

# Separação

- Na maior parte dos casos, a amostra a ser analisada tem mais de um componente e exige uma etapa de separação ou de concentração da amostra a ser feita antes da análise propriamente dita.
- Mesmo as substâncias puras usadas, como padrões raramente têm pureza acima de 99,99%, o que permite que estejam presentes até  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  de outros materiais.
- Substância(s) a ser(em) analisada(s) → ANALITO(S)
- Substância que afeta o sinal analítico → INTERFERENTE

# Técnicas de separação

Isolam o analito dos constituintes potencialmente interferentes. Envolve o transporte do material e a redistribuição espacial dos seus componentes.

**-Separações em grande escala:** incluem filtração, processos que dependem de efeitos térmicos (destilação, evaporação, secagem), procedimentos que usam efeitos de solubilidade (extração com solvente, cristalização e precipitação), troca iônica, diálise, liofilização.

**-Separações com instrumentos:** CG, CLAE, eletroforese

# Filtração

- ✓ Processo muito simples de separação de material sólido de uma solução, feito com auxílio de algum tipo de filtro.
- ✓ A distinção entre o que é sólido e o que é líquido, embora clara do ponto de vista teórico, é mais difícil de definir em termos práticos.
- ✓ Partículas de 0,1 mm de diâmetro médio ou maiores, que são visíveis a olho nu e tendem a se depositar na parte inferior da solução, são sólidas e podem ser separadas usando papel de filtro em um funil. As partículas de diâmetro igual a  $0,3 \mu\text{m}$ , porém, são sólidas ou não?

# Precipitação analítica

- ✓ Requerem uma alta diferença de solubilidade entre o analito e os potenciais interferentes.
- ✓ Fatores como: co-precipitação, velocidade de precipitação e suspensões coloidais, podem dificultar o processo de separação, principalmente quando se pretende isolar pequena quantidade de fase sólida.

1. *Separações baseadas no controle de acidez*
2. *Separações de sulfetos*
3. *Outros precipitantes inorgânicos*
4. *Precipitantes orgânicos*

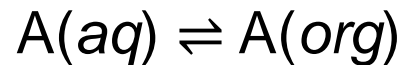
- 1. Separações baseadas no controle de acidez:** diferença de solubilidade dos hidróxidos, óxidos hidratados e ácidos de vários elementos. Podem ser agrupados em 3 categorias de acordo com as soluções empregadas: (a) concentradas de ácidos fortes, (b) tamponadas e (c) concentradas de bases fortes .
- 2. Separações de sulfetos:** com exceção dos metais alcalinos e alcalinos terrosos, a maioria dos cátions forma sulfetos muito pouco solúveis.
- 3. Outros precipitantes inorgânicos:** a  $\text{Ag}^+$  pode ser separada de outros cátions com  $\text{Cl}^-$ .
- 4. Precipitantes orgânicos:** alguns compostos orgânicos apresentam uma alta seletividade. Ex: dimetilglioxima e 8-hidroxiquinolina

# Extração por solvente

- ✓ Extensão segundo a qual os solutos, inorgânicos ou orgânicos, distribuem-se entre 2 fases líquidas imiscíveis difere significativamente e essas diferenças têm sido empregadas para a realização de separações de espécies químicas.
- ✓ **Transferência de uma substância dissolvida de uma fase para outra.**
- ✓ A extração em química analítica tem como objetivo **isolar** ou **concentrar** o constituinte desejado ou **separá-lo** das espécies interferentes.

# Princípios

- ✓ A partição de um soluto entre 2 fases líquidas imiscíveis é um fenômeno de equilíbrio governado pela LEI DE DISTRIBUIÇÃO.
- ✓ Se o soluto da espécie A distribui-se entre a água e uma fase orgânica, o equilíbrio resultante pode ser descrito como:



- ✓ A razão para as atividades para A nas 2 fases será uma constante e independente da quantidade total de A, a uma dada

T:

Coeficiente de  
partição ou  
distribuição

$$K = \frac{(a_A)_{org}}{(a_A)_{aq}} \approx \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

Extração de  
uma solução  
aquosa com  
solvente  
orgânico

# Caso 1: uma extração

- ✓ Suponha  $n_0$ , número de mol do soluto A em  $V_{aq}$  (mL) de uma solução aquosa, extraída com  $V_{org}$  (mL) de um solvente orgânico.
- ✓ No equilíbrio, irá restar na fase aquosa  $n_1$  de A e será transferido para a fase orgânica  $n_0 - n_1$ .
- ✓ As concentrações de A nas 2 fases serão:

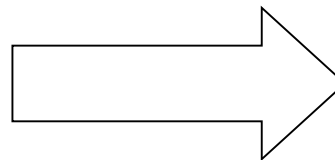
$$[A]_{aq} = \frac{n_1}{V_{aq}} \quad [A]_{org} = \frac{n_0 - n_1}{V_{org}}$$

$$K = \frac{(a_A)_{org}}{(a_A)_{aq}} \approx \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

$$K = \frac{n_0 - n_1}{V_{org}} \times \frac{V_{aq}}{n_1} = \frac{n_0 V_{aq} - n_1 V_{aq}}{V_{org} n_1}$$

$$KV_{org} n_1 = n_0 V_{aq} - n_1 V_{aq}$$

$$(KV_{org} + V_{aq}) n_1 = n_0 V_{aq}$$



$$n_1 = \frac{n_0 V_{aq}}{KV_{org} + V_{aq}}$$



# Exemplo

A constante de distribuição do iodo entre um solvente orgânico e H<sub>2</sub>O é 85. Encontre a concentração de I<sub>2</sub> que permanece na camada aquosa após a extração de 50,0 mL de 1,00x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> de iodo com 50,0 mL de solvente orgânico.

$$n_1 = \frac{n_0 V_{aq}}{KV_{org} + V_{aq}} = \frac{50n_0}{(85 \times 50) + 50} = 0,012n_0$$

Restou na  
fase  
aquosa

$$n_1 = [I_2]_1 V_{aq}$$

$$n_0 = [I_2]_0 V_{aq}$$

Inicial na  
fase aquosa

$$[I_2]_1 = 0,012 \times [I_2]_0 = 1,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

## Caso 2: múltiplas extrações

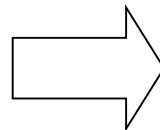
Considerando a segunda extração com mesmo volume de solvente:

$n_2$  = número de mol de A que resta na solução aquosa após a segunda extração com o mesmo volume de solvente.

$$n_2 = \frac{n_1 V_{aq}}{KV_{org} + V_{aq}}$$

$$n_2 = \left( \frac{V_{aq}}{KV_{org} + V_{aq}} \right)^2 n_0$$

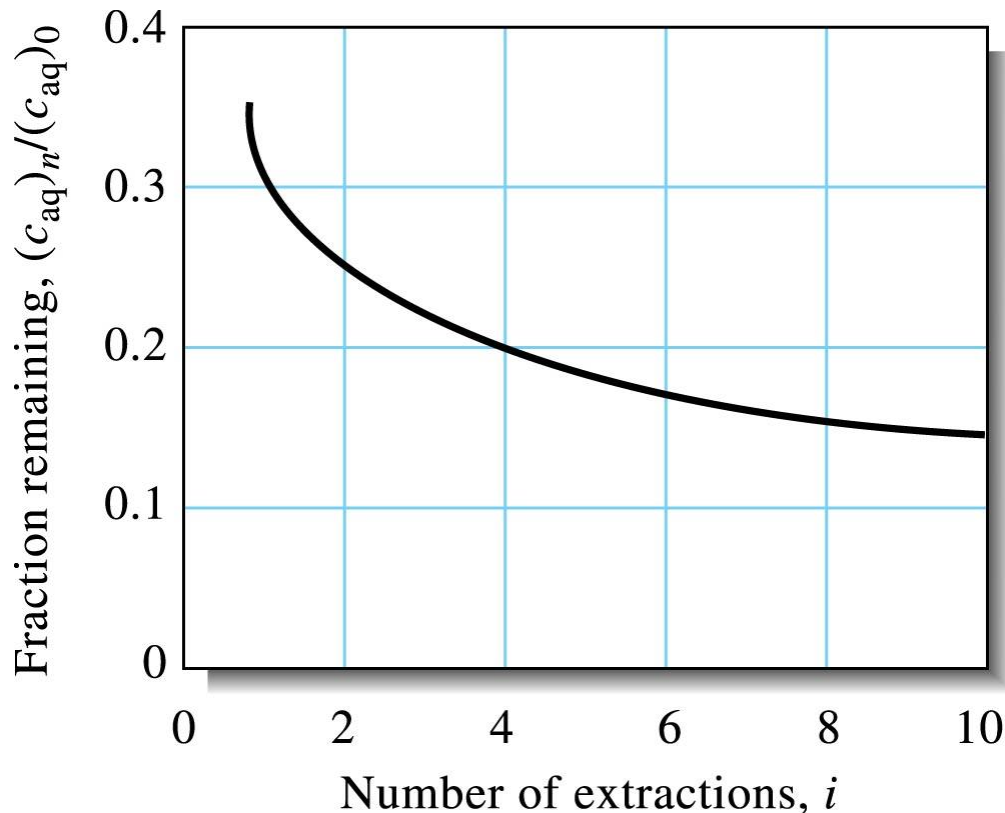
$$n_i = \left( \frac{V_{aq}}{KV_{org} + V_{aq}} \right)^i n_0$$



$$[A]_i = \left( \frac{V_{aq}}{KV_{org} + V_{aq}} \right)^i [A]_0$$

# Fração remanescente

Mais eficiente empregar pequenas porções de solvente para extrair uma amostra do que extrair com uma única porção de maior volume.



# Exemplo

A constante de distribuição do iodo entre um solvente orgânico e  $\text{H}_2\text{O}$  é 85. Encontre a concentração de  $\text{I}_2$  que permanece na camada aquosa após a extração de 50,0 mL de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de iodo com 2 porções de 25,0 mL e com 5 porções de 10,0 mL de solvente orgânico.

# Exemplo

A constante de distribuição do iodo entre um solvente orgânico e  $H_2O$  é 85. Encontre a concentração de  $I_2$  que permanece na camada aquosa após a extração de 50,0 mL de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  de iodo com 2 porções de 25,0 mL e com 5 porções de 10,0 mL de solvente orgânico.

$$[I_2]_2 = \left( \frac{50,0}{(85 \times 25) + 50} \right)^2 \times 1,00 \times 10^{-3} = 5,28 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$$

$$[I_2]_5 = \left( \frac{50,0}{(85 \times 10) + 50} \right)^5 \times 1,00 \times 10^{-3} = 5,29 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$$

# Caso 3: Equilíbrio

**Razão de distribuição (D):** é utilizado quando se trata de uma espécie que tem mais de uma forma química

$$D = \frac{\text{concentração total na fase 2 (org)}}{\text{concentração total na fase 1 (aq)}}$$

- ✓ Uma espécie neutra é mais solúvel em solvente orgânico e uma espécie carregada é mais solúvel na fase aquosa.
- ✓ Se o soluto é um ácido ou uma base, sua carga muda com a mudança de pH.

Considere uma **espécie básica** cuja forma neutra é **B** (solúvel na **fase orgânica**) e ácido conjugado **BH<sup>+</sup>** (solúvel na **fase aquosa**)

Fase aquosa (solvente polar) →  $C_{aq} = [B]_1 + [BH^+]_1$

Fase orgânica (solvente apolar) →  $C_{org} = [B]_2$

$$K = \frac{[B]_{org}}{[B]_{aq}} = \frac{[B]_2}{[B]_1}$$

$$K_a = \frac{[H^+][B]}{[BH^+]}$$

$$D = \frac{K}{K_a + [H^+]}$$

# Exemplo

Suponha que o coeficiente de partição da amina, B, seja  $K = 3,0$  e a constante de dissociação ácida de  $BH^+$  seja  $K_a = 1,0 \times 10^{-9}$ . Se 50 mL de amina aquosa  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$  forem extraídos com 100 mL de solvente, qual será a concentração formal restante na fase aquosa em pH 10,00?



# Exemplo

Suponha que o coeficiente de partição da amina, B, seja  $K = 3,0$  e a constante de dissociação ácida de  $BH^+$  seja  $K_a = 1,0 \times 10^{-9}$ . Se 50 mL de amina aquosa  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$  forem extraídos com 100 mL de solvente, qual será a concentração formal restante na fase aquosa em pH 10,00?

$$D = \frac{3,0 \times 1,0 \times 10^{-9}}{1,0 \times 10^{-9} + 1 \times 10^{-10}} = 2,73$$

# Exemplo

Suponha que o coeficiente de partição da amina, B, seja  $K = 3,0$  e a constante de dissociação ácida de  $BH^+$  seja  $K_a = 1,0 \times 10^{-9}$ . Se 50 mL de amina aquosa  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$  forem extraídos com 100 mL de solvente, qual será a concentração formal restante na fase aquosa em pH 10,00?

$$D = \frac{3,0 \times 1,0 \times 10^{-9}}{1,0 \times 10^{-9} + 1 \times 10^{-10}} = 2,73$$

$$[A]_i = \left( \frac{V_{aq}}{DV_{org} + V_{aq}} \right)^i [A]_0$$

# Exemplo

Suponha que o coeficiente de partição da amina, B, seja  $K = 3,0$  e a constante de dissociação ácida de  $BH^+$  seja  $K_a = 1,0 \times 10^{-9}$ . Se 50 mL de amina aquosa  $0,010 \text{ mol L}^{-1}$  forem extraídos com 100 mL de solvente, qual será a concentração formal restante na fase aquosa em pH 10,00?

$$D = \frac{3,0 \times 1,0 \times 10^{-9}}{1,0 \times 10^{-9} + 1 \times 10^{-10}} = 2,73$$

$$[A]_i = \left( \frac{V_{aq}}{DV_{org} + V_{aq}} \right)^i [A]_0$$

$$[B]_1 = \left( \frac{50}{(2,73 \times 100) + 50} \right) \times 0,010 = 0,0015 \text{ mol L}^{-1}$$

# Separação de metais como quelatos

Muitos agentes quelantes são constituídos de ácidos fracos que reagem com os íons metálicos para formar complexos neutros altamente solúveis em solventes orgânicos.

