Quanto maior α maior a separação entre dois componentes.
- ▶ α é sempre maior 1.
- ▶ Fornece uma medida de quão bem a coluna vai separar A e B.

$$\alpha = \frac{(t_R')_B}{(t_R')_A} = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A}$$

52

52

Cromatografia: Princípios



- ▶ Termos empregados para as medidas quantitativas da eficiência da coluna cromatográfica: (1) **altura de prato H** e (2) **número de pratos (teóricos)N**.

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

L é o comprimento (geralmente em cm)

- ▶ Eficiência cromatográfica aumenta à medida que o **número de pratos se torna maior**, conforme a **altura do prato H torna-se menor**.

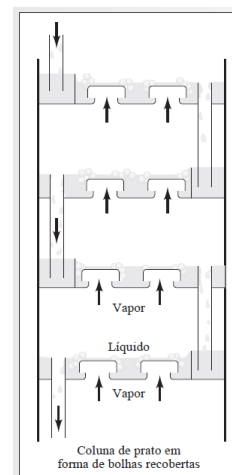
53

53

Cromatografia: Princípios



- ▶ Supondo a coluna cromatográfica como uma série de estágios separados onde ocorre o equilíbrio entre o analito, a F.E. e a F.M.
- ▶ Martin e Synge trataram a coluna cromatográfica como se fosse feita de uma **série de pratos** nos quais as condições de equilíbrio sempre prevaleciam.
- ▶ Cada “estágio” de equilíbrio é chamado de **PRATO (TEÓRICO)**
- ▶ Esses termos como designadores da eficiência da coluna que são mantidos por razões históricas somente



54

54

Próxima aula



- ▶ Fundamentos da cromatografia (continuação...)
 - ▶ **Resolução de uma Coluna**
 - ▶ Melhoria do Desempenho da Coluna
 - ▶ Velocidades de Migração dos Solutos
 - ▶ Alargamento de Banda e Eficiência da Coluna
 - ▶ Variáveis que Afetam a Eficiência da Coluna
 - ▶ Aplicações

55

55

Princípios das Separações Cromatográficas (continuação...)

3

56

Cromatografia: Princípios



- ▶ Termos empregados para as medidas quantitativas da eficiência da coluna cromatográfica: (1) **altura de prato H** e (2) **número de pratos (teóricos)N**.

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

L é o comprimento (geralmente em cm)

- ▶ Eficiência cromatográfica aumenta à medida que o **número de pratos se torna maior**, conforme a **altura do prato H torna-se menor**.

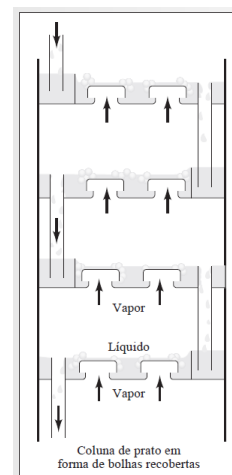
57

57

Cromatografia: Princípios



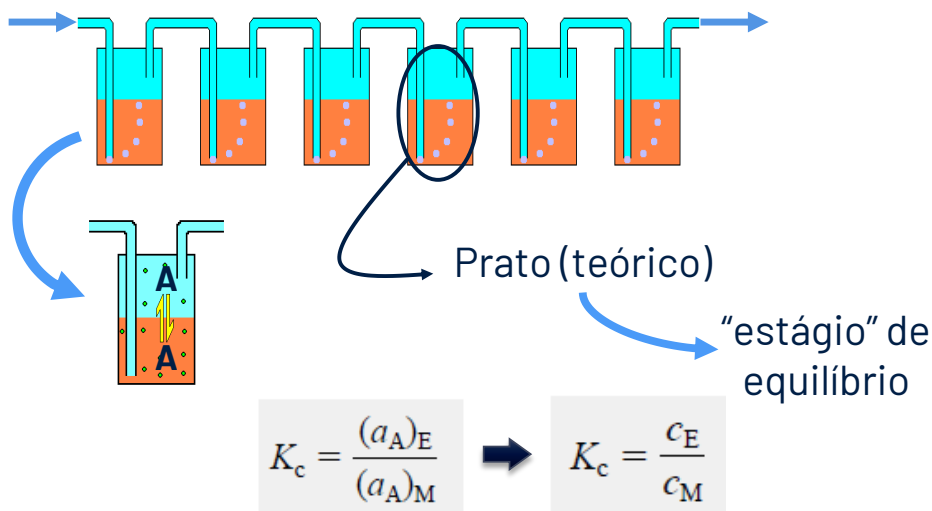
- ▶ Supondo a coluna cromatográfica como uma série de estágios separados onde ocorre o equilíbrio entre o analito, a F.E. e a F.M.
- ▶ Martin e Synge trataram a coluna cromatográfica como se fosse feita de uma **série de pratos** nos quais as condições de equilíbrio sempre prevaleciam.
- ▶ Cada “estágio” de equilíbrio é chamado de **PRATO (TEÓRICO)**
- ▶ Esses termos como designadores da eficiência da coluna que são mantidos por razões históricas somente



58

58

Cromatografia: Princípios



59

59

Cromatografia: Princípios

- ▶ **Picos** em um cromatograma → semelhança com **curva gaussiana**;

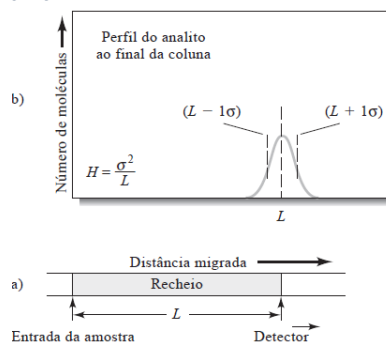
Nas curvas normais de erro, presume-se que a incerteza associada com qualquer medida seja a soma de um grande número de incertezas individualmente indetectáveis e aleatórias, com probabilidade igual de assumir um valor positivo ou negativo.

