

QUI346

CROMATOGRRAFIA

Princípios de Cromatografia

CROMATOGRAFIA

Princípio

CROMATOGRAFIA É UMA TÉCNICA DE SEPARAÇÃO (com diversos mecanismos)

Definição:

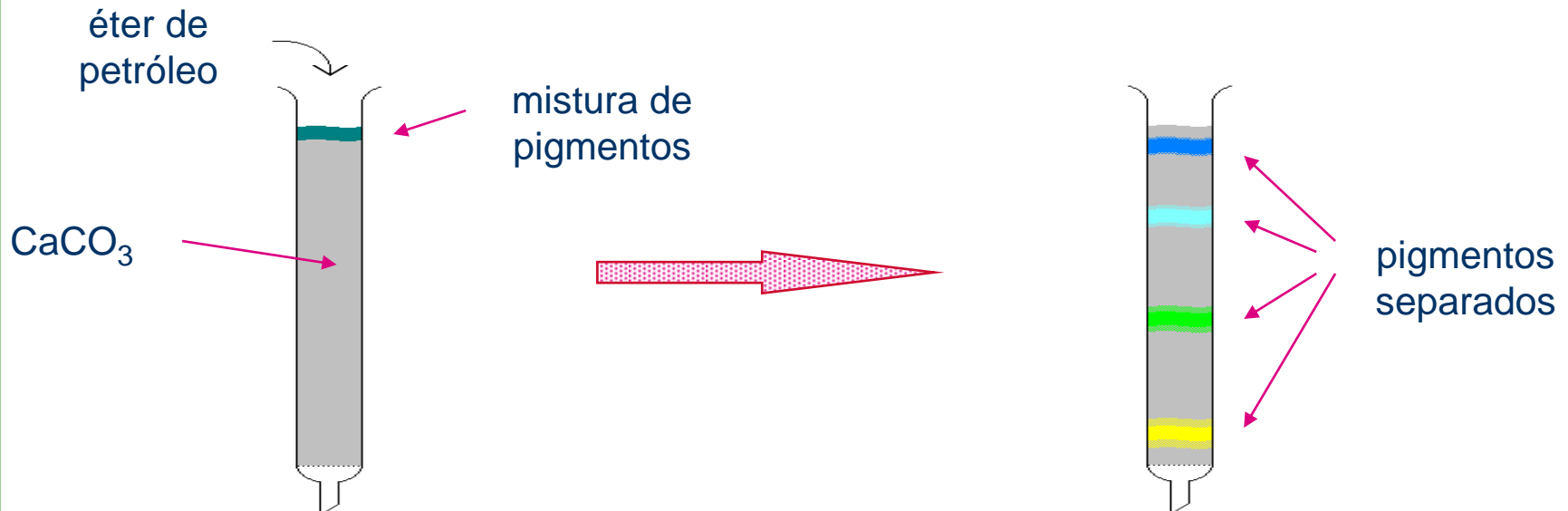
Separação dos componentes de uma mistura através da distribuição destes entre duas fases – uma estacionária e uma móvel.

CROMATOGRAFIA

Método de Separação

HISTÓRICO

Tswett (1906) ⇒ extrato de folhas em coluna de alumina, sucrose e carbonato de cálcio.



Cromato = cor / grafia = escrita

CROMATOGRAFIA

Método de Separação

HISTÓRICO

Cromato = cor / grafia = registro

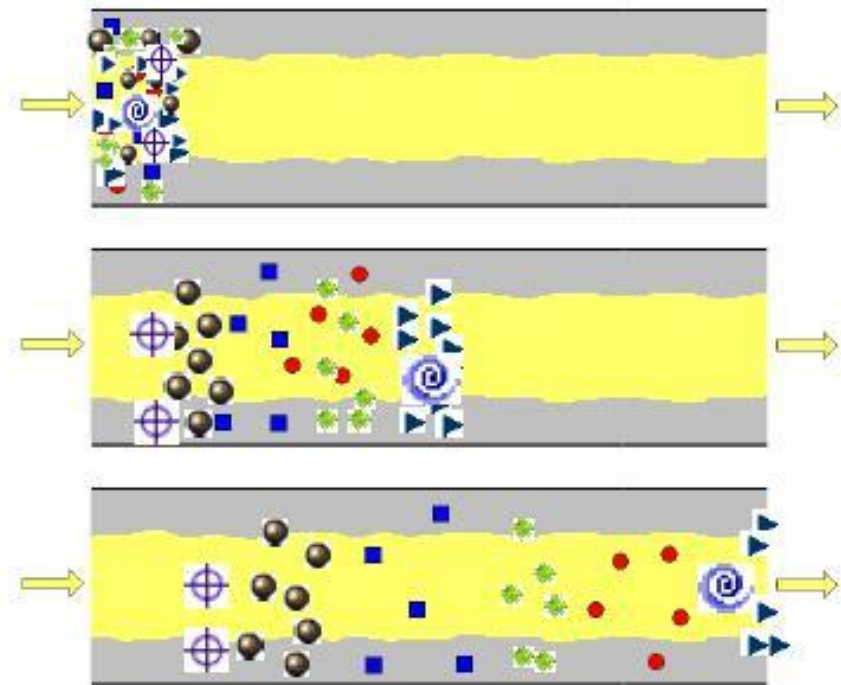


SEPARAÇÃO DE PIGMENTOS DE VEGETAIS (Fonte: Portal do Professor – MEC)

CROMATOGRAFIA

Princípio

A fase **móvel** passa pela fase **estacionária** que pode estar dentro de uma coluna (**cromatografia em coluna**) ou sobre uma placa (**cromatografia planar**) e os componentes da mistura são separados pela diferença de afinidade pelas duas fases.



Transporte dos componentes de uma amostra por uma fase móvel através de uma fase estacionária (**cromatografia em coluna**)

CROMATOGRAFIA

Modalidades e Classificação (tipos de cromatografia)

FIGURA I-1: Classificação da cromatografia pelas formas físicas das fases móveis e estacionárias.

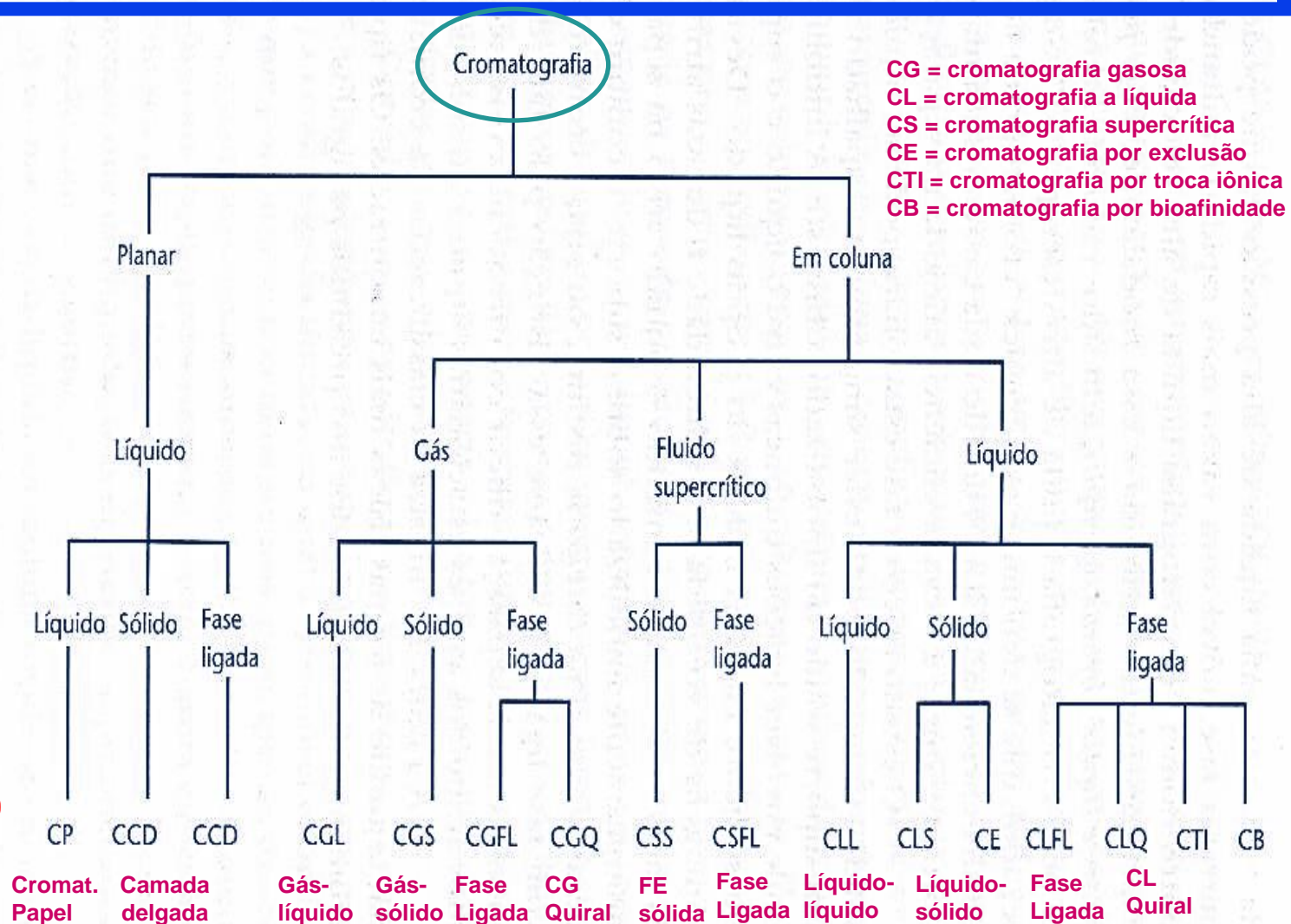
Critério de classificação

Técnica

Fase móvel (FM)

Fase (FE) estacionária

Tipo de cromatografia



Fonte: Collins, C.H. et al. (coord.) **Fundamentos de Cromatografia**, Editora Unicamp, 5a ed., Campinas, 2006, p. 24.

CROMATOGRAFIA

COMO FUNCIONA?

O PROCESSO CROMATOGRÁFICO

Exemplo 1: simples ilustração do processo da cromatografia em coluna

<https://www.youtube.com/watch?v=0m8bWKHmRMM> (1:11')

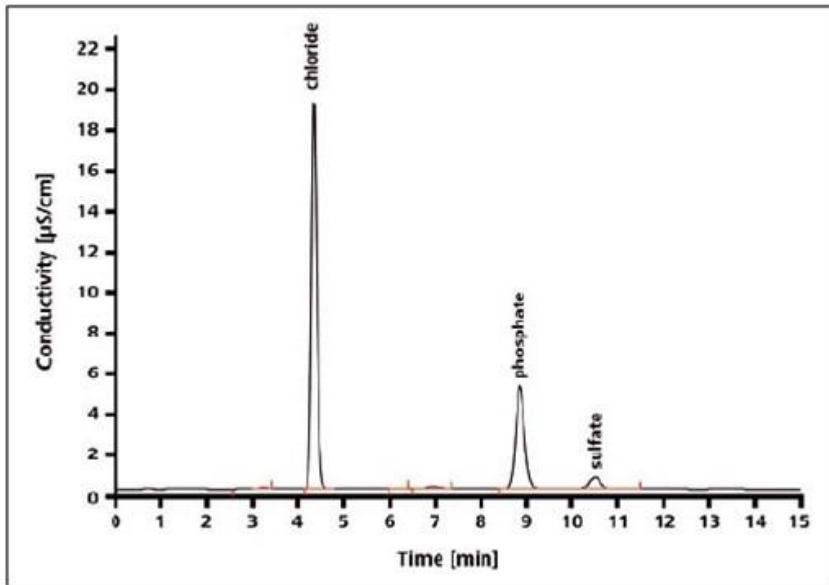
Exemplo 2: o processo da cromatografia em coluna em fase gasosa de alta eficiência (coluna capilar)

<https://www.youtube.com/watch?v=piGSGkcwFAw> (4:18' a 6:21')

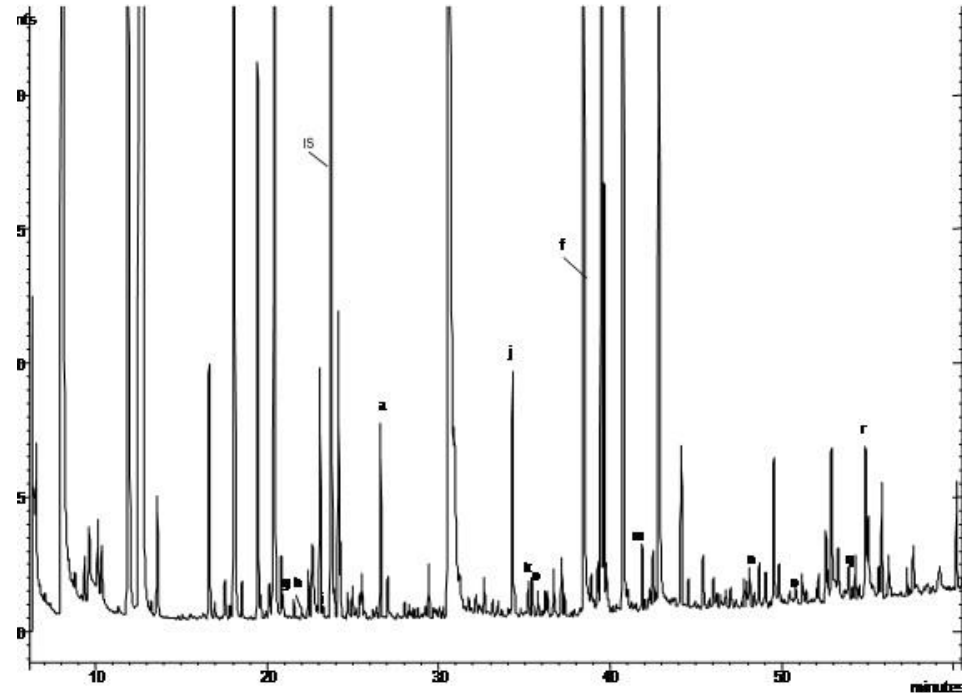
TEORIA BÁSICA

Cromatograma

Cromatograma = gráfico de **sinal vs tempo**.



Cromatograma de ânions em amostra de leite dialisado, contendo 9,88 mg/L de cloreto, 17,40 mg/L de fosfato e 1,09 mg/L de sulfato (após a diluição da amostra). Coluna: Metrosep A Supp 5-100, eluente 3,2 mmol/L de carbonato de sódio e 1,0 mmol/L de bicarbonato de sódio. Fluxo de 0,7 mL/min. Temperatura da coluna: 30°C. Volume de injeção de 20 µL. Solução acceptora: água ultrapura. (fonte: <http://www.metrohm.com.br/news/MaterialLeite.html>)

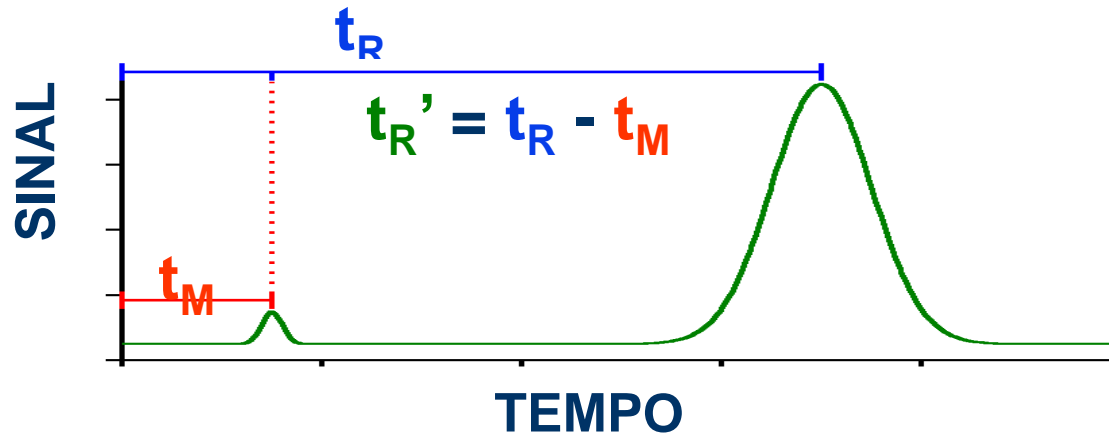


Cromatograma de uvas da casta Alvarinho. Componentes orgânicos voláteis do suco de uvas (fração headspace) responsáveis pela característica sensorial da fruta separados por cromatografia em fase gasosa (18 compostos são assinalados no cromatograma). (fonte: <http://www.vinalia.com.pt/servicos2>)

TEORIA BÁSICA

Tempo de Retenção (t_R)

Cromatograma = gráfico de **sinal** vs **tempo**.



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

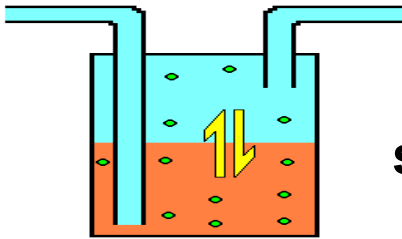
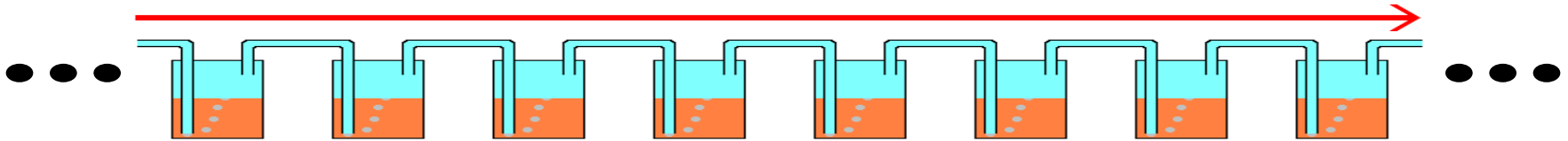
t_M = Tempo de Retenção do Composto Não-Retido (tempo mínimo para um composto que não interaja com a fase estacionária – FE – atravessar a coluna) (Tempo Morto)

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

TEORIA BÁSICA

Constante de Distribuição, K_C

Coluna cromatográfica: série de estágios independentes onde acontece o equilíbrio entre o analito dissolvido na Fase Estacionária e na Fase Móvel



Ocorre um “quase-equilíbrio” entre o analito sorvido na FE e dissolvido na FM (gás de arraste).

$$K_C = \frac{[A]_S}{[A]_M}$$

K_C = Constante de Distribuição

$[A]_S$ = concentração do analito na FE

$[A]_M$ = concentração do analito na FM

↓ *Afinidade pela FE*



↓ $[A]_S$

MENOR RETENÇÃO !!!

↑ *Volatilidade*



↑ $[A]_M$



TEORIA BÁSICA

Fator de Retenção, k

Expressando o equilíbrio em termos da MASSA do analito em cada fase, ao invés da concentração:

$$K_c = \frac{[A]_s}{[A]_M} = \frac{\frac{W_s}{V_s}}{\frac{W_M}{V_M}} = \frac{\left(\frac{W_s}{V_s}\right)}{\left(\frac{W_M}{V_M}\right)} = \frac{W_s}{W_M} \times \frac{V_M}{V_s}$$

FATOR DE RETENÇÃO, k : razão entre as massas de analito contidas na FE (W_s) e no gás de arraste (W_M)

$$k = \frac{W_s}{W_M}$$

RAZÃO DE FASES, β : razão entre volumes de FE e gás de arraste na coluna

$$\beta = \frac{V_M}{V_s}$$

$$K_c = k \times \beta$$

TEORIA BÁSICA

Fator de retenção vs tempo de retenção

$$K_c = k \times \beta \quad \text{MAS,}$$

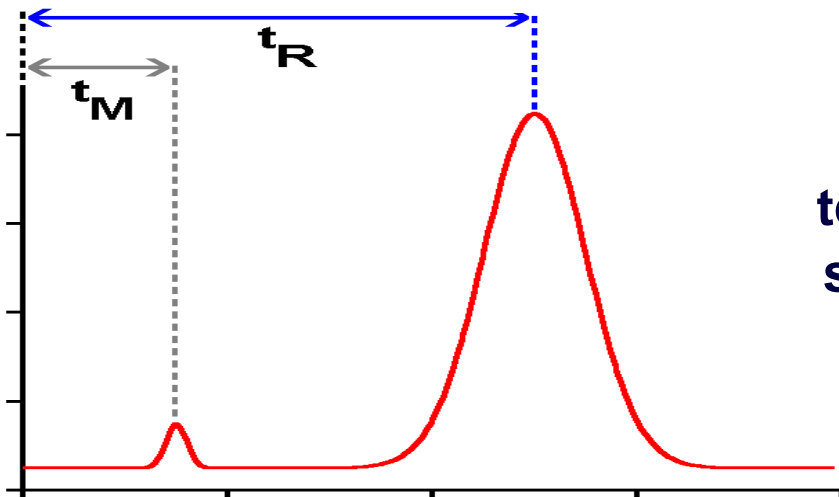
$$k = \left(\frac{t_R}{t_M} \right) - 1 = \left(\frac{t_R'}{t_M} \right)$$

$$\text{ENTÃO, } K_c = \left(\left(\frac{t_R}{t_M} \right) - 1 \right) \times \beta$$

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t_{R'B}}{t_{R'A}}$$

é possível estimarem a constante de distribuição (K_c) e, o fator de retenção (k) e o fator de seletividade (α) partir do cromatograma!

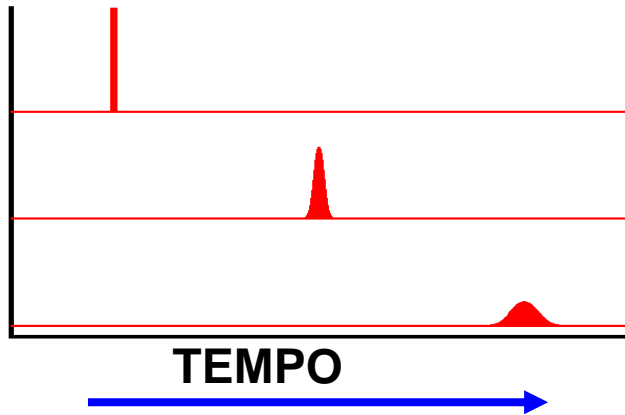
α é o fator de seletividade e avalia a separação entre dois analitos, A e B (B com maior t_R).



Dessa forma, a constante termodinâmica de distribuição K_c pode ser estimada a partir da razão de fases β da coluna e de informações do cromatograma (t_M e t_R)

TEORIA BÁSICA

Eficiência de Sistemas Cromatográficos



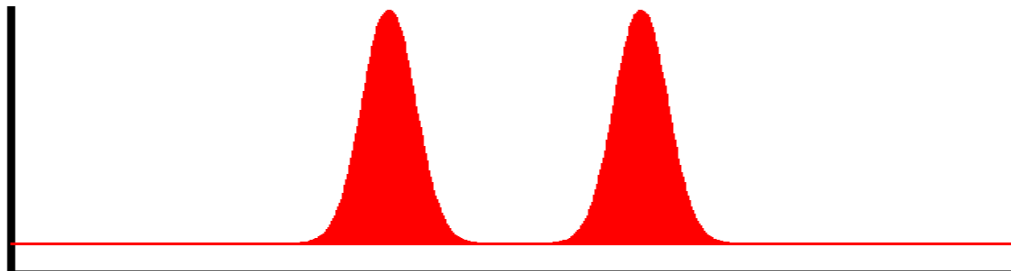
A migração de um analito pela coluna provoca inevitavelmente o alargamento da sua banda:

EFICIÊNCIA Capacidade de eluição com o mínimo de dispersão do analito.



Menor eficiência

vs



Maior eficiência

TEORIA BÁSICA

Quantificação da Eficiência: Pratos Teóricos

A teoria da separação pode ser explicada por uma analogia com processos de **destilação** e extração em contra-corrente.

Foi proposta por Martin & Singer em 1941.

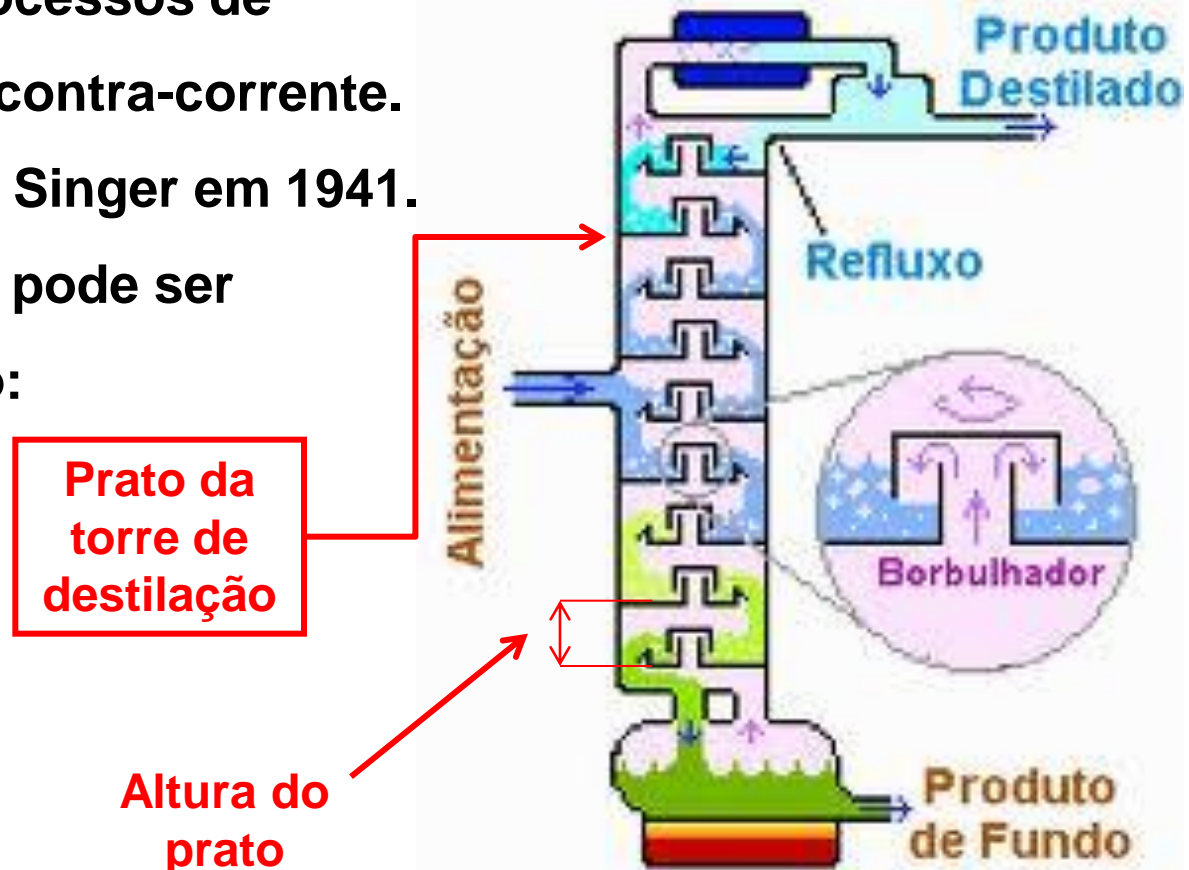
A eficiência da separação pode ser medida por um parâmetro:

Prato Teórico.