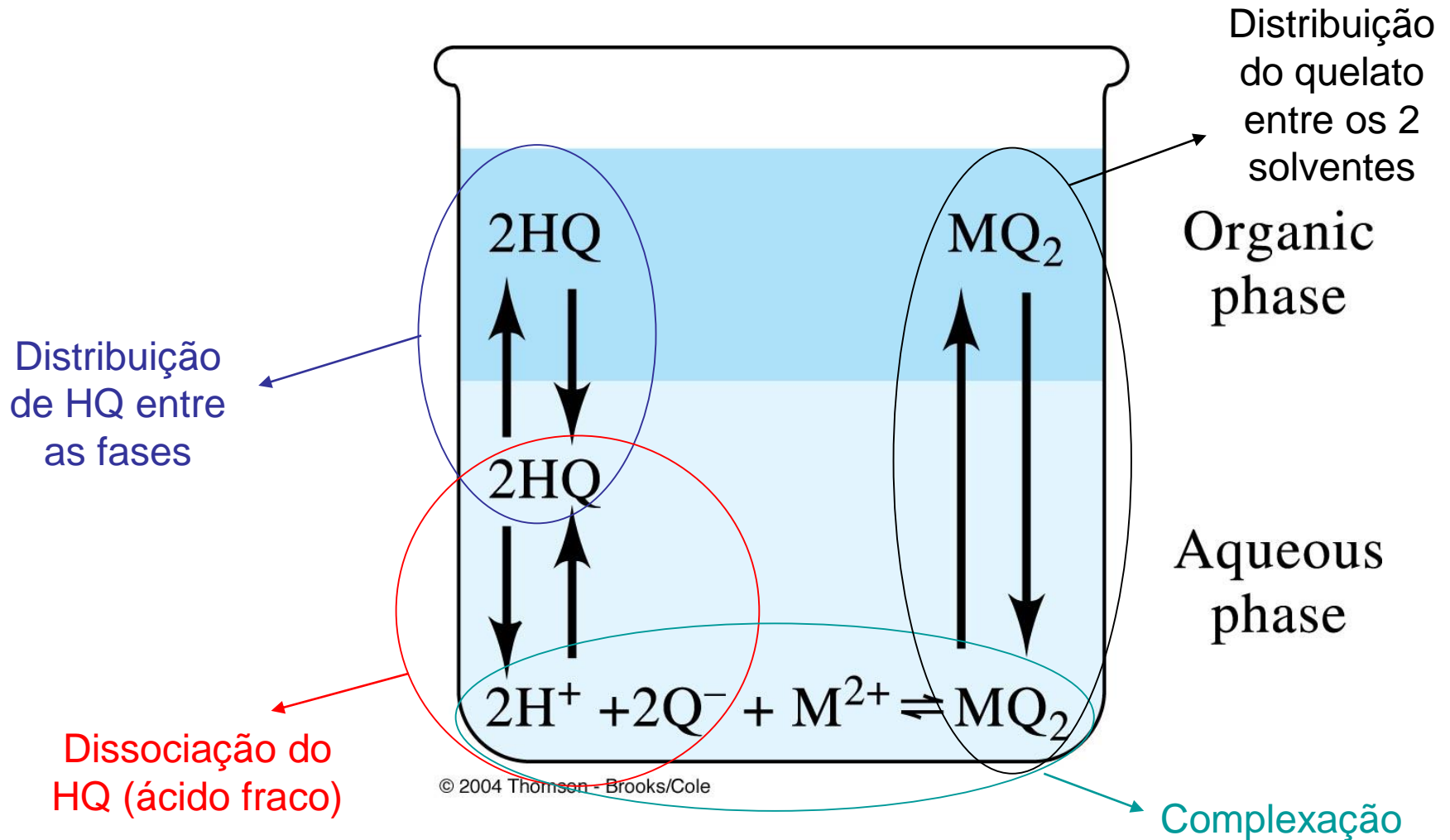
A maioria dos **quelatos metálicos não carregados** é praticamente **insolúvel em água**.

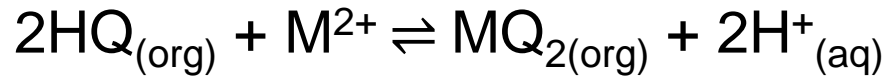
**Agentes quelantes** são bastante solúveis em **solvente orgânico**.

**Ex. de quelantes:** ditizona, 8-hidroxiquinolina, cupferron

# Exemplo

Extração de um cátion divalente ( $M^{2+}$ ) com uma solução de 8-hidroxiquinolina (HQ)





$$K = \frac{[\text{MQ}_2]_{(org)} [\text{H}^+]_{(aq)}^2}{[\text{HQ}]_{(org)}^2 [\text{M}^{2+}]_{(aq)}}$$

Como HQ está presente na fase orgânica em grande excesso em relação a  $\text{M}^{2+}$  na fase aquosa de forma de  $[\text{HQ}]_{(org)}$  permanece essencialmente constante durante a extração.

$$K[\text{HQ}]_{(org)}^2 = k = \frac{[\text{MQ}_2]_{(org)} [\text{H}^+]_{(aq)}^2}{[\text{M}^{2+}]_{(aq)}} \Rightarrow \boxed{\frac{k}{[\text{H}^+]_{(aq)}^2} = \frac{[\text{MQ}_2]_{(org)}}{[\text{M}^{2+}]_{(aq)}}}$$

A razão da concentração da espécie metálica nas duas fases é inversamente proporcional ao  $[\text{H}^+]^2$  na fase aquosa.

# Extração de cloretos e nitratos

**a) Extração com éter do íon metálico em solução aquosa de  $\text{HCl}$   $6 \text{ mol L}^{-1}$ :**

-Vários íons são transferidos para a fase orgânica: Fe(III), Sb (V), Ti(III), Mo(VI), Au(III), Sn(IV).

-Al(III), cátions divalentes (Co, Pb, Mn, Ni) não são extraídos.

-Fe(III) são extraídos para a fase orgânica através da formação do par iônico  $\text{H}_3\text{O}^+\text{FeCl}_4$ .

**b) Extração com éter do íon metálico em solução aquosa de  $\text{HNO}_3$   $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  e saturada com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ :**

-Íons urânio, bismuto, ferro(III) são extraídos.

# Separação por troca iônica

Troca iônica é um processo pelo qual os íons são presos em um sólido poroso e essencialmente insolúvel são trocados por íons presentes em uma solução que é levada ao contato com o sólido.

Resina de troca iônica de íons são polímeros de alto peso molecular que contêm um grande número de grupos funcionais iônicos por molécula.

As resinas trocadoras de cátions contêm grupos ácidos, enquanto que as resinas trocadoras de ânions contêm grupos básicos.



# Classificação das resinas

Resinas trocadoras de cátions do tipo ácido forte apresentam grupos ácidos sulfônicos ( $-\text{SO}_3\text{-H}^+$ ) ligados a matriz polimérica.

Resinas trocadoras de cátions do tipo ácido fraco devem sua ação a grupos carboxílicos ( $-\text{COO}\text{-H}^+$ ).

Resinas trocadoras de ânions do tipo base forte possuem grupos amínicos quartenários ( $-\text{N}(\text{CH})_3^+\text{OH}^-$ ).

Resinas trocadoras de ânions do tipo base fraca possuem grupos amínicos secundários ou terciários ( $-\text{NH}(\text{CH})_2^+\text{OH}^-$ ).

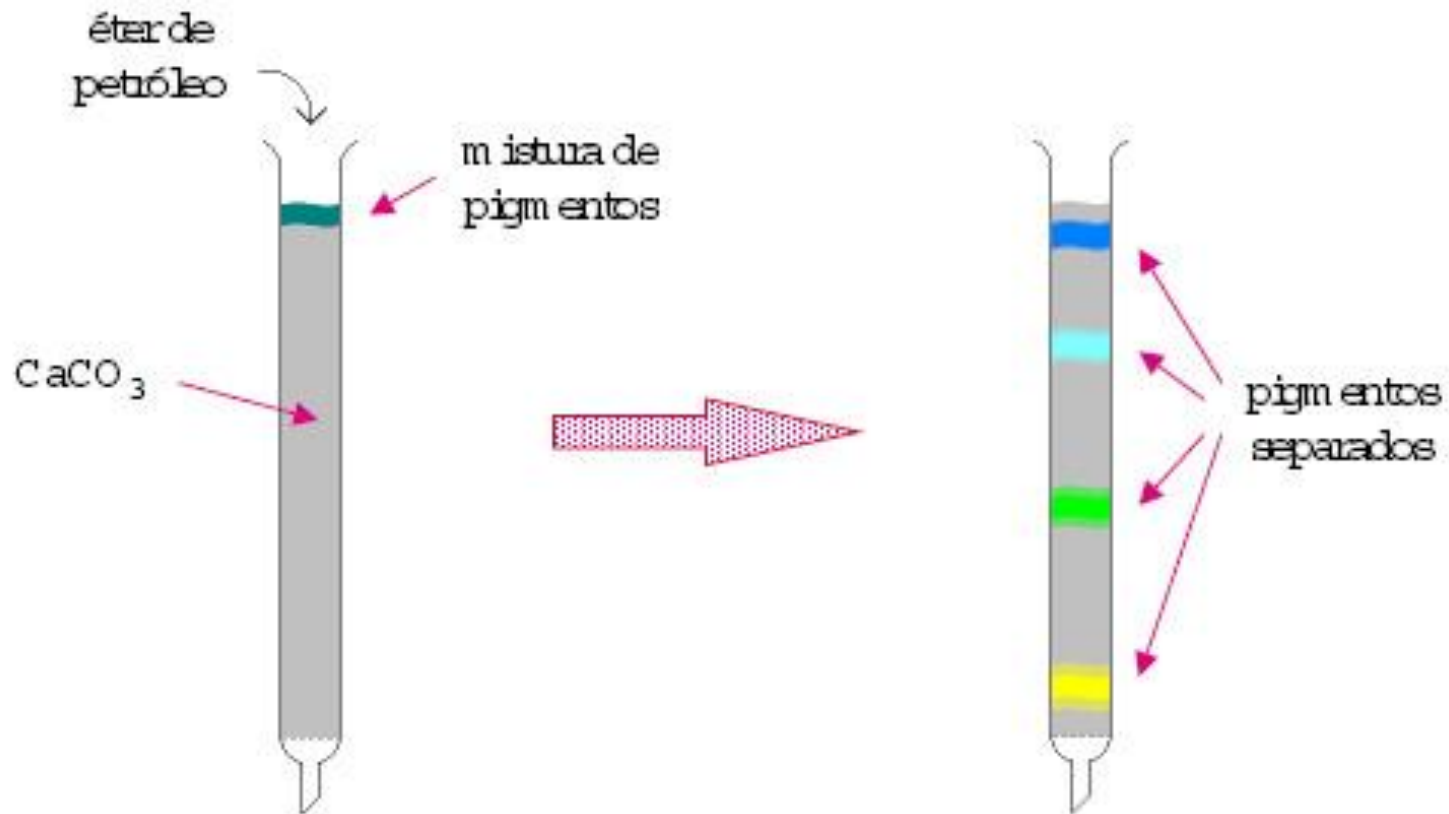
# Aplicações

- Eliminar íons interferentes nas análises (Ex:  $Al(III)$  e  $Fe(III)$  co-precipitam com  $SO_4^{2-}$  durante determinação de  $SO_4^{2-}$ . A resina remove  $Al(III)$  e  $Fe(III)$ ).
- Concentração de íons traços (Ex: análise de traços de íons metálicos presentes em águas naturais)
- Dosagem de eletrólitos (Ex: Teor salino da amostra pode ser determinado pela titulação dos íons  $H^+$  liberados quando uma alíquota da amostra passa pela coluna)
- Preparação de soluções ácidas ou básicas (Ex: dureza de águas)

# INTRODUÇÃO À CROMATOGRAFIA

## Histórico

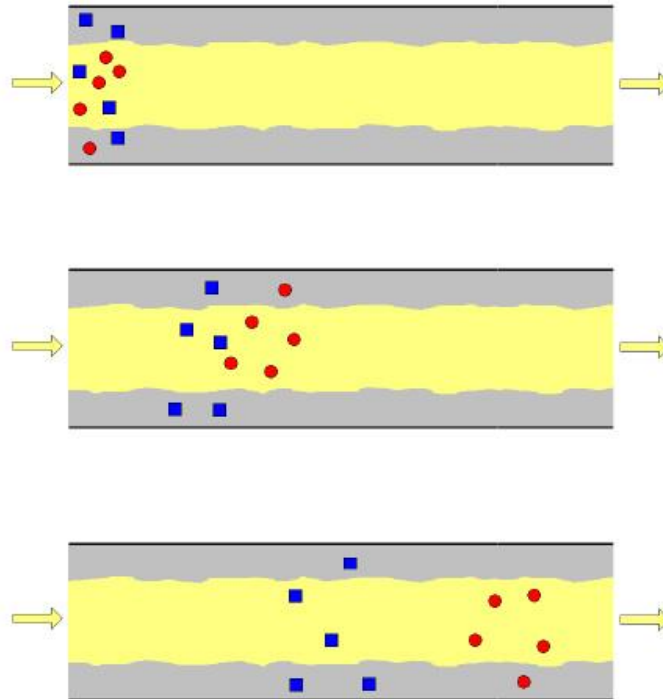
**M. TSWEET** (1903): Separação de vários pigmentos de plantas em colunas recheadas com adsorventes sólidos e solventes variados.



# CROMATOGRAFIA

## Princípio básico

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



# CLASSIFICAÇÃO

Vários critérios são utilizados para classificação das modalidades de cromatografia, as mais comuns são relacionados à **técnica empregada**, ao **mecanismo de separação envolvido** e aos **diferentes tipos de fases** utilizadas.

## QUANTO À TÉCNICA:

- Cromatografia planar (FE sobre uma superfície plana)
- Cromatografia em coluna (FE disposta em um tubo cilindro)

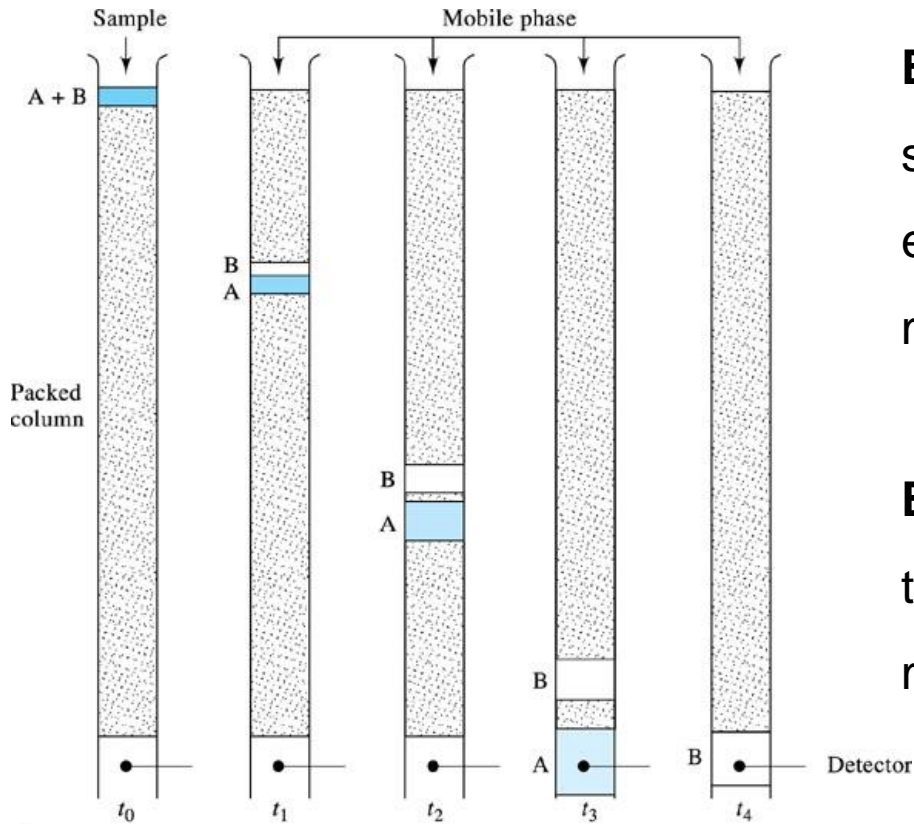
## QUANTO À NATUREZA DA FASE MÓVEL:

- Se for líquido: cromatografia líquida ou em fase líquida
- Se for gás: cromatografia a gás ou em fase gasosa

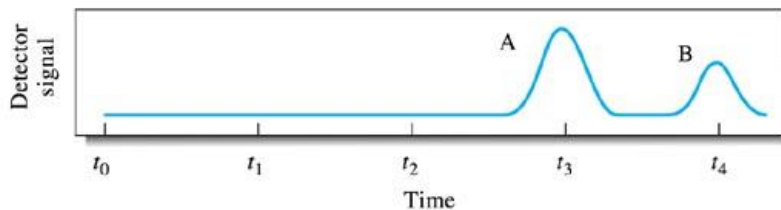
## QUANTO AO TIPO DE INTERAÇÃO DA FE COM A AMOSTRA (MECANISMO):

- Adsorção / Partição / Troca iônica / Exclusão molecular / Por afinidade

# ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA EM COLUNA



a) eluente (entrada) → coluna → eluato (saída)



b)

A – fração >: + FM

B – fração <: + FE

**Eluição:** é um processo no qual os solutos são lavados através da fase estacionária pelo movimento de uma fase móvel.

**Eluente:** solvente empregado para transportar os componentes de uma mistura através de uma fase estacionária.

Em virtude do fato de que o movimento do soluto pode ocorrer somente na fase móvel, a VELOCIDADE MÉDIA com o qual o soluto migra depende da fração de tempo que permanece nessa fase.

# MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS EM COLUNA

TABLE 30-4

Classification of Column Chromatographic Methods

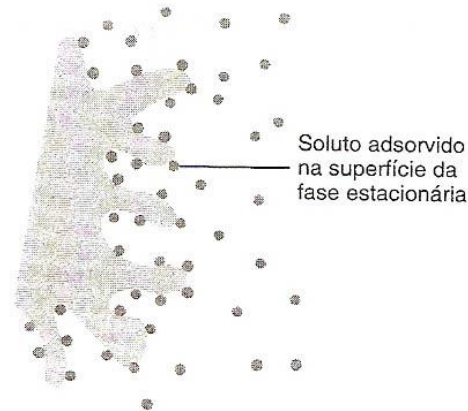
General Classification	Specific Method	Stationary Phase	Type of Equilibrium
Gas chromatography (GC)	Gas-liquid (GLC)	Liquid adsorbed or bonded to a solid surface	Partition between gas and liquid
Liquid chromatography (LC)	Gas-solid	Solid	Adsorption
	Liquid-liquid, or partition	Liquid adsorbed or bonded to a solid surface	Partition between immiscible liquids
	Liquid-solid, or adsorption	Solid	Adsorption
	Ion exchange	Ion-exchange resin	Ion exchange
	Size exclusion	Liquid in interstices of a polymeric solid	Partition/sieving
Supercritical fluid chromatography (SFC) (mobile phase: supercritical fluid)	Affinity	Group-specific liquid bonded to a solid surface	Partition between surface liquid and mobile liquid
		Organic species bonded to a solid surface	Partition between supercritical fluid and bonded surface

# CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO

Utiliza uma FE sólida e uma FM líquida ou gasosa. O soluto é adsorvido na superfície da partícula sólida. O equilíbrio entre a FE e a FM justifica a separação dos diferentes solutos.

L-S: a separação baseia-se na adsorção e volatilidade dos analitos

G-S: há uma competição entre as moléculas da amostra e as moléculas da FM em ocupar os sítios ativos na superfície do analito (FE)



Cromatografia de adsorção

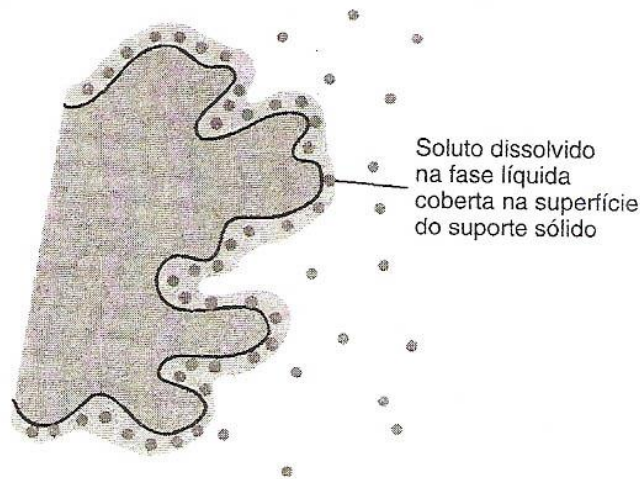


# CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO

Uma FE líquida forma um filme fino na superfície de um suporte sólido. O soluto está em equilíbrio entre a FE e a FM.

G-L: diferença de solubilidade dos analitos na FE e suas diferenças de volatilidade

L-L: diferentes solubilidades dos analitos na FE e na FM. Os mais solúveis na FE são seletivamente retidos.



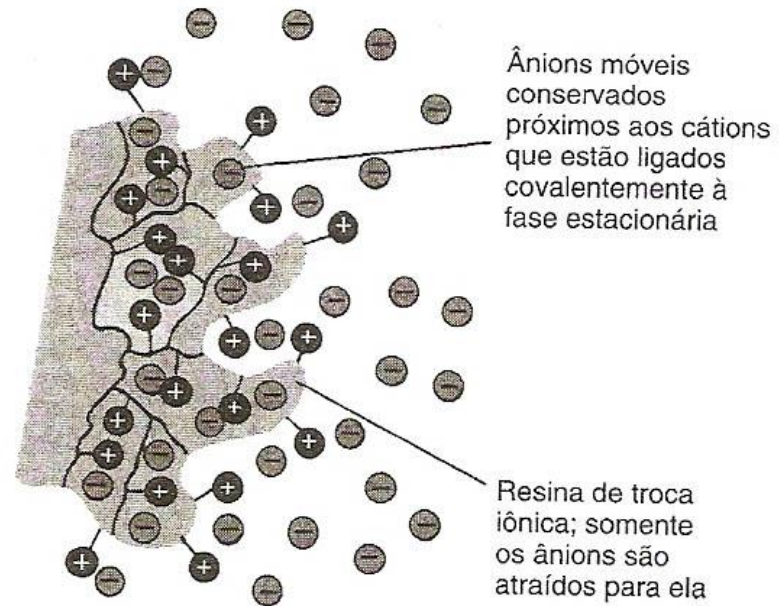
Cromatografia de partição

# CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Neste tipo de cromatografia, ânions como  $-\text{SO}_3^-$  ou cátions como  $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$  estão ligados covalentemente à fase estacionária sólida, geralmente uma RESINA.

Os íons de carga oposta do soluto são atraídos para a fase estacionária pela força eletrostática.

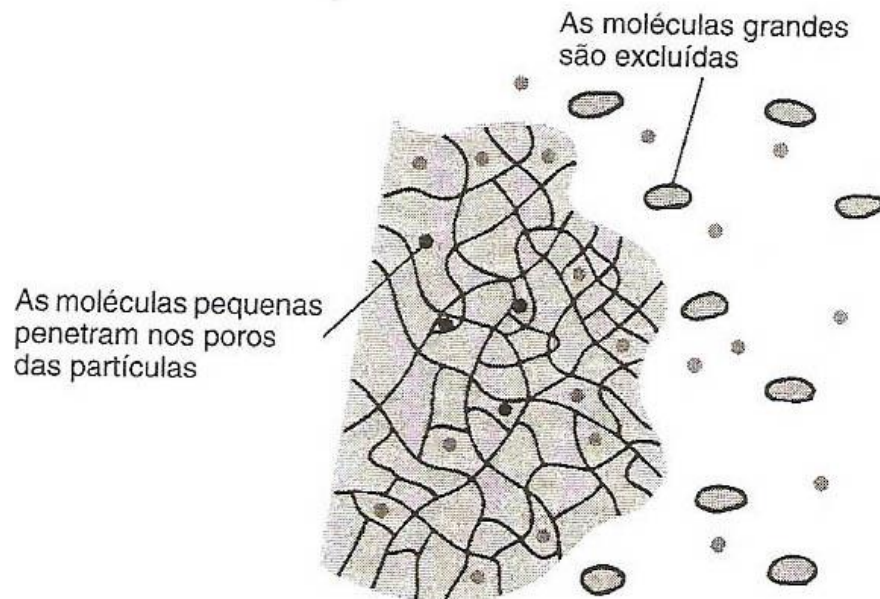
A fase móvel é um líquido.



Cromatografia de troca iônica

# CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR

- Cromatografia de filtração em gel ou de permeação em gel.
- A FE é uma matriz de partículas de forma, tamanho e porosidade uniforme.
- Separa moléculas pelo tamanho, com os maiores solutos passando por ela com maior velocidade.
- As menores são capazes de penetrar facilmente nos poros da FE, enquanto que as maiores são excluídas dos poros e eluem mais rapidamente.



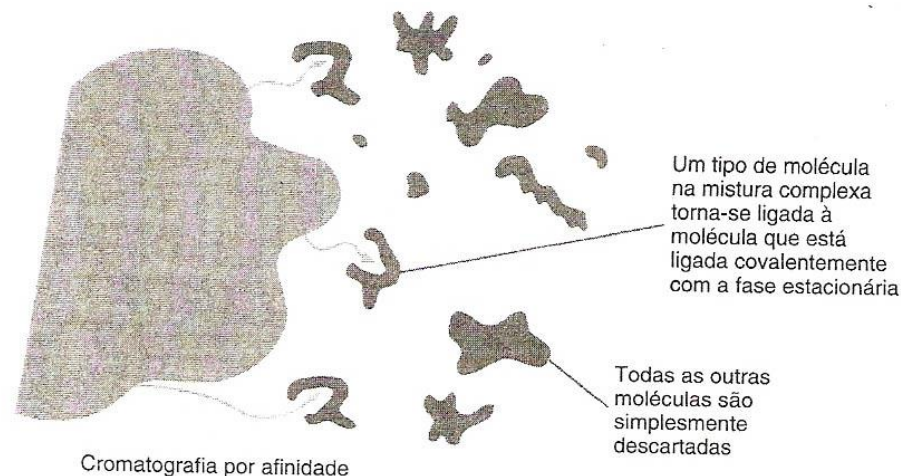
Cromatografia de exclusão molecular

# CROMATOGRAFIA POR AFINIDADE

Emprega interações específicas entre um tipo de molécula do soluto e uma segunda partícula que está ligada covalentemente (imobilizada) à FE.

Ex: a molécula imobilizada pode ser um anticorpo para uma determinada proteína  
Quando se passa pela coluna uma mistura contendo milhares de proteínas, somente a proteína que reage com o anticorpo se liga à coluna.

Após a lavagem de todas as outras substâncias dissolvidas da coluna, a proteína desejada é expulsa através da mudança do pH ou da força iônica.



# FINALIDADE

**Cromatografia analítica** tem como objetivo separar, identificar e quantificar os componentes de uma mistura (colunas com diâmetros pequenos).

**Cromatografia preparativa** tem como objetivo purificar uma quantidade significativa dos componentes de uma mistura (colunas com diâmetros maiores).

# APLICAÇÕES

**Cromatografia gasosa:** aplicada a análise de compostos voláteis ou não voláteis, desde que seja possível preparar derivados voláteis e termicamente estáveis.

Análise ambiental / Análise de alimentos / Indústrias químicas e farmacêuticas / Controle de poluição

EX: óleos essenciais, frações do petróleo, petroquímicos, inseticidas residuais e formulações, gases industriais, etc.

**Cromatografia líquida:** aplicada a análise de compostos voláteis, não voláteis, iônicos ou não desde que solúveis na FM operando em uma FE conveniente.

EX: proteínas, ácidos nucleicos, aminoácidos, corantes, pigmentos, etc.

# CROMATOGRAFIA A GÁS

Fase móvel = líquida



Cromatografia líquida (CL)

Fase móvel = gás



Cromatografia gasosa (CG)

Em CG a fase estacionária pode ser



Sólida

Líquida



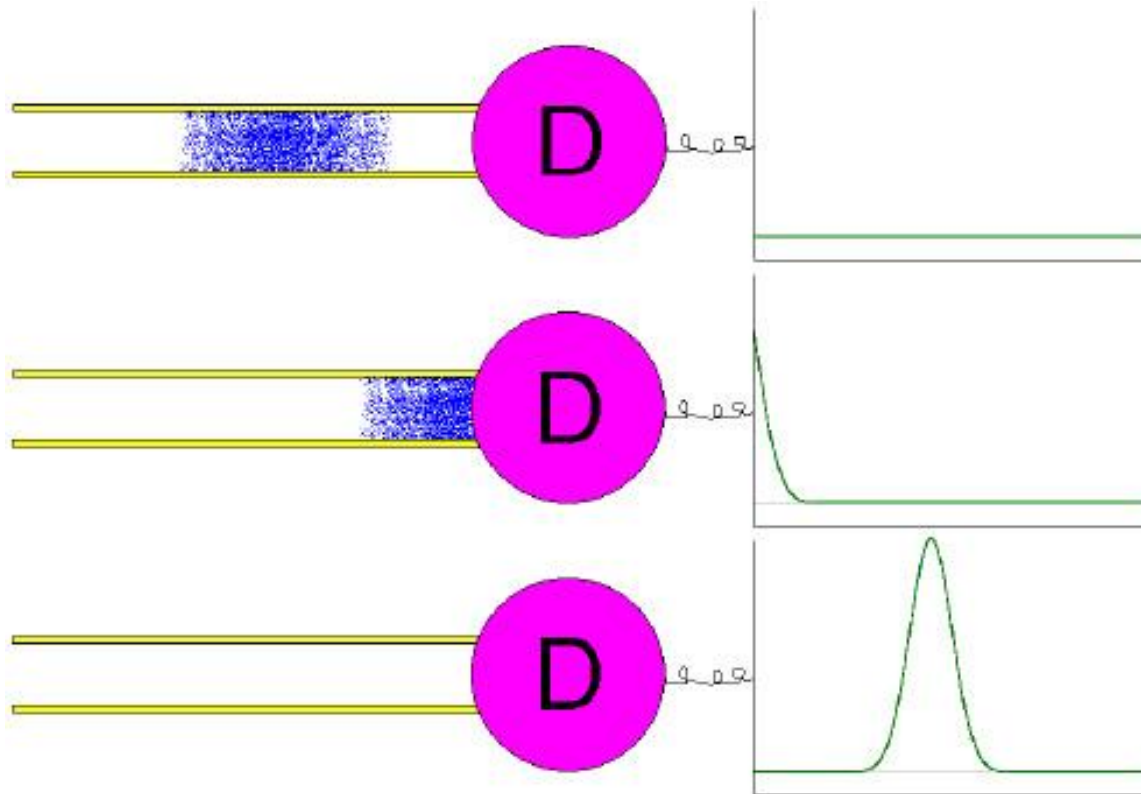
Cromatografia Gás-sólido (CGS)