- ▶ Formato típico gaussiano do pico cromatográfico pode ser atribuído à combinação aditiva de movimentos aleatórios das várias moléculas à medida que elas se deslocam através da coluna

- ▶ **Largura** da curva gaussiana está relacionada com a **variância** ou com o **desvio padrão**

$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$

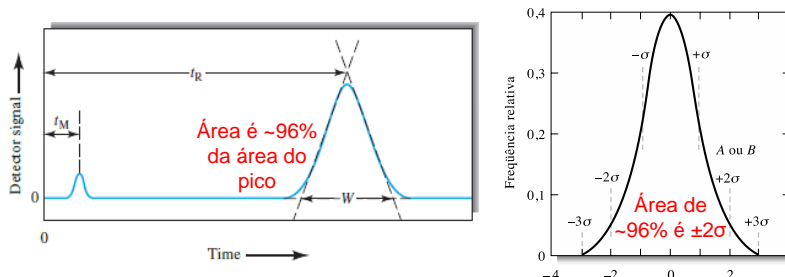
Variância (σ^2) e desvio padrão (σ) = unidade em cm



60

60

Cromatografia: Princípios



- ▶ A variância do pico, que pode ser obtida por um procedimento gráfico simples, é designada como τ e está relacionada com o desvio padrão:

$$\tau = \frac{\sigma}{L/t_R} \rightarrow \sigma = \frac{LW}{4t_R} \rightarrow H = \frac{\left(\frac{LW}{4t_R}\right)^2}{L} \rightarrow H = \frac{LW^2}{16 t_R^2}$$

$4\tau = W$ Como: $H = \frac{\sigma^2}{L}$

61

61

Cromatografia: Princípios



$$H = \frac{LW^2}{16 t_R^2} \rightarrow N = 16 \left(\frac{t_R}{W}\right)^2$$

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



⊗ Maior t_R implica em maior tempo de análise

62

62

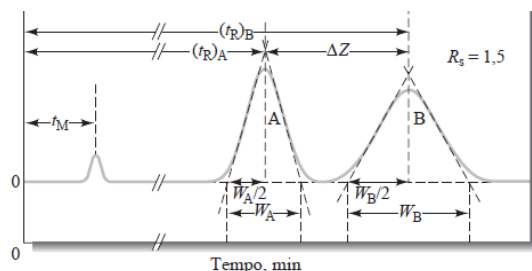
Cromatografia: Princípios



Resolução (R_s) de uma Coluna

- É uma medida quantitativa da habilidade da coluna em separar os analito.

Dois fatores contribuem para a forma como os compostos são separados por cromatografia: **diferença nos tempos de eluição** entre os picos (quanto mais distantes, melhor será a sua separação) e a **largura dos picos** (quanto mais largos forem os picos, pior será a sua separação).



63

63

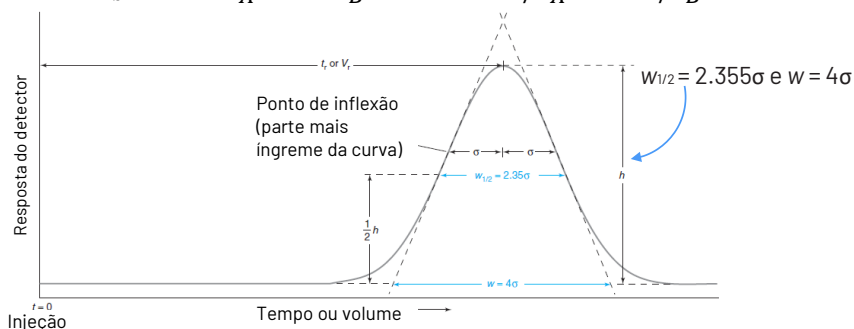
Cromatografia: Princípios



Resolução (R_s) de uma Coluna

- Nos diz quanto duas bandas se distanciam uma em relação a outra em comparação com suas larguras.

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{\bar{W}_b} = \frac{2[t_{R(B)} - t_{R(A)}]}{W_{bA} + W_{bB}} = \frac{1,177 [t_{R(B)} - t_{R(A)}]}{W_{1/2A} + W_{1/2B}}$$



64

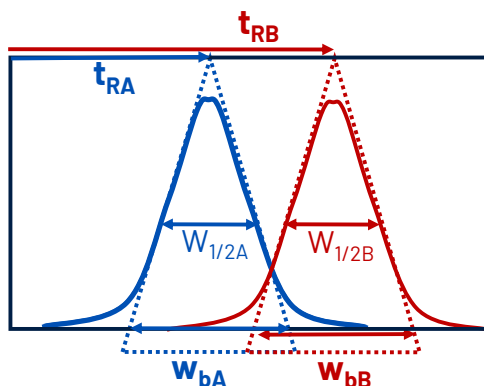
64

Cromatografia: Princípios



- É uma medida quantitativa da habilidade da coluna em separar os analito.

$$R_s = \frac{\Delta t_R}{\bar{W}_b} = \frac{2[t_{R(B)} - t_{R(A)}]}{W_{bA} + W_{bB}} = \frac{1,177[t_{R(B)} - t_{R(A)}]}{W_{1/2A} + W_{1/2B}}$$