Colunas de destilação de uma refinaria

Destilação Contínua



TEORIA BÁSICA

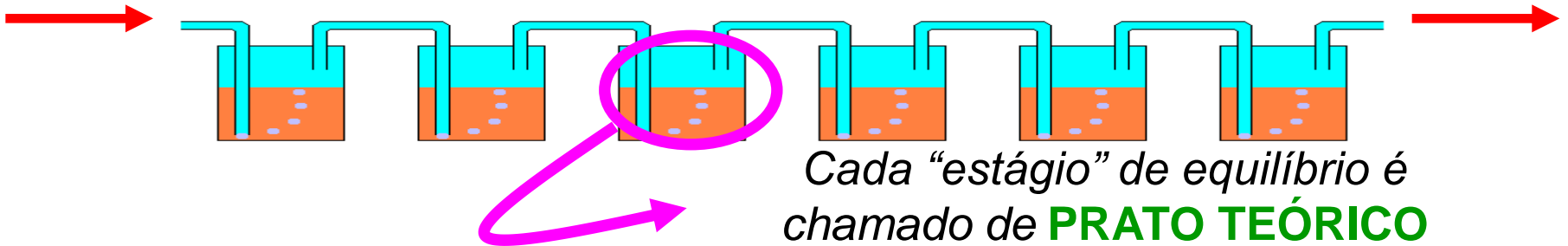
Quantificação da Eficiência: Pratos Teóricos

- Na **destilação** os pratos realmente existem (onde o vapor passa através de uma fase líquida) e, assim, a distância de um prato a outro (altura) pode ser medida.
- É assumido que o sistema esteja em equilíbrio durante esse processo.
- Na **coluna cromatográfica os pratos não podem ser observados fisicamente e por isso são chamados pratos teóricos. Mas, é possível calcular a altura equivalente a um prato teórico (HETP) a partir do comprimento da coluna.**
- **Dessa forma, o conceito utilizado em destilação é estendido para explicar o processo cromatográfico.**

TEORIA BÁSICA

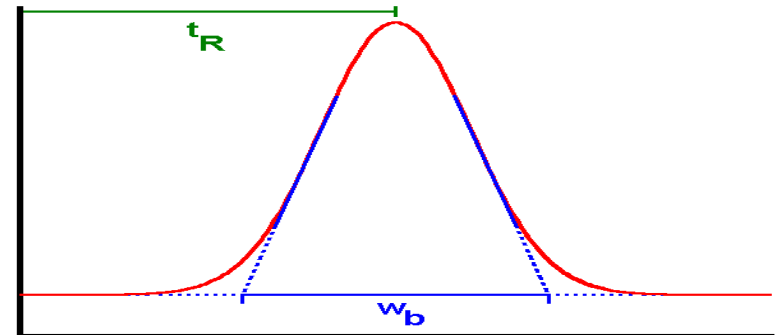
Quantificação da Eficiência: Pratos Teóricos

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



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

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



↑ t_R
↓ w_b

↑ N

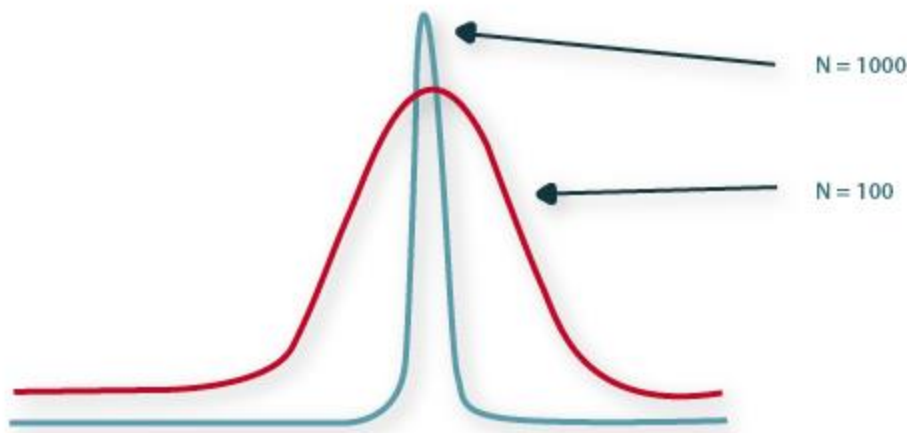
Coluna mais eficiente

O NÚMERO DE PRATOS TEÓRICOS EFETIVOS (N_{ef}) É OBTIDO UTILIZANDO O TEMPO DE RETENÇÃO AJUSTADO (t_R') NA FÓRMULA

TEORIA BÁSICA

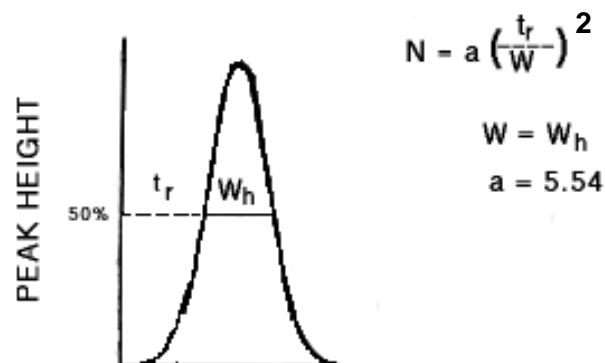
Determinação da Eficiência

A eficiência com que um sistema (FE sob certas condições) elui um analito pode ser medida pelo número de pratos teóricos utilizados para essa eluição.

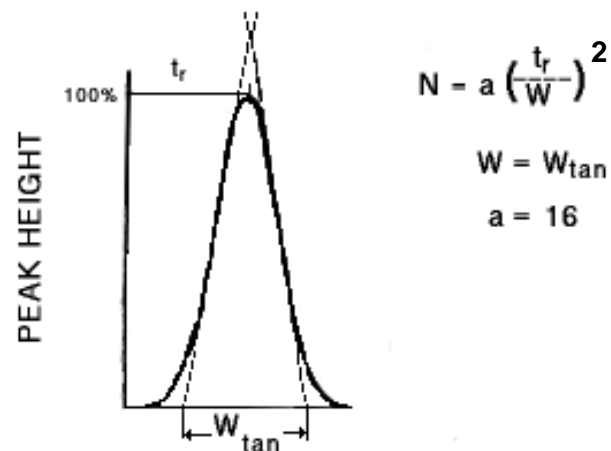


Avaliação da eficiência de uma coluna separar dois analitos diferentes com o mesmo tempo de retenção

HALF-PEAK HEIGHT METHOD



TANGENT METHOD



TEORIA BÁSICA

Quantificação da Eficiência: Pratos Teóricos

ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO TEÓRICO (H) $H = \frac{L}{N}$

“Tamanho” de cada estágio de equilíbrio

Atenção! H_{ef} é obtido do N_{ef}

EXEMPLOS PARA CROMATOGRAFIA A GÁS

(L = comprimento da coluna)

Capilares, L = 30 m

Empacotadas, L = 2 m

Valores típicos de H e N para CG:

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

Valores de H para colunas capilares e empacotadas são próximos, mas como L para capilares é MUITO maior elas são mais eficientes

TEORIA BÁSICA

Quantificação da Eficiência: Pratos Teóricos

A PARTIR DA TABELA AO LADO DETERMINE O TEMPO DE RETENÇÃO DO ANALITO UTILIZADO PARA A OBTENÇÃO DE "H" CONSIDERANDO QUE A LARGURA DO PICO SEJA NUMERICAMENTE IGUAL A d_c , EM MINUTOS.

AVALIANDO APRENDIZADO

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad H = \frac{L}{N}$$

Capilares, L = 30 m

Empacotadas, L = 2 m

d_c (mm)	d_f (um)	H (mm)	t_R (min)
0,10	0,25	0,081	15,21
0,25	0,25	0,156	27,41
0,32	0,32	0,200	30,98
0,32	0,50	0,228	29,02
0,32	1,00	0,294	25,56
0,32	5,00	0,435	21,01
0,53	1,00	0,426	35,16
0,53	5,00	0,683	27,77
2,16	10%	0,549	32,59
2,16	5%	0,500	34,15

TEORIA BÁSICA

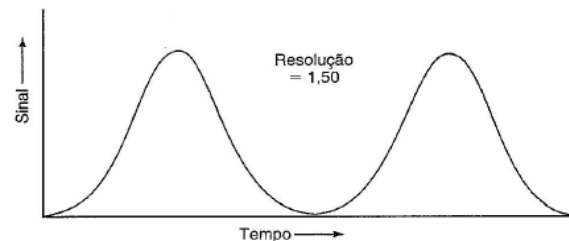
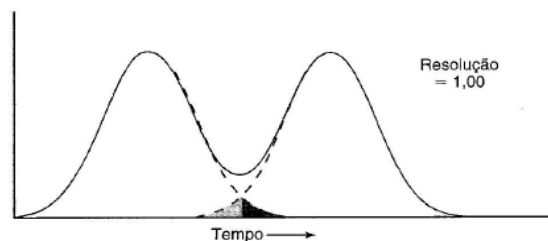
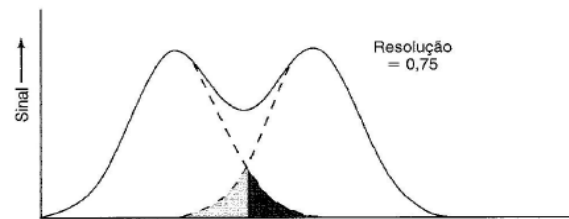
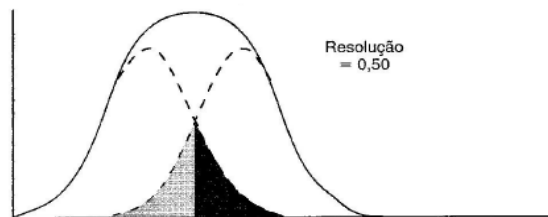
Avaliação da Separação

RESOLUÇÃO

A separação completa e efetiva de dois picos cromatográficos depende simultaneamente das suas retenções ($\equiv \alpha = f(tR1, tR2)$) e das suas larguras ($\equiv H = f(tR, wb)$):

RESOLUÇÃO R_s expressa a separação efetiva entre dois picos adjacentes

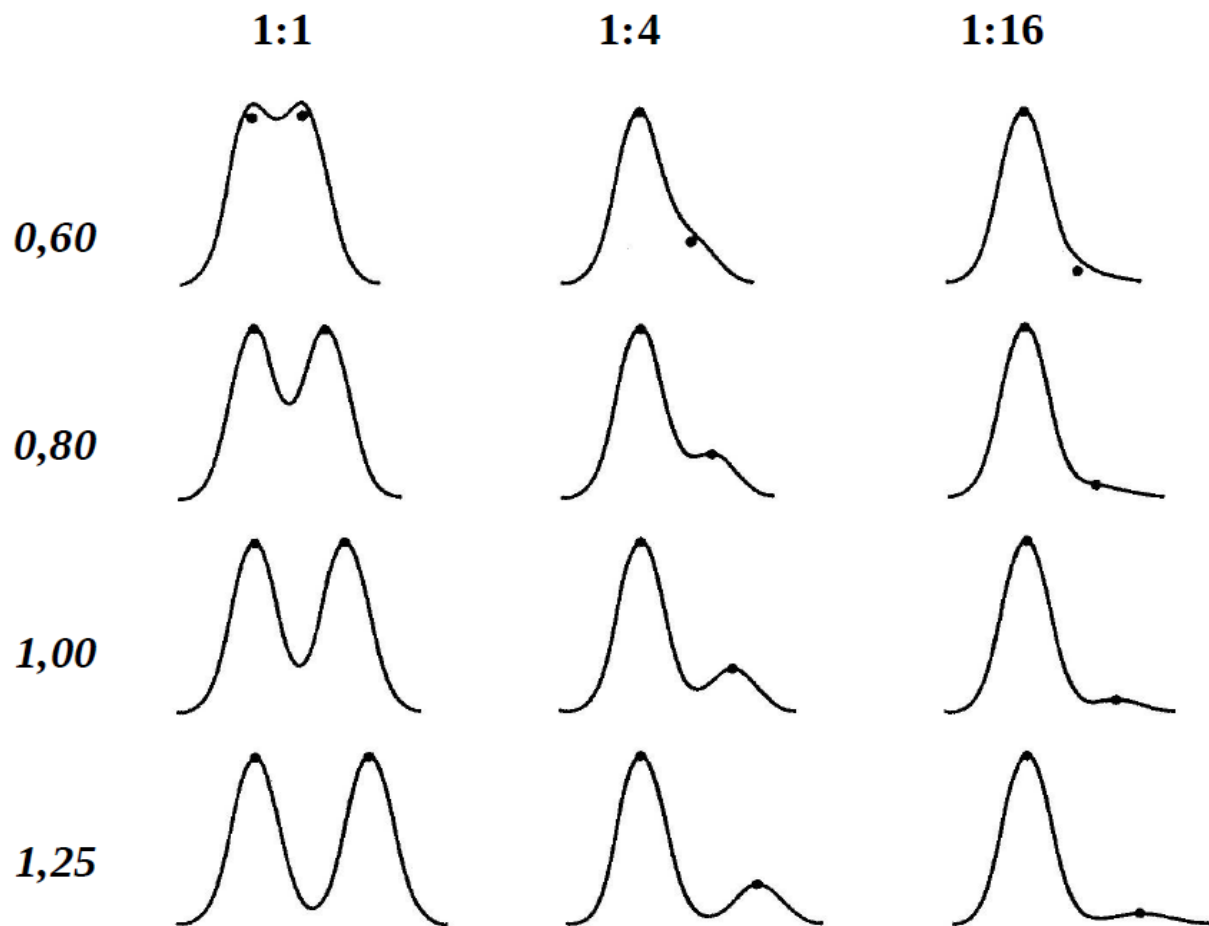
$$\Rightarrow R_s = \frac{2 \cdot (t'_{R1} - t'_{R2})}{(W_{B1} + W_{B2})}$$



TEORIA BÁSICA

Avaliação da Separação

RESOLUÇÃO x RAZÃO ENTRE ÁREAS



TEORIA BÁSICA

Eficiência e Separação pelo Cromatograma

A separação e a eficiência são avaliadas simultaneamente na busca da maior quantidade possível de analitos separados no processo cromatográfico

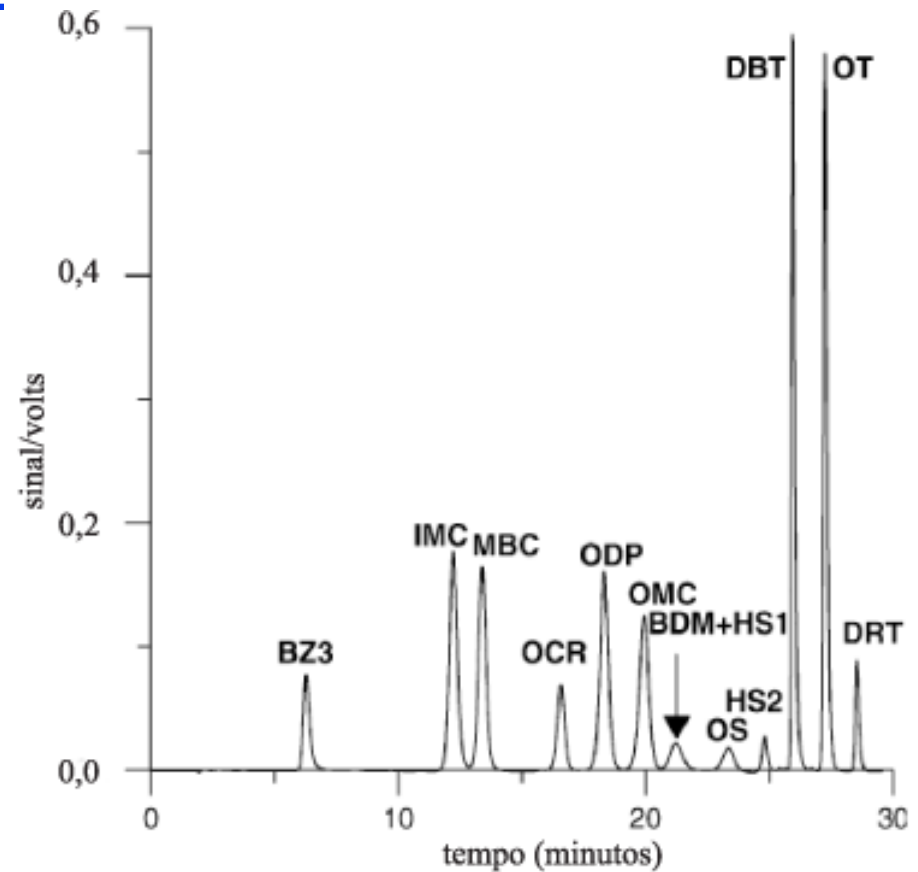
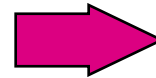


Figura 6. Separação de filtros solares lipossolúveis utilizando etanol como FM. Coluna: LiChrospher RP-18 (125 × 4 mm, dp 5 μm). FM: etanol:ácido acético 1%, 60:40, v/v, por 5 min, a 70% etanol em 10 min, mantendo 70% etanol por 10 min, a 100% etanol em 0,5 min, mantendo 100% etanol por 4,5 min, voltando a 60% em 14,5 min; temperatura 45 °C; vazão 0,5 mL/min; injeção: 20 μL; detecção: UV 313 nm. Solutos: benzofenono-3 (BZ3), isoamilmetoxicinamato (IMC), 4-metilbenzilidenocamfora (MBC), octocrileno (OCR), octildimetilPABA (ODP), octilmetoxicinamato (OMC), butilmetoxidibenzoilmetano (BDM), homosalato (HS) onde HS1 e HS2 são isômeros de HS, octilsalicilato (OS), dietil-hexilbutamidotriazina (DBT), octiltiazina (OT) e drometizoltrissiloxano (DRT). Adaptado da ref. 44

CROMATOGRAFIA:

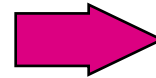
Modalidades e Classificação

FM = Líquido



Cromatografia a Líquida

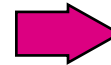
FM = Gás



Cromatografia a Gás (CG)

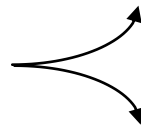
Cromatografia a gás

Sólida

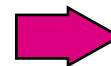


Cromatografia Gás-Sólido (CGS)

Em CG a **FE** pode ser:



Líquida



Cromatografia Gás-Líquido (CGL)

QUI346

CROMATOLOGRAFIA

Princípios de
Cromatografia

Cromatografia a Gás

CROMATOGRAFIA GASOSA

Histórico

1940



“CGS” rudimentar

CGL proposta (Martin e Synge)

Separação de ácidos orgânicos por CGL: primeiro cromatógrafo (Martin e James)

1950

Primeiro equipamento comercial (Griffin & George)

Detector por Densidade de Gás (Martin e James)

Detector por Ionização em Chama (McWilliam e Dewar)

Detector por Captura de Eletrons (Lovelock e Lipsky)

1960

Colunas Capilares (Golay)

Importância:

Vendas de equipamentos e acessórios para CG nos EUA estimadas em mais de US\$ 750.000.000 (1995).

CROMATOGRAFIA GASOSA

Aplicabilidade

Quais misturas podem ser separadas por CG?



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



Misturas cujos constituintes sejam **VOLÁTEIS** (evaporáveis)

**NO
GERAL:**

CG é aplicável para separação e análise de misturas cujos constituintes tenham PONTOS DE EBULIÇÃO de até 300°C e que sejam termicamente estáveis.

O Cromatógrafo a Gás

Instrumentação

Foto de um cromatógrafo a gás com detecção por espectrometria de massas

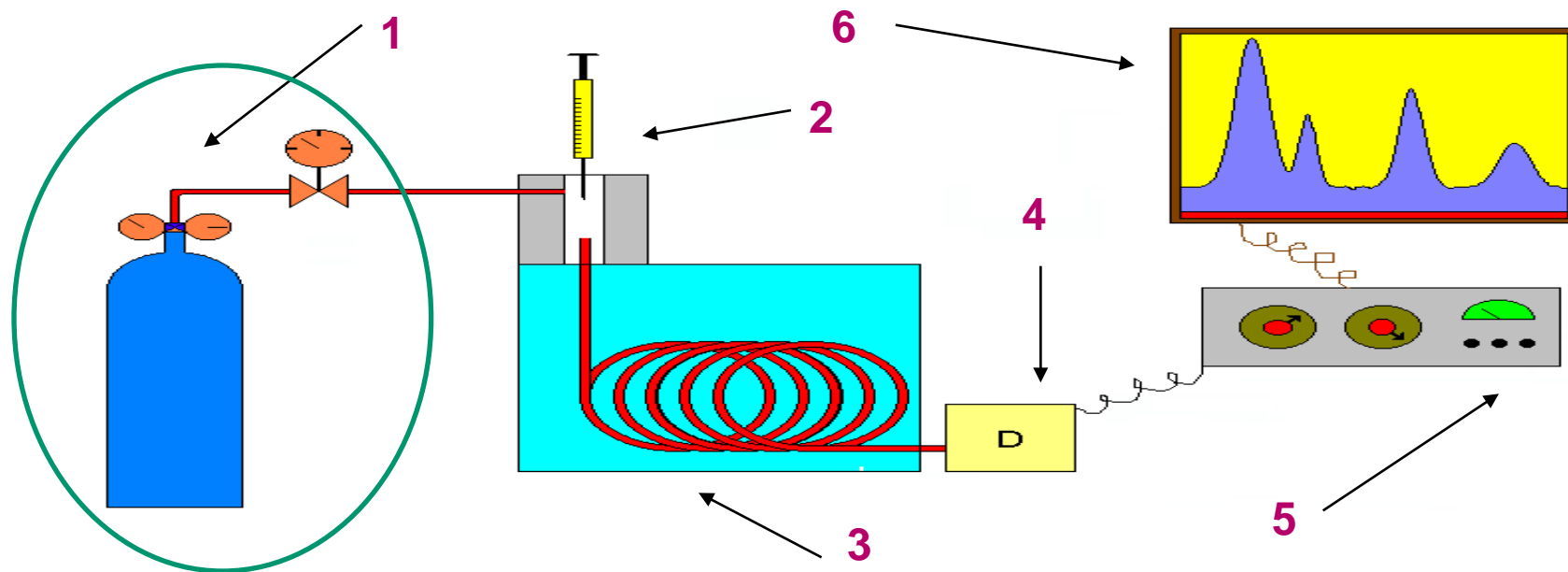


GCMS Shimadzu QP2010 Plus

O Cromatógrafo a Gás

Instrumentação

Esquema com as partes principais do CG



1 - Reservatório de Gás e Controles de Vazão / Pressão.

2 - Injetor (Vaporizador) de Amostra.

3 - Coluna Cromatográfica e Forno da Coluna.

4 - Detector.

5 - Aquisição e Tratamento de Sinal.

6 - Saída do sinal (output / cromatograma).

temperatura controlada

computador

Fase Móvel (Gás de Arraste)

Fase Móvel em CG: **NÃO** interage com a amostra - apenas a carrega através da coluna (**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.

Impurezas típicas em gases e seus efeitos:

H₂O, O₂



oxida / hidroliza algumas FE
incompatíveis com DCE

hidrocarbonetos

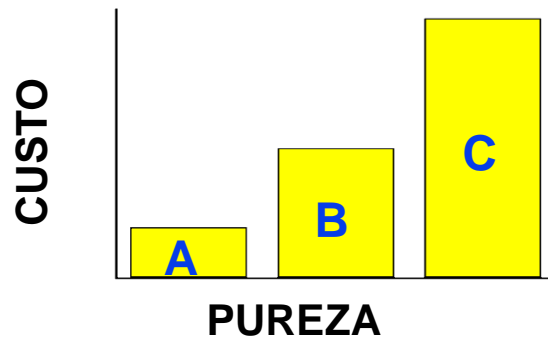


ruído no sinal de DIC

Fase Móvel (Gás de Arraste)

Requisitos:

CUSTO Gases de altíssima pureza podem ser muito caros.



A = 99,995 % (4.5)

B = 99,999 % (5.0)

C = 99,9999 % (6.0)

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

Seleção de Gases de Arraste em Função do Detector:

DCT → He , H₂

DIC → N₂ , H₂

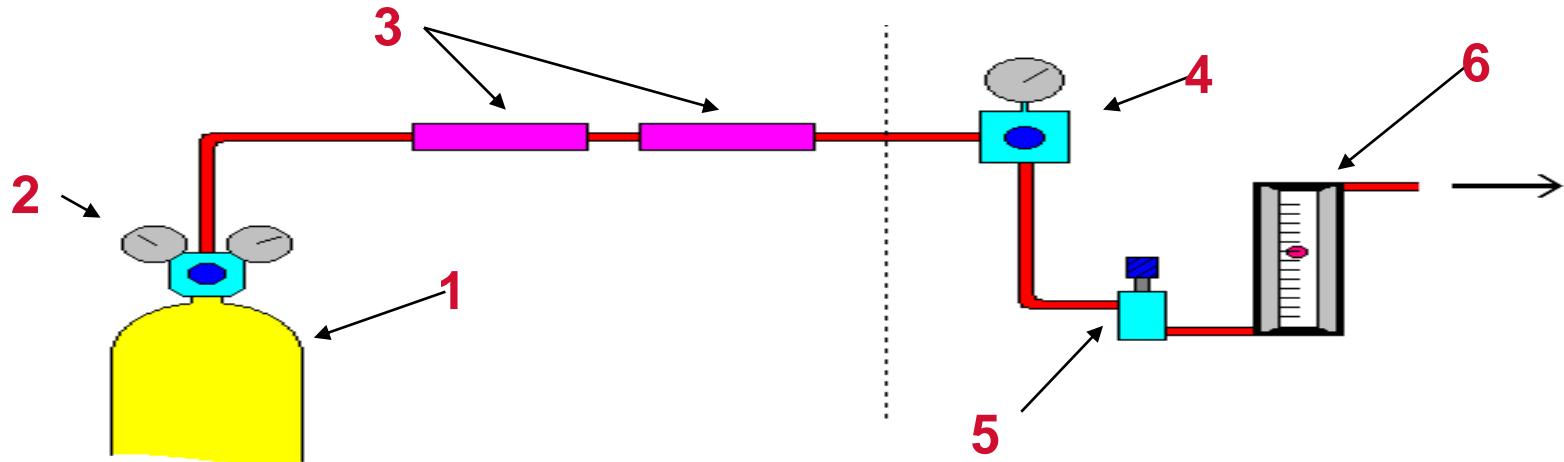
DCE → N₂ (SS), Ar + 5% CH₄

Fase Móvel (Gás de Arraste)

Componentes necessários à linha de gás:

✦ controladores de vazão / pressão de gás

✦ dispositivos para purificação de gás (“traps”)



1 - Cilindro de Gás

2 - Regulador de Pressão Primário

3 - “Traps” para eliminar impurezas do gás

4 - Regulador de Pressão Secundário

5 - Regulador de Vazão (Controlador Diferencial de Fluxo)

6 - Medidor de Vazão (Rotâmetro)

*Nota: Tubos e
Conexões de Aço
Inox ou Cobre*

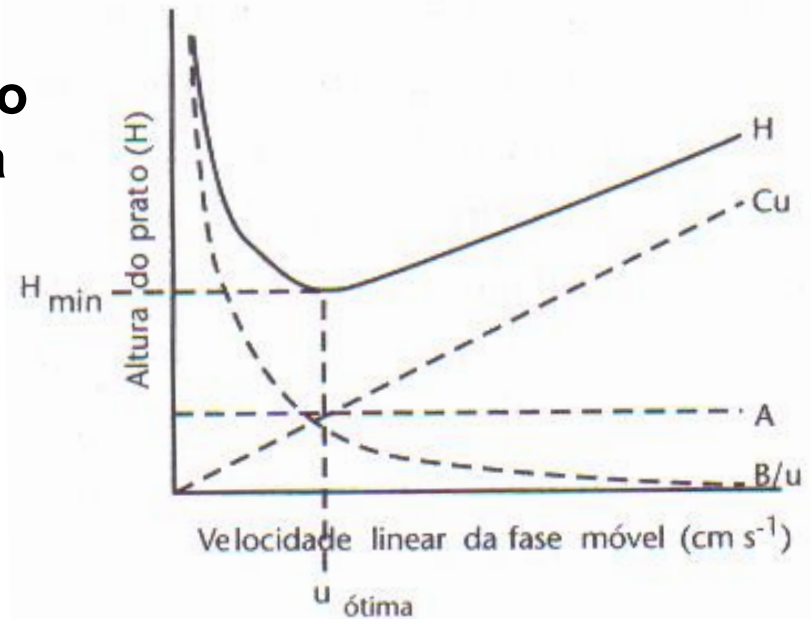
Fase Móvel (Gás de Arraste)

Otimização da Eficiência: Teoria da Velocidade

Teoria que leva em conta a dinâmica do processo de separação e foi proposta em 1956 por J. J. van Deemter

A altura equivalente a um prato teórico é função da velocidade linear média do gás de arraste \bar{u} :

O valor de H pode ser minimizado otimizando-se a vazão de gás de arraste



- Colunas Empacotadas: Equação de van Deemter

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u}$$

(A, B, C = constantes)

- Colunas Capilares: Equação de Golay

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + (C_M + C_S) \cdot \bar{u}$$

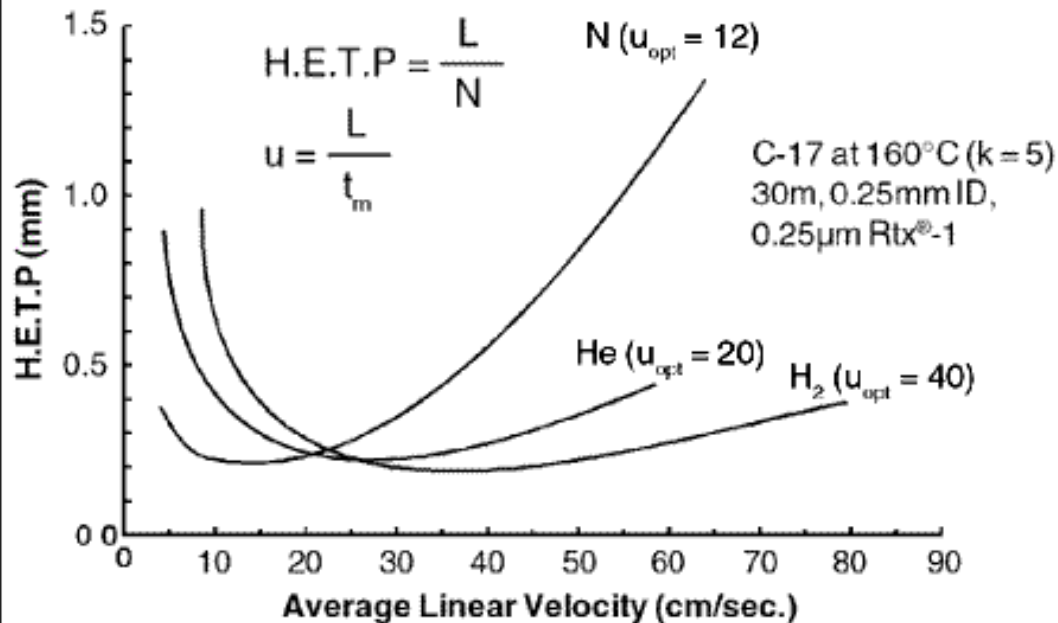
(B, C_M , C_S = constantes)

Relações
algébricas
entre H e \bar{u} :

Fase Móvel (Gás de Arraste)

Escolha do gás de arraste: Perfis de van Deemter para H₂, He e N₂

Figure 1 - van Deemter Profile of Hydrogen, Helium, and Nitrogen



H₂ é o gás mais rápido (μ ótimo = 40 cm/s) e tem H (HETP) mínimo num grande patamar.