Cromatografia Gás-líquido (CGL)

**A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma FE (sólida ou líquida) e uma FM (gasosa).**

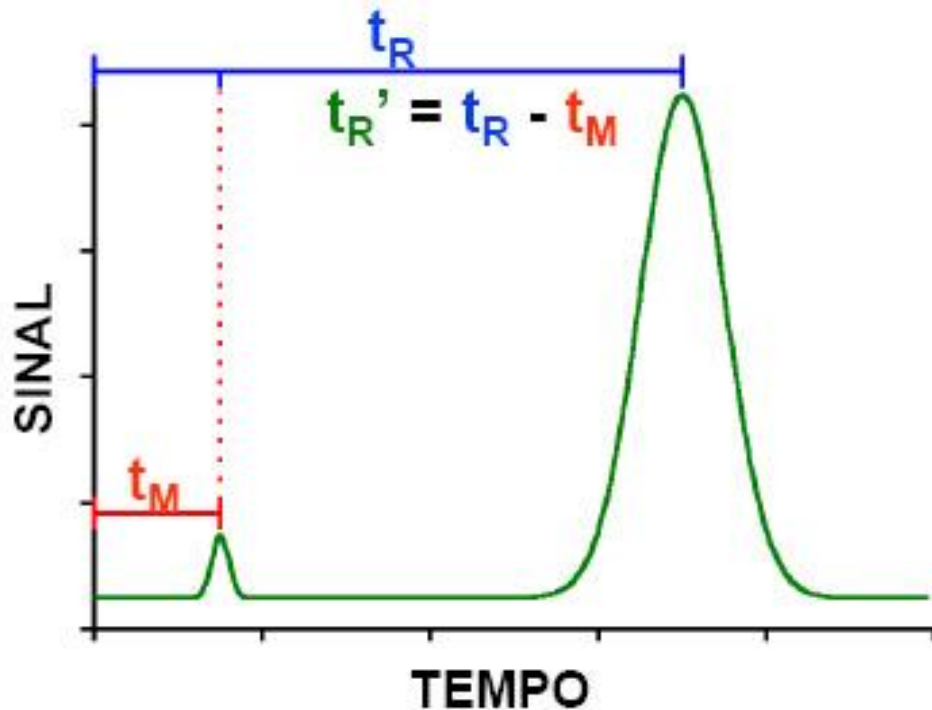
# CROMATOGRAMA

É o registro gráfico da resposta do detector em função do tempo. Cada constituinte separado que eluir da coluna gera um pico. O ideal é obter picos bem separados, simétricos e finos.





# TEMPO DE RETENÇÃO AJUSTADO



$t_R$  = 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 fase estacionária  
atravessa a coluna)

$t_R'$  = tempo de retenção  
ajustado  
(tempo médio que as  
moléculas do analito passam  
sorvidas na fase  
estacionária)

# FATOR DE CAPACIDADE OU FATOR DE RETENÇÃO

É um parâmetro experimental importante empregado na comparação das velocidades de migração de solutos em colunas.

Indica quantas vezes a mais uma substância é retida na coluna que a substância inerte.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{\text{tempo de permanência do soluto na FE}}{\text{tempo de permanência do soluto na FM}}$$

$k' < 1 \rightarrow$  eluição muito rápida

$2 < k' < 10 \rightarrow$  ideal

$k' > 20/30 \rightarrow$  eluição muito longa

# EXEMPLO

Foi injetada uma mistura de benzeno, tolueno e metano num cromatógrafo a gás. O metano deu um pico em 42s, enquanto o benzeno precisou de 251s e o tolueno foi eluído em 333s. Encontre o tempo de retenção ajustado e o fator de retenção para cada substância.

$$t_R' = t_R - t_M$$

Benzeno: 209s

Tolueno: 291 s

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

Benzeno: 5,0

Tolueno: 6,9

# FATOR DE SELETIVIDADE OU FATOR DE SEPARAÇÃO

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A}$$

$K_B$  = coeficiente de partição da espécie mais fortemente retida B

$K_A$  = coeficiente de partição da espécie menos retida A

Rearranjando....

$$\alpha = \frac{t'_{RB}}{t'_{RA}} = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

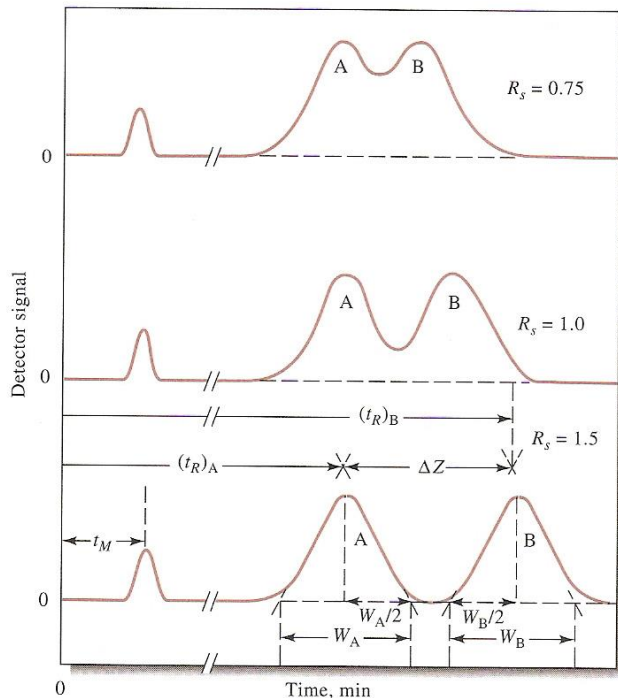
$$\alpha > 1$$

# EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO

Cromatograma com picos separados e estretos.

- Quanto mais separados os picos → maior a RESOLUÇÃO
- Quanto mais estreitos os picos → maior EFICIÊNCIA

**RESOLUÇÃO:** medida quantitativa da separação entre 2 picos consecutivos



$$R_E = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

$R_E < 1,0$  → sem separação

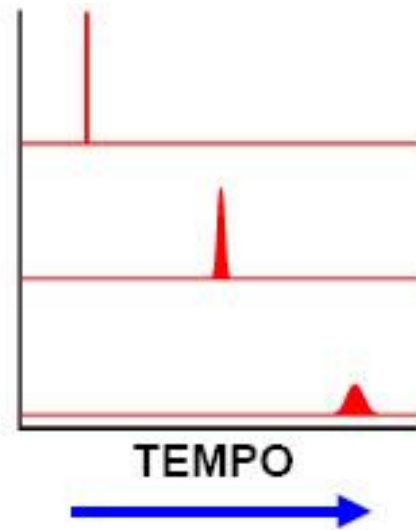
$R_E = 1,0$  → há sobreposição

$R_E > 1,0$  → há separação

# EFICIÊNCIA DA SEPARAÇÃO

**EFICIÊNCIA:** capacidade de eluição com o mínimo de dispersão do analito.

A largura está diretamente relacionada ao tempo de residência na coluna e inversamente relacionada à velocidade na qual a fase móvel flui.



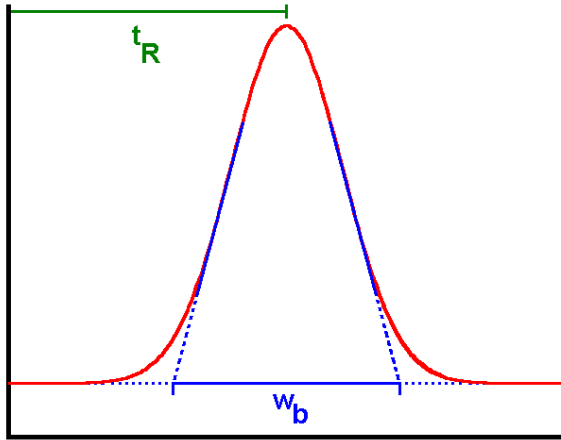
ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO TEÓRICO (H)

NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS (N)

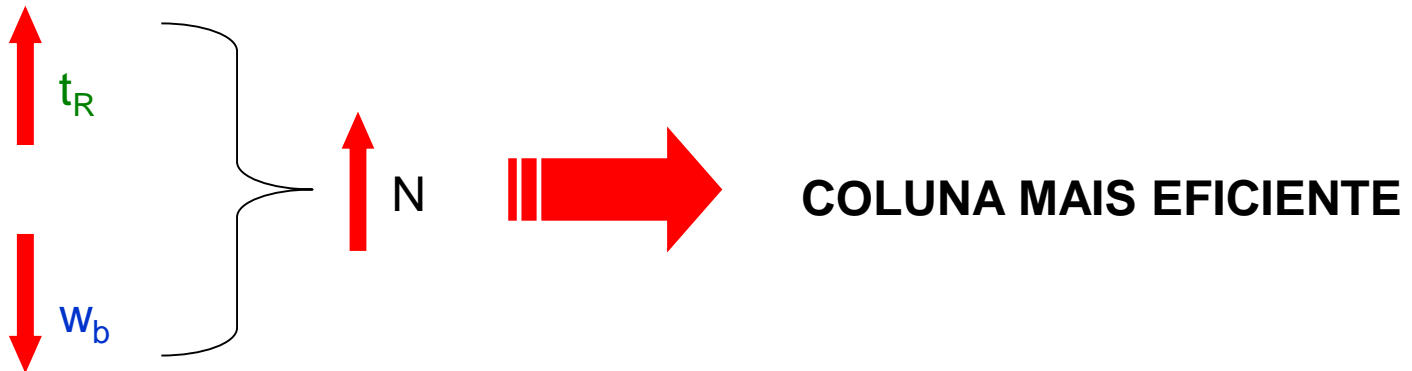
COMPRIMENTO DA COLUNA (L)

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

# NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS

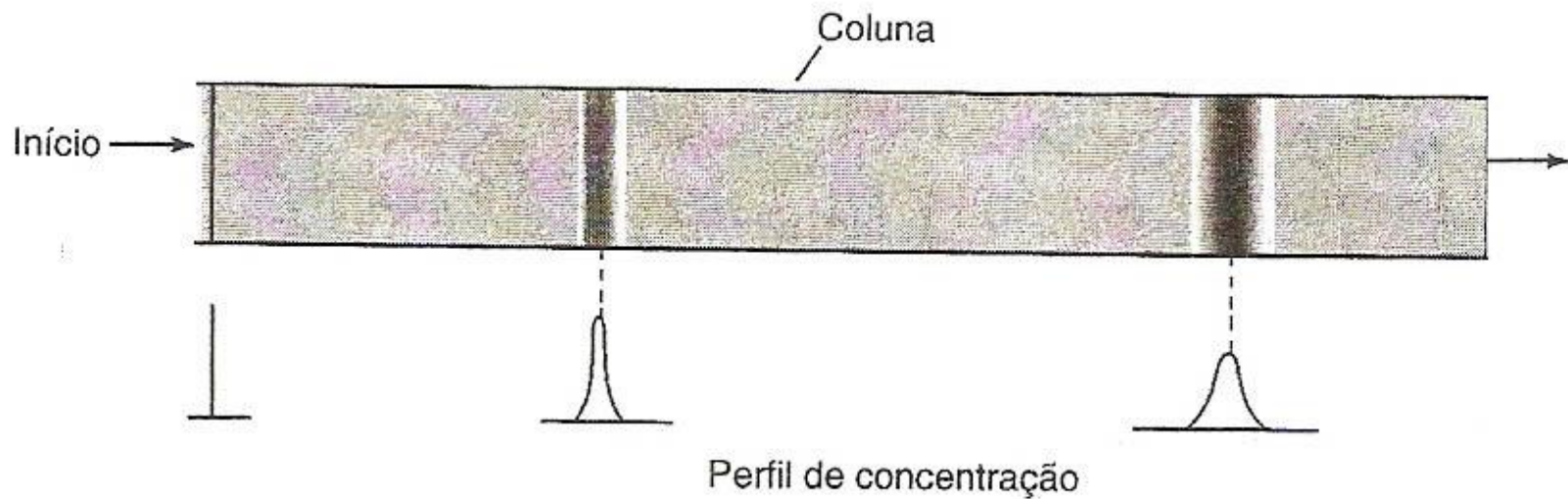


$$N = 16. \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2$$



# DIFUSÃO

A principal causa de **alargamento** dos picos → **difusão longitudinal**





# PARÂMETROS FUNDAMENTAIS

$\alpha$  e  $k'$  → podem ser alterados mais facilmente variando-se a temperatura ou composição da fase móvel

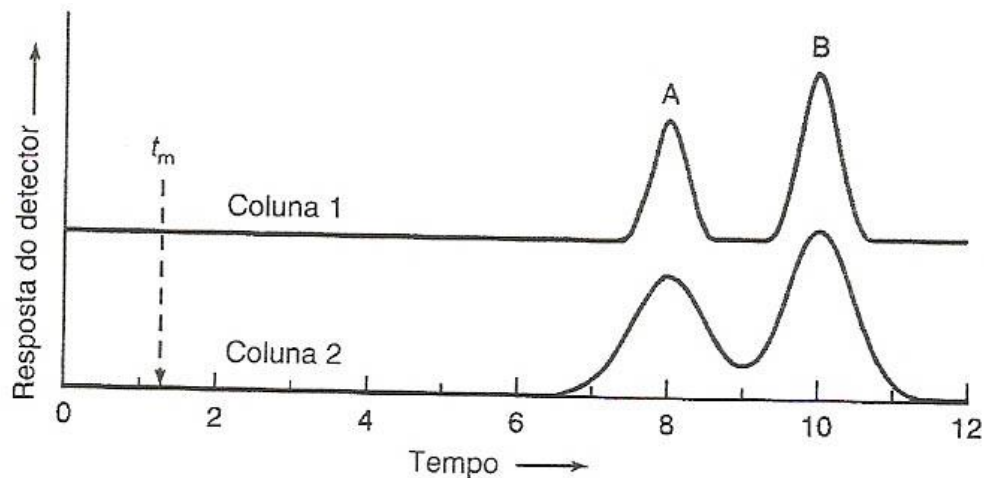
$N$  → pode ser mudado alterando-se o comprimento da coluna

$H$  → pode ser mudado alterando a velocidade da fase móvel, tamanho de partícula da fase estacionária, viscosidade da fase móvel e espessura do filme líquido adsorvido que constitui a fase estacionária