65

65

Cromatografia: Princípios

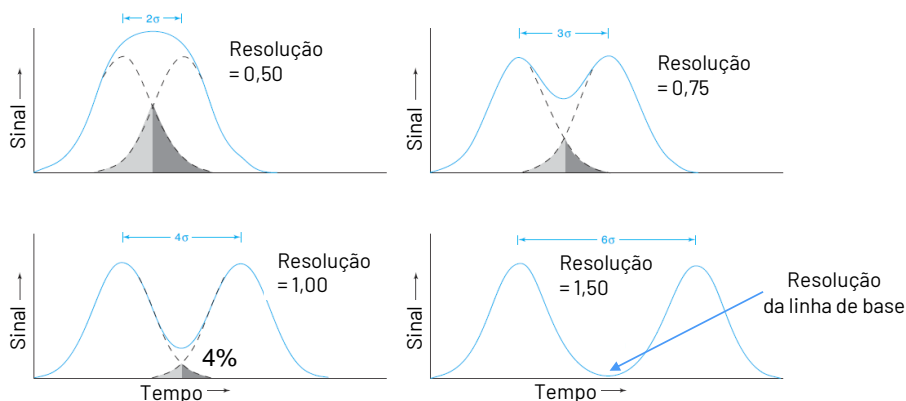


Quanto maior a resolução, maior a separação.

Quando $R_s = 1$, os dois picos são razoavelmente separados, com somente 2% de sobreposição se as quantidades dos dois forem iguais.

$R_s = 1,25$ é suficiente para fins quantitativos.

$R_s = 1,50$ indica separação completa.



66

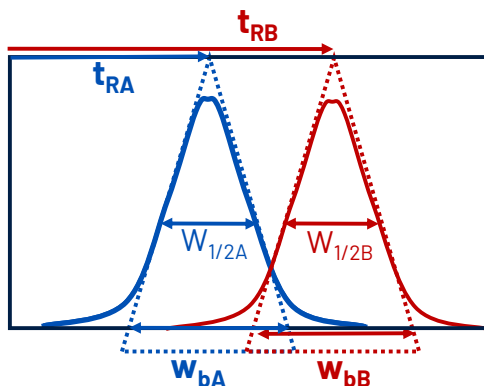
66

Cromatografia: Princípios



Resolução (R_s) de uma Coluna

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$



67

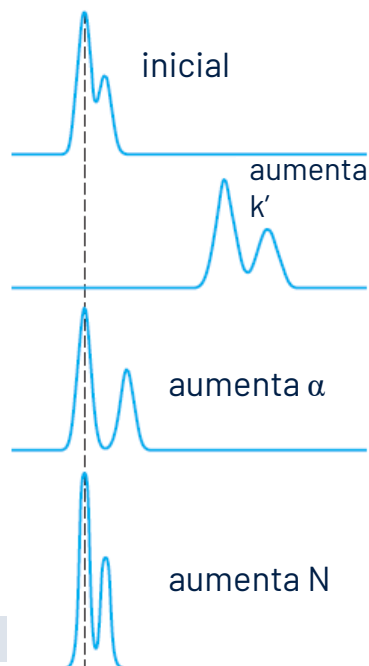
67



Efeito dos parâmetros de separação na resolução

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_B}{1 + k'_B} \right)$$

- Considerações: R_s é proporcional a \sqrt{N} → quando o comprimento da coluna dobra, a resolução aumenta de $\sqrt{2}$.
- Reduzir k' piora a retenção → aumentar k aumenta o tempo de análise.
- Se a retenção relativa aumenta → melhor resolução



68

68

Variáveis que Afetam a Eficiência da Coluna



- O alargamento de banda reflete a perda de eficiência de uma coluna.
- Quanto mais lentos forem os processos de transferência de massa que ocorrem quando o soluto migra através da coluna, mais larga será a banda na saída da coluna.

Variáveis que Influenciam a Eficiência de uma Coluna

Variável	Símbolo	Unidades Usuais
Velocidade linear da fase móvel	u	cm s^{-1}
Coefficiente de difusão na fase móvel*	D_M	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Coefficiente de difusão na fase estacionária*	D_E	$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$
Fator de retenção (ver Equação 30-18)	k	sem unidade
Diâmetro das partículas do recheio	d_p	cm
Espessura da camada de líquido que recobre a fase estacionária	d_f	cm

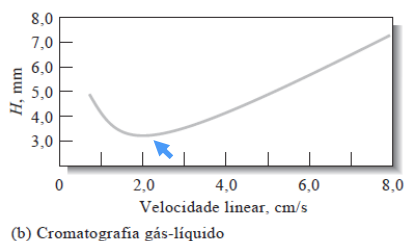
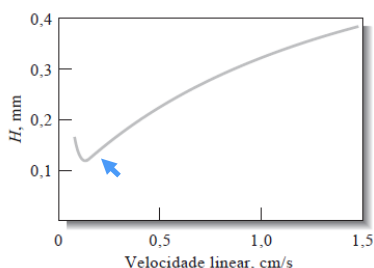
69

69

Variáveis que Afetam a Eficiência da Coluna



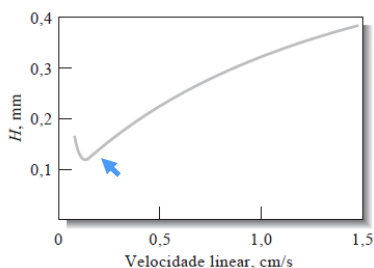
- A **extensão do alargamento** de uma banda depende do tempo que a fase móvel esteja em contato com a fase estacionária, o qual por sua vez depende da **vazão da fase móvel**.
- Estudos determinando-se **H como uma função da velocidade da fase móvel**.
- Mínimo para H (ou um máximo em eficiência) a baixas velocidades lineares.