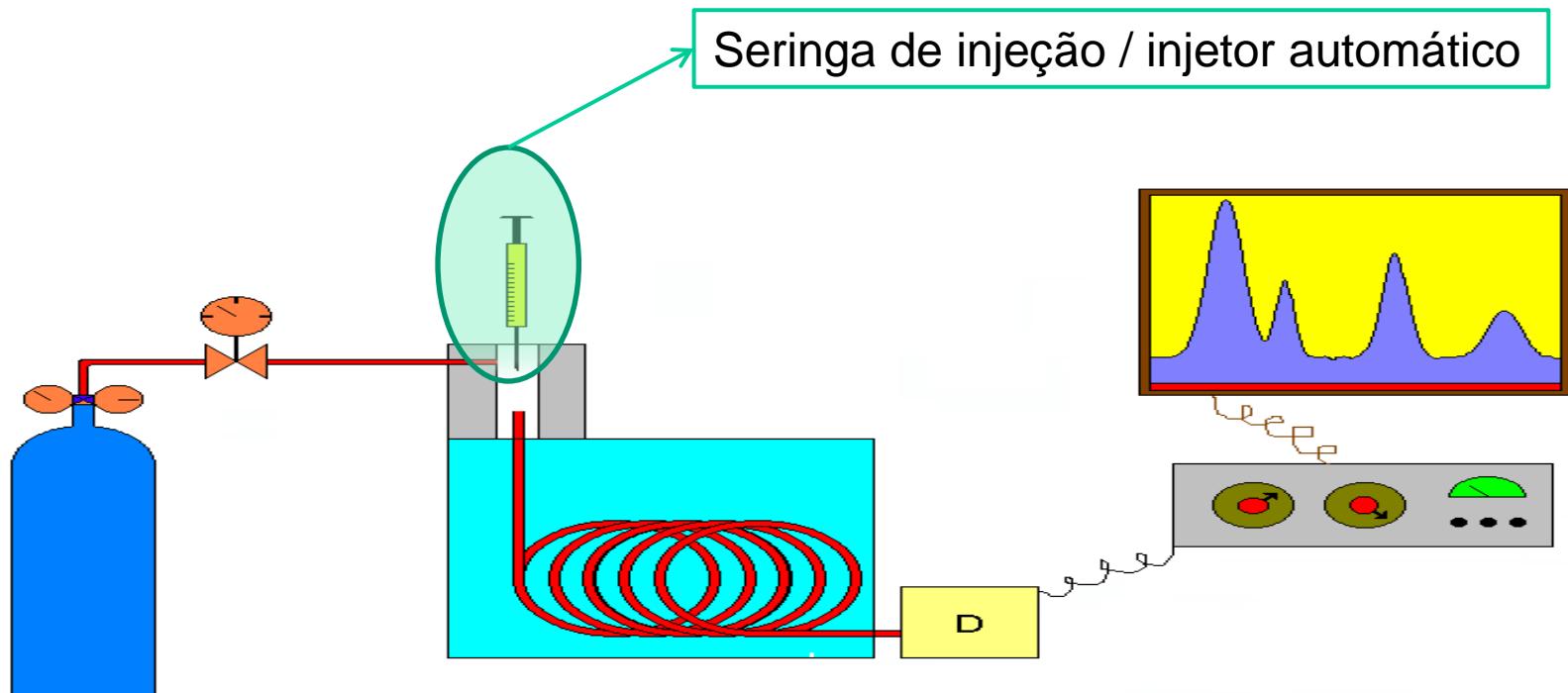
He é o segundo mais rápido (μ ótimo = 20cm/s).

N₂ tem a pior performance em coluna capilares (μ ótimo = 12cm/s).

(Ar não é recomendado como gás de arraste porque oxida a FE)

INSTRUMENTAÇÃO

Sistema de Injeção

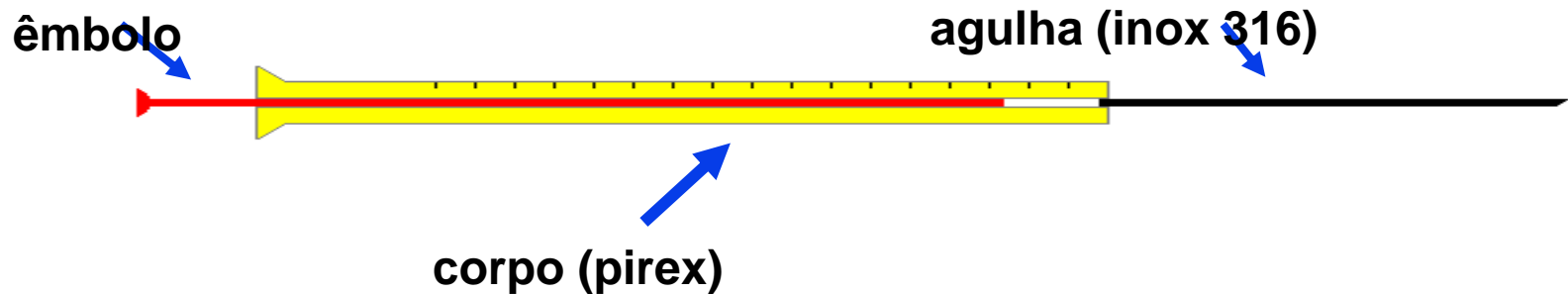


INSTRUMENTAÇÃO

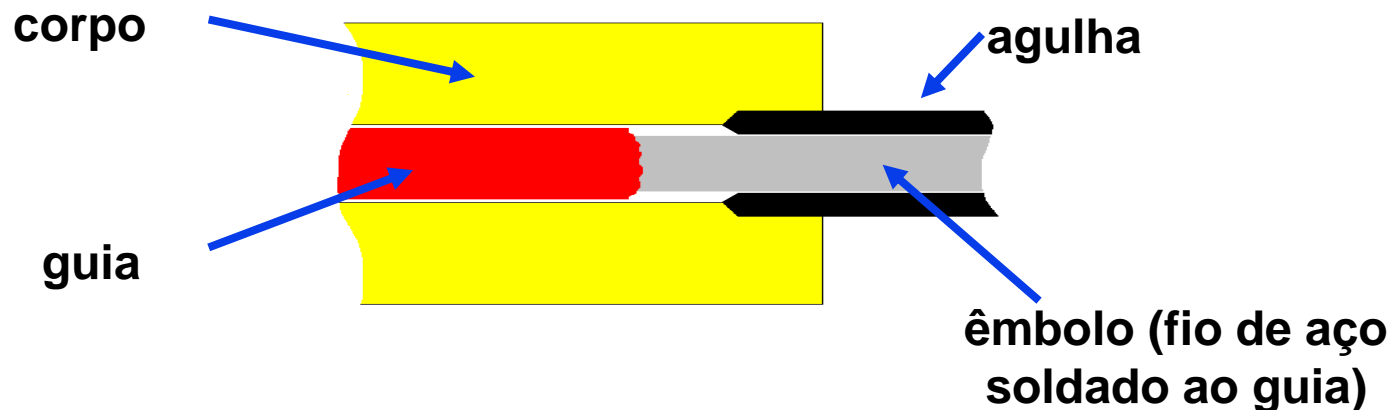
Microseringas para Injeção

LÍQUIDOS Capacidades típicas: 1 μL , 5 μL e 10 μL

Microseringa de 10 μL :



Microseringa de 1 μL (seção ampliada):



INSTRUMENTAÇÃO

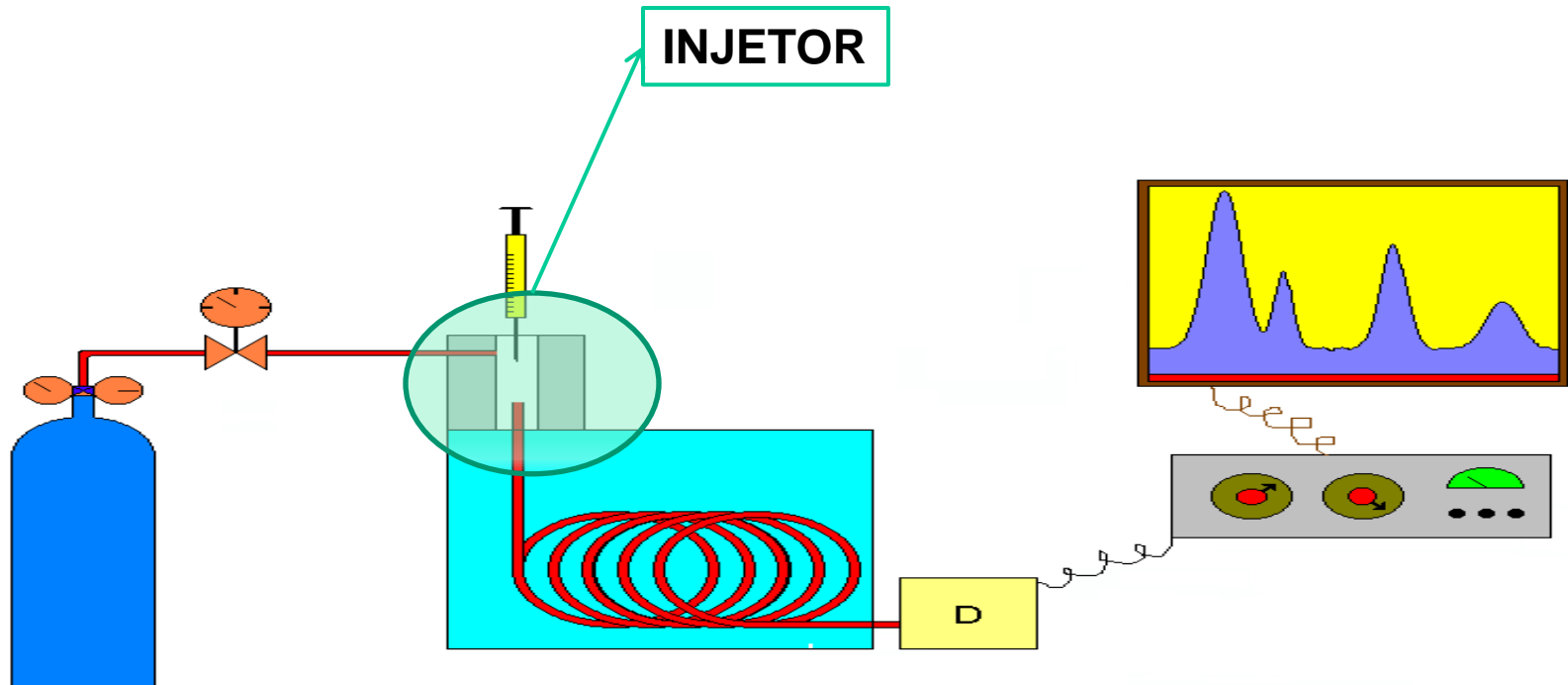
Sistema de injeção automático

Sistemas automáticos de injeção (introdução) da amostra



O Cromatógrafo a Gás

Instrumentação

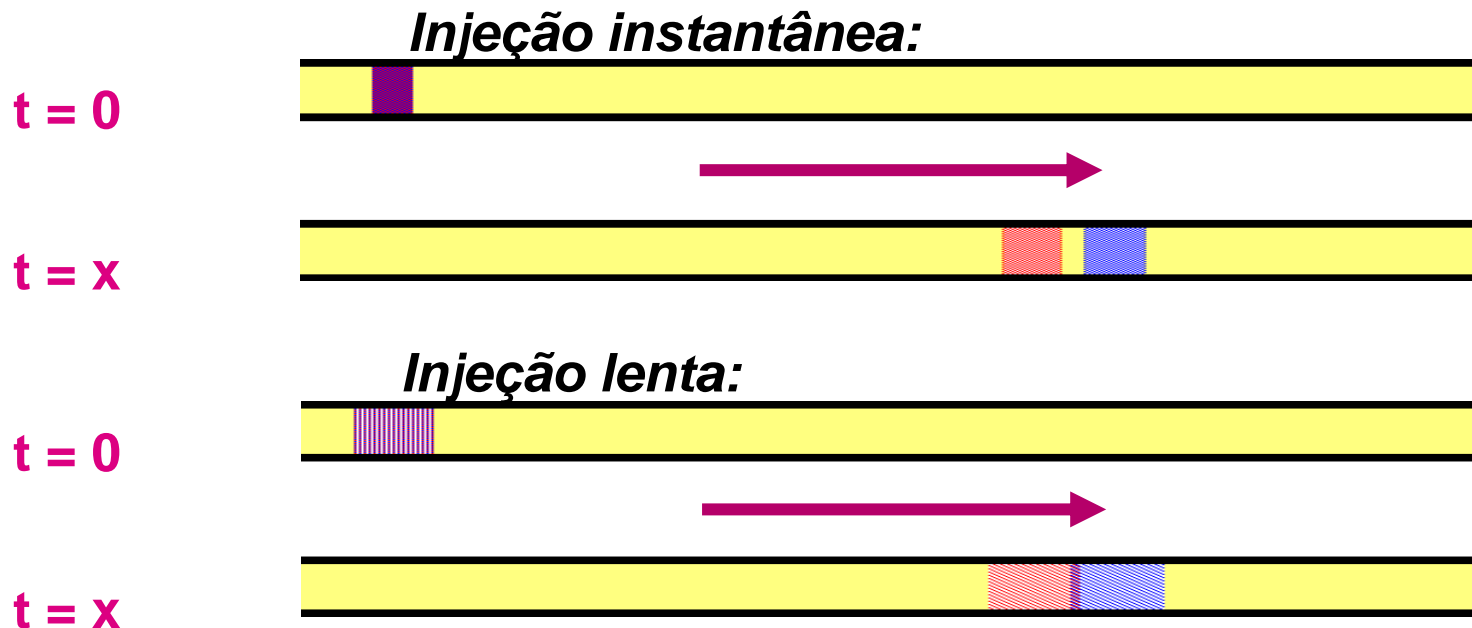


INSTRUMENTAÇÃO

Condição do Sistema de Injeção

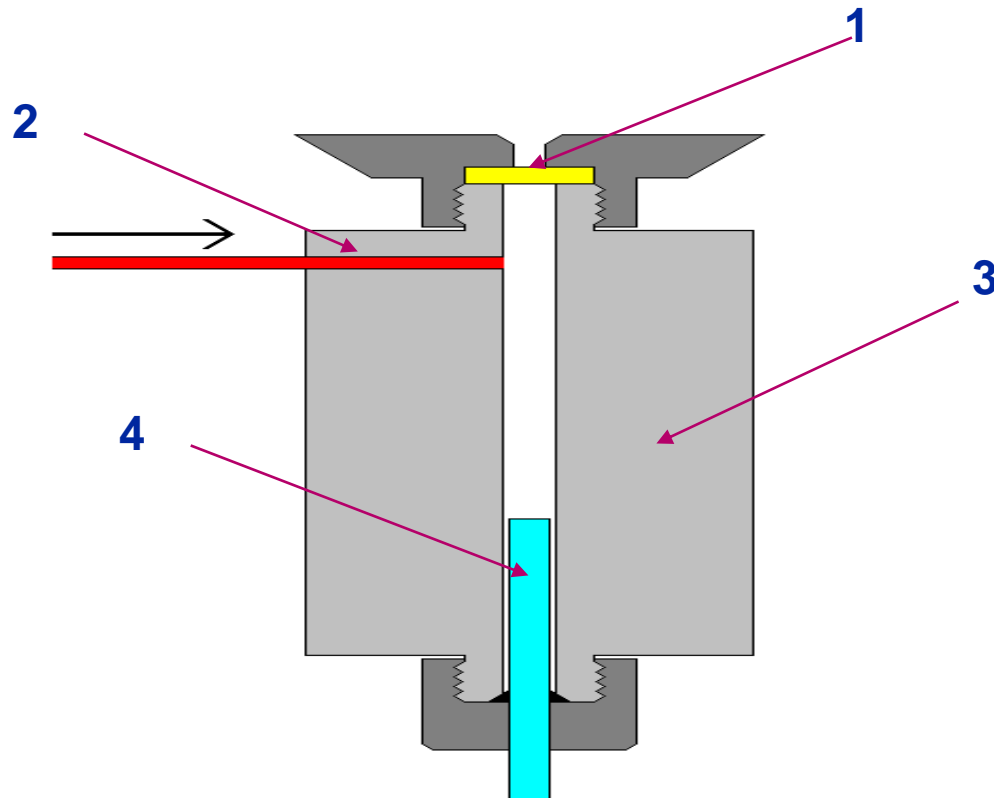
Os dispositivos para injeção (**MICROSERINGA, INJETORES** ou **VAPORIZADORES**) devem prover meios de introdução **INSTANTÂNEA** da amostra na coluna cromatográfica

DISPERSÃO DOS ANALITOS NA COLUNA DEVIDO À INJEÇÃO



INSTRUMENTAÇÃO

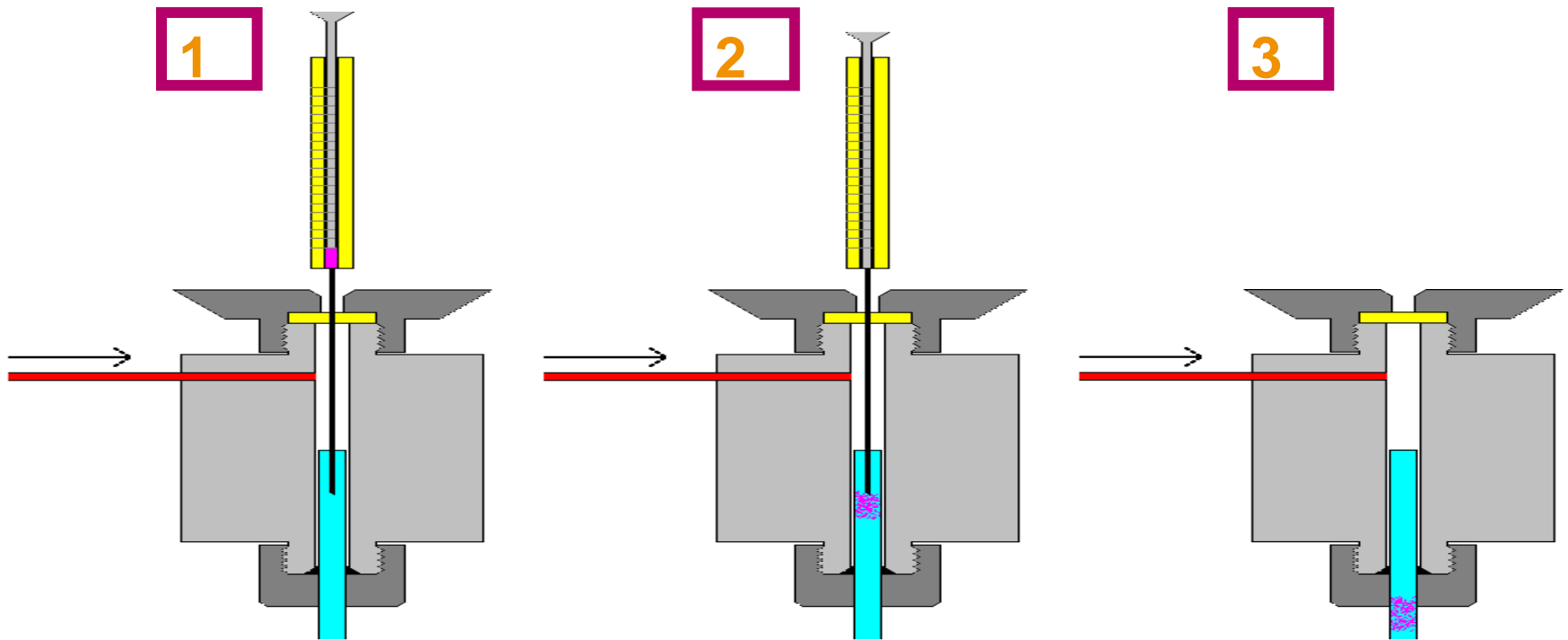
Injetor *on-column*



- 1 - Septo (silicone)
- 2 - Alimentação do gás de arraste
- 3 - Bloco metálico aquecido
- 4 - Ponta da coluna cromatográfica

INSTRUMENTAÇÃO

Injeção "on-column" de líquidos



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

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

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

INSTRUMENTAÇÃO

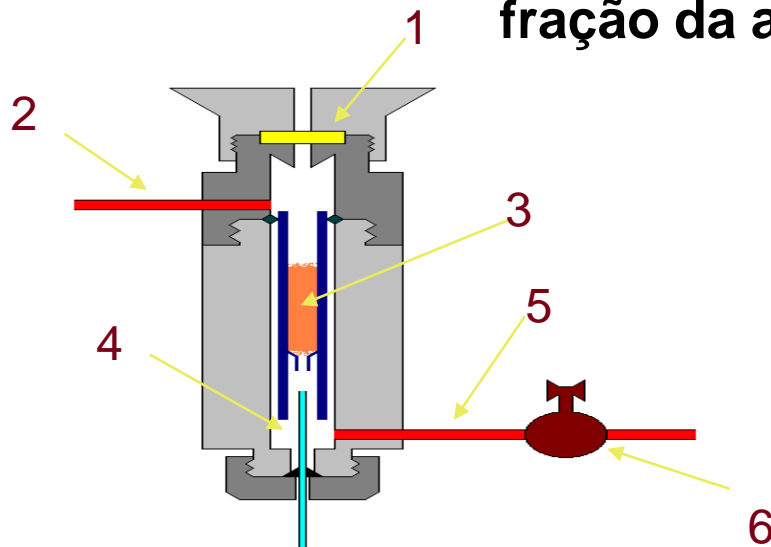
Injetor *split/splitless*

Colunas Capilares tem baixa capacidade de processamento de amostra (sub-microlitro)



Injeção direta com microseringa muito difícil !!!

Injetores com divisão (“splitters”) Sistema pneumático despreza fração da amostra injetada



- 1 - Septo;
- 2 - Entrada de gás de arraste;
- 3 - “Liner” (misturador);
- 4 - Coluna Capilar
- 5 - Purga de gás de arraste;
- 6 - Válvula de controle de purga.




- *Menor sensibilidade (boa parte da amostra é desprezada)*

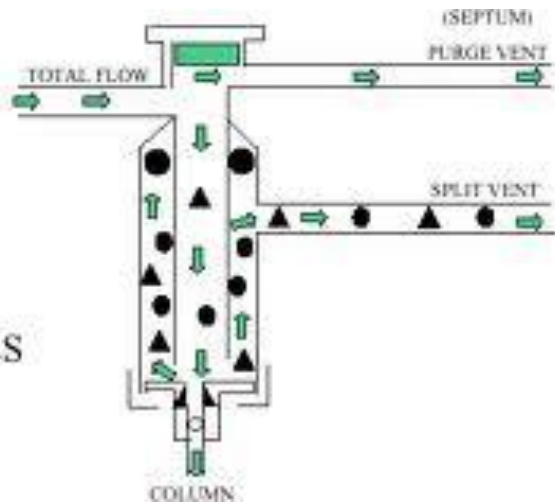
- *Divisão da amostra raramente é uniforme (fração purgada dos constituintes menos voláteis é sempre menor)*

- *Ajuste da razão de divisão é mais uma fonte de erros*

INSTRUMENTAÇÃO

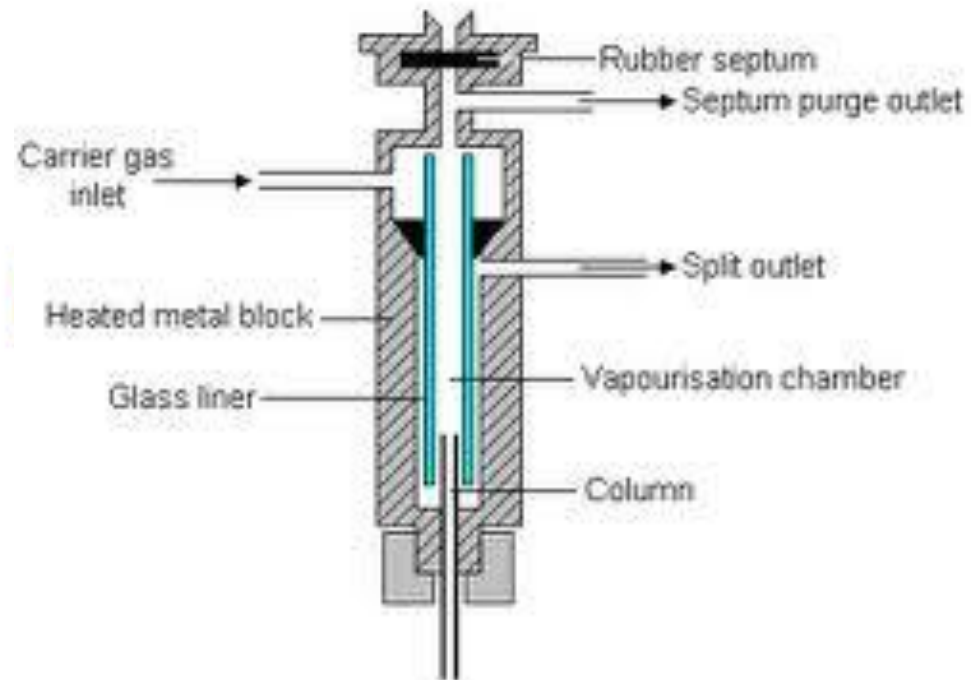
Injetor *split/splitless*

-  CARRIER GAS
-  SAMPLE MOLECULES
-  SOLVENT MOLECULES



Esquema de funcionamento de um injetor split/splitless

The split / splitless injector



Partes de um detector split/splitless

INSTRUMENTAÇÃO

Parâmetros de Injeção

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

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

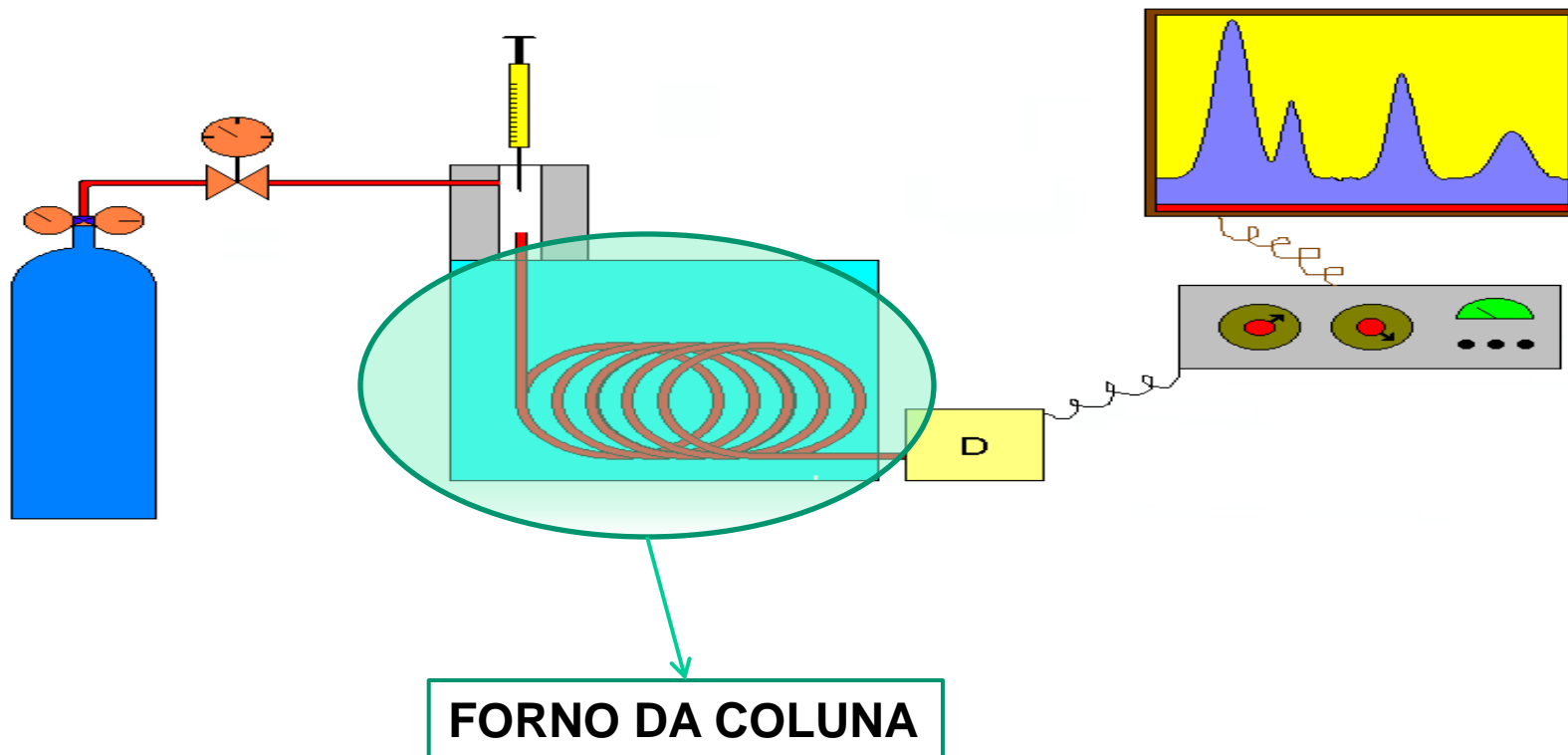
VOLUME INJETADO Depende do tipo de coluna e do estado físico da amostra

<u>COLUNA</u>	<i>Amostras Líquidas</i>	<i>Amostras Gasosas</i>
<i>empacotada</i> $\varnothing = 3,2 \text{ mm } (1/4")$	$0,2 \mu\text{L} \dots 20 \mu\text{L}$	$0,1 \text{ ml} \dots 50 \text{ mL}$
<i>capilar</i> $\varnothing = 0,25 \text{ mm}$	$0,01 \mu\text{L} \dots 3 \mu\text{L}$	$0,001 \text{ ml} \dots 0,1 \text{ mL}$

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

O Cromatógrafo a Gás

Instrumentação



INSTRUMENTAÇÃO

Forno da Coluna

Características Desejáveis de um Forno:

AMPLA FAIXA DE TEMPERATURA DE USO *Pelo menos de $T_{ambiente}$ até 400°C. Sistemas criogênicos ($T < T_{ambiente}$) 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 quanto em desenvolvimento de metodologias analíticas novas.*