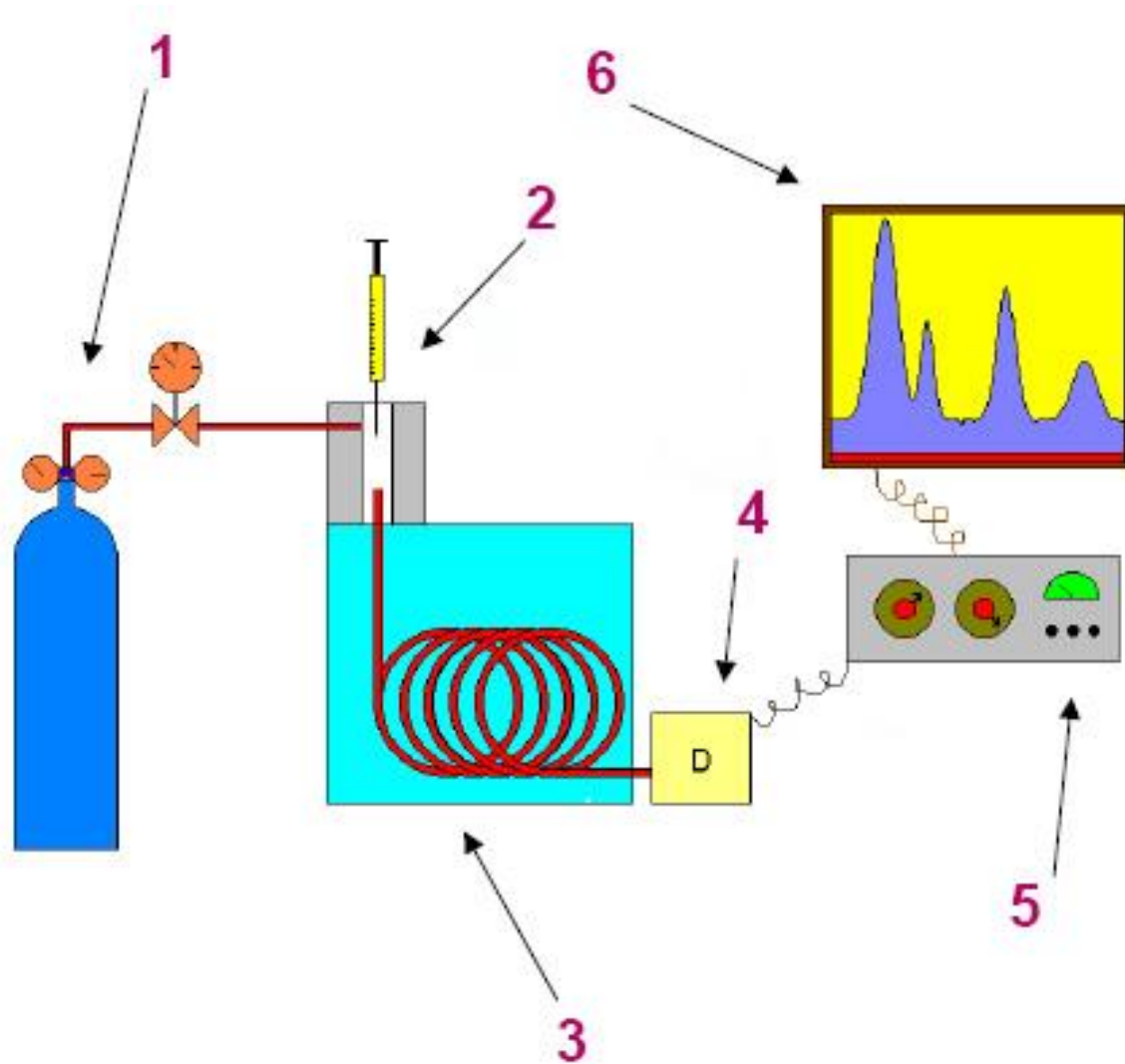
# EXERCÍCIO

Os cromatogramas dos compostos A e B foram obtidos na mesma taxa de fluxo com duas colunas do mesmo tamanho.

- (a) Qual a coluna que tem mais pratos teóricos?
- (b) Qual a coluna que tem maior altura de prato?
- (c) Qual a coluna que tem a melhor resolução?
- (d) Qual o composto com maior fator de retenção?
- (e) Qual o composto com maior coeficiente de partição?



# CROMATÓGRAFO A GÁS



1. Reservatório de gás e controles de vazão e pressão

2. Injetor de amostra

3. Forno e coluna cromatográfica

4. Detector

5. Amplificação de sinal

6. Registro do sinal

# GÁS DE ARRASTE

Fase móvel em CG: **NÃO** interage com a amostra - apenas a carrega através da coluna. Assim é usualmente referida como **GÁS DE ARRASTE**.

## REQUISITOS:

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

**PURO** Deve ser isento de impurezas que possam degradar a fase estacionária (filtros para remoção de  $H_2O$ , hidrocarbonetos e  $O_2$ ).

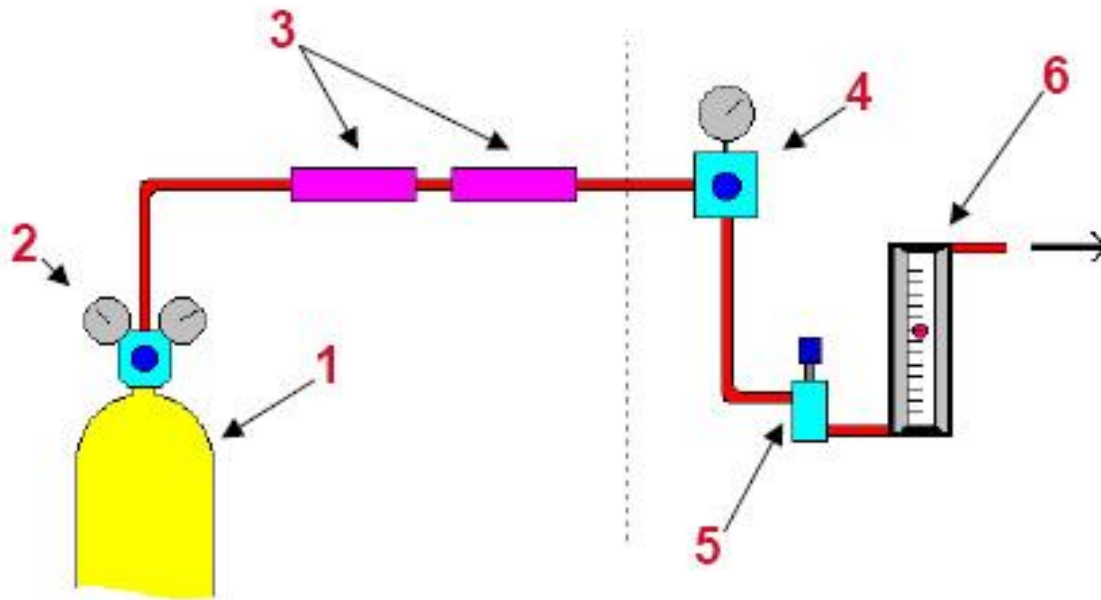
Compatibilidade com o sistema de detecção

# GÁS DE ARRASTE

## ALIMENTAÇÃO

*Componentes necessários à linha de gás:*

- controladores de vazão / pressão de gás
- dispositivos para purificação de gás

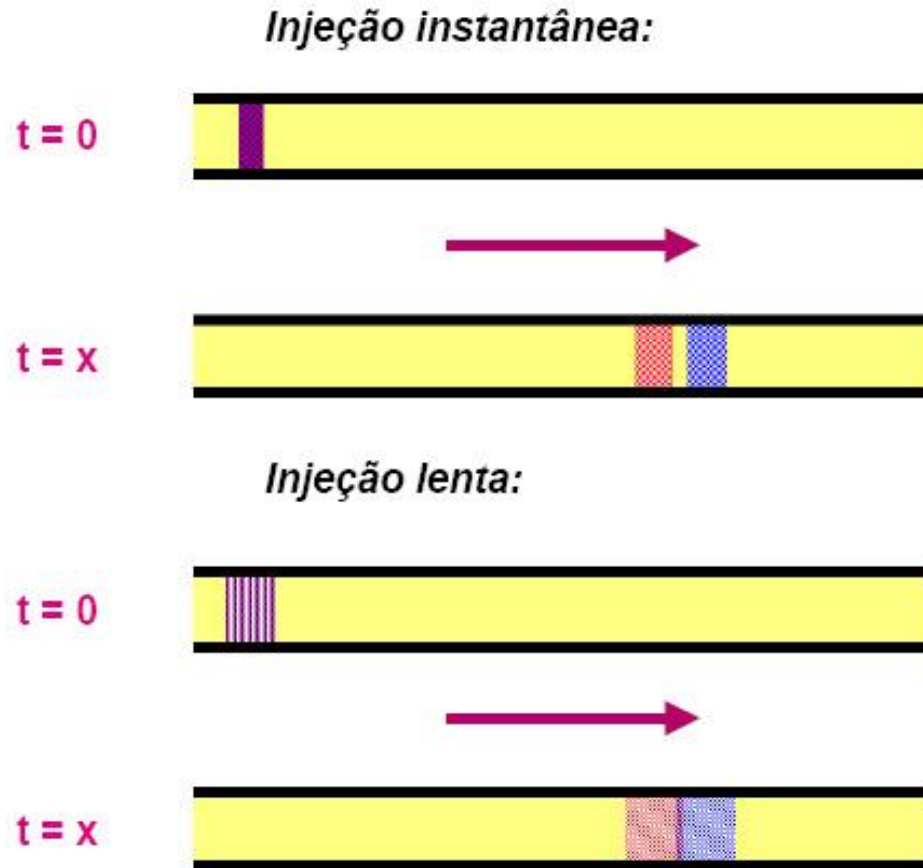


1. Cilindro de gás
2. Regulador de pressão primário
3. Dispositivos para purificação de gás
4. Regulador de pressão secundário
5. Regulador de vazão
6. Medidor de vazão (rotâmetro)

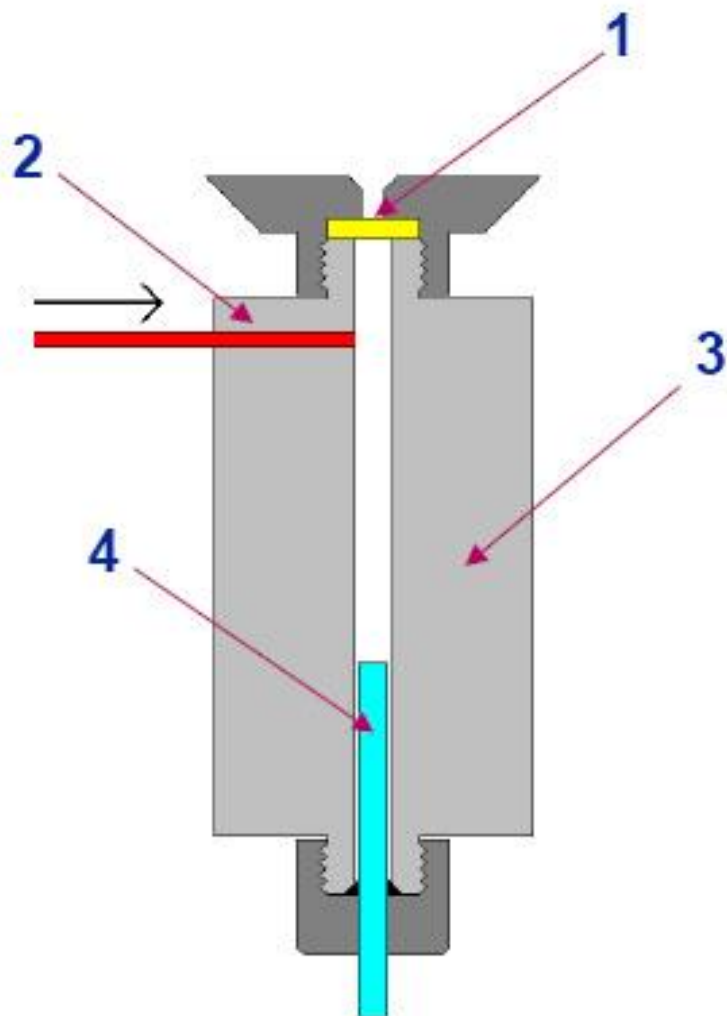
*Nota: tubos e conexões: aço inox ou cobre*

# INJEÇÃO DA AMOSTRA

Os dispositivos para injeção devem prover meios de introdução **INSTANTÂNEA** da amostra na coluna cromatográfica.

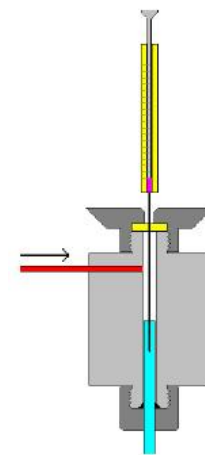


# INJEÇÃO DA AMOSTRA



1. Septo
2. Gás de arraste
3. Bloco metálico aquecido
4. Coluna cromatográfica

Com auxílio  
de micro seringa



# 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 da amostra.

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

Coluna	Amostras líquidas	Amostras gasosas
Empacotada	0,2 a 20 $\mu\text{L}$	0,1 a 50 mL
Capilar	0,01 a 3 $\mu\text{L}$	0,001 a 0,1 mL

**Sólidos:** convencionalmente dissolve-se em um solvente adequado e injeta-se a solução



# Fase estacionária sólida

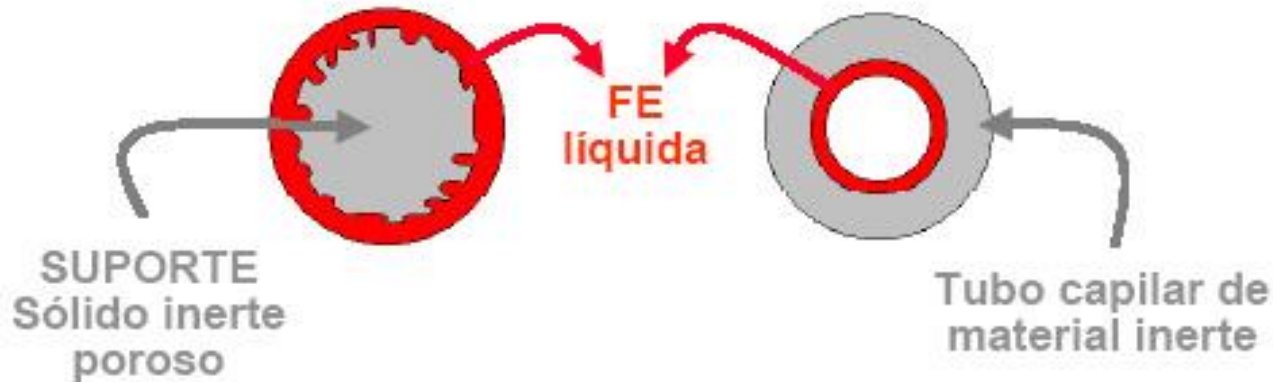
**SÓLIDOS** Colunas recheadas com material finamente granulado (empacotadas) ou depositado sobre a superfície interna do tubo (capilar)

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

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

# Fase estacionária líquida

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



Para minimizar a perda dessa fase líquida por volatilização, normalmente ela é:



**Entrecruzada:** as cadeias poliméricas são quimicamente ligadas entre si



**Quimicamente ligadas:** as cadeias poliméricas são “presas” ao suporte por ligações químicas

# Fase estacionária (FE)

*Características de uma FE ideal:*

- ▶ **AMPLA FAIXA DE TEMPERATURAS DE USO** Maior flexibilidade na otimização da separação.
- ▶ **BOA ESTABILIDADE QUÍMICA E TÉRMICA** Maior durabilidade da coluna, não reage com componentes da amostra.
- ▶ **POUCO VISCOSA** Colunas mais eficientes (menor resistência à transferência do analito entre fases).
- ▶ **DISPONÍVEL EM ELEVADO GRAU DE PUREZA** Colunas reproduzíveis; ausência de picos “fantasma” nos cromatogramas.
- ▶ Regra geral: a FE deve ter características tanto quanto possível próximas das dos solutos a serem separados (polar, apolar, aromático ...)