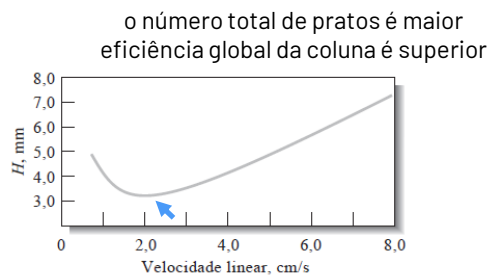
70

70

Variáveis que Afetam a Eficiência da Coluna



(a) Cromatografia líquida



(b) Cromatografia gás-líquido

- Geralmente na cromatografia líquida são obtidos a menores velocidades lineares que na cromatografia gasosa.
- H em colunas para a cromatografia líquida são pelo menos uma ordem de grandeza menor que em colunas para a cromatografia gasosa.
- No entanto, **para a cromatografia líquida empregam-se colunas de 15-25 cm e em cromatografia gasosa de 50 m ou superior.**

71

71



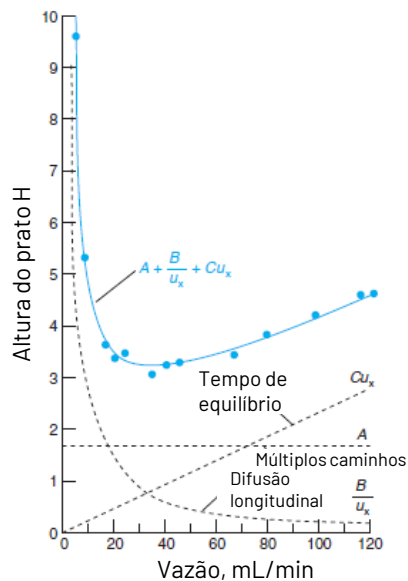
Variáveis que Afetam a Eficiência da Coluna

A **equação de van Deemter** nos diz como a coluna e a vazão afetam a altura do prato:

$$H \approx A + \frac{B}{\mu_x} + C\mu_x$$

↙ Múltiplos caminhos ↘ Difusão longitudinal
↙ ↘ Tempo de equilíbrio

Onde μ_x é a velocidade linear e A, B e C são constantes para uma determinada coluna e fase estacionária. Alterar a coluna e a fase estacionária altera A, B e C.



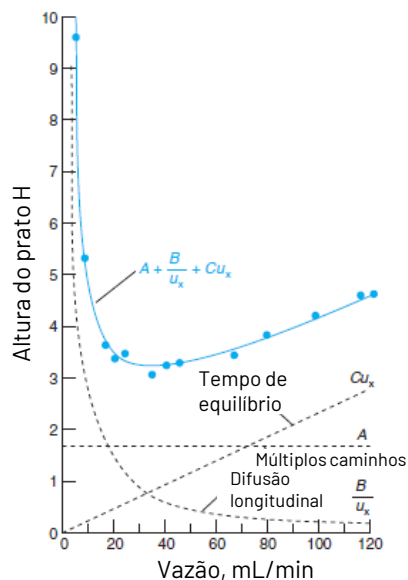
72

72



Variáveis que Afetam a Eficiência da Coluna

- Mecanismos de alargamento de banda que são **proporcionais** à velocidade linear, **inversamente proporcionais** à velocidade linear e **independentes** da velocidade linear.
- Na velocidade linear ótima, H da coluna é menor e, portanto, N é maior.
- Abaixo da velocidade linear ótima, o alargamento da difusão longitudinal, B, é mais significativo. Acima do ideal, tempo de equilíbrio



73

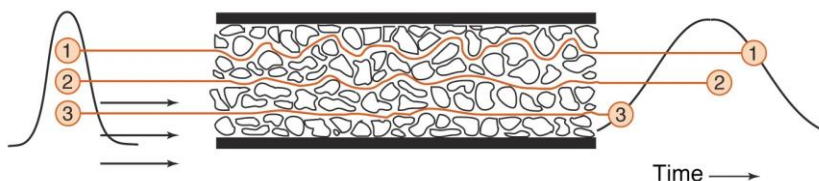
73

Cromatografia: Por que as bandas alargam?



$$H \approx A + \frac{B}{\mu_x} + C\mu_x$$

Múltiplos caminhos

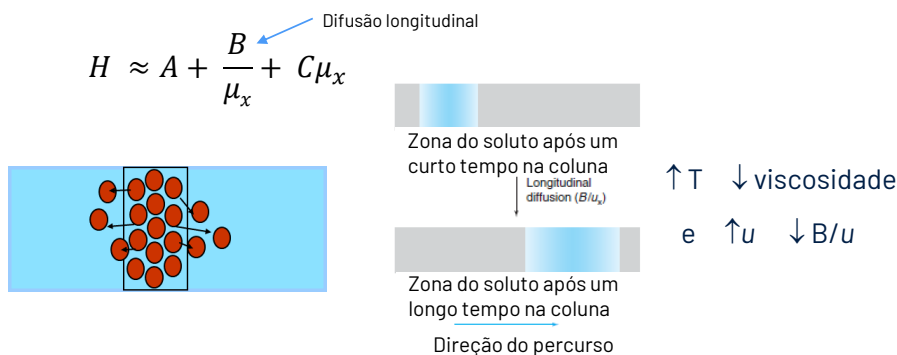


- Alargamento de banda proveniente de caminhos de fluxo múltiplos. Quanto menores as partículas da fase estacionária, e quanto maior sua homogeneidade, menos sério é o problema. Este processo está ausente em uma coluna tubular aberta.