TEMPERATURA ESTÁVEL E REPRODUTÍVEL *A temperatura deve ser mantida com exatidão e precisão de $\pm 0,1^\circ\text{C}$.*

INSTRUMENTAÇÃO

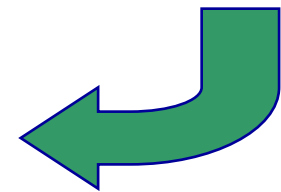
Temperatura da Coluna

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

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



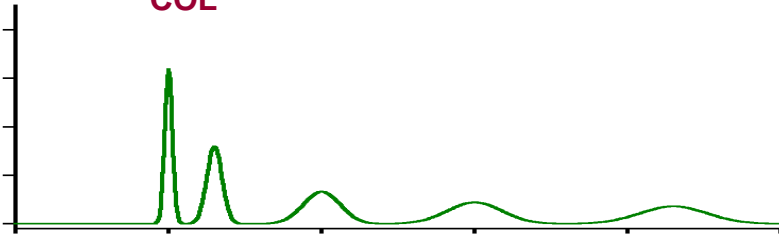
*ANALITO ELUI MAIS RAPIDAMENTE
(MENOR RETENÇÃO)*



INSTRUMENTAÇÃO

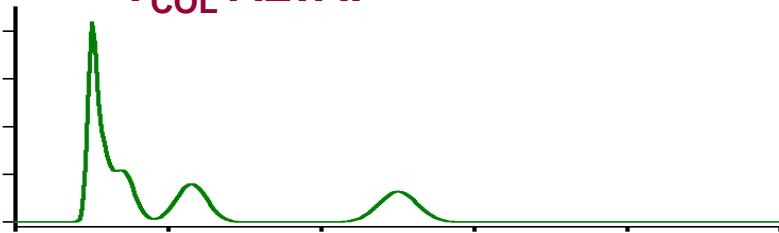
Programação Linear de Temperatura

T_{COL} BAIXA:



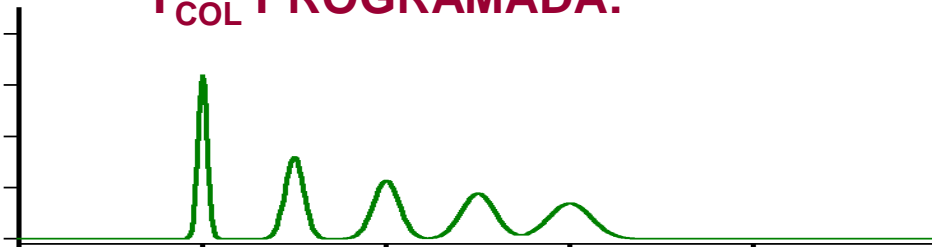
- Componentes mais voláteis são separados
- Componentes menos voláteis demoram a eluir, saindo como picos mal definidos

T_{COL} ALTA:



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

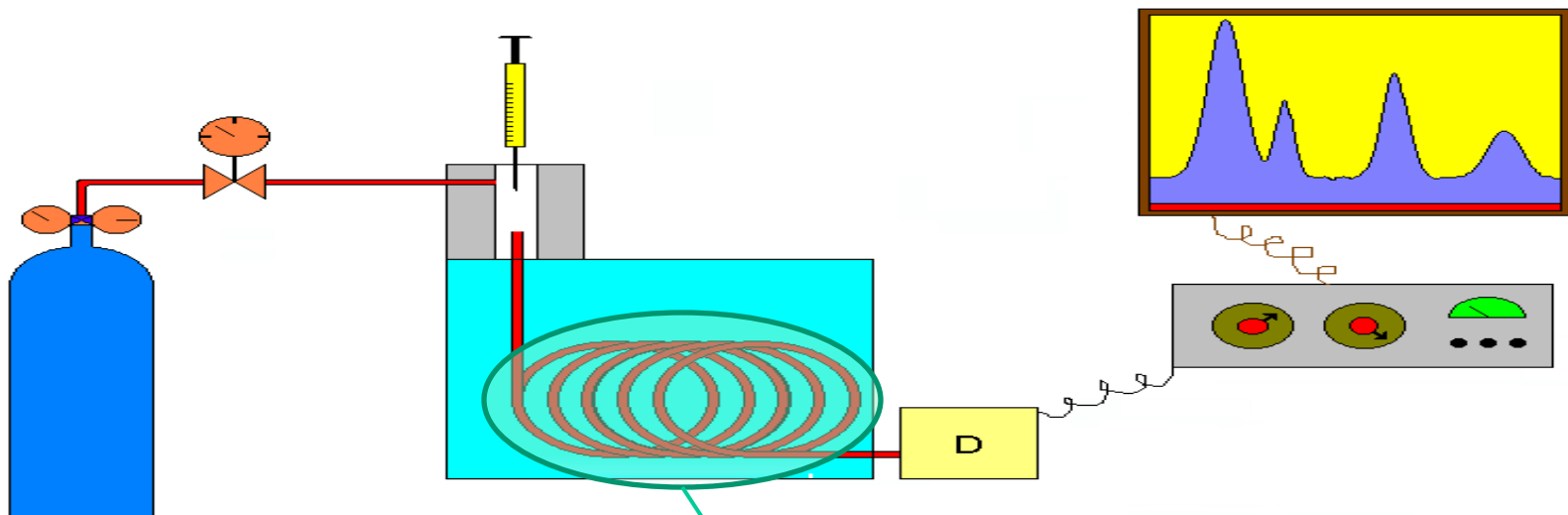
T_{COL} PROGRAMADA:



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

O Cromatógrafo a Gás

Instrumentação



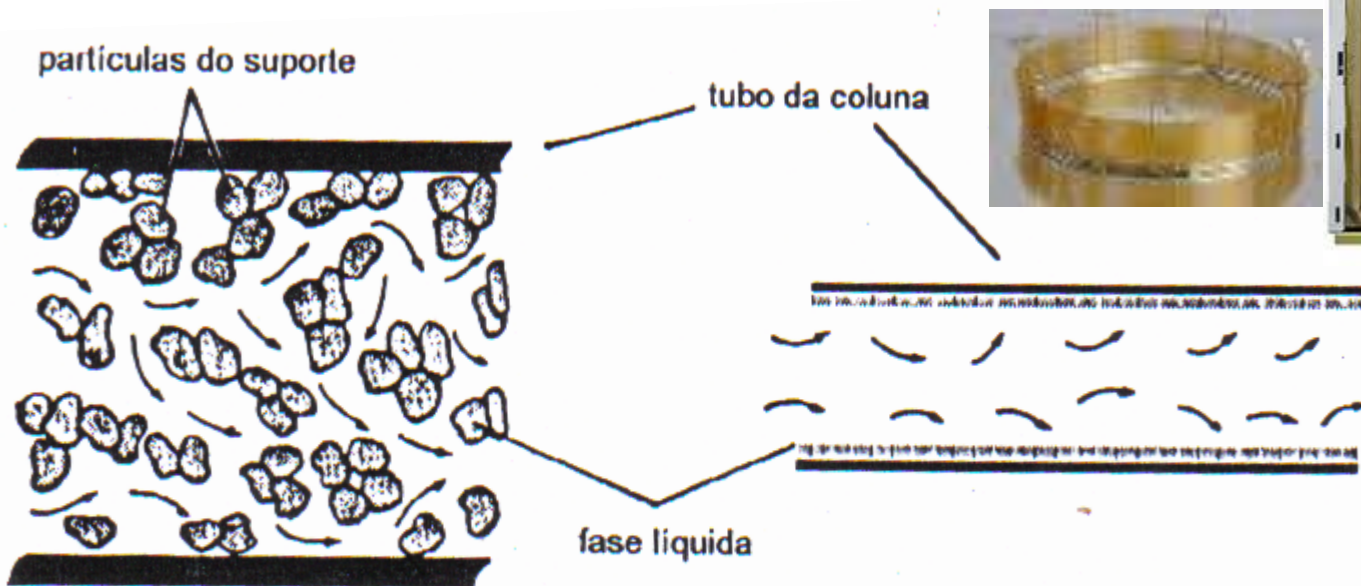
A COLUNA CROMATOGRÁFICA

CROMATOGRAFIA GASOSA

Instrumentação: Colunas

A coluna suporta a FE. Em CG a coluna pode ser recheada ($\varnothing = 3$ a 6 mm e $L = 0,5$ m a 5 m) ou capilar ($\varnothing = 0,1$ a 0,5 mm e $L = 5$ m a 100 m).

Colunas Capilares x Recheadas:



Esquema comparativo entre uma coluna convencional (esquerda) e uma capilar (direita)

CROMATOGRAFIA GASOSA

Instrumentação: Colunas

RECHEADAS

FE sólida granulada ou FE líquida depositada sobre suporte sólido.

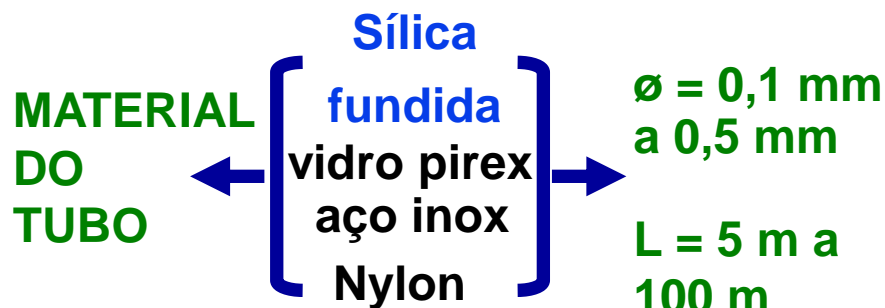


Eficiência maximizada com:

- Diminuição de d_c
 - Diminuição de d_p
 - Recheio regular
- Limitados pela resistência à passagem de gás de arraste

CAPILARES

FE sólida granulada ou FE líquida depositada sobre paredes internas.



* ↑ L = ↑ N Colunas mais eficientes

* $F_c = 1 \dots 10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ Controle de vazão mais difícil

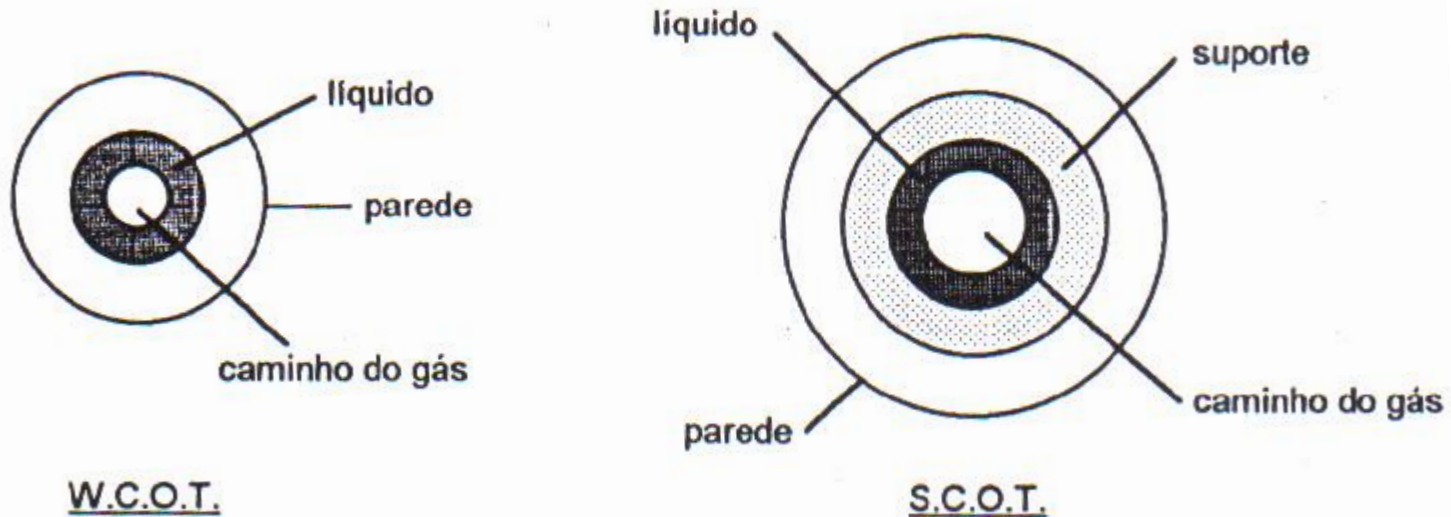
* ↓ V_i Dispositivos especiais de injeção

CROMATOGRAFIA GASOSA

Instrumentação: Colunas Capilares

(a) tubo aberto com a parede interna recoberta, **W.C.O.T.** e

(b) tubo aberto com o suporte recoberto, **S.C.O.T.**



Comparação em dois tipos de colunas: W.C.O.T. (Tubo aberto com a parede interna recoberta) e S.C.O.T (tubo aberto com o suporte recoberto)

COLUNAS CAPILARES

Diâmetro Interno

↓ d_C = ↑ Eficiência

Valores comuns:

0,10 mm



1

0,25 mm
0,32 mm



2

0,53 mm



3

1

Colunas de altíssima eficiência (amostras complexas, “Fast GC”); capacidade volumétrica limitada de processamento de amostra

2

Diâmetros mais comuns; capacidade volumétrica limitada de amostra requer dispositivos especiais de injeção

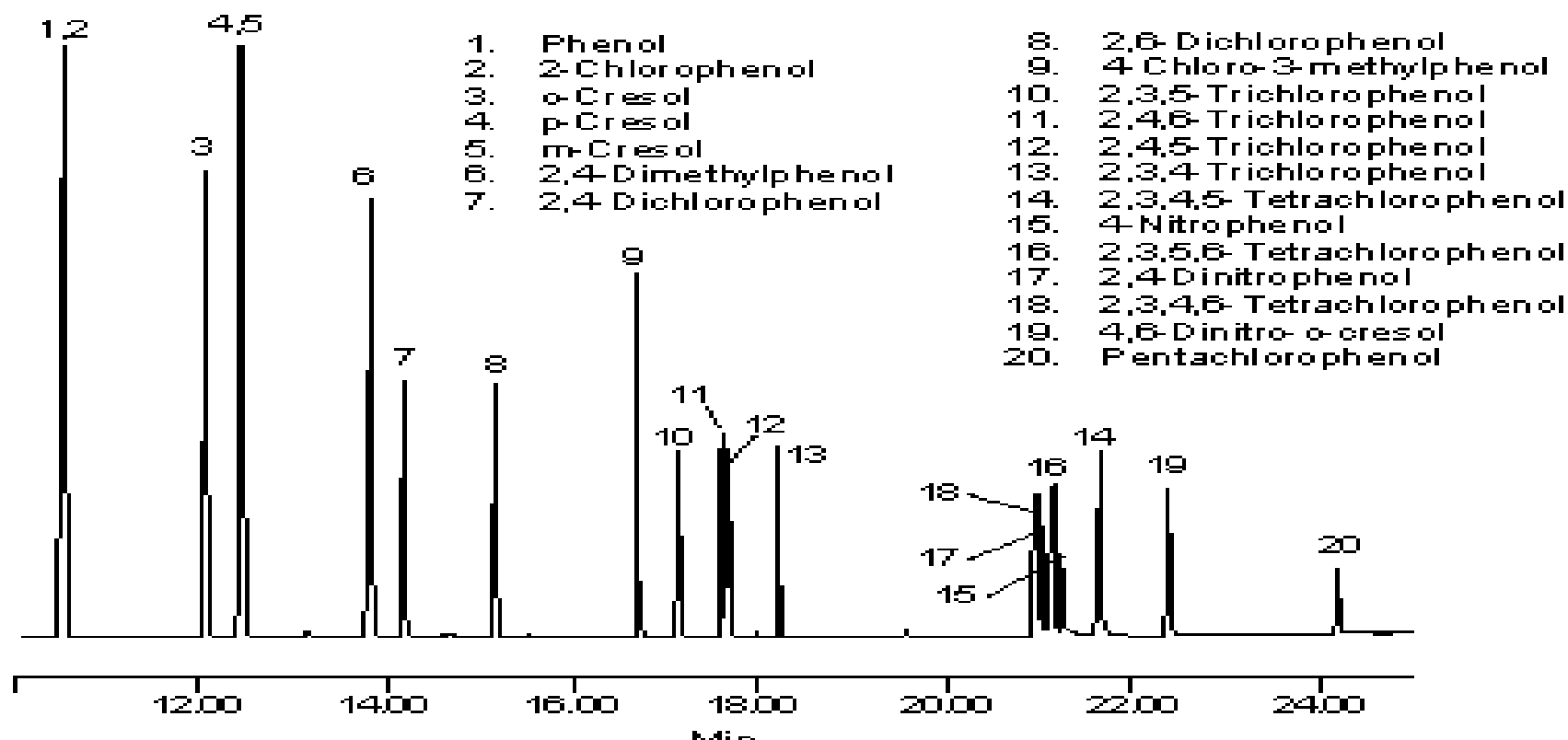
3

Colunas “megabore”: menor eficiência, mas maior capacidade de processamento permite uso de injetores convencionais

COLUNAS CAPILARES

Eficiência vs Poder de separação

As altas eficiências ($\uparrow N$) das colunas capilares permitem picos “muito finos”



Separação de vinte fenóis em solução padrão

COLUNAS CAPILARES

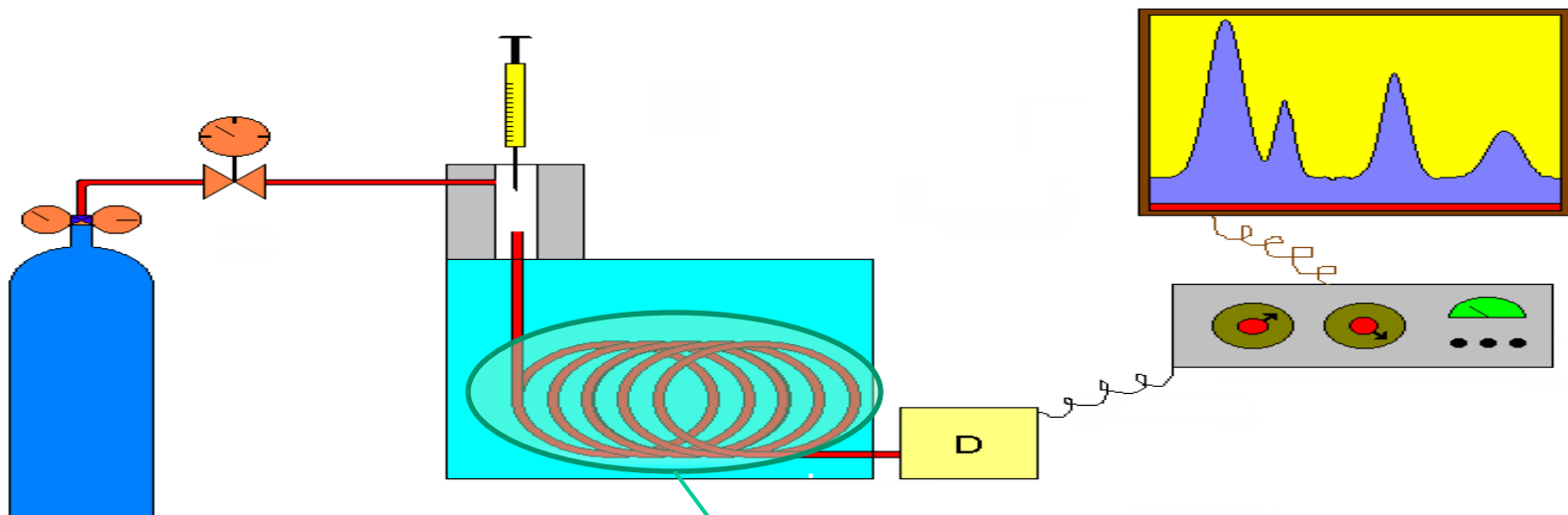
Eficiência vs Poder de separação

Picos “muito finos” permitem a separação de misturas muito complexas (cromatogramas com muitos picos)



O Cromatógrafo a Gás

Instrumentação

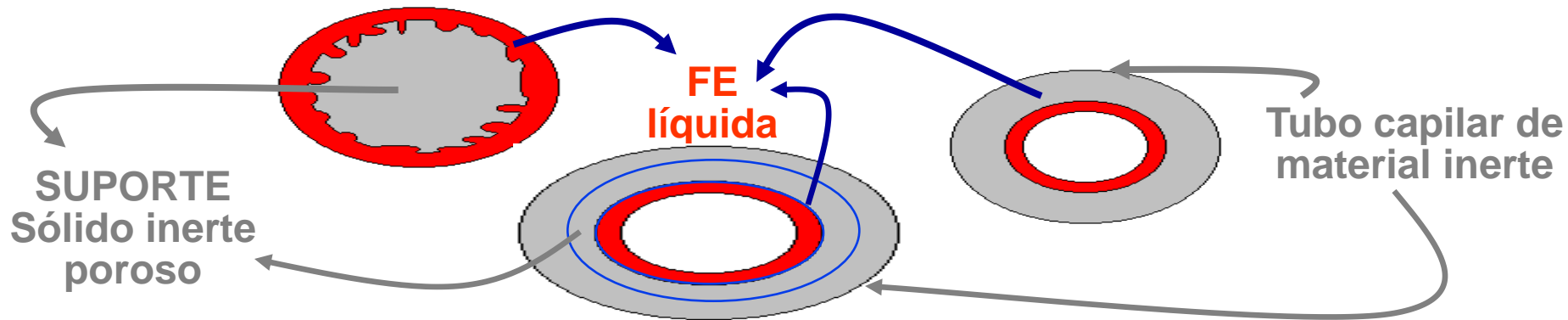


**A FASE ESTACIONÁRIA DENTRO
DA COLUNA CROMATOGRÁFICA**

FASES ESTACIONÁRIAS

Conceitos Gerais

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



Para minimizar a perda de FE líquida por volatilização, normalmente ela é:



Entrecruzada: as cadeias poliméricas são quimicamente ligadas entre si

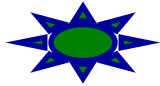


Quimicamente ligadas: as cadeias poliméricas são “presas” ao suporte por ligações químicas

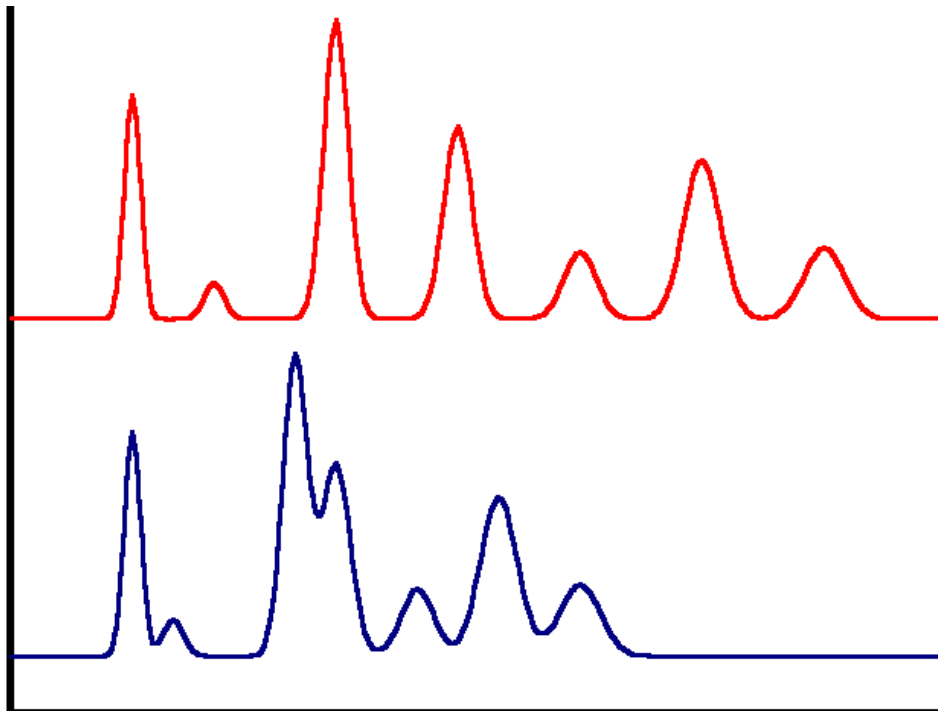
SÓLIDOS que recheiam colunas (empacotadas) ou depositados sobre a superfície interna do tubo (capilar) são finamente granulados

FASES ESTACIONÁRIAS

Características de uma FE ideal



SELETIVA Deve interagir diferencialmente com os componentes da amostra.



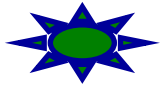
FE Seletiva: separação adequada dos constituintes da amostra

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

Regra geral: a FE deve ter características tanto quanto possível próximas das dos solutos a serem separados (polar, apolar, aromático ...)

FASES ESTACIONÁRIAS

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)

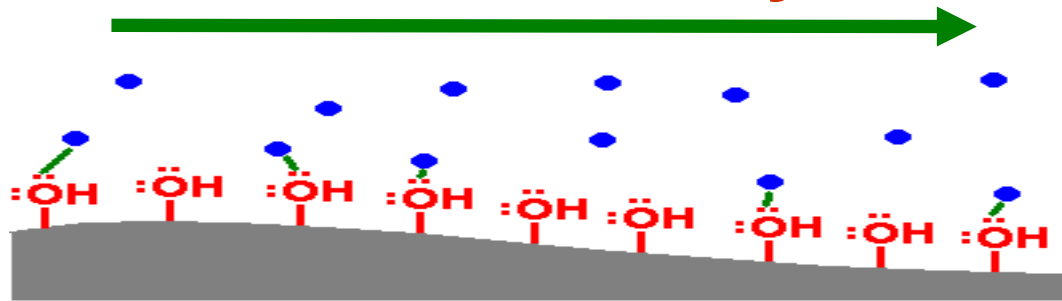


DISPONÍVEL EM ELEVADO GRAU DE PUREZA Colunas reprodutíveis; ausência de picos “fantasma” nos cromatogramas.

FASES ESTACIONÁRIAS

FE Sólidas (colunas recheadas): Adsorção

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



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

 **ADSORÇÃO**

Sólidos com grandes áreas superficiais (partículas finas, poros)

Solutos polares

Sólidos com grande número de sítios ativos (hidroxilas, pares de elétrons...)

FASES ESTACIONÁRIAS

FE Sólidas (colunas recheadas)

Características - Sólidos finamente granulados (diâmetros de partículas típicos de 105 μm a 420 μm).
Gerais:
- Grandes áreas superficiais (até $10^2 \text{ m}^2/\text{g}$).

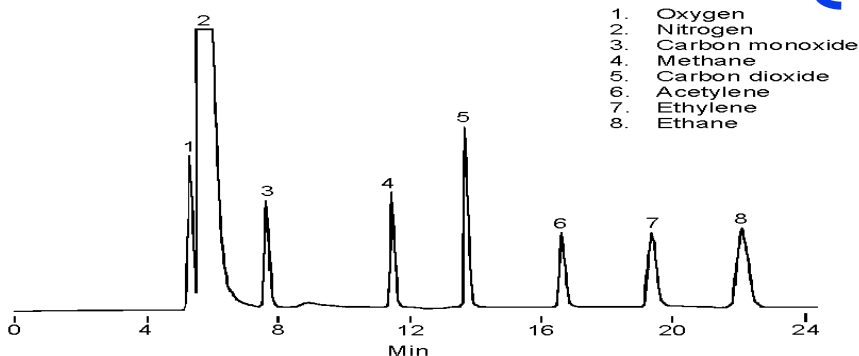
Mais usados:

Polímeros Porosos Porapak (copolímero estireno-divinilbenzeno), Tenax (polióxido de difenileno)

Sólidos Inorgânicos Carboplot, Carboxen (carvões ativos grafitizados), Alumina, Peneira Molecular (argila microporosa)

Principais Aplicações:

- Separação de gases fixos
- Compostos leves
- Séries homólogas



GASES DE REFINARIA

Coluna: Carboxen-1000 60-80 mesh; 15' x 1/8''

T_{COL} : 35°C a 225°C / 20°C. min⁻¹

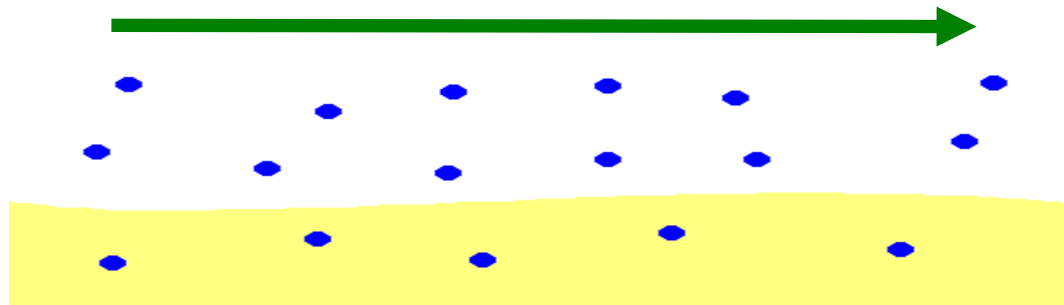
Gás de Arraste: He @ 30 mL.min⁻¹

Detector: TCD

FASES ESTACIONÁRIAS

FE Líquidas: Absorção

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



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

Filmes espessos de FE líquida

Grande superfície líquida exposta ao gás de arraste

Interação forte entre a FE líquida e o analito (grande solubilidade)

**ABSORÇÃO
(PARTIÇÃO)**



FASES ESTACIONÁRIAS

Famílias de FE Líquidas

Maior parte das aplicações em CG moderna

Quatro grandes grupos estruturais:

➔ **PARAFINAS** Apolares; alta inércia química; praticamente abandonadas. Principais: esqualano ($C_{30}H_{62}$), Apiezon (graxas para vácuo).

➔ **POLIÉSTERES** Ésteres de diálcoois com diácidos. Polares; altamente sensíveis a umidade e oxidação; uso em declínio. Principais: DEGS, EGA, EGS.

ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRAXOS

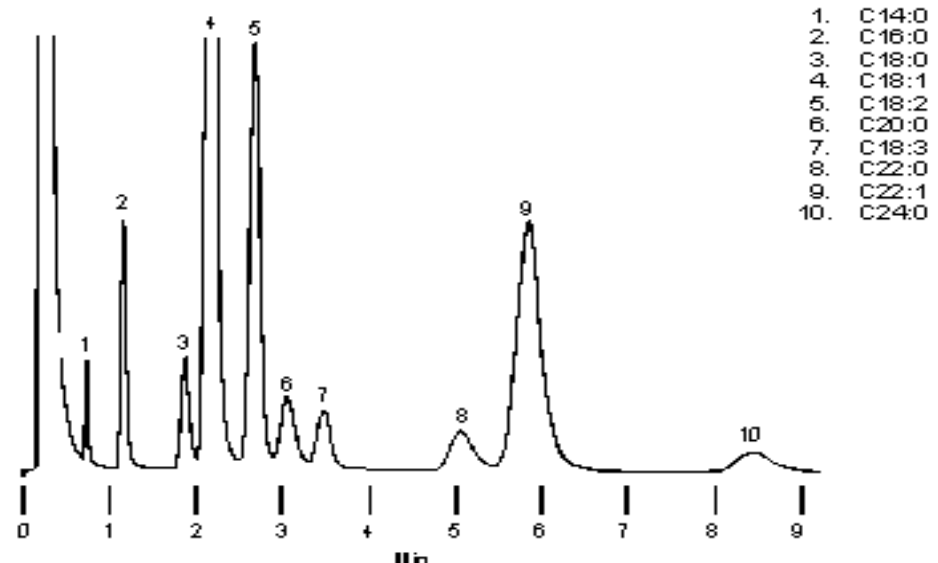
Coluna: 5%DEGS-PS s/ Supel-coport 100/120 mesh; 6' x 1/8"

T_{COL}: 200°C (isotérmico)

Gás de Arraste: N₂ @ 20 mL.min⁻¹

Detector: FID

Amostra: 0,5 µL de solução em clorofórmio contendo 0,5 µg de cada éster

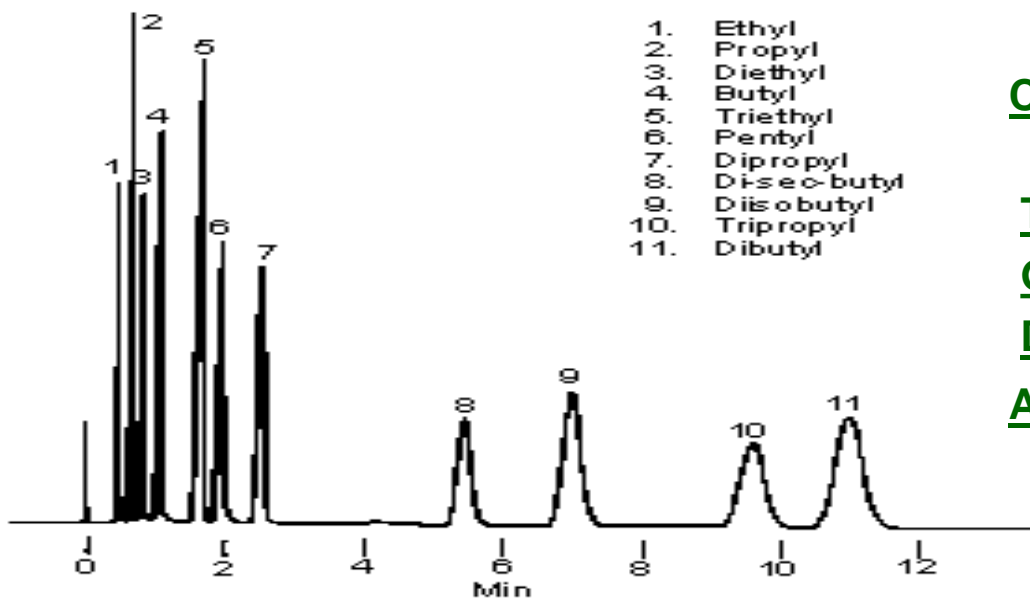
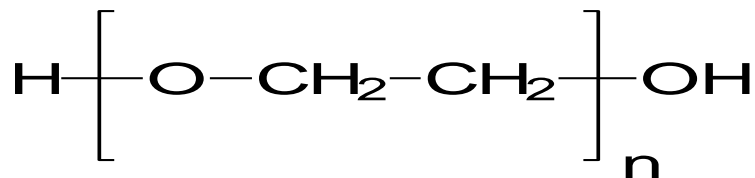


FASES ESTACIONÁRIAS

Famílias de FE Líquidas

➔ **POLIGLICÓIS** Muito polares; sensíveis a umidade e oxidação; ainda muito importantes. Principal: Polietilenoglicol (nomes comerciais: Carbowax, DB-Wax, Supelcowax, HP-Wax, etc.)

Estrutura Química:



AMINAS ALIFÁTICAS

Coluna: 4 % Carbowax 20M s/
Carbopack B + 0,8% KOH

T_{COL}: 200°C (isotérmico)

Gás de Arraste: N₂ @ 20 mL.min⁻¹

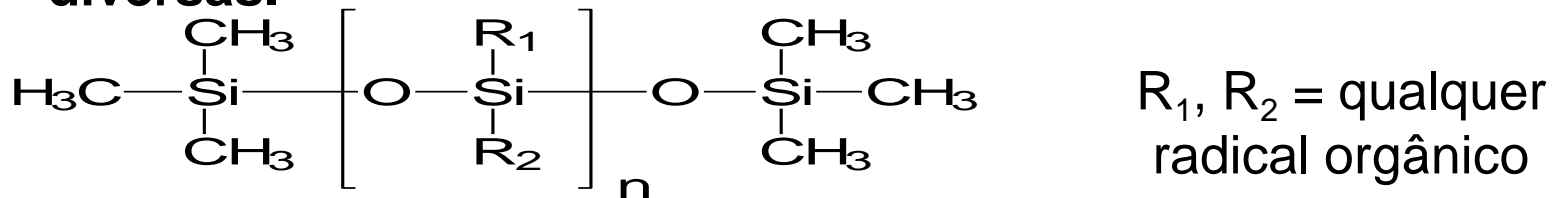
Detector: FID

Amostra: 0,01 µL da mistura de aminas

FASES ESTACIONÁRIAS

Famílias de FE Líquidas

➔ **SILICONES (polisiloxanas)** As FE mais empregadas em CG. Cobrem ampla faixa de polaridades e propriedades químicas diversas.



- **Ligação Si-O extremamente estável = elevada estabilidade térmica e química das FE.**
- **Silicones são fabricados em larga escala para diversas aplicações = minimização de custo do produto + tecnologia de produção e purificação largamente estudada e conhecida.**
- **Praticamente qualquer radical orgânico ou inorgânico pode ser ligado à cadeia polimérica = FE “ajustáveis” a separações específicas + facilidade de imobilização por entrecruzamento e ligação química a suportes**

FASES ESTACIONÁRIAS

Famílias de FE Líquidas

FE derivadas de polidimetilsiloxano (PDMS) por substituição de $-CH_3$ por radicais orgânicos, em ordem crescente aproximada de polaridade:

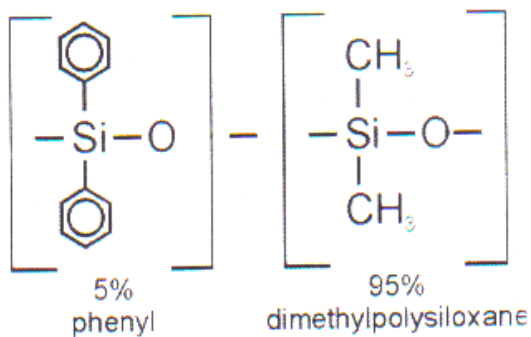
<i>Substituintes</i>		<i>Nomes Comerciais</i>	<i>Observações</i>
-	-	SE-30 OV-1 OV-101 SP-2100	mais apolares da série pouco seletivas
metil	-	Dexsil 300GC	similar a PDMS estável até $> 400^{\circ}C$
fenil 5 %	-	SE-52 SE-54 OV-3 OV-5 OV-73	pouco polar
cianopropil 7%	fenil 7%	OV-1701 SPB-7 CP-Sil 19CB	moderadamente polar
fenil 50 %	-	OV-17 SP-2250 HP-50+ SPB-50	moderadamente polar retém aromáticos
trifluoropropil 50%	-	OV-210 QF-1	moderadamente polar retém compostos carbonílicos
cianopropil 50%	fenil 50%	OV-225 SP-2300 CP-Sil 43CB	polar retem doadores de elétrons
cianopropil 100%	-	SP-2340 SP-2330 Silar-9 CP	altamente polar

Diferenças entre FE de composição similar provenientes de fornecedores diferentes: pureza, viscosidade.

FASES ESTACIONÁRIAS

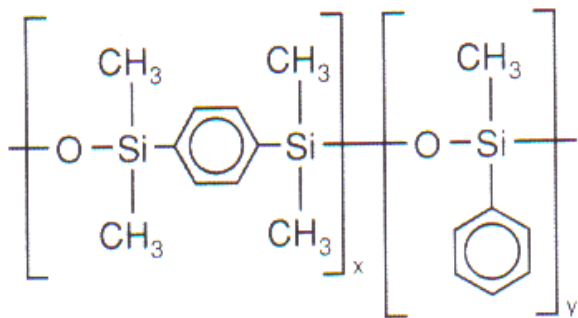
Famílias de FE Líquidas

CP-Sil 8 CB



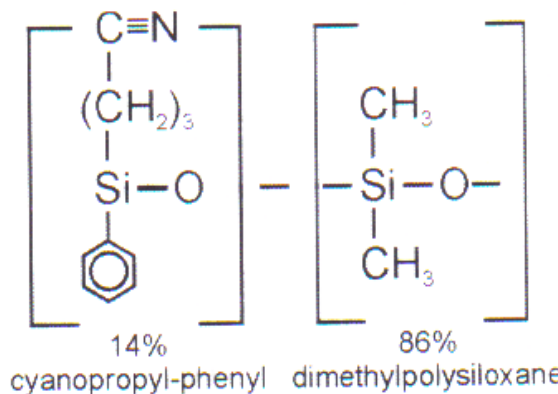
McReynolds constants: 33 68 59 98 65

CP-Sil 8 CB Low Bleed/MS



McReynolds constants: 34 72 64 98 71

CP-Sil 19 CB



McReynolds constants: 82 170 157 236 160

McReynolds constants: a b c d e

- a = benzene
- b = 1-butanol
- c = 2-pentanone
- d = nitropropane
- e = pyridine

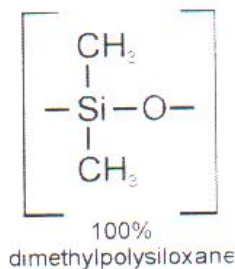
FASES ESTACIONÁRIAS

Famílias de FE Líquidas

Column Phase Composition

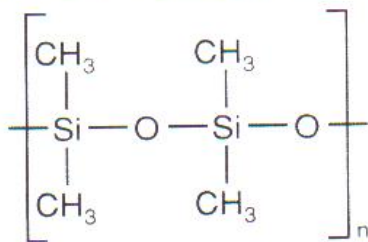
Phase Composition

CP-Sil 5 CB



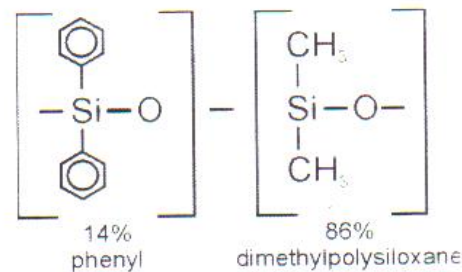
McReynolds constants*: 15 53 44 64 41

CP-Sil 5 CB Low Bleed/MS



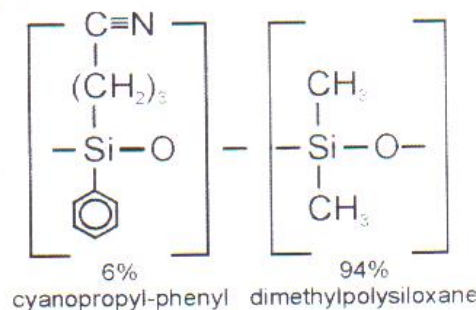
McReynolds constants: 28 46 48 69 50

CP-Sil 13 CB



McReynolds constants: 72 104 101 156 124

CP-1301

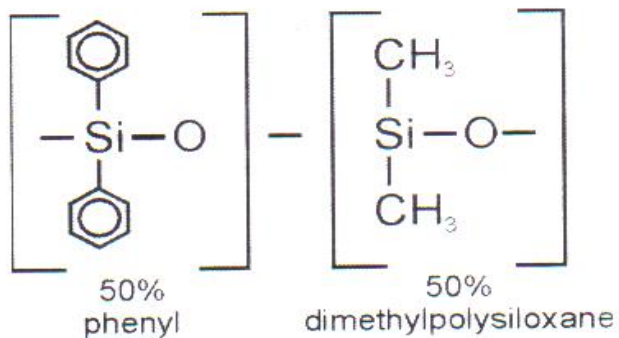


McReynolds constants: 50 115 107 164 103

FASES ESTACIONÁRIAS

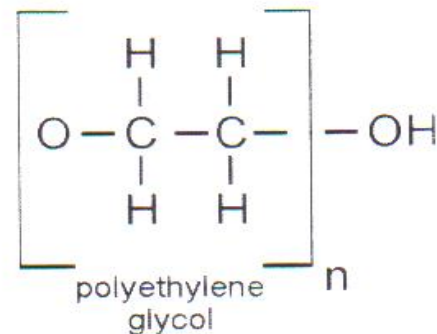
Famílias de FE Líquidas

CP-Sil 24 CB



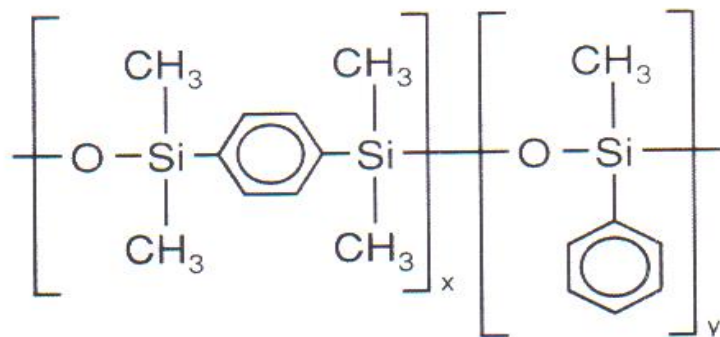
McReynolds constants: 147 171 176 268 238

CP-Wax 52 CE



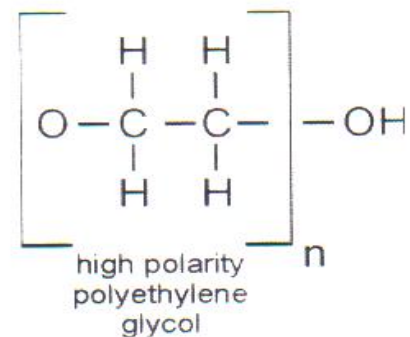
McReynolds constants: 320 510 373 559 426

CP-Sil 24 CB Low Bleed/MS



McReynolds constants: 149 166 177 273 241

CP-Wax 57 CB

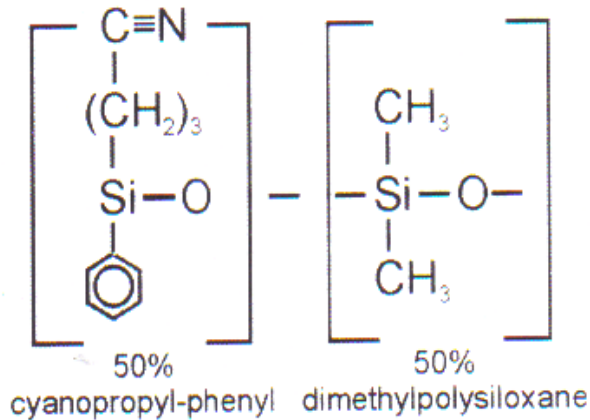


McReynolds constants: 335 560 385 592 552

FASES ESTACIONÁRIAS

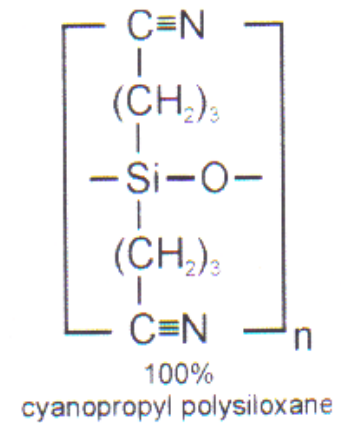
Famílias de FE Líquidas

CP-Sil 43 CB



McReynolds constants: 227 373 336 489 398

CP-Sil 88

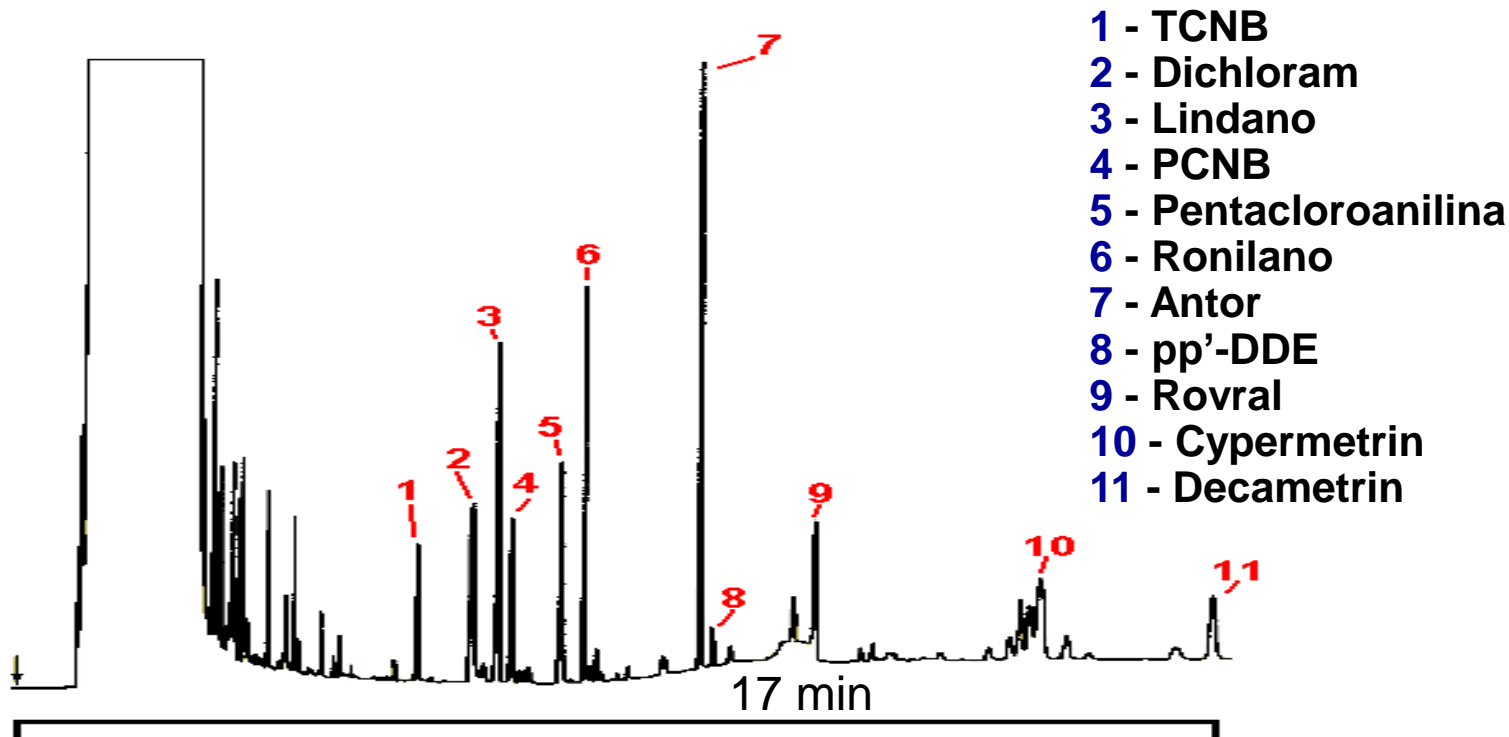


McReynolds constants: 523 757 659 942 801

FASES ESTACIONÁRIAS

Famílias de FE Líquidas: Aplicação

Separação de pesticidas - FE = 100 % PDMS



Coluna: CP-Sil 5 (25 m x 0,32 mm x 0,12 μm)

T_{COL}: 195°C (6,5 min) / 195°C a 275°C (10°C.min⁻¹)

Gás de Arraste: He @ 35 cm.min⁻¹

Amostra: 2 μL de solução dos pesticidas “on-column”

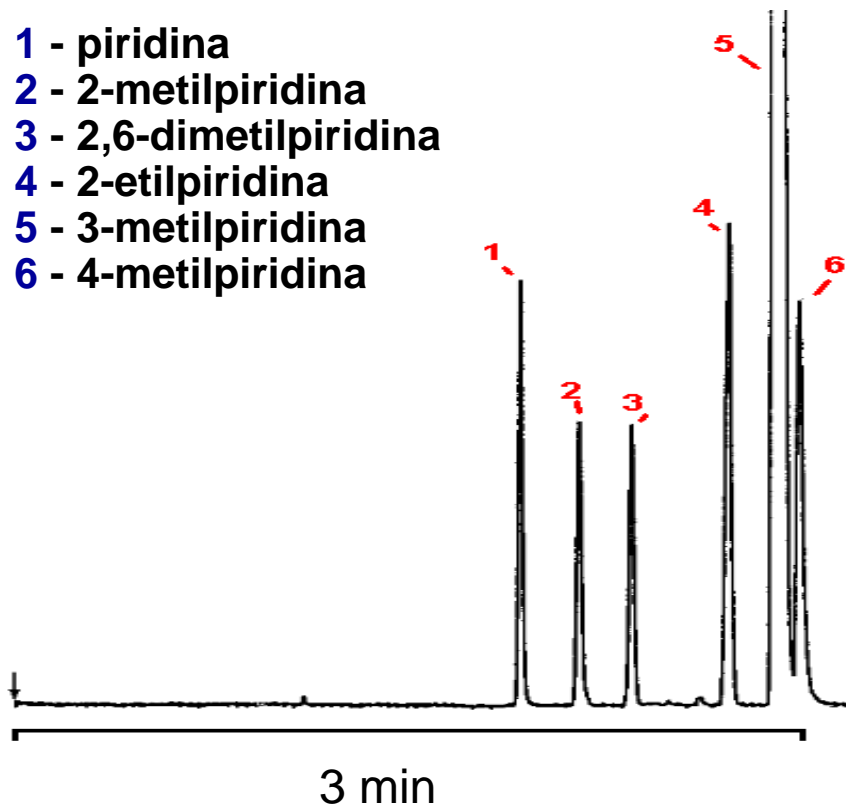
Detector: FID

FASES ESTACIONÁRIAS

Famílias de FE Líquidas : Aplicação

Separação de piridinas - FE = 100 % CNpropilsilicone

- 1 - piridina
- 2 - 2-metilpiridina
- 3 - 2,6-dimetilpiridina
- 4 - 2-etilpiridina
- 5 - 3-metilpiridina
- 6 - 4-metilpiridina



Coluna: CP-Sil 43CB (10 m x 0,10 mm x 0,2 μ m)

T_{COL}: 110°C (isotérmico)

Gás de Arraste: N₂ @ 16 cm.min⁻¹

Amostra: 0,1 μ L de solução 1-2% das piridinas em 3-metilpiridina

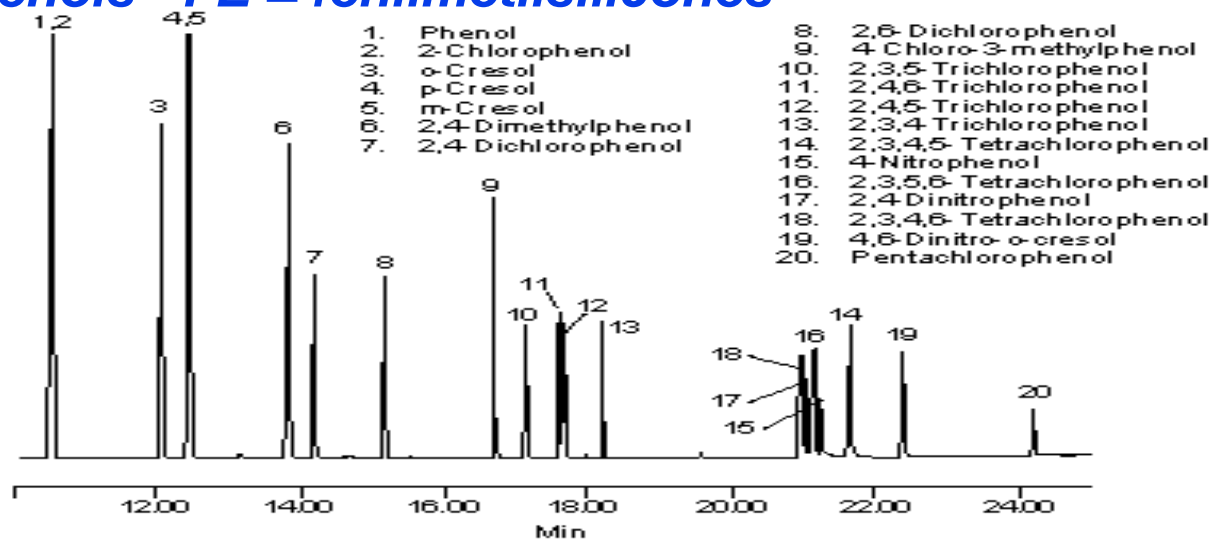
Detector: FID

FASES ESTACIONÁRIAS

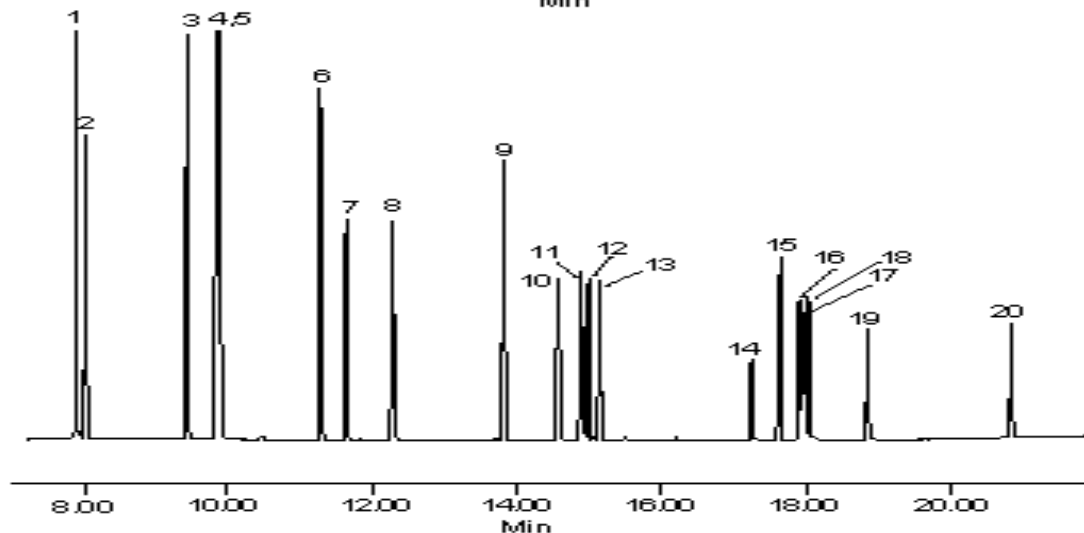
Famílias de FE Líquidas : Aplicação

Separação de fenóis - FE = fenilmetilsilicones

50% Ph
50% Me



5% Ph
95% Me



FASES ESTACIONÁRIAS

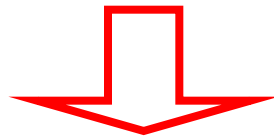
FE Quirais

Separação de isômeros óticos:

◆ **PRODUTOS BIOLÓGICOS** Distinção entre produtos de origem sintética e natural (natural \Rightarrow normalmente substâncias oticamente puras; sintético \Rightarrow muitas vezes são misturas racêmicas).

◆ **FÁRMACOS** Em muitos fármacos apenas um dos isômeros óticos têm atividade farmacológica.

Propriedades físico-químicas de isômeros óticos são MUITO SIMILARES



FE convencionais não interagem diferencialmente com isômeros óticos

Separação de misturas de isômeros óticos só é possível com FE oticamente ativas = FE Quirais

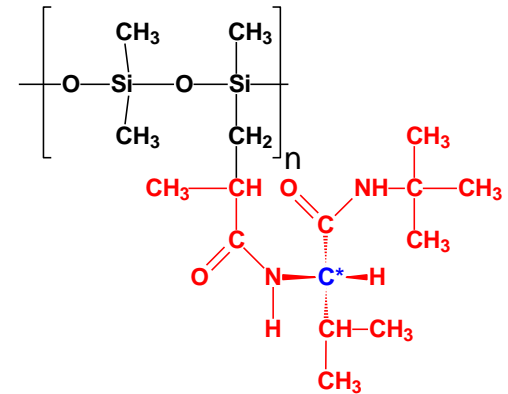
FASES ESTACIONÁRIAS

FE Quirais

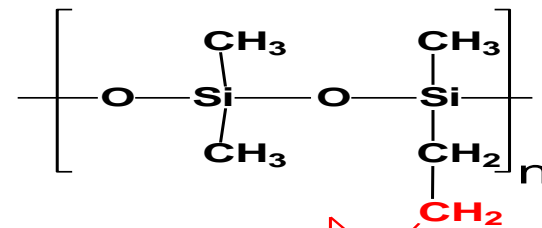
FE óticamente ativas mais importantes:

Derivados de aminoácidos:

Misturas de compostos formadores de pontes de hidrogênio.