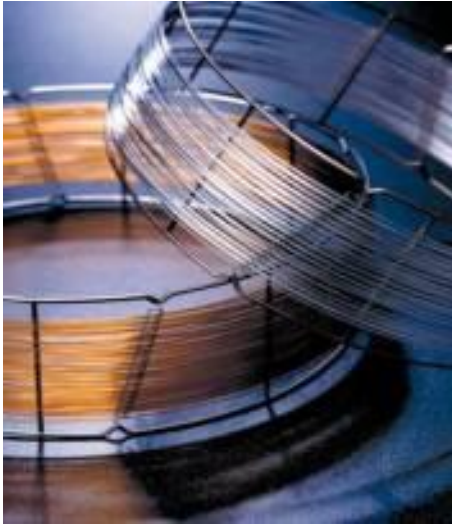
SANGRAMENTO OU SANGRIA DA COLUNA: perda da FE por volatilização

# Colunas

- São dispositivos fundamentais que permitem a separação dos constituintes da amostra.
- São tubos longos contendo a fase estacionária.
- O material que constitui a coluna não deve interagir com o recheio da coluna (FE).
- As colunas podem ser EMPACOTADAS ou RECHEADAS (analíticas ou preparativas) e CAPILARES (analíticas).
- Material inerte: aço inox, Al, Cu, vidro, sílica fundida, teflon.

# Colunas

## CAPILAR



$$\varnothing = 0,1 \text{ a } 0,5 \text{ mm}$$

$$L = 10 \text{ a } 100 \text{ m}$$

Paredes internas recobertas com um filme fino ( $\sim 30\mu\text{m}$ ) de fase estacionária líquida ou sólida

$$\varnothing = 2 \text{ a } 4 \text{ mm}$$

$$L = 1 \text{ a } 6 \text{ m}$$

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

## EMPACOTADA



# Colunas empacotadas

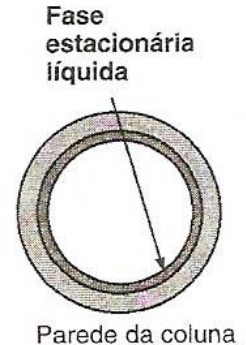
- Contêm um fino suporte sólido coberto com uma fase estacionária líquida não-volátil (partição) ou o próprio sólido pode ser a fase estacionária (adsorção).
- São fabricadas de tubos de vidro ou aço inox.
- O recheio, ou suporte sólido em uma coluna empacotada, serve para fixar a FE líquida de forma que a maior área superficial possível esteja exposta à fase móvel.
- Características do suporte para FE: (1) inércia química; (2) granulometria uniforme; (3) resistência mecânica; (4) grande área superficial e (5) resistência à temperatura elevada
- Materiais: terra diatomácea, polímeros porosos

# Colunas capilares

➤ São feitas de sílica fundida ( $\text{SiO}_3$ ) e cobertas com poliimida (um plástico capaz de resistir até  $350^\circ\text{C}$ ) para suportar e proteger da umidade atmosférica.

➤ COLUNA CAPILAR COM PAREDE RECOBERTA (WCOT):

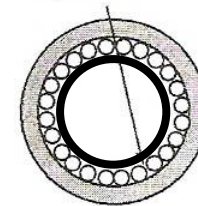
se caracteriza por um filme de espessura de 0,1 a 5  $\mu\text{m}$  de FE líquida na parede interna da coluna. Quanto **menor a espessura** da FE, **maior a resolução**, **menor  $t_R$**  e **menor capacidade da amostra**.



➤ COLUNA CAPILAR COM SUPORTE RECOBERTO (SCOT):

parede interna do capilar recoberta com um suporte sólido recoberto com filme de FE líquida. Maior área superficial e maior capacidade da amostra que WCOT.

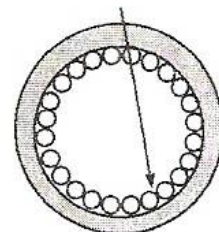
Suporte sólido recoberto com fase estacionária líquida



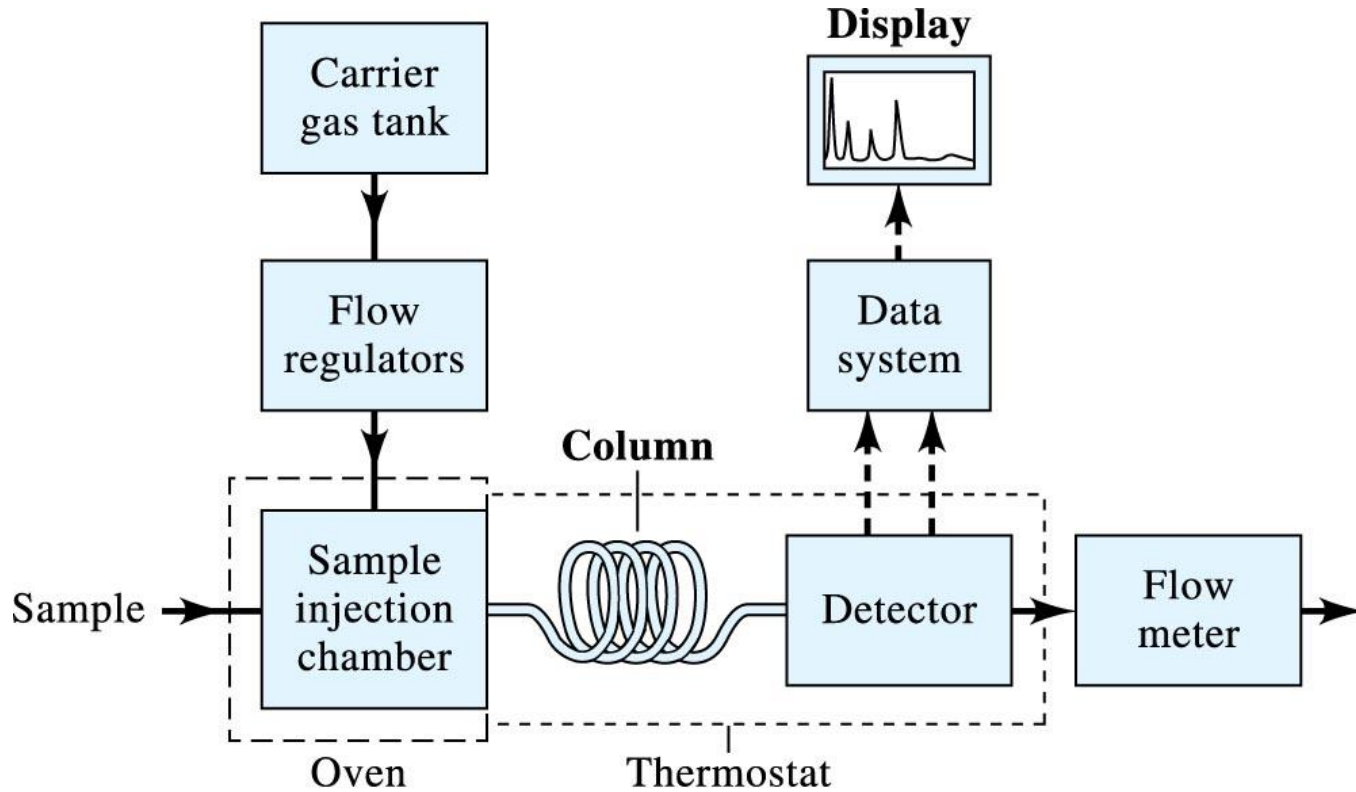
➤ COLUNA CAPILAR COM CAMADA POROSA (PLOT):

parede interna do capilar recoberta com uma camada porosa.

Partículas sólidas da fase estacionária



# Temperatura da coluna

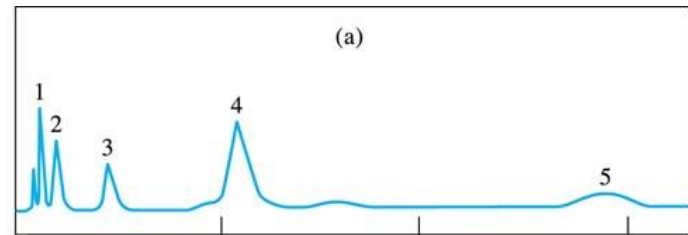


© 2004 Thomson - Brooks/Cole

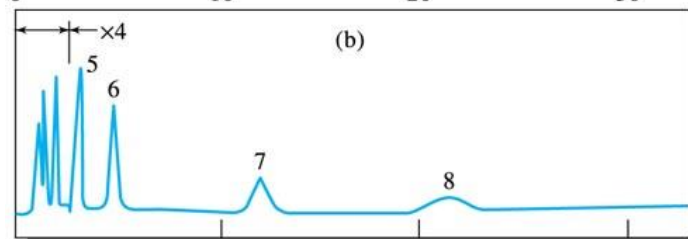
A T da coluna é o fator que mais afeta a separação. O aumento da T da coluna diminui  $t_R$  dos últimos compostos e diminui o tempo de análise, mas acusa perda de resolução. A T da coluna pode ser mantida cte (ANÁLISE ISOTÉRMICA) ou aumentar linearmente ou não (PROGRAMAÇÃO DE T).



# Efeito da temperatura

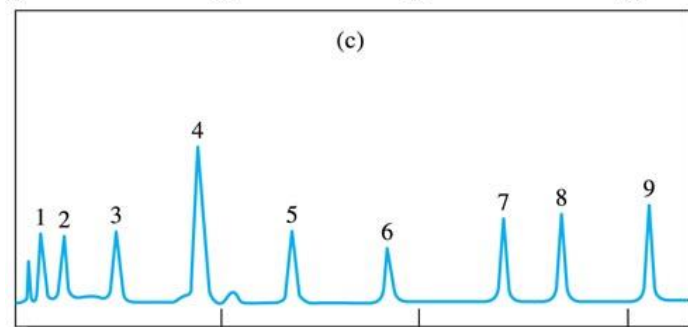


T = 45°C

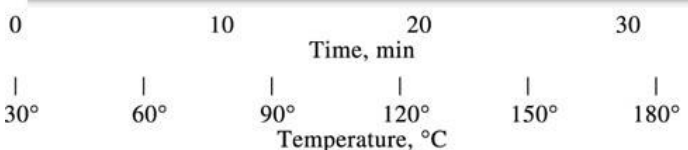


T = 145°C

Maior temperatura → menor tempo de eluição



T programada



# Forno da coluna

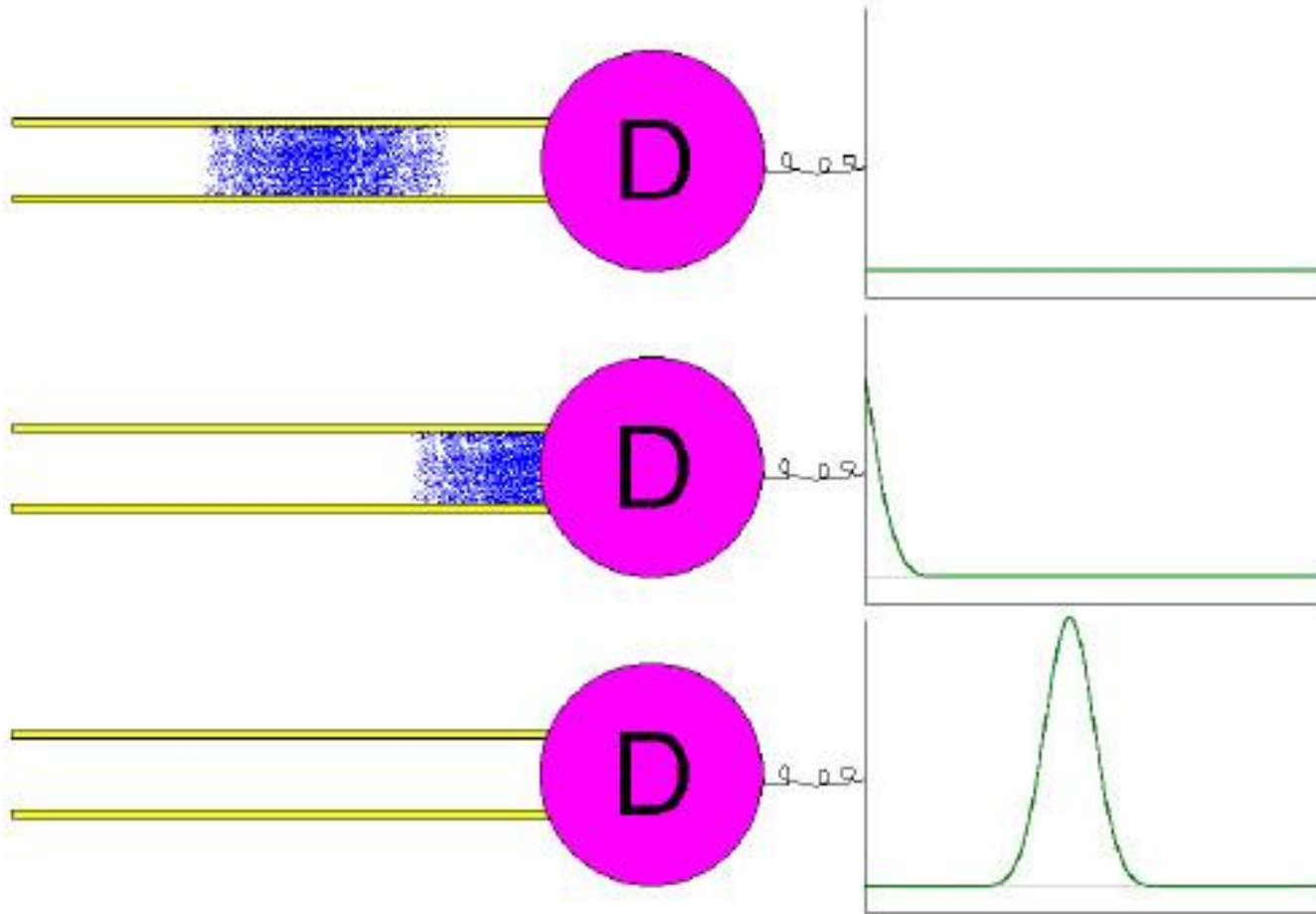
*Características desejáveis de um forno:*

- ✿ **AMPLA FAIXA DE TEMPERATURA DE USO** Pelo menos de  $T_{\text{ambiente}}$  até 400°C. Sistemas criogênicos ( $T < T_{\text{ambiente}}$ ) podem ser necessários em casos especiais.
- ✿ **TEMPERATURA INDEPENDENTE DOS DEMAIS MÓDULOS** Não deve ser afetado pela temperatura do injetor e detector.
- ✿ **TEMPERATURA UNIFORME EM SEU INTERIOR** Sistemas de ventilação interna muito eficientes para manter a temperatura homogênea em todo forno.
- ✿ **FÁCIL ACESSO À COLUNA** A operação de troca de coluna pode ser freqüente.
- ✿ **AQUECIMENTO E ESFRIAMENTO RÁPIDO** Importante tanto em análises de rotina e durante o desenvolvimento de metodologias analíticas novas.