74

74

Cromatografia: Por que as bandas alargam?

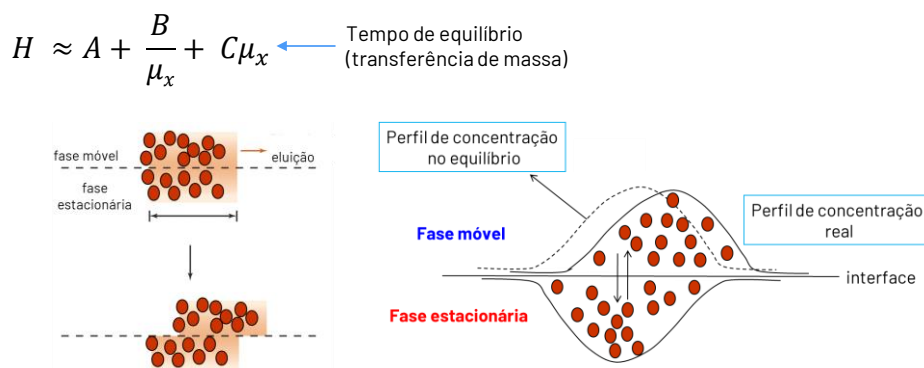


- μ = velocidade média linear da fase móvel
- Na difusão, as espécies migram de uma região mais concentrada para mais diluída.
- Velocidade de migração é proporcional a diferença de conc. entre as regiões e ao coeficiente de difusão das espécies.
- Efeito significativo na CG e de menor importância na CL.

75

75

Cromatografia: Por que as bandas alargam?



- Se a transferência de massa na fase móvel (setas tracejadas) ocorresse rapidamente, as moléculas de soluto não sofreriam alargamento adicional devido ao termo Cm . Se a transferência de massa for lenta em relação à velocidade da fase móvel, ocorre o alargamento de Cm .

76

76

Cromatografia: Formas assimétricas



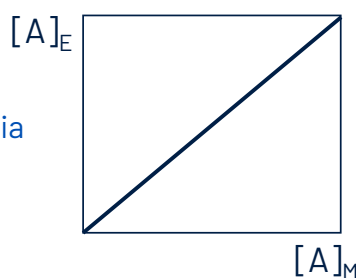
- ▶ O formato de pico gaussiano resulta quando o coeficiente de partição, K é independente da concentração de soluto na coluna.
- ▶ K permanece invariável por um amplo intervalo de concentração, portanto $[A]_E$ é proporcional a $[A]_M$
- ▶ Em colunas reais, K muda à medida que a concentração de soluto aumenta, e os picos cromatográficos são distorcidos.



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

cromatografia
linear

Isoterma de distribuição



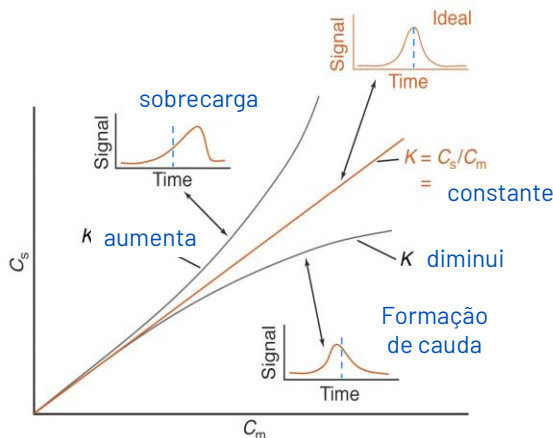
77

77

Cromatografia: Princípios



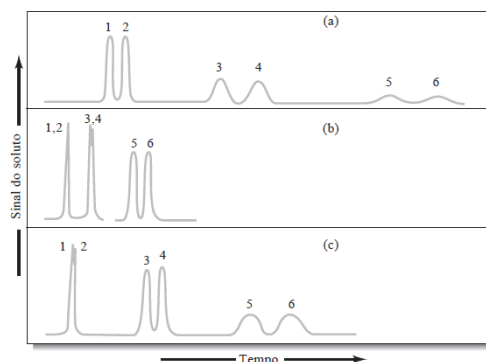
- A isoterma central ideal dá um pico simétrico, com um tempo de retenção que não depende da concentração de soluto. Essa constância permite o uso do tempo de retenção t_R para identificar o soluto.
- Sobrecarga: À medida que a concentração de soluto aumenta, o soluto torna-se cada vez mais solúvel na fase estacionária.
- Cauda: a injeção de soluto concentrado satura uma porção significativa dos locais de sorção, deixando menos locais disponíveis para retenção



78

78

Cromatografia: O problema geral da eluição



- Uma solução comum para esse problema está na alteração das condições que determinam os valores de k à medida que a separação se processa;
- Em cromatografia líquida → variação da composição da fase móvel.
- Em cromatografia gasosa → a temperatura pode ser alterada.

79

79

Resumindo....



Termos usados em cromatografia

- ▶ **Fase estacionária:** imobilizada em coluna ou superfície plana
- ▶ **Fase móvel:** movimenta-se através da fase estacionária levando os analitos (gás, líquido ou fluido supercrítico)
- ▶ **Eluição:** processo no qual os solutos são transportados através da fase estacionária pela fase móvel
- ▶ **Eluato:** fase móvel que sai da coluna
- ▶ **Eluente:** é o solvente empregado para transportar os componentes de uma mistura através da fase estacionária
- ▶ **Cromatograma:** é o registro gráfico da função da concentração (sinal) pelo tempo ou volume de eluição

80

80

Resumindo...