Chiralsil-Val



Chiralsil-Metal

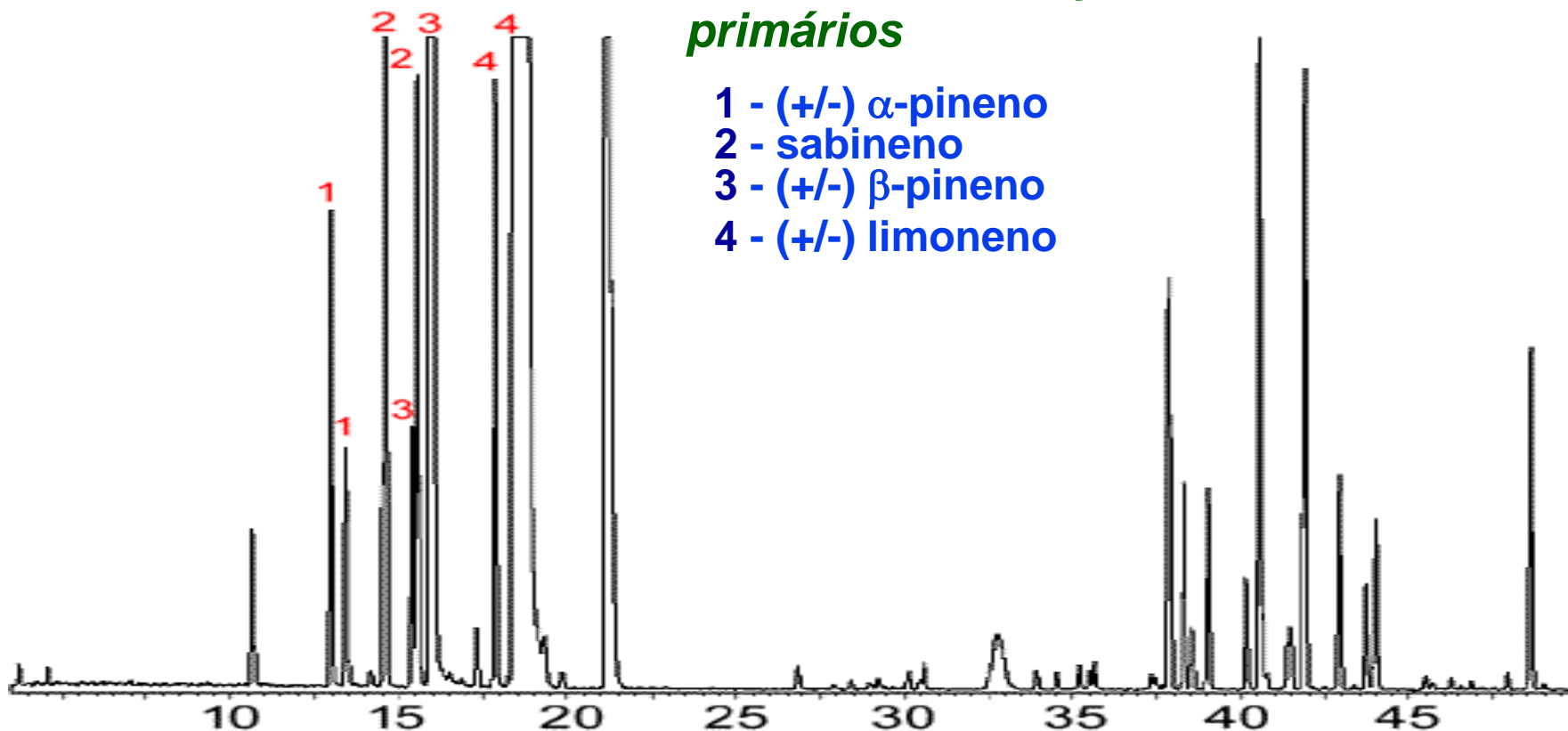
Organometálicos:

Separação de enantiômeros formadores de complexos.

FASES ESTACIONÁRIAS

FE Quirais: Aplicações

Óleo essencial artificial de limão: separação de terpenos primários



Coluna: Rt- β DEXsm (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m)

T_{COL}: 1 min a 40°C / 2°C min⁻¹ / 3 min a 200°C

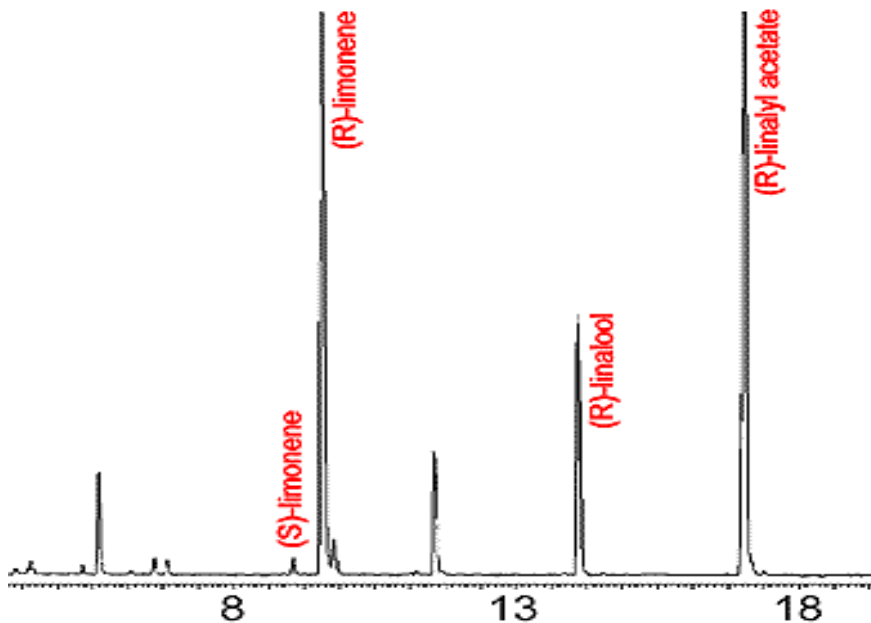
Gás de Arraste: H₂ @ 80 cm.min⁻¹

Detector: FID

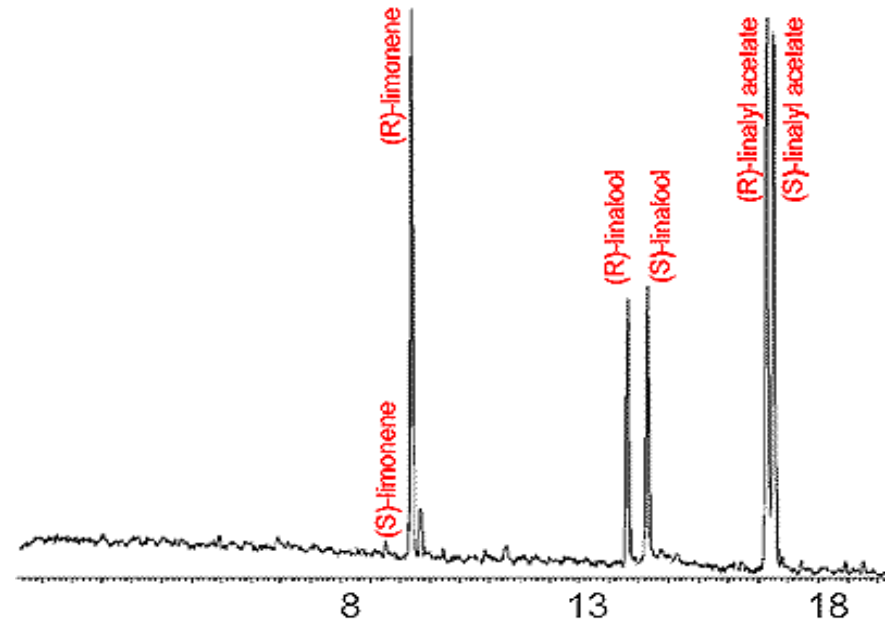
FASES ESTACIONÁRIAS

FE Quirais: Aplicações

Aroma de mexerica: distinção entre aroma natural e artificial



Óleo essencial natural



Essência artificial

Coluna: Rt- β DEXse (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m)

T_{COL}: 1 min a 40°C / 4°C min⁻¹ / 200°C

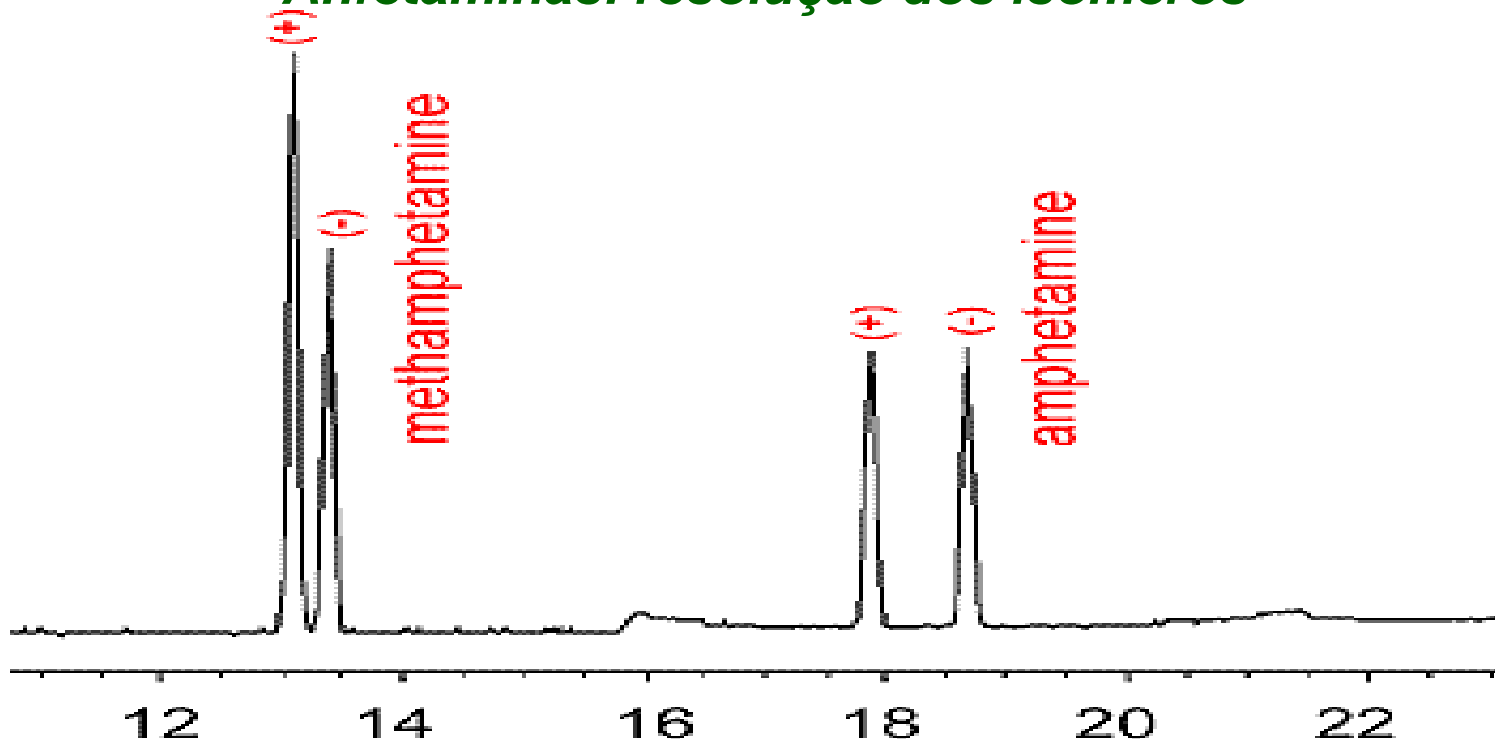
Gás de Arraste: He @ 80 cm.min⁻¹

Detector: MS

FASES ESTACIONÁRIAS

FE Quirais: Aplicações

Anfetaminas: resolução dos isômeros



Coluna: Rt- β DEXcst (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m)

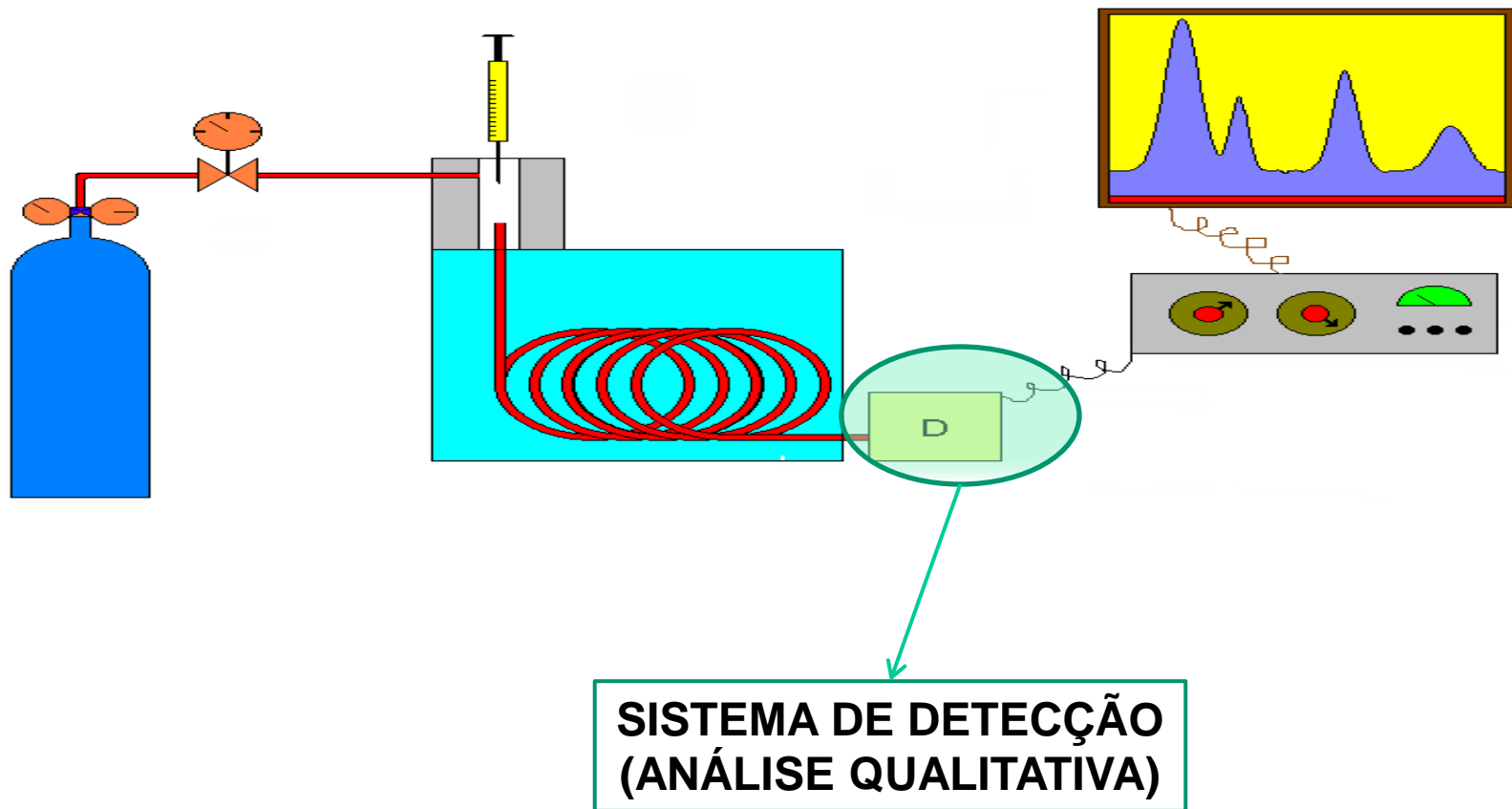
T_{COL}: 1 min a 120°C / 1,5°C min⁻¹ / 3 min A 175°C

Gás de Arraste: He @ 25 cm.min⁻¹

Detector: MS

O Cromatógrafo a Gás

Instrumentação

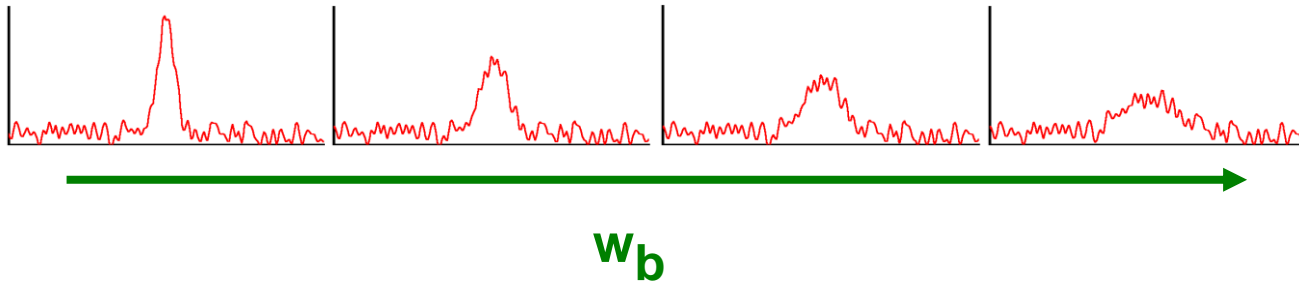


DETECÇÃO

Parâmetros Básicos de Desempenho

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

Mesmo detector, nível de ruído e massa de analito MAS diferentes larguras de base:



$$QMD = f \left(\begin{array}{l} \text{Detector (sinal gerado, ruído)} \\ \text{Largura do pico cromatográfico} \end{array} \right)$$

LD é independente da eficiência do sistema cromatográfico !

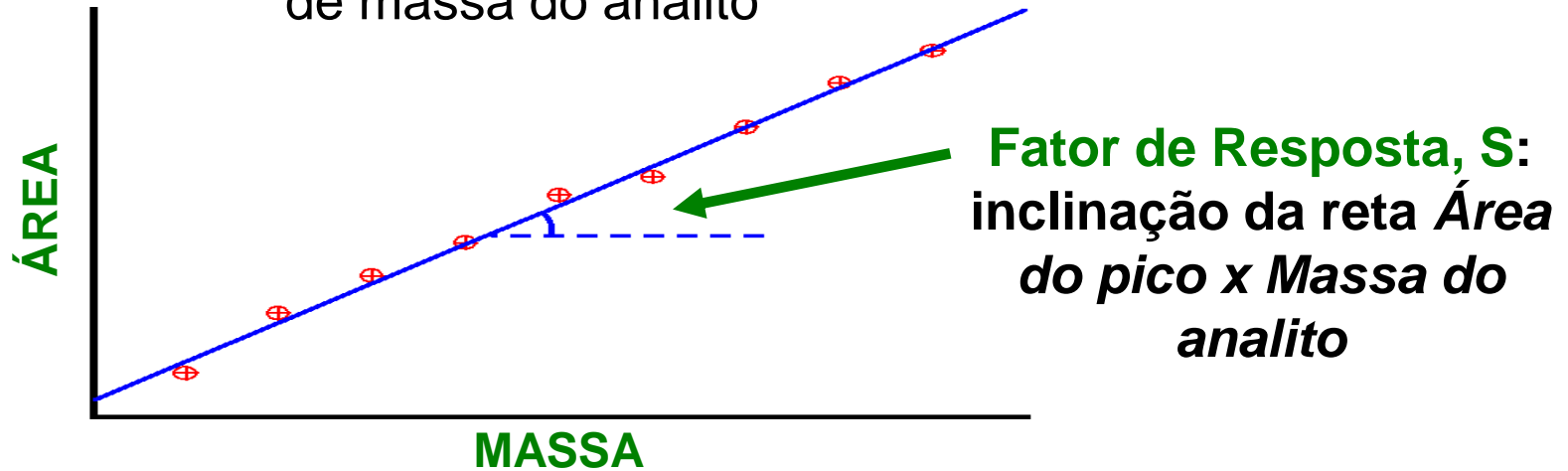
[QMD] =
massa
(ng, pg ...)

[LD] =
massa / tempo
(ng.s⁻¹, pg.s⁻¹ ...)

DETECÇÃO

Parâmetros Básicos de Desempenho

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



↑ **S** → ↑ *Sensibilidade* → *o mesmo incremento de massa causa um maior incremento de área*

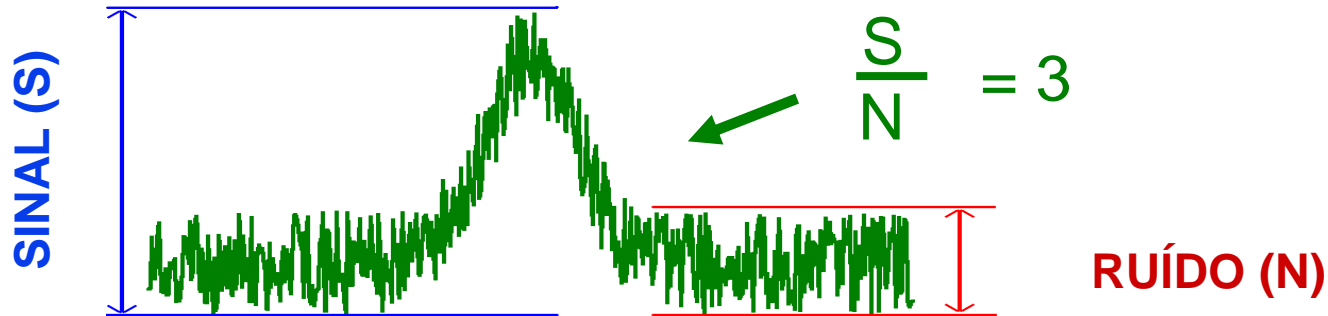
Na ausência de erros determinados:

$$S \approx \frac{A}{m} \left\{ \begin{array}{l} A = \text{área do pico cromatográfico} \\ m = \text{massa do analito} \end{array} \right.$$

DETECÇÃO

Parâmetros Básicos de 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

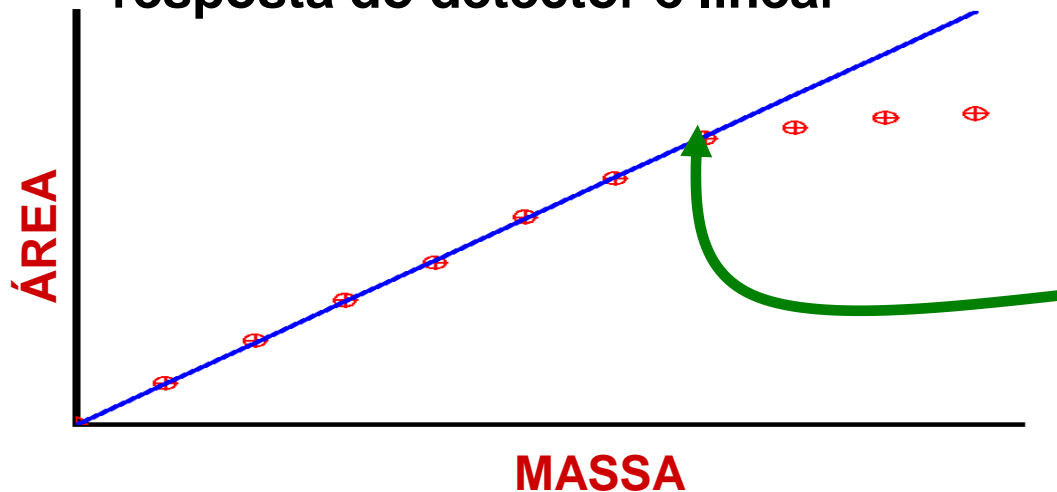
Impurezas acumuladas no detector

Aterramento elétrico deficiente

DETECÇÃO

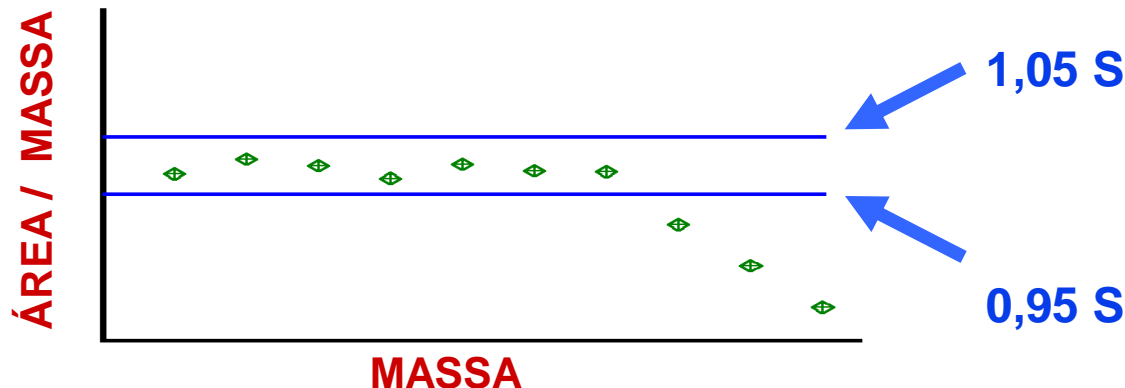
Parâmetros Básicos de Desempenho

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



A partir de certo ponto o sinal não aumenta mais linearmente

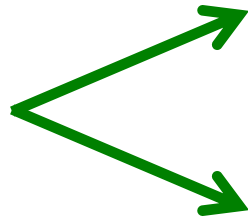
O fim da zona de linearidade pode ser detectado quando a razão (Área / Massa) diverge em mais de 5 % da inclinação da reta na região linear:



ANÁLISE QUALITATIVA

Conceitos Gerais

*Aplicações
Qualitativas de
CG*



Identificação individual das espécies contidas na amostra

Determinação da identidade da amostra propriamente dita

Fontes de Informações Qualitativas

RETENÇÃO
identificação

Uso de dados de retenção de um analito para sua

DETECÇÃO
substâncias eluídas

Detectores que fornecem informações estruturais sobre as

Para análise qualitativa confiável por CG é recomendável combinação de dados provenientes de pelo menos duas fontes

ANÁLISE QUALITATIVA

Parâmetros de identificação

Identificação utilizando o tempo de retenção

- ❖ Diferentes compostos podem apresentar o mesmo tempo de retenção
- ❖ t_R depende de: fluxo do gás de arraste; dimensões da coluna; fase líquida; temperatura da coluna

Confirmação do pico

- ❖ Adição de padrão (elimina-se variações experimentais entre as injeções)
- ❖ Repetir a análise em outra coluna com diferente polaridade
- ❖ Utilização de espectrômetro de massas

Identificação utilizando métodos gráficos

- ❖ t'_R de série homóloga ($\log t'_R \times n^\circ$ de carbono ou $\log t'_R$, coluna polar x $\log t'_R$ coluna apolar)
- ❖ Índice de Retenção de Kovátz
- ❖ Utilização de métodos analíticos auxiliares (GC-IR, GC-MS, identificação de grupos funcionais, etc)

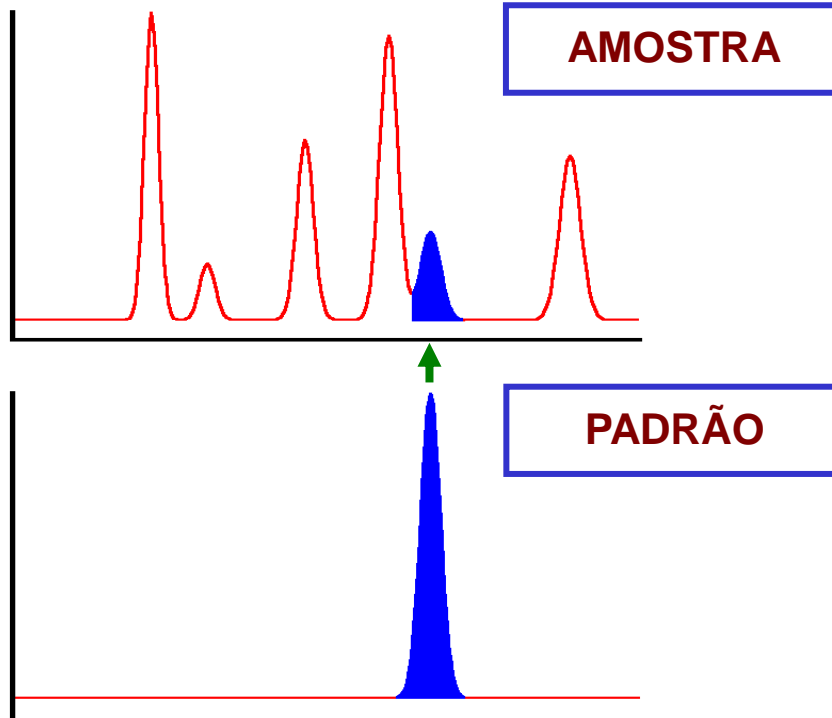
ANÁLISE QUALITATIVA

Tempos de Retenção

$$t'_R = f$$

Interações analito / FE
Pressão de vapor do analito
Condições operacionais (T_{COL} , F_C ...)