# Cromatograma

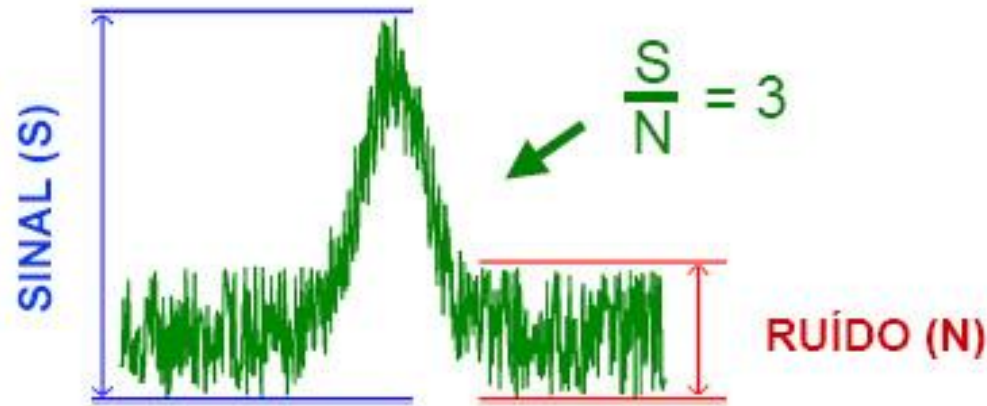
*Gráfico sinal x tempo*

*Idealmente: cada substância separada aparece como um PICO no cromatograma.*



# Parâmetros - desempenho

**QUANTIDADE MÍNIMA DETECTÁVEL** Massa de um analito que gera um pico com altura igual a três vezes o nível de ruído



**RUÍDO** Qualquer componente do sinal gerado pelo detector que não se origina da amostra

FONTES DE RUÍDO:

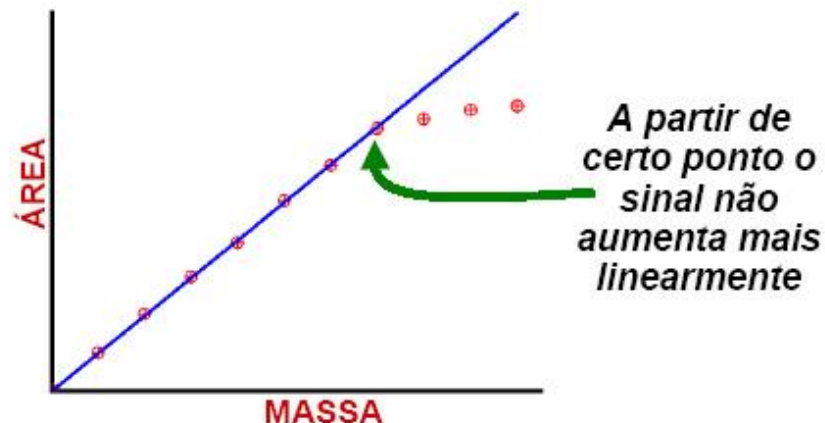
- Contaminantes nos gases
- Impurezas acumuladas no detector
- Aterramento elétrico deficiente

# Parâmetros - desempenho

**LIMITE DE DETEÇÃO** Quantidade de analito que gera um pico com  $S/N = 3$  e  $w_b = 1$  unidade de tempo

**SENSIBILIDADE** Relação entre o incremento de área do pico e o incremento de massa do analito

**FAIXA LINEAR DINÂMICA** Intervalo de massas dentro do qual a resposta do detector é linear



# Detectores

Dispositivos que geram um sinal elétrico proporcional à quantidade eluída de um analito.

~ 60 detectores já usados em CG



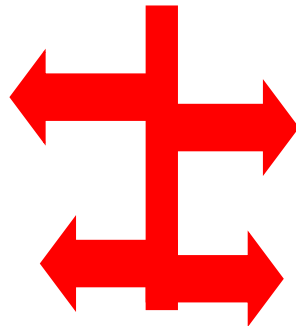
~ 15 equipam cromatógrafos comerciais



4 respondem pela maior parte das aplicações

Detector de condutividade  
térmica - DCT (TCD)

Detector de captura de  
elétrons - DCE (ECD)



Detector de ionização de  
chama - DIC (FID)

Detector espectrométrico de  
massas - EM (MS)

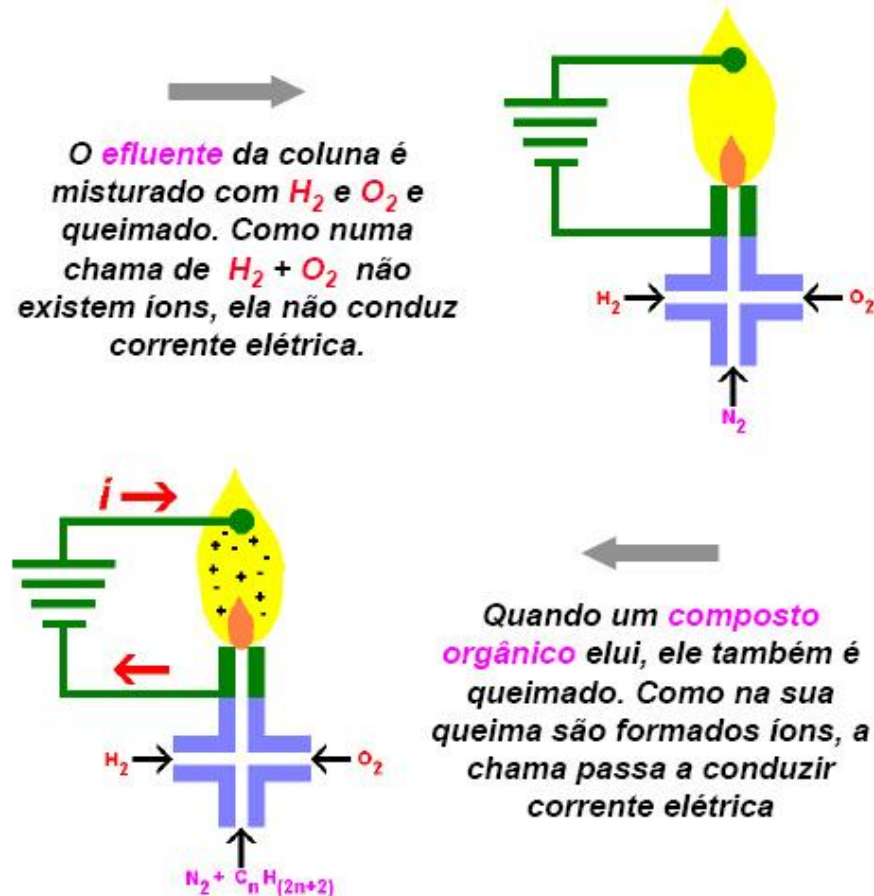
# Características

Um detector **IDEAL** tem as seguintes características:

- sensibilidade adequada
- boa estabilidade e reprodutibilidade
- uma resposta linear para solutos que se estenda por várias ordens de grandeza
- um intervalo de temperatura que abranja desde a temperatura ambiente até pelo menos 400°C
- uma resposta rápida, independentemente da vazão
- alta confiabilidade e de fácil uso
- não destruir a amostra

# Detector de ionização de chama

**PRINCÍPIO** Formação de íons quando um composto é queimado em uma chama de hidrogênio e oxigênio





# Detector de ionização de chama

**SELETIVIDADE** Seletivo para substâncias que contém ligações C-H em sua estrutura química.

(como virtualmente todas as substâncias analisáveis por CG são orgânicas, na prática o DIC é UNIVERSAL)

## ***Compostos que NÃO produzem resposta no DIC:***

Grupos: carbonila, álcool, halogênios, amínicos; gases não combustíveis (H<sub>2</sub>O, CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub>)

**SENSIBILIDADE** Alta ( $\sim 10^{-13}$  g s<sup>-1</sup>)

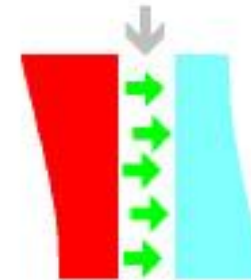
**LINEARIDADE** Largo intervalo ( $\sim 10^7$ )

**DESVANTAGEM** Destruição da amostra após a etapa da combustão

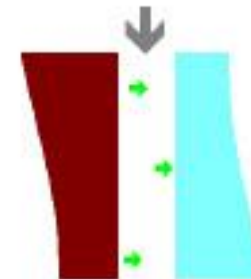
# Detector de condutividade térmica

**PRINCÍPIO** Baseia-se na propriedade dos corpos quentes perderem calor com um delta de velocidade específico, que depende da condutividade térmica dos gases emitidos e de sua composição

*A taxa de transferência de calor entre um **corpo quente** e um **corpo frio** depende da condutividade térmica do gás no espaço que separa os corpos*



*Se a condutividade térmica do gás diminui, a quantidade de calor transferido também diminui - o corpo quente se aquece.*



# Detector de condutividade térmica

**SELETIVIDADE** Observa-se sinal para qualquer substância eluída diferente do gás de arraste = UNIVERSAL

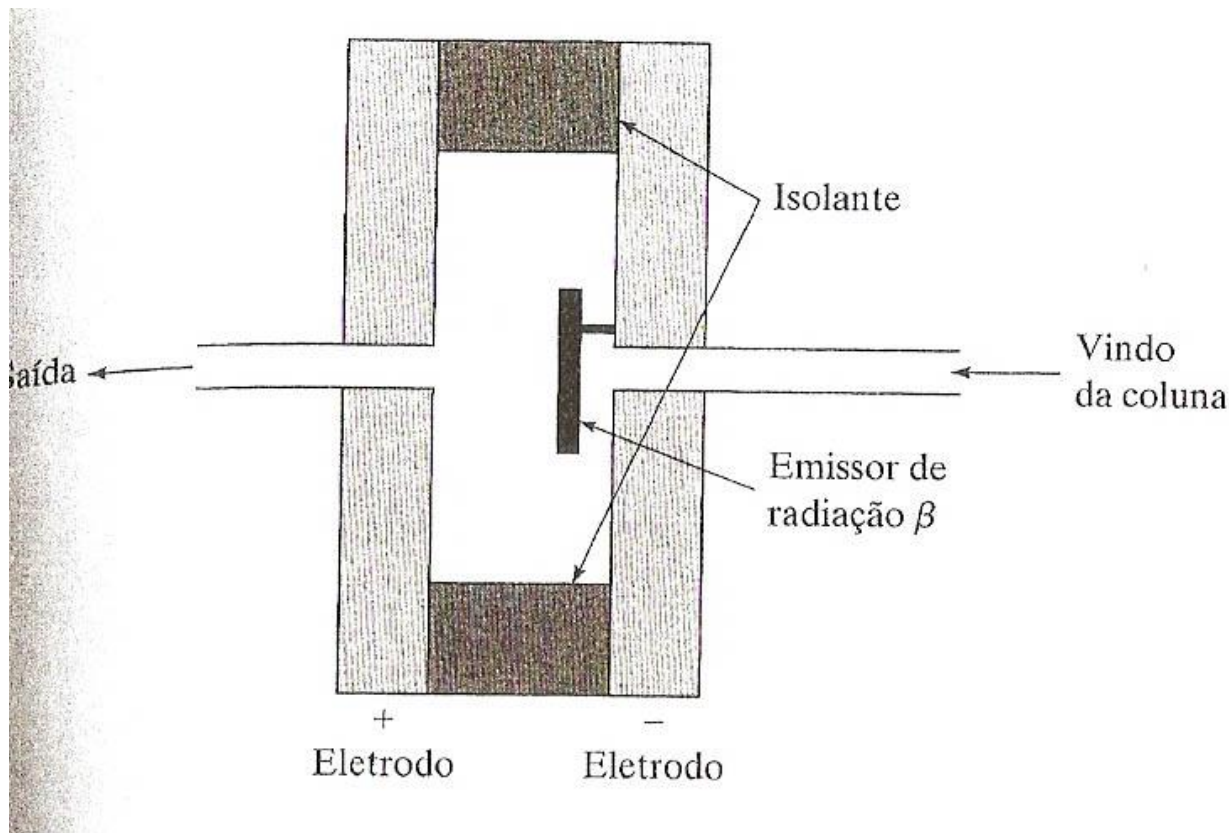
**LINEARIDADE** Larga faixa dinâmica ( $\sim 10^5$ )

**BAIXA SENSIBILIDADE (LIMITAÇÃO)**

**CARÁTER NÃO DESTRUTIVO DA AMOSTRA**

# Detector de captura de elétrons

**PRINCÍPIO** Supressão de um fluxo de elétrons causada pela sua passagem de espécies eletrofílicas (capturam elétrons)



# Detector de captura de elétrons

**SELETIVIDADE**

**LINEARIDADE** A resposta linear está limitada a um intervalo de cerca de 2 ordens de magnitude

**ALTA SENSIBILIDADE**

**NÃO ALTERA A AMOSTRA DE MODO SIGNIFICATIVO**

# Aplicações

## QUALITATIVA

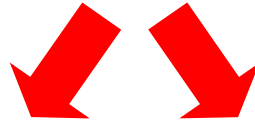
- comparação do tempo de retenção

## QUANTITATIVA

- altura de pico
- área de pico
- calibração e padrões
- padrão interno

# Análise qualitativa

Aplicações qualitativas de CG



Identificação individual das espécies contidas na amostra

Determinação da identidade da amostra propriamente dita

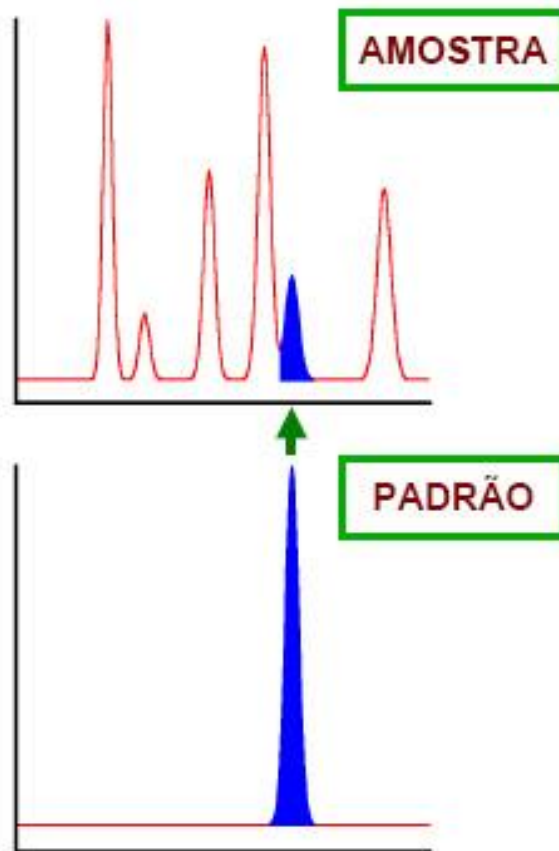
*Fontes de informações qualitativas:*

**RETENÇÃO** Uso de dados de retenção de um analito para sua identificação

**DETECÇÃO** Detectores que fornecem informações estruturais sobre as substâncias eluídas

# Análise qualitativa

Sob as mesmas condições operacionais, o tempo de retenção ajustado do analito é constante