Daniel C. Harris, Análise Química Quantitativa, Editora LTC, 9ed.

Grandeza	Equação	Parâmetros
Coefficiente de partição	$K = c_s/c_m$	c_s = concentração do soluto na fase estacionária c_m = concentração do soluto na fase móvel
Tempo de retenção ajustado	$t'_r = t_r - t_m$	t_r = tempo de retenção do soluto de interesse t_m = tempo de retenção do soluto que não é retido
Volume de retenção	$V_r = t_r \cdot u_v$	u_v = vazão volumétrica = volume/unidade de tempo
Fator de retenção	$k = t'_r/t_m = KV_s/V_m$ $k = \frac{t_e}{t_m}$	V_s = volume da fase estacionária V_m = volume da fase móvel t_e = tempo em que o soluto permanece na fase estacionária t_m = tempo em que o soluto permanece na fase móvel
Retenção relativa	$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1}$	Os índices 1 e 2 referem-se aos dois solutos
Retenção relativa não ajustada	$\gamma = t_2/t_1 (\gamma > 1)$	t_2 = tempo de retenção do soluto 2 t_1 = tempo de retenção do soluto 1
Número de pratos	$N = \frac{16t_r^2}{w^2} = \frac{5,55t_r^2}{w_{1/2}^2}$	w = largura na base $w_{1/2}$ = largura a meia altura
Altura do prato	$H = \frac{\sigma^2}{x} = \frac{L}{N}$	σ = desvio-padrão da banda x = distância percorrida pelo centro da banda L = comprimento da coluna N = número de pratos da coluna
Resolução	Resolução = $\frac{\Delta t_r}{w_{méd}} = \frac{\Delta V_r}{w_{méd}}$ Resolução = $\frac{\sqrt{N}}{4} (\gamma - 1)$	Δt_r = diferença nos tempos de retenção ΔV_r = diferença nos volumes de retenção $w_{méd}$ = largura média medida na linha base nas mesmas unidades que o numerador (tempo ou volume) N = número de pratos γ = retenção relativa não ajustada

81

81

Cromatografia: Exercício 1



Metanol e etanol são separados em uma coluna de GC com t_R de 370 e 385 s, respectivamente, e meias larguras ($w_{1/2}$) de 9,42 e 10,0 s. Um pico de butano não retido ocorre aos 10,0 s. Calcule o fator de seletividade, de retenção e a resolução. Os picos estão resolvidos?

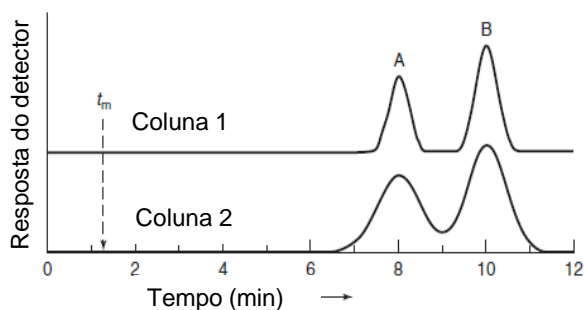
82

82

Cromatografia: Exercício 2



Os cromatogramas dos compostos A e B foram obtidos na mesma vazão com duas colunas de igual comprimento. O valor de t_m é 1,3 min em ambos os casos. (a) Qual coluna tem mais pratos teóricos? (b) Qual coluna tem maior altura de prato? (c) Qual coluna oferece maior resolução? (d) Qual composto tem o maior fator de retenção? (e) Qual composto tem um coeficiente de partição maior? (f) Qual é o valor numérico do fator de retenção do pico A? (g) Qual é o valor numérico do fator de retenção do pico B? (h) Qual é o valor numérico da retenção relativa?



83

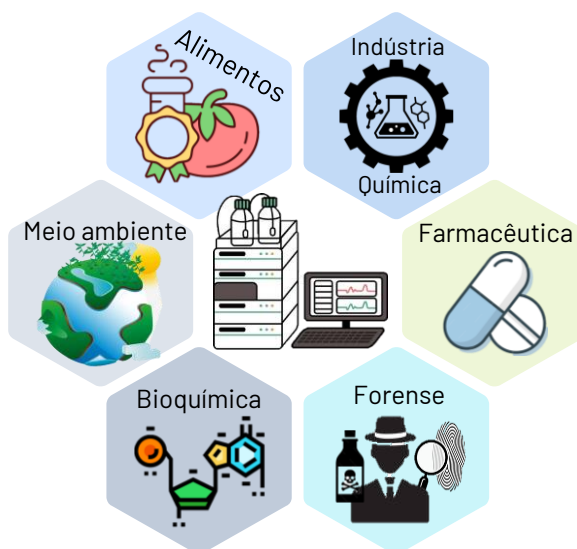
83

Cromatografia: Aplicações analíticas



Cromatografia é usada para finalidades analíticas e preparativas (para purificar quantidades maiores de componentes em uma mistura, por ex. separar isômeros óticos em medicamentos)

- Identificar substâncias;
- Purificação e ou separação de compostos;
- Monitoramento do ar;
- Testagem de água potável;
- Detecção de drogas através da urina e *fingerprinting*.