Fixas as condições operacionais, o tempo de retenção ajustado de um analito é uma constante

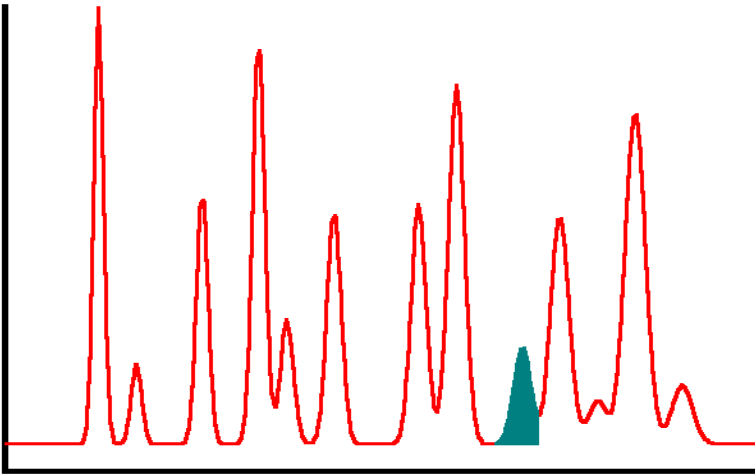


Comparação de cromatogramas da amostra e de uma solução padrão do analito suspeito

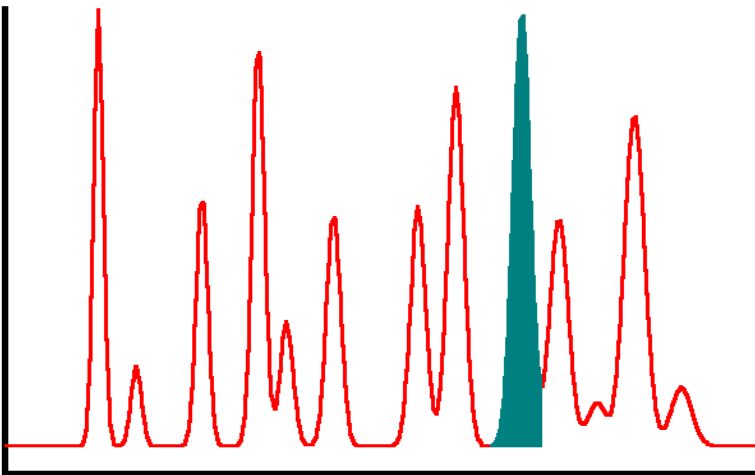
ANÁLISE QUALITATIVA

Tempos de Retenção

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



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

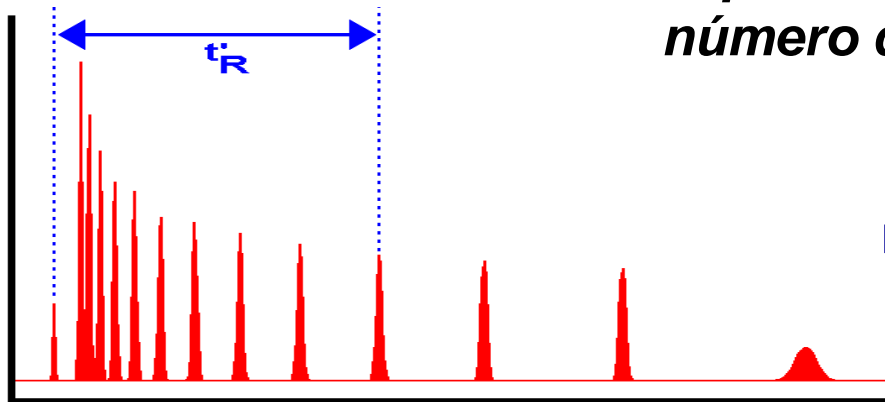


Comparação com cromatograma da amostra dopada permite identificação mais confiável do desconhecido

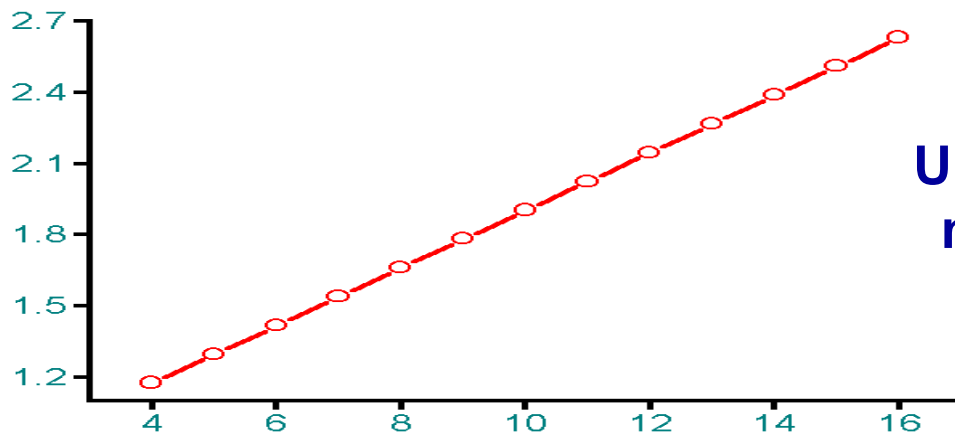
ANÁLISE QUALITATIVA

Índice de Retenção de Kovàts

FUNDAMENTO Os t'_R isotérmicos para uma série homóloga de compostos dependem logaritmicamente do número de átomos de carbono na cadeia.



Separação isotérmica de uma mistura de n-alcenos (n-C₄, n-C₅, ... n-C₁₆)

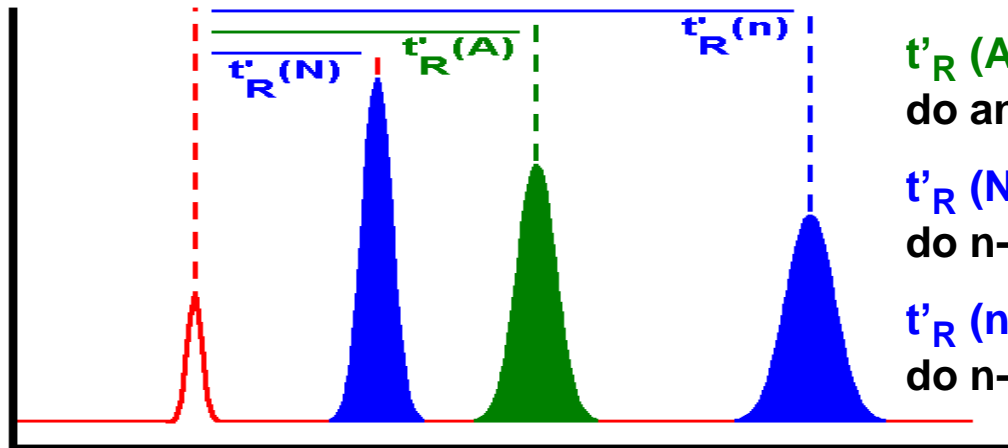


Um gráfico de $\log(t'_R)$ em função do número de átomos de carbono do analito n_C é LINEAR

ANÁLISE QUALITATIVA

Índice de Retenção de Kovàts

O índice de retenção de Kovàts (I) para um analito é definido por:



$t'_R(A) = X_i$ = Tempo de retenção ajustado do analito A

$t'_R(N) = X_z$ = Tempo de retenção ajustado do n-alcano com N carbonos

$t'_R(n) = X_{(z+1)}$ = Tempo de retenção ajustado do n-alcano com n carbonos ($n = N + 1$)

Interpolação
logarítmica dos t'_R



$$I = 100 \left[\frac{\log X_i - \log X_z}{\log X_{(z+1)} - \log X_z} + z \right]$$

Ex.: um analito com $I = 874$ teria um tempo de retenção ajustado equivalente ao de um n-alcano hipotético com cadeia de 8,74 átomos de carbono

ANÁLISE QUALITATIVA

Parâmetros de Escolha de Colunas

Constantes de McReynolds \Rightarrow São parâmetros de avaliação de uma coluna baseado nas propriedades de sua FE para separar compostos de estruturas químicas distintas: **Benzeno, n-Butanol, Pentanona-2, nitropropano e Piridina (5 constantes –números– representando as principais interações).**

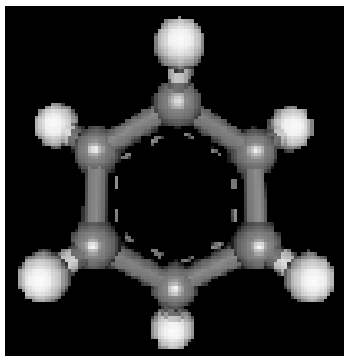
Essas constantes são obtidas a partir dos valores de I a 120°C para esses compostos relativamente à uma fase apolar (SE 30, parafina):

$\Delta I = I \text{ polar} - I \text{ apolar} = \text{polaridade da coluna}$.

ANÁLISE QUALITATIVA

Constantes de McReynolds

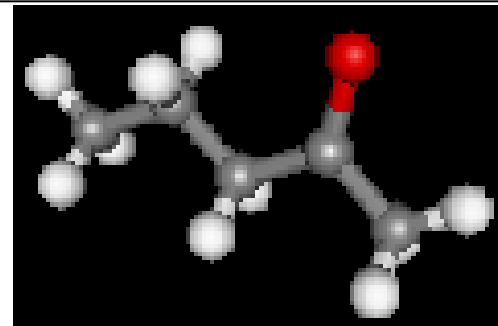
Dispersão primária com algumas propriedades de acceptor fraco de prótons



BENZENO

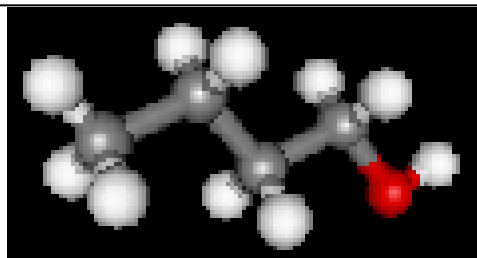
(olefinas e aromáticos)

Propriedades de orientação com acceptor de prótons



2-PENTANONA (cetonas, éteres, aldeídos, ésteres, epóxidos, derivados de dimetilamino)

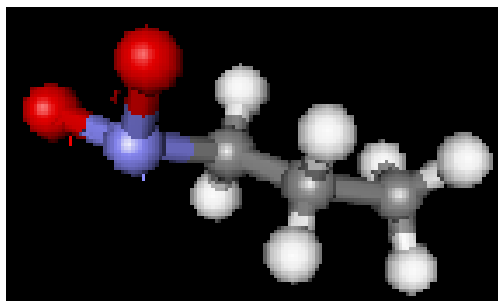
Propriedades de orientação com capacidade de acceptor e doador de prótons



n-BUTANOL

(álcoois, nitrilas, ácidos)

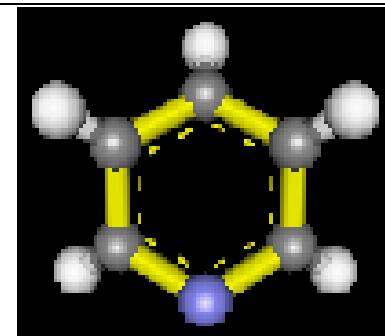
Orientação de dipolo fraca com forte capacidade de acceptor de elétrons



2-NITROPROPANO

(derivados nitro e nitrilas)

Voltar ao slide 66 (const. Mc Reynolds das FEs)



PIRIDINA (bases aromáticas)

ANÁLISE QUANTITATIVA

Procedimentos (Repetitividade)

- ❖ Amostragem (representativa)
- ❖ Preparo da Amostra (trituração, filtração, extração, diluição e/ou conc.)
 - ❖ Cuidados: contaminação, perda, degradação, etc
- ❖ Análise Cromatográfica (fontes de erros: gás de arraste, injetor, coluna, detector e integrador)
- ❖ Técnicas de Integração:
 - ❖ Manual ($h \times w_h$; triangulação- $h \times w_b / 2$ -; planimetria, cortar e pesar)
 - ❖ Mecânica
 - ❖ Eletrônica (microprocessada)
- ❖ Cálculos (métodos de quantificação)
 - ❖ Normalização
 - ❖ Normalização da Área Corrigida
 - ❖ Padrão Externo
 - ❖ Padrão Interno
 - ❖ Adição Padrão

ANÁLISE QUANTITATIVA

Métodos de quantificação

Normalização: $%A = (\text{Área } A / \text{Área total}) \times 100$

**Assume-se que todos os compostos foram aluídos da coluna
que a resposta do detector é a mesma para todos**

Normalização de Área Corrigida: $F_A = \text{Área } A / \text{massa } A = \text{fator de resposta}$
 $%A = [(\text{Área } A / F_A) / \Sigma (\text{Área } n / F_n)] \times 100$

Assume-se que todos os compostos foram eluídos da coluna

Padrão Externo: Constrói-se uma curva analítica de área \times massa de A padrão.

A massa de A na amostra é obtida da curva analítica

Desvantagens: padrões extremamente puros e mesmo volume de injeção

Padrão Interno (PI): Adiciona-se à amostra um composto que seja: **extremamente puro, quimicamente similar ao analito, eluir numa região limpa do cromatograma, ausente na amostra e em concentrações próximas à do analito**

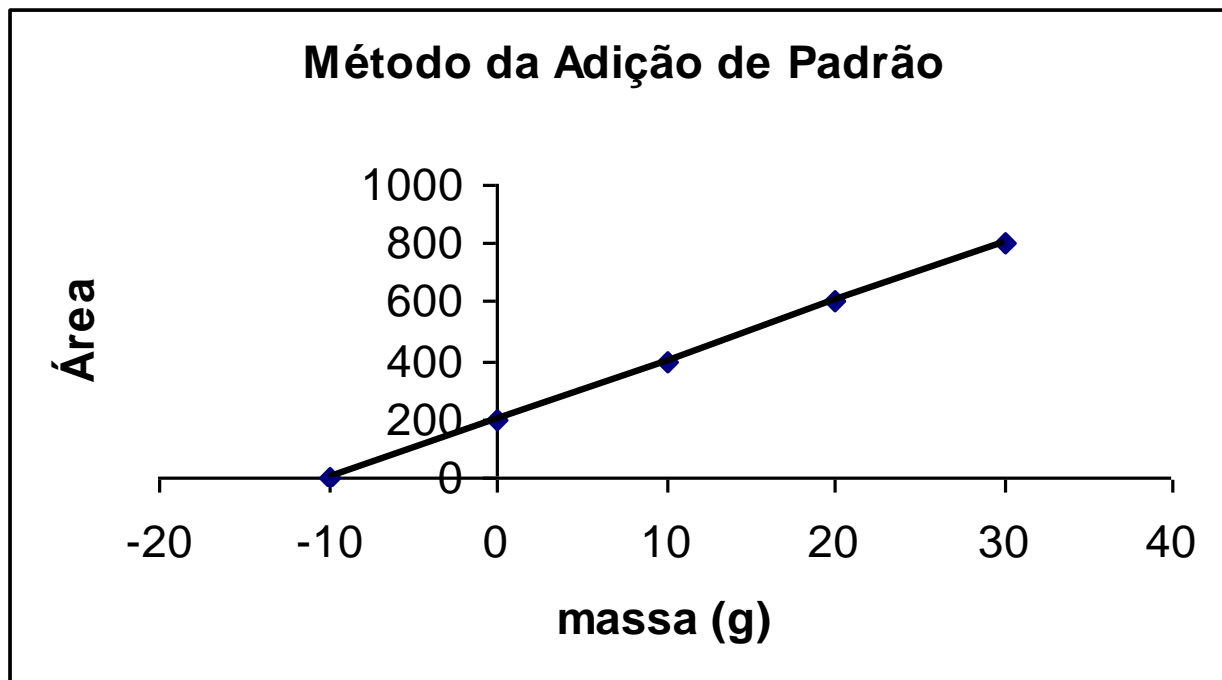
Constrói-se uma curva analítica de área $A / \text{área } PI \times \text{massa de } A \text{ padrão} / \text{massa } PI$

Vantagem: independe das variáveis experimentais

ANÁLISE QUANTITATIVA

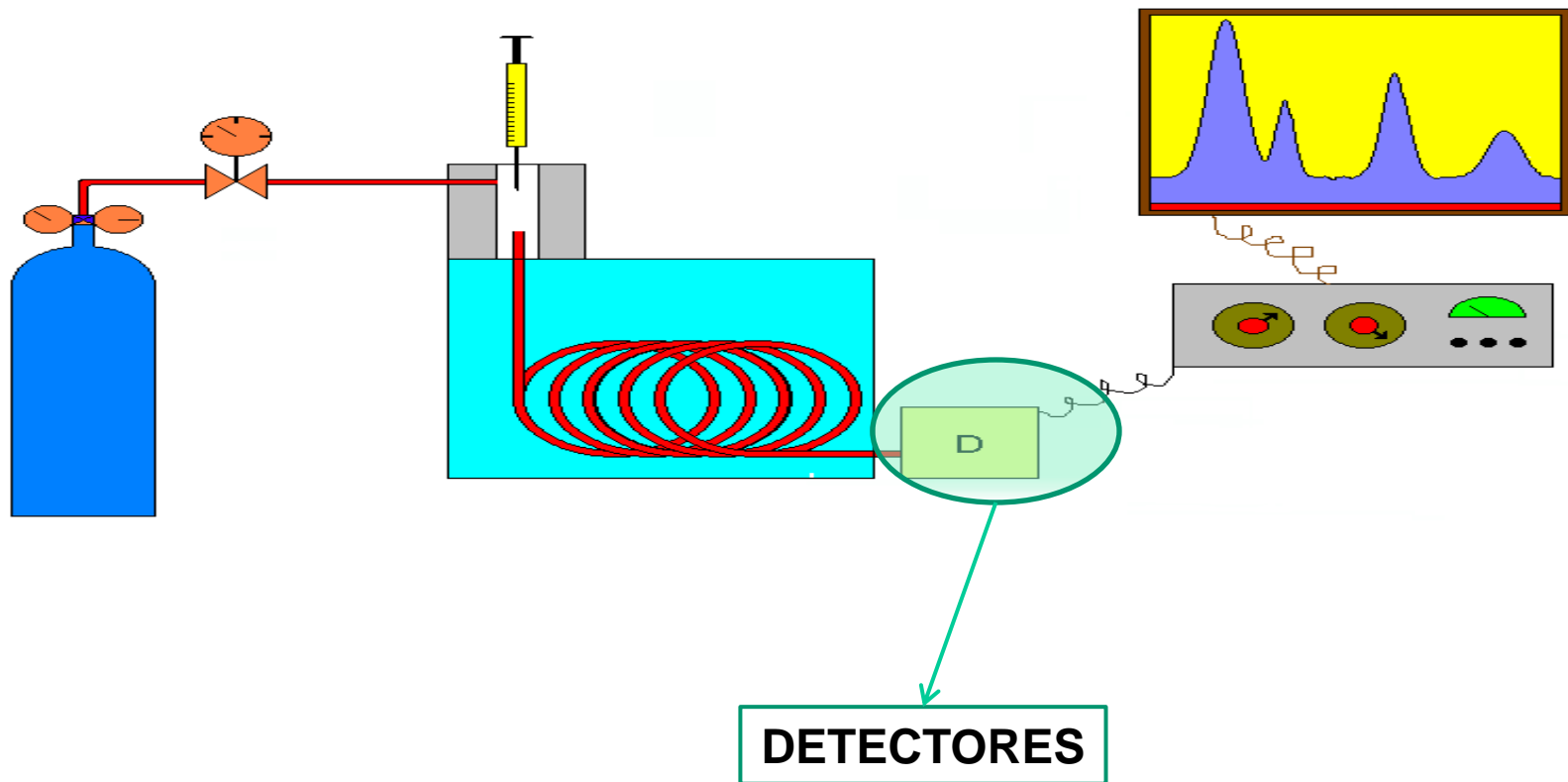
Métodos de quantificação

Adição Padrão: Adiciona-se diferentes quantidades do padrão do composto na amostra e constrói-se uma curva analítica dessas quantidades \times área do pico cromatográfico. A massa do composto na amostra original é obtida na intersecção da reta com o eixo das abscissas.



O Cromatógrafo a Gás

Instrumentação



INSTRUMENTAÇÃO: DETECTORES

Definições Gerais

Dispositivos que geram um sinal elétrico proporcional à quantidade eluida de um analito

~ 60 detectores já usados em CG

~ 15 equipam cromatógrafos comerciais

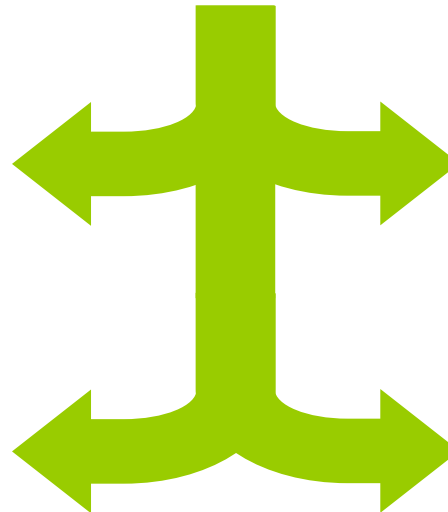
4 respondem pela maior parte das aplicações

DCT TCD
Detector por
Condutividade
Térmica

DCE ECD
Detector por
Captura de
Eletrons

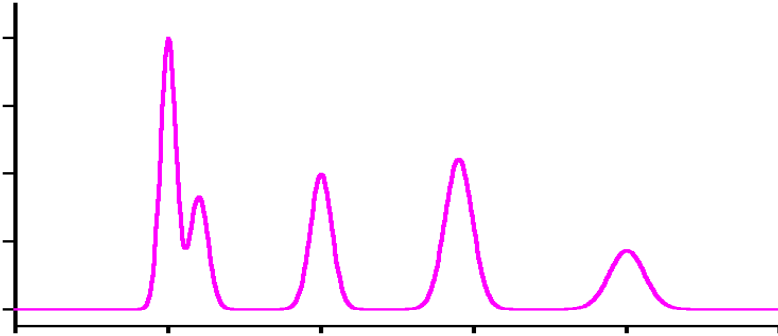
DIC FID
Detector por
Ionização em
Chama

EM MS
Detector
Espectrométrico
de Massas

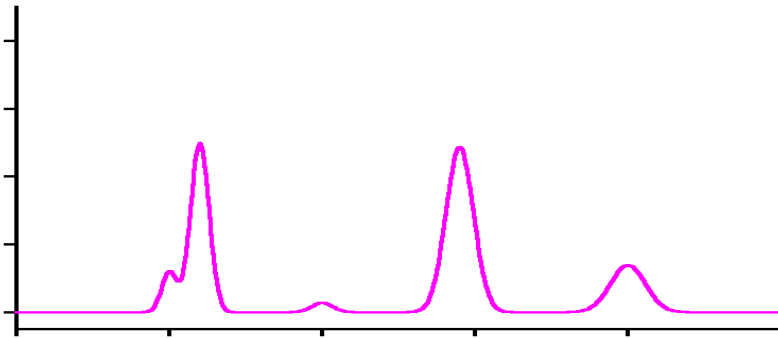


INSTRUMENTAÇÃO: DETECTORES

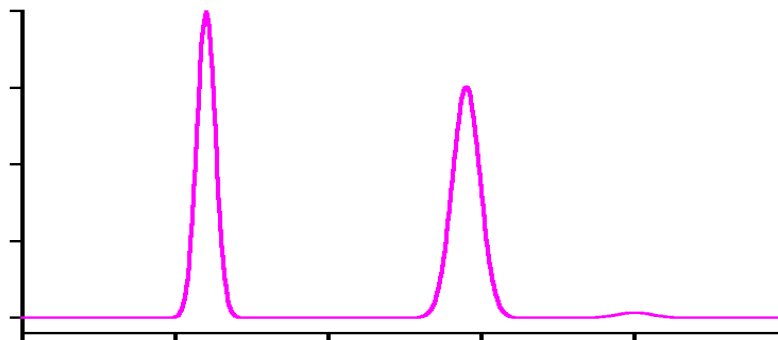
Classificação



UNIVERSAIS:
Geram sinal para qualquer substância eluída.



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






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

DETECTORES QUALITATIVOS

Métodos de Detecção Qualitativos

Métodos de detecção que fornecem informações qualitativas sobre os analitos eluídos:

-  Cromatografia Gasosa com Detecção Espectrométrica de Massas (CG-EM) (detector qualitativo e quantitativo)
-  Cromatografia Gasosa com Detecção Espectrométrica por Emissão Atômica (CG-EA)
-  Cromatografia Gasosa com Detecção Espectrométrica por Absorção no Infravermelho (CG-EIV)

Identificação muito confiável quando combinados à técnicas de identificação baseadas em retenção.

DETECTOR QUALI/QUANTITATIVO

Espectrometria de Massas

PRINCÍPIO *A amostra é fragmentada e ionizada em um padrão característico da espécie química.*

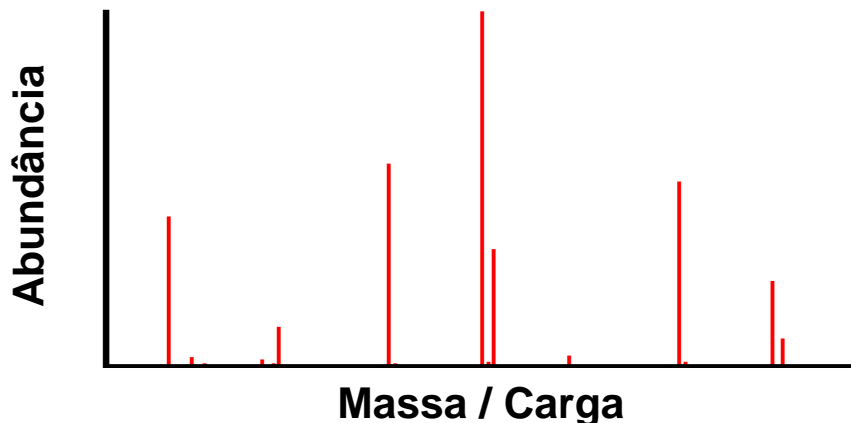
- 1 Moléculas da amostra são bombardeadas por elétrons (*electron impact* = EI) ou íons (*chemical ionization* = CI):



- 2 O íon formado se fragmenta:

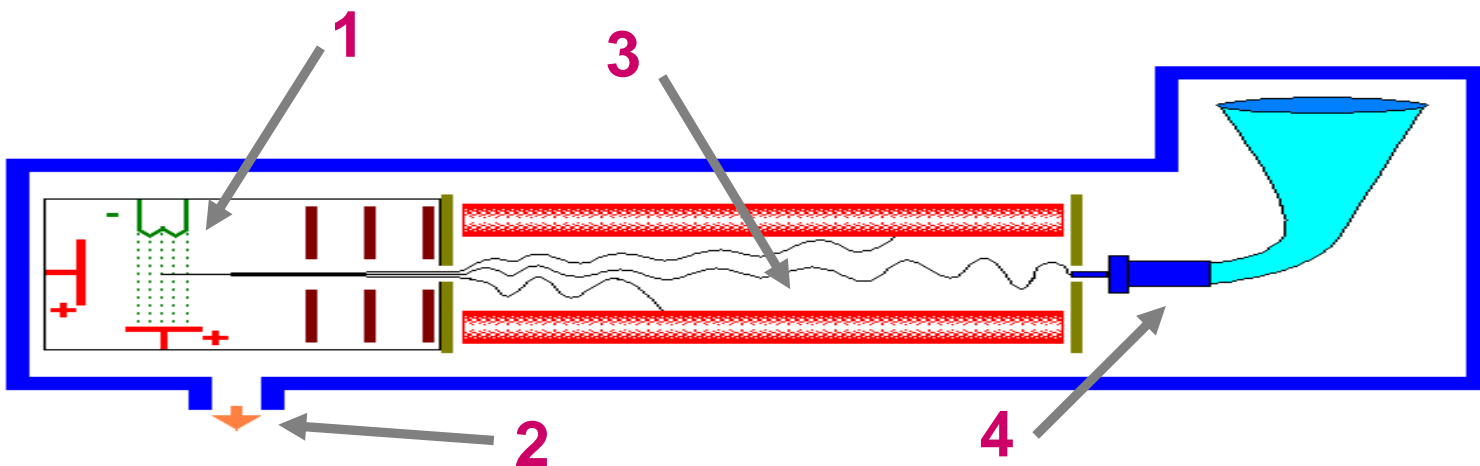


- 3 Os fragmentos iônicos formados são separados magneticamente de acordo com suas massas moleculares e contados:



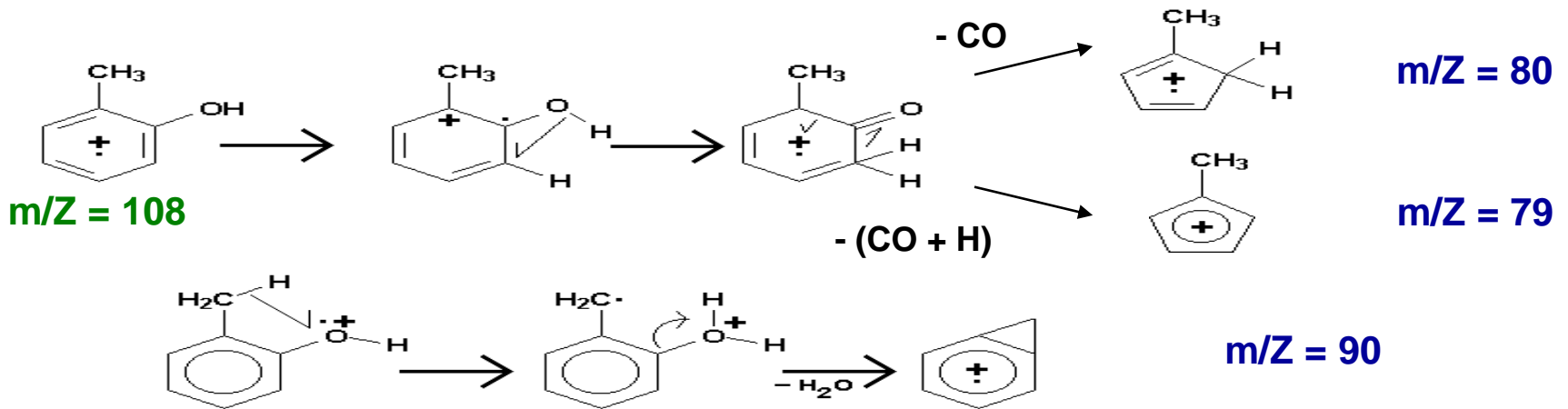
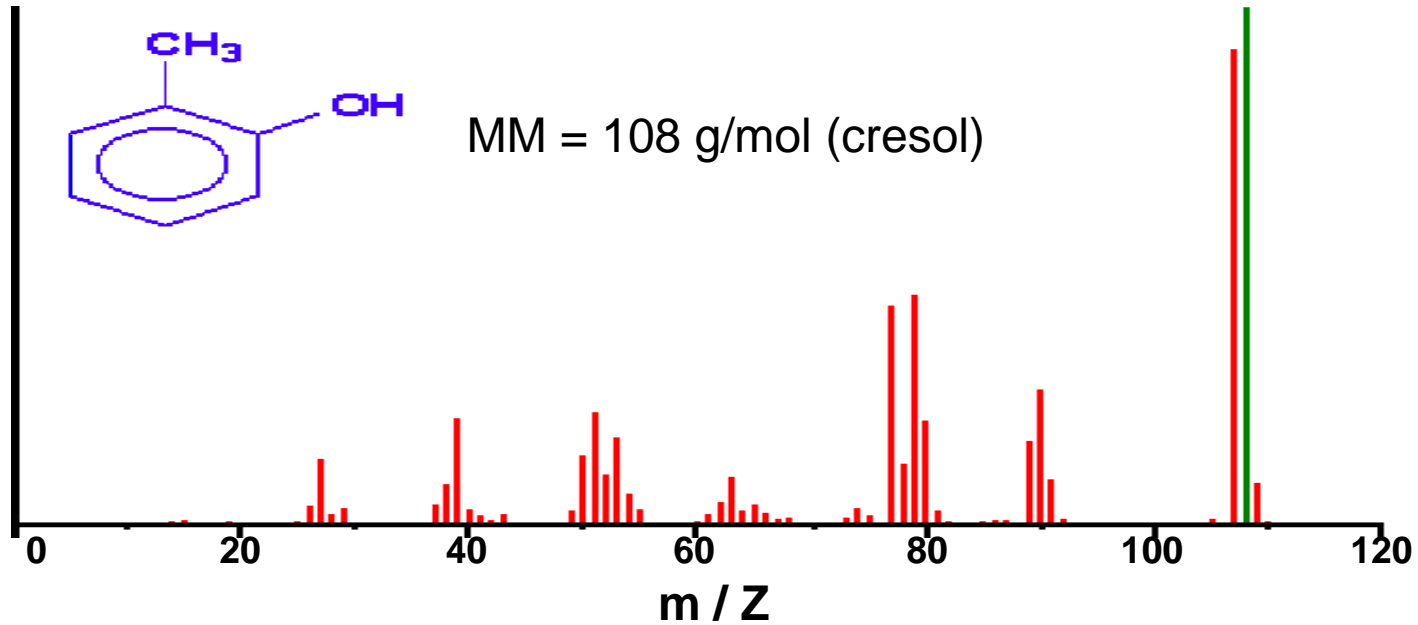
O gráfico do número de íons formados em função da razão Massa / Carga dos íons é o
ESPECTRO DE MASSAS do analito

DETECTOR: Espectrômetro de Massas (EM)



- 1 Câmara de Ionização** Elétrons gerados por um filamento aquecido bombardeiam a amostra. Os fragmentos ionizados (carga +1) são repelidos pelo eletrodo positivo e conduzidos ao separador magnético.
- 2 Saída de Vácuo** Todo o interior do EM deve estar sob alto vácuo (nano atm).
- 3 Separador Magnético** A ação do campo magnético deixa apenas íons com determinada razão Massa / Carga atravessar esta área do equipamento.
- 4 Detector** Uma válvula fotomultiplicadora ou um fotodiodo gera um sinal elétrico proporcional ao número de íons que incide sobre o elemento.