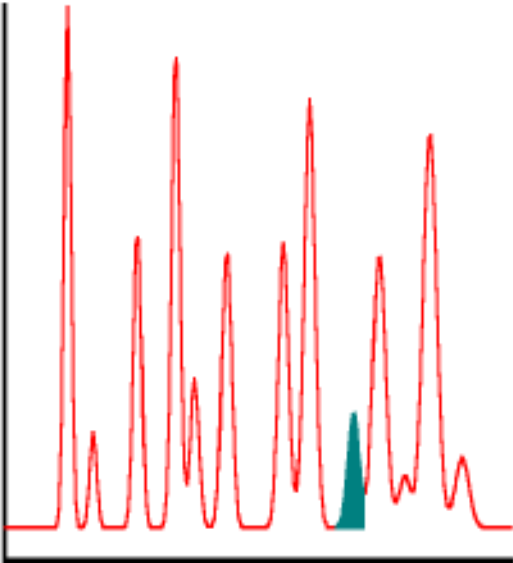


Comparação de cromatogramas da amostra e de uma solução padrão do analito suspeito

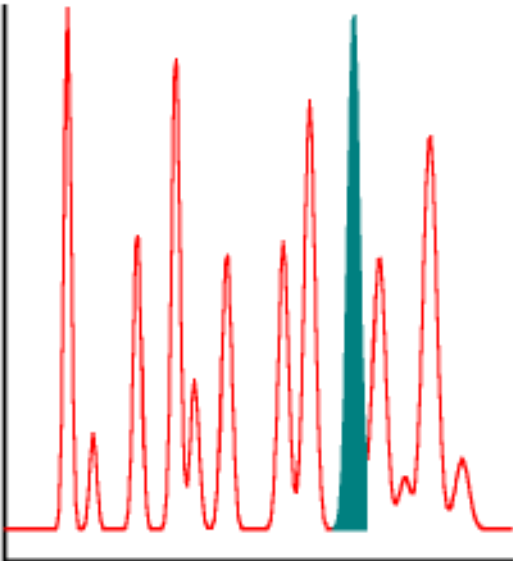
Identificação por  $t'_R$  é muito pouco confiável



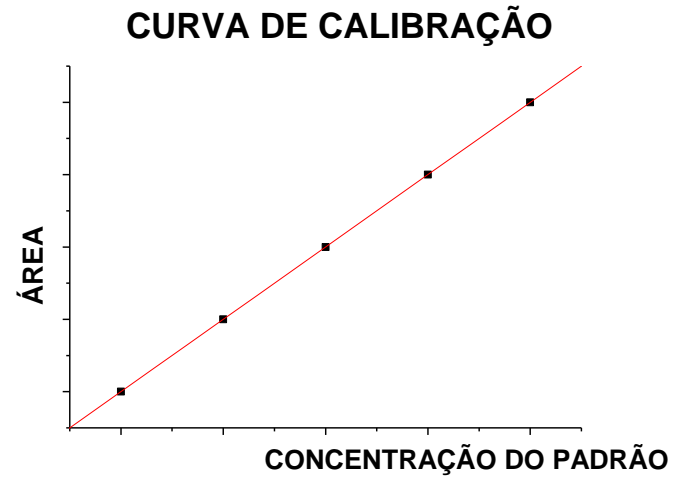
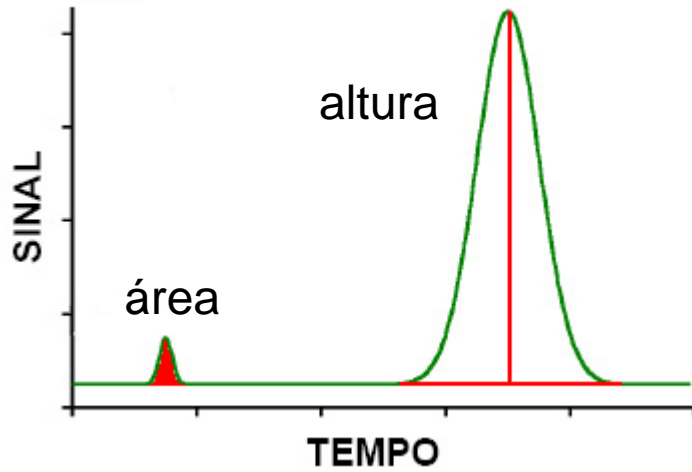
# Análise qualitativa



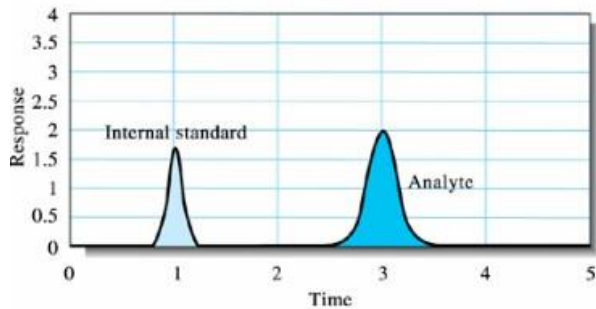
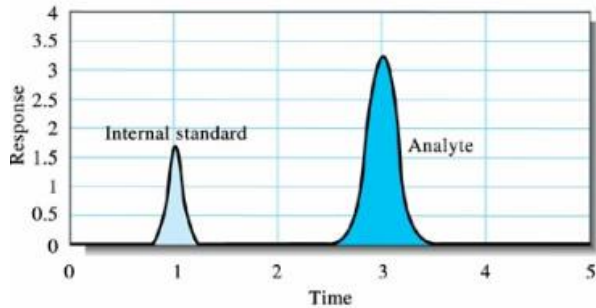
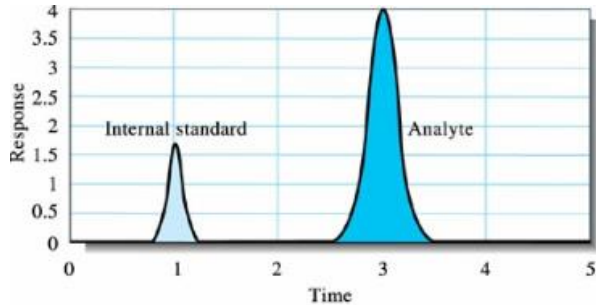
Comparação de  $t'_R$  usando dopagem (“*spiking*”) da amostra com o analito suspeito: aumento da confiabilidade de identificação.



# Análise quantitativa

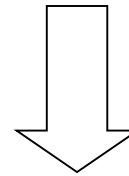


# Padrão interno



$$R_p = k_p C_p V$$

$$R_a = k_a C_a V$$



$$\frac{R_p}{k_p C_p} = \frac{R_a}{k_a C_a}$$

p = padrão interno

a = analito

R = resposta

C = concentração

V = volume utilizado

k = constante de proporcionalidade

# Exemplo - artigo

*Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-4, 200\_

---

## COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO EM CROMATOGRAFIA GASOSA: UM EXPERIMENTO PARA CURSOS DE QUÍMICA

---

**Carolina Bastos Pereira Ligiero, Lindomar Augusto dos Reis, Gabrieli Lessa Parrilha, Milton Baptista Filho e Maria Cristina Canela\***

Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Av. Alberto Lamego, 2000, 28013-602 Campos dos Goytacazes – RJ, Brasil

Recebido em 23/4/08; aceito em 3/2/09; publicado na web em 7/5/09

---

COMPARISON OF QUANTIFICATION METHODS IN GAS CHROMATOGRAPHY: AN EXPERIMENT FOR CHEMISTRY COURSES. This article describes an experiment designed to teach quantitative determination in gas chromatography (GC) in Organic and Analytical Chemistry practical classes. The experiment consisted of extracting and analyzing eugenol from clove seeds to perform a quantitative approach aimed at comparing results obtained by external and internal calibration procedures. Therefore, this experiment proved to be very effective tool to enhance students awareness on the need to understand different types of calibration in GC and on how to avoid common experimental errors, and to find the best ways to eliminate their interference during the quantitative analysis phase.

Keywords: GC; quantitative analysis; teaching.

# Óleo essencial de cravo da Índia

## Preparo dos padrões para as curvas de calibração

Foram confeccionadas cinco soluções-padrão com diferentes concentrações de eugenol obtido comercialmente (Firmenich) em 25 mL de diclorometano (Vetec). Como padrão interno adicionou-se uma quantidade fixa de 46 mg ( $1,84 \text{ g L}^{-1}$ ) de carvona (Firmenich) a cada padrão. As massas e concentrações de eugenol em cada padrão são mostradas na Tabela 1.

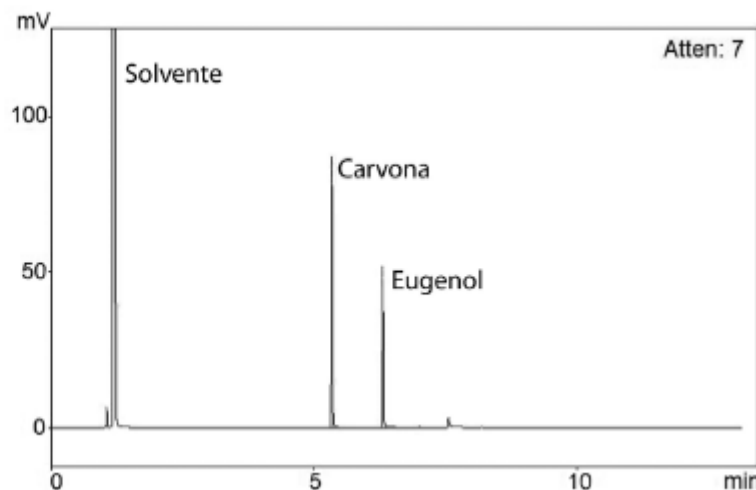
**Tabela 1.** Preparação dos padrões

Padrão	Massa de eugenol (mg)	Concentração de eugenol ( $\text{g L}^{-1}$ )
1	20,8	0,83
2	31,2	1,25
3	52,0	2,08
4	72,8	2,91
5	93,6	3,74

## Preparo da amostra analítica

Uma alíquota de 51 mg da amostra do óleo essencial extraída do cravo-da-Índia foi diluída para 25 mL de diclorometano. Como padrão interno foram adicionados 46 mg de carvona, conforme feito anteriormente com os padrões.

## Injeção das amostras



**Figura 2.** Cromatograma do padrão contendo eugenol e carvona

**Tabela 2.** Resultados das injeções dos padrões

Padrão	Área Eugenol	Área Carvona	Razão Áreas Eugenol/Carvona
1	33423	87415	0,382
2	49625	88792	0,559
3	60810	69865	0,870
4	120861	102089	1,184
5	176752	111873	1,580

# Curvas de calibração

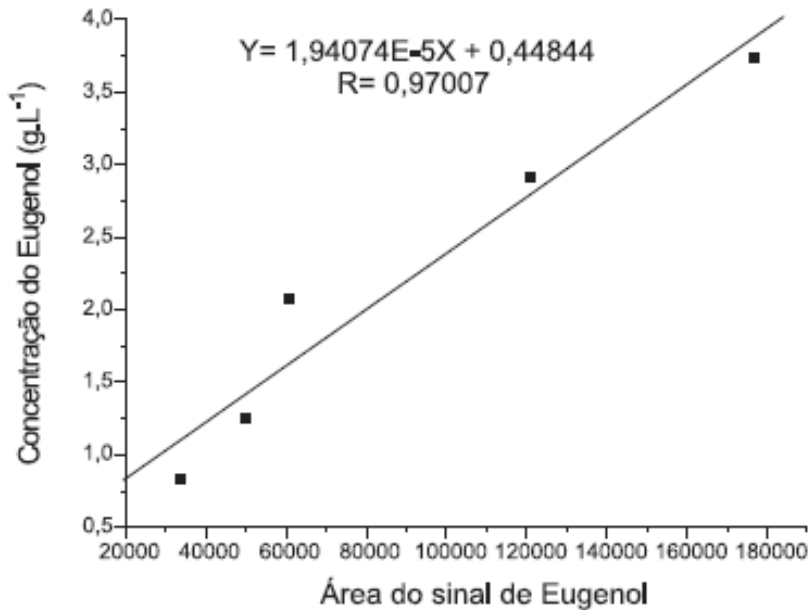


Figura 3. Curva de calibração externa do eugenol

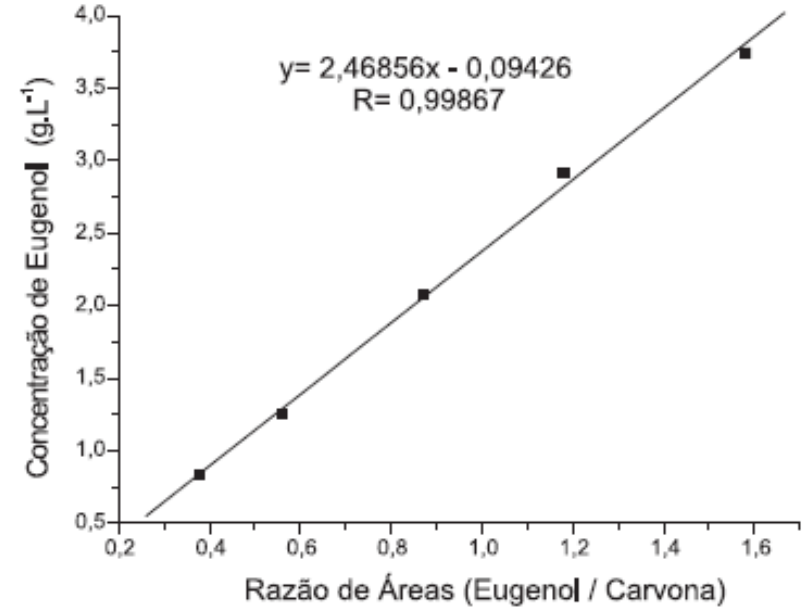


Figura 4. Curva de calibração utilizando padrão intern

Tabela 6. Comparação entre as diferentes calibrações

Calibração	Concentração Média (g L <sup>-1</sup> )	Desvio Padrão	Percentual de Eugenol no Óleo	Desvio Relativo (%)
Externa	1,194	0,075	58,525	6,272
Interna	1,567	0,011	76,810	0,673