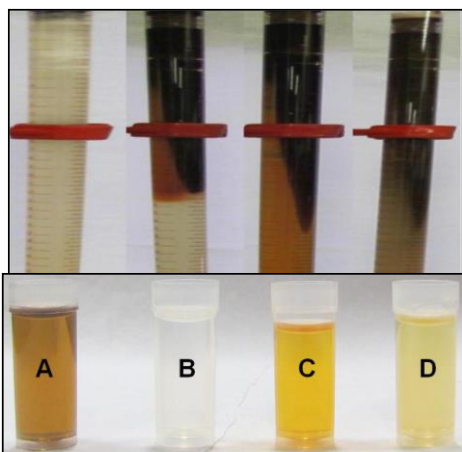
84

84

Cromatografia: Aplicações analíticas



Método **SARA**: **S**aturados, **A**romáticos, **R**esinas, **A**sfaltenos



Etapas do método:

1. Coluna cromatográfica (bureta preenchida com sílica)
2. Parte solúvel do óleo cru em n-heptano é injetada no topo da coluna
2. Fase móvel (hexano, hexano + diclorometano, diclorometano e metanol, tolueno)

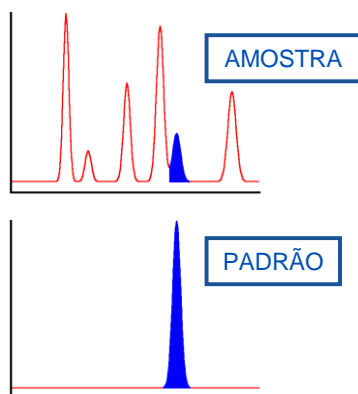
85

85

Cromatografia: Aplicações analíticas



t_R são úteis para identificar os componentes em misturas (limitada pelo número de variáveis que devem ser controladas → resultados reprodutíveis)



Fixar as condições operacionais, o t_R de um analito é constante



Comparação de cromatogramas da amostra e de uma solução padrão do analito suspeito

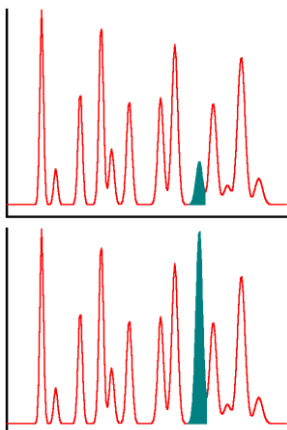
86

86

Cromatografia: Aplicações analíticas



Amostra complexa: incerteza nos t'_R medidos pode levar a identificação errônea



Comparação com cromatograma da amostra enriquecida (**spiking**) permite identificação mais confiável do desconhecido



Nenhum outro pico deve aparecer no cromatograma da mistura em adição ao do composto conhecido e o **aumento de intensidade de um pico previamente existente** deve ser observado.

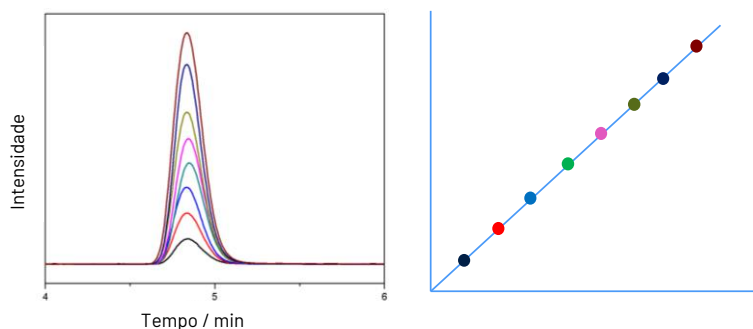
87

87

Cromatografia: Aplicações analíticas



A **cromatografia quantitativa** está baseada na comparação da altura ou da área de um pico analítico com aquele de um ou mais padrões. Se as condições são controladas adequadamente, ambos os parâmetros variam linearmente com a concentração



88

88

Cromatografia: Aplicações analíticas



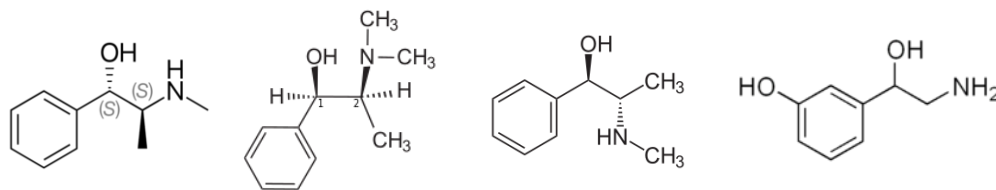
Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
vol. 41, n. 3, jul./set., 2005

RBCF

Determinação de efedrinas em urina por cromatografia em fase gasosa (CG/DNP) para o controle da dopagem no esporte

Paula Rodrigues Garcia, Maurício Yonamine*, Regina Lúcia de Moraes Moreau

Extração líquido-líquido → Cromatografia gasosa



"...ação psicoestimulante, foram incluídas na lista de substâncias proibidas nas atividades esportivas pelo Comitê Olímpico Internacional (COI) e estabelecidas concentrações na urina para o controle da dopagem (efedrina e metilefedrina: 10 ug/mL." Moreau et al., 2005.

89

89

Cromatografia: Aplicações analíticas



Extração líquido-líquido

Os analitos foram extraídos com 2,5 mL de éter terc-butilmetílico, após agitação por 10 min e centrifugação a 300 g por 5 min.

Cromatografia gasosa com detector de nitrogênio/fósforo (CG/DNP)

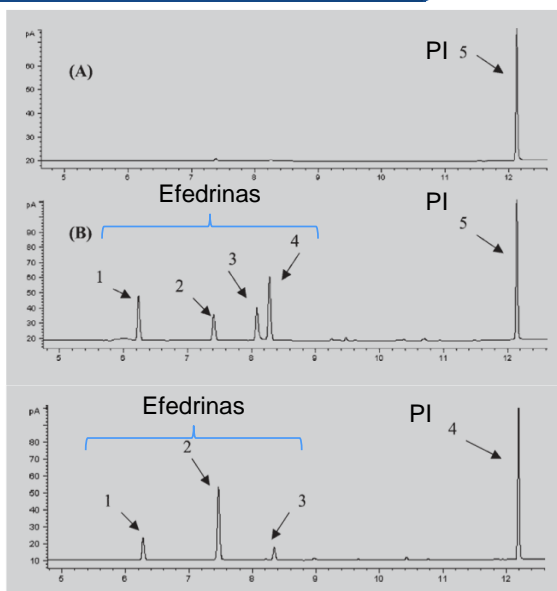
Amostra de urina →

3,31 µg/mL de norefedrina (1)
14,86 µg/mL de efedrina (2)
0,87 µg/mL de pseudoefedrina (3)

90

Fonte: Moreau et al., 2005.

90



Cromatografia: Aplicações analíticas



TABELA III – Resultados das análises de amostras de urina de voluntários, seu relato de uso e modalidades esportivas que praticam

Voluntário	Relato de uso	Modalidade esportiva	Resultado (µg/mL)			
			EPH	PEPH	NEPH	MEPH
A	SCE (eventual)	corrida/natação	14,9	0,9	3,3	-
B	SCE (1x/dia)	musculação	8,3	1,2	1,5	-
C	SCE (5x/sem)	musculação/ jiu-jitsu	3,6	-	1,8	-
D	SCE (1x/dia)	musculação/ jiu-jitsu	32,6	1,7	2,9	-
E	SCE (1x/dia)	musculação/ jiu-jitsu	17,6	1,7	1,9	-
F	SCE (1x/dia)	musculação/ jiu-jitsu	11,3	2,0	3,2	-
G	S (NR)	musculação	2,0	-	-	-
H	EPH (3x/dia)	NR	-	4,8	94,0	-
I		NR	-	14,0	118,3	3,8
J	EFE (1x/dia)	NR	-	209,8	7,5	-

EPH: efedrina, PEPH: pseudoefedrina, NEPH: norefedrina, MEPH: metilefedrina, SCE: suplemento nutricional contendo efedrina, S: suplemento nutricional não especificado, EFE: especialidade farmacêutica contendo pseudoefedrina, NR: não relatado, sem: semana.

91

Fonte: Moreau et al., 2005.

91

Exercícios



- Defina (a) eluição; (b) fase móvel; (c) fase estacionária; (d) razão de partição; (e) tempo de retenção; (f) fator de retenção; (g) fator de seletividade; (h) altura de prato.
- As substâncias A e B têm tempos de retenção de, respectivamente, 16,40 e 17,63 minutos em uma coluna de 30 cm. Espécies não retidas passam através da coluna em 1,30 min. As larguras dos picos na base para A e B são 1,11 e 1,21, respectivamente. Calcule (a) a resolução da coluna (b) número de pratos para cada componente (c) a altura do prato (d) o comprimento da coluna necessário para ter uma resolução de 1,5 (e) o tempo necessário para eluir B na coluna mais longa (f) a altura do prato necessária para resolução de 1,5 na coluna original de 30 cm no tempo original.
- Os seguintes dados foram obtidos durante a Calibração para a Determinação Cromatográfica de Isoctano em uma Mistura de Hidrocarbonetos. Qual a equação da curva de calibração? Para uma amostra desconhecida, uma área de pico de 2,65 foi obtida. Calcule a porcentagem molar de isoctano nesta amostra.

Porcentagem Molar de Isoctano	Área do Pico
0,352	1,09
0,803	1,78
1,08	2,60
1,38	3,03
1,75	4,01
Amostra desconhecida	2,65

92

92

Exercícios



4. O cromatograma de uma mistura das espécies A, B, C e D forneceu os seguintes dados:

	Tempo de retenção / min	Largura do pico na base W, min
Não retido	3,1	-
A	5,4	0,41
B	13,3	1,07
C	14,1	1,16
D	21,6	1,72

Considerando que foi utilizada uma coluna de 24,7 cm, calcular: (a) o número de pratos de cada pico. (b) a média e o desvio padrão para (c) a altura de prato para a coluna. (d) o fator de retenção para os compostos (e) a resolução para a separação dos compostos B e C (f) o coeficiente de seletividade para essa separação (g) o comprimento da coluna que seria necessário para separar essas duas substâncias com resolução 1,5.

93

93

Materiais Complementares



1. <https://www.youtube.com/watch?v=Sa6sus8fpyE>

Quim. Nova, Vol. 31, No. 8, 2190-2193, 2008

EXPERIMENTO DIDÁTICO SOBRE CROMATOGRAFIA GASOSA: UMA ABORDAGEM ANALÍTICA E AMBIENTAL

José Carlos P. Pentado*, Dulce Magalhães e Jorge C. Masini
Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo - SP, Brasil

Recebido em 16/10/07; aceito em 16/4/08; publicado na web em 3/10/08

Educação

Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences
vol. 41, n. 3, jul./set., 2005

RBCF

Determinação de efedrinas em urina por cromatografia em fase gasosa (CG/DNP) para o controle da dopagem no esporte

Paula Rodrigues Garcia, Maurício Yonamine*, Regina Lúcia de Moraes Moreau

94

94

Próxima aula



- ▶ Cromatografia gasosa

95

95