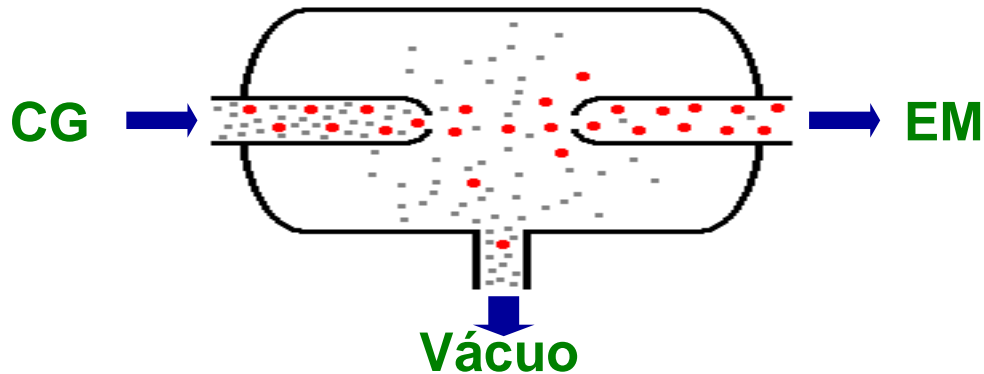
DETECTOR: Espectro de Massas



DETECTOR: EM

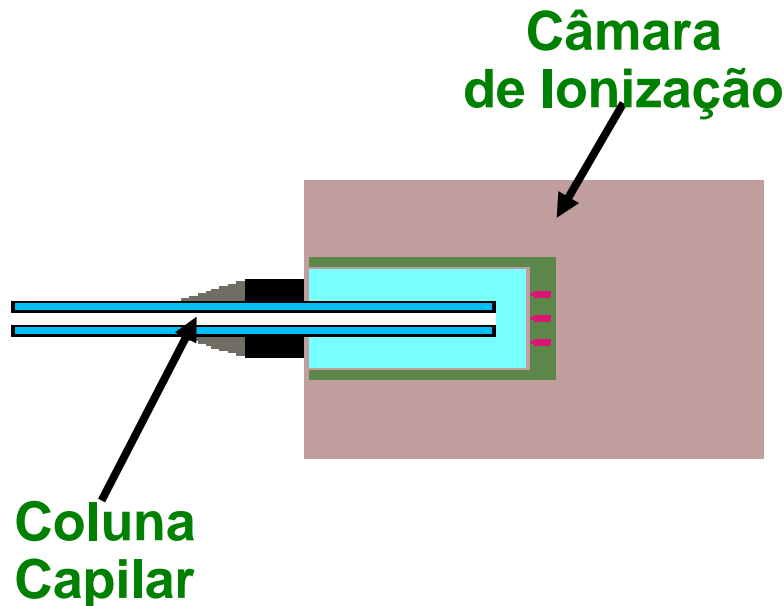
Acoplamento ao CG

Interface cromatógrafo - espectrômetro:



Separador Molecular

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



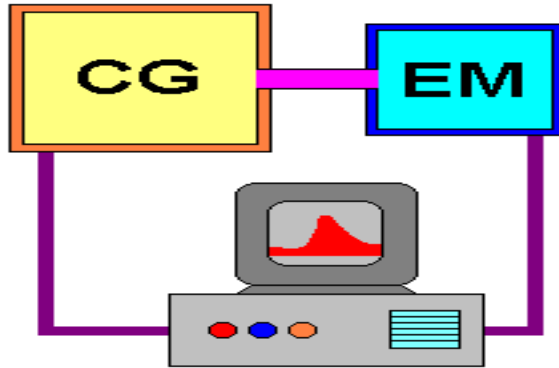
Interface Capilar Direta

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

DETECTOR: EM

Acoplamento ao CG

Sistema de Controle e Aquisição de Dados:



É **NECESSÁRIO** que sistemas CG-EM sejam totalmente controlados por microcomputador.

Sistema de Controle e Aquisição de Dados:

- 1** Gerencia e monitora o funcionamento dos módulos de CG e EM.
- 2** Coleta e arquiva espectros de massa em intervalos regulares de tempo e constrói o cromatograma.
- 3** Após a corrida, compara espectros coletados com bases de dados para identificação dos eluatos.

COMPUTADORES RÁPIDOS E COM GRANDE CAPACIDADE DE ESTOCAGEM DE DADOS

DETECTOR: EM

Geração do Cromatograma

Espectros de massas completos coletados e arquivados em intervalos regulares de tempo

Geração do cromatograma a partir dos espectros:

★ CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS (TIC = Total Ion Chromatogram)

Para cada espectro o número total de íons detectados na faixa de massas varrida é somado e plotado em função do tempo, gerando o cromatograma.

★ MONITORAMENTO DO ÍON SELECIONADO (SIM = Single Ion Monitoring)

Seleciona-se um fragmento resultante da fragmentação da espécie de interesse. Gera-se o cromatograma plotando-se o número de íons detectados com a massa desse fragmento em função do tempo.

TIC

Universal

Similar a DIC

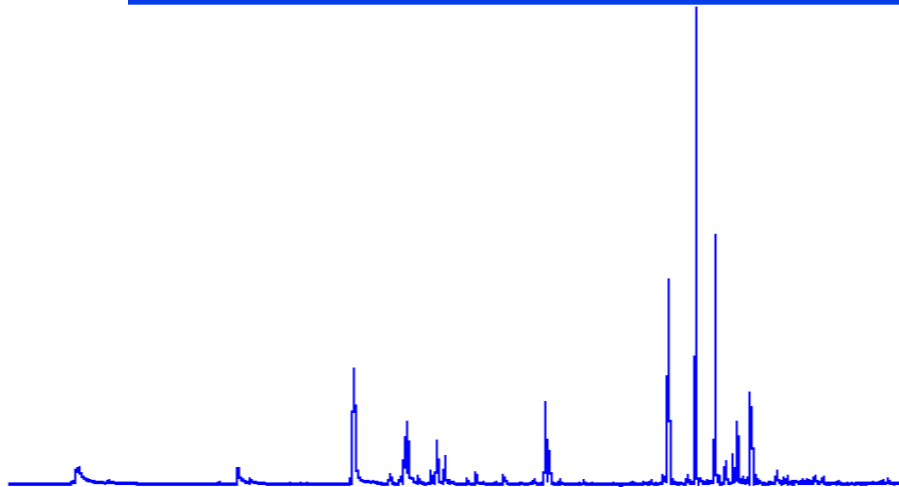
SIM

Seletivo

Maior Sensibilidade

DETECTOR: EM

CG-EM (GC-MS): TIC x SIM



TIC = Total Ion Chromatogram

Aparecem os picos correspondentes a todas substâncias eluídas



SIM = Single Ion Monitoring (m/z = 149)

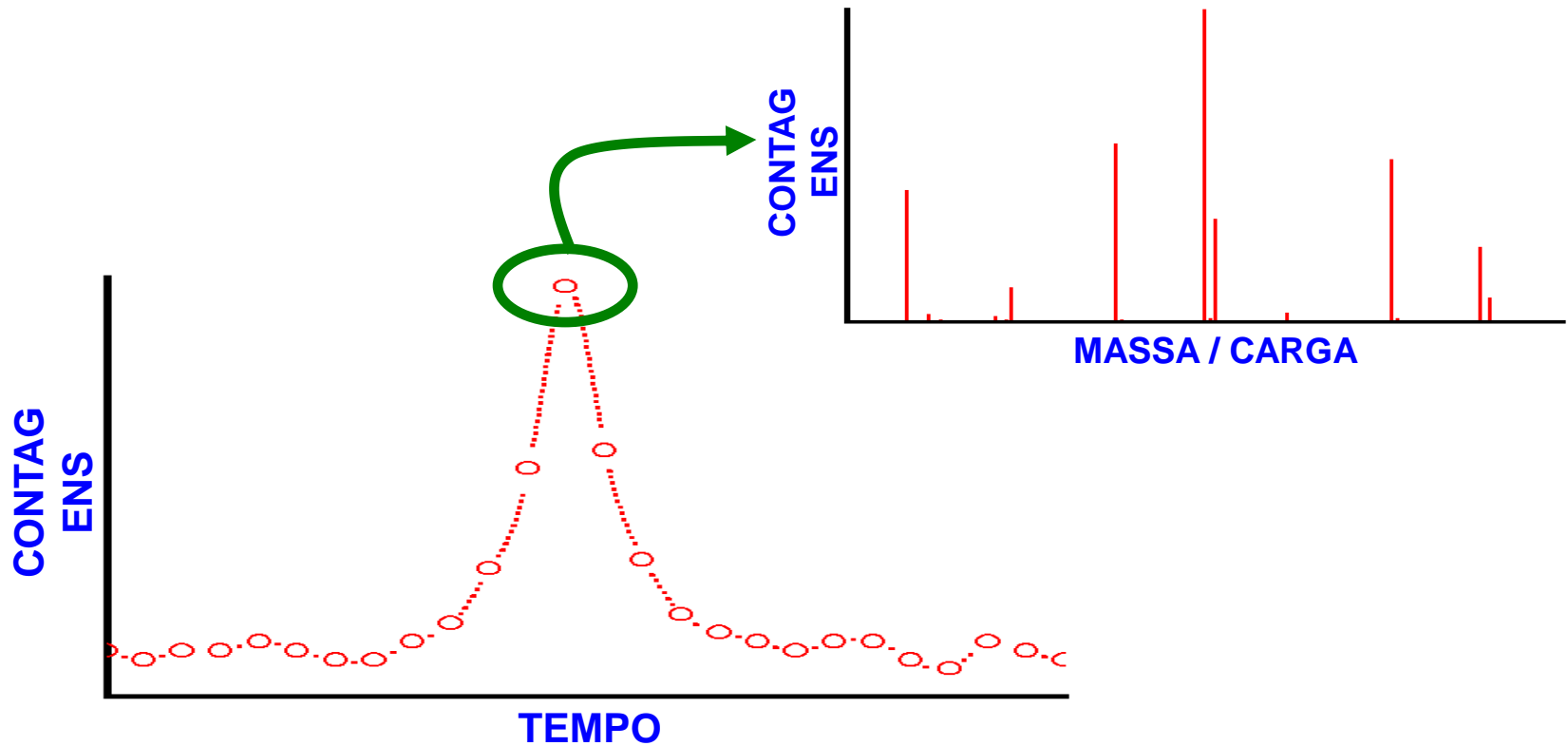
Cromatograma construído a partir dos mesmos dados acima, mas apenas usando fragmentos com massa = 149 (ftalatos: plastificante)

Aroma de polpa industrializada de cajá após extração por SPME

DETECTOR: EM

Identificação de Eluatos

1 *Seleção manual ou automática do espectro de massa correspondente a um eluato.*

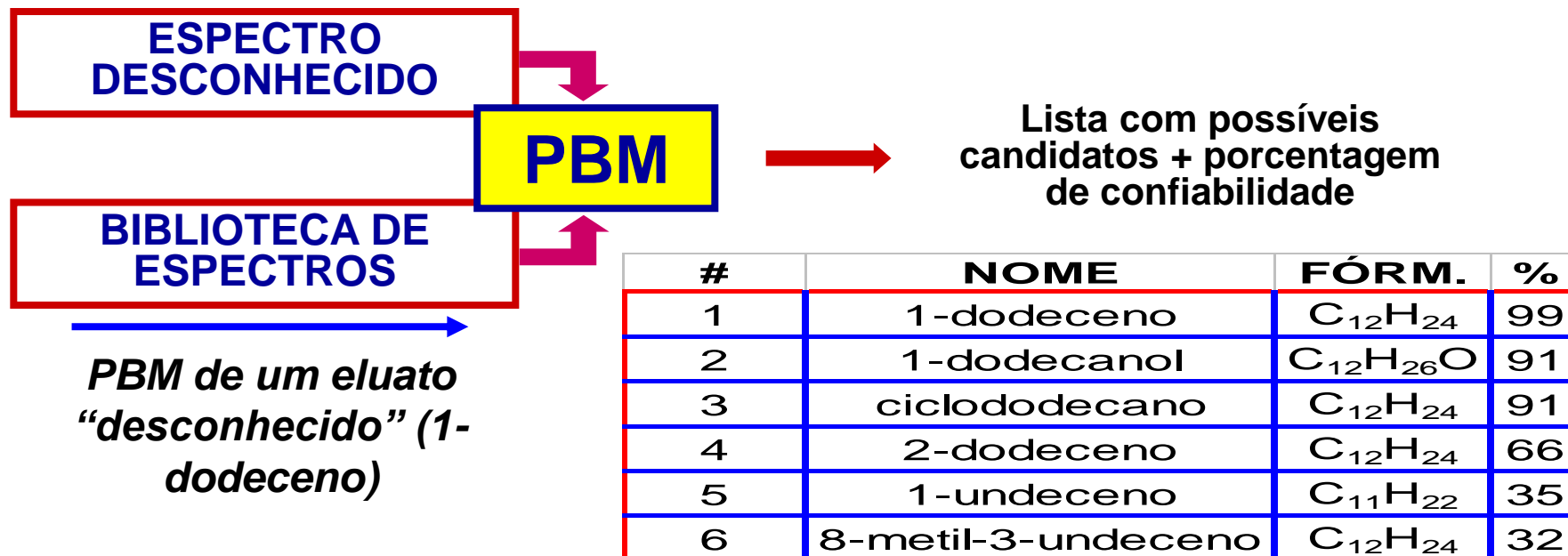


2 *Interpretação manual do espectro e / ou comparação automática com biblioteca de espectros padrão do equipamento.*

DETECTOR: EM

Identificação de Eluatos

Busca automática em bibliotecas de espectros: comparação estatística (Probability Based Matching)



LIMITAÇÕES:

Identificação pouco confiável de espectros muito simples

Limitada pelo tamanho da base de dados

Diferenças entre espectros gerados por diversos EM

INSTRUMENTAÇÃO

Detectores Quantitativos

Mais Importantes:

 **DETECTOR POR CONDUTIVIDADE TÉRMICA (DCT OU TCD)**

Variação da condutividade térmica do gás de arraste.

 **DETECTOR POR IONIZAÇÃO EM CHAMA (DIC OU FID)** Íons

gerados durante a queima dos eluatos em uma chama de H_2 + ar.

 **DETECTOR POR CAPTURA DE ELÉTRONS (DCE OU ECD)**

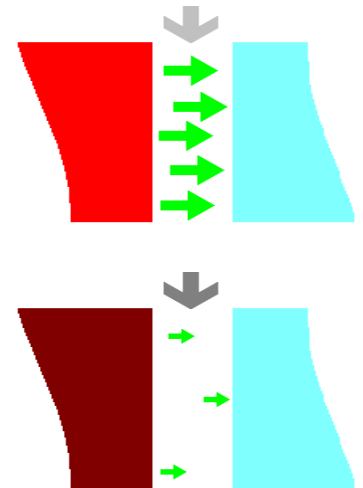
Supressão de corrente causada pela absorção de elétrons por eluatos altamente eletrofílicos.

DETECTOR QUANTITATIVO: Detector por Condutividade Térmica (DCT)

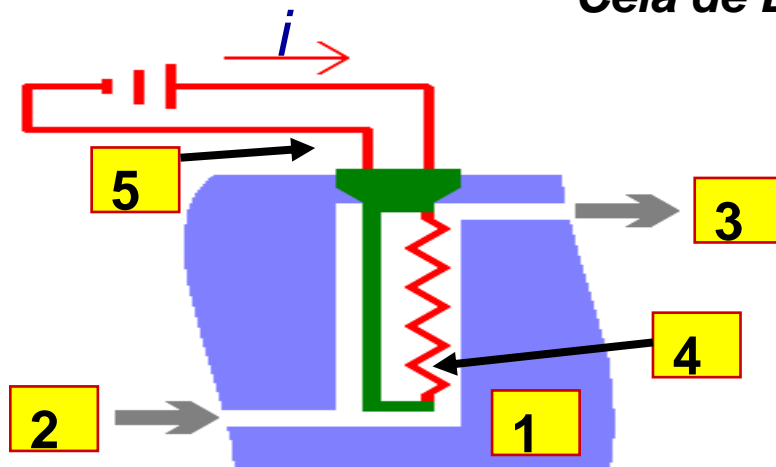
PRINCÍPIO Variação na condutividade térmica do gás quando da eluição de um analito.

*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 perde calor mais lentamente.



Cela de Detecção do DCT:



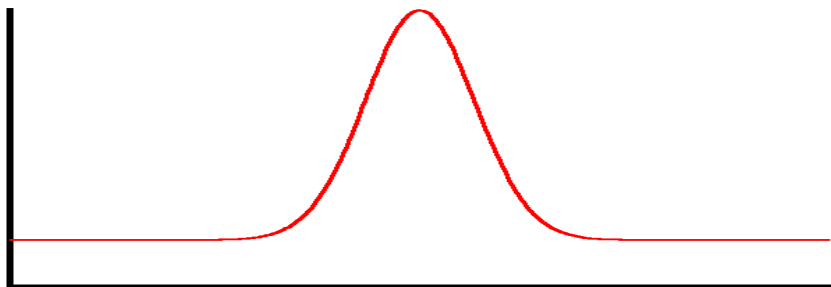
- 1 Bloco metálico (aço)
- 2 Entrada de gás de arraste
- 3 Saída de gás de arraste
- 4 Filamento metálico (liga W-Re) aquecido
- 5 Alimentação de corrente elétrica para aquecimento do filamento

DETECTOR QUANTITATIVO: DCT

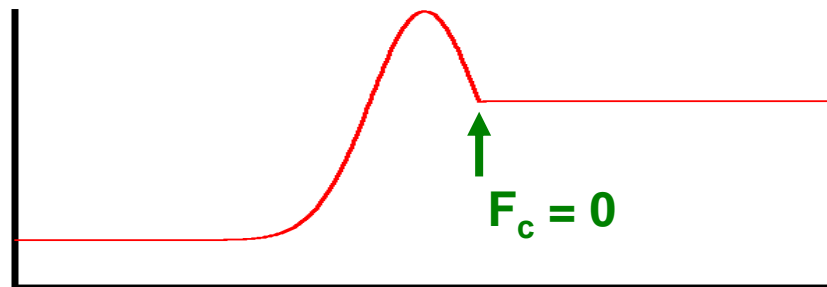
SELETIVIDADE *Observa-se sinal para qualquer substância eluída diferente do gás de arraste = UNIVERSAL*

SENSIBILIDADE / LINEARIDADE *Dependendo da configuração particular e do analito: QMD = 0,4 ng a 1 ng com linearidade de 10^4 (ng - dezenas de μg)*

VAZÃO DE GÁS DE ARRASTE *O sinal é proporcional à concentração do analito no gás de arraste que passa pela cela de amostra.*



VAZÃO DE GÁS DE ARRASTE CONSTANTE DURANTE A ELUIÇÃO



VARIAÇÃO DA VAZÃO DE GÁS DE ARRASTE DURANTE A ELUIÇÃO

Com DCT, a área dos picos cromatográficos é MUITO dependente da vazão do gás de arraste !!!

DETECTOR QUANTITATIVO: DCT

Características Operacionais

FATORES DE RESPOSTA Quanto menor a condutividade térmica do analito, maior o sinal.

Os fatores de resposta dependem da condutividade térmica do analito



Quantidades iguais de substâncias diferentes geram picos cromatográficos com áreas diferentes !!!

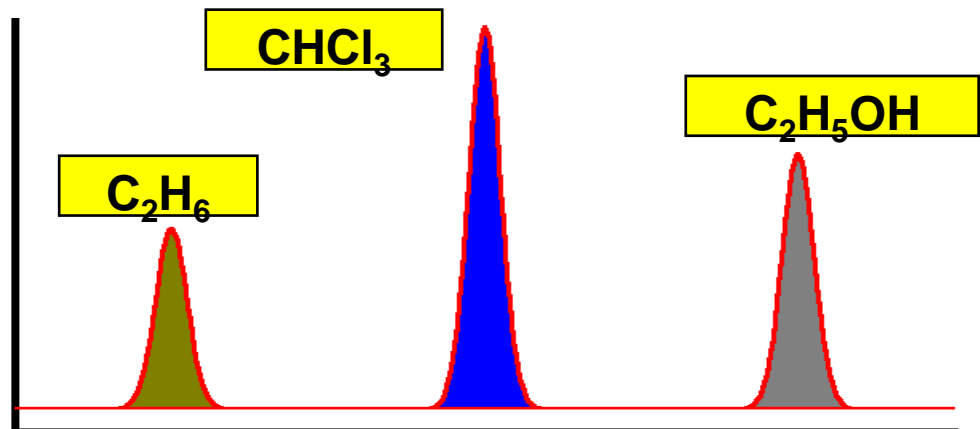


Mistura de quantidades equimolares de:

Etano $\rightarrow \lambda = 17,5$

Clorofórmio $\rightarrow \lambda = 6,0$

Etanol $\rightarrow \lambda = 12,7$



DETECTOR QUANTITATIVO: DCT

Aplicações

1 *Separação e quantificação de compostos que não geram sinal em outros detectores (gases nobres, gases fixos)*

Separação de Gases Fixos e Hidrocarbonetos:

Coluna: CP Sil 5CB

(50 m x 0.32 mm x 5 μ m)

Gás de Arraste: He @ 3 ml.min⁻¹

T_{COL}: 40°C **Detector:** DCT

1 N₂

2 CH₄

3 CO₂

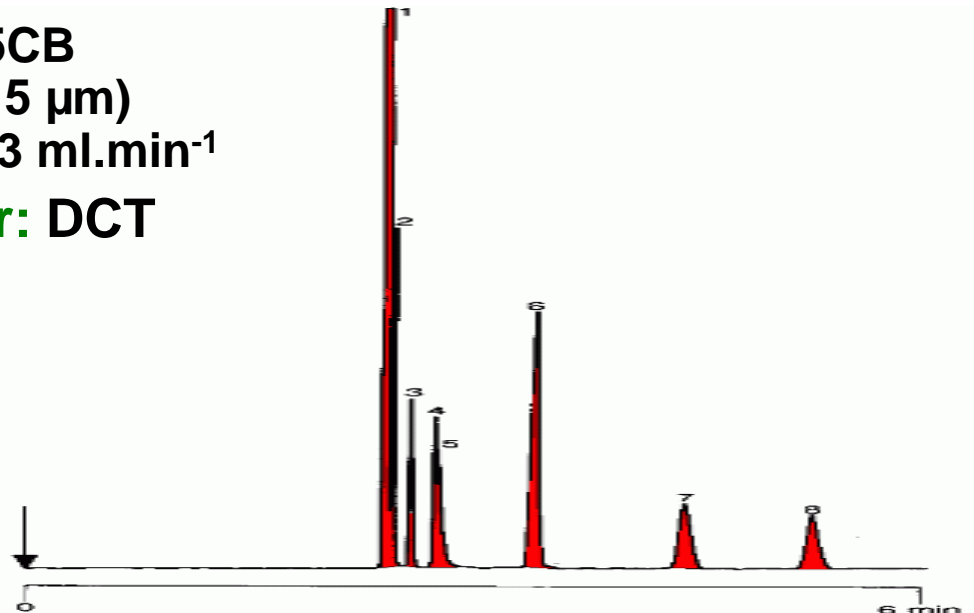
4 n-C₂

5 NH₃

6 n-C₃

7 i-C₄

8 n-C₄



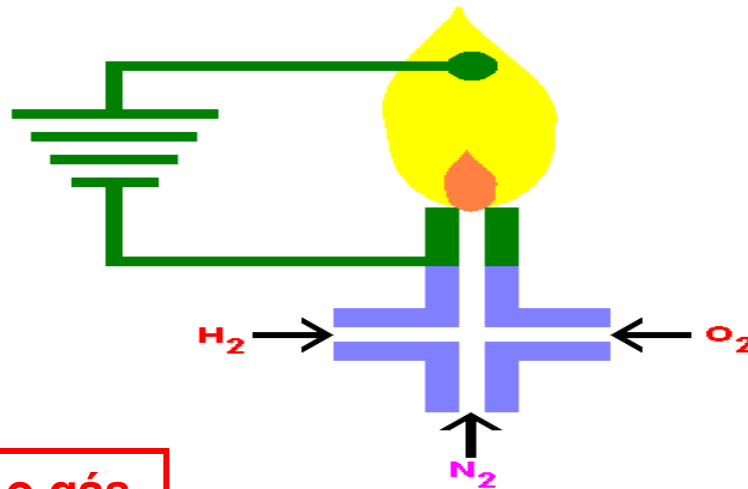
2 *Por ser um detector não-destrutivo, pode ser usado em CG preparativa ou detecção sequencial com dois detectores em “tandem”*

DETECTOR QUANTITATIVO

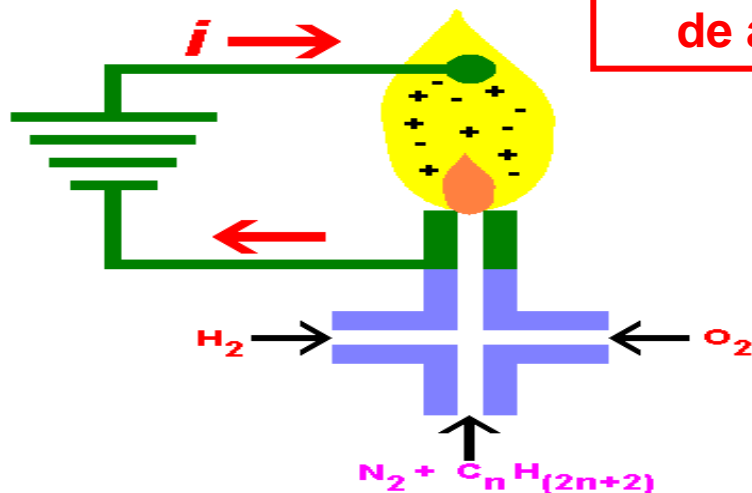
Detector por Ionização em Chama (DIC)

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

O **efluente** da coluna é misturado com H_2 e O_2 e queimado. Como numa chama de $H_2 + O_2$ não existem íons, ela não conduz corrente elétrica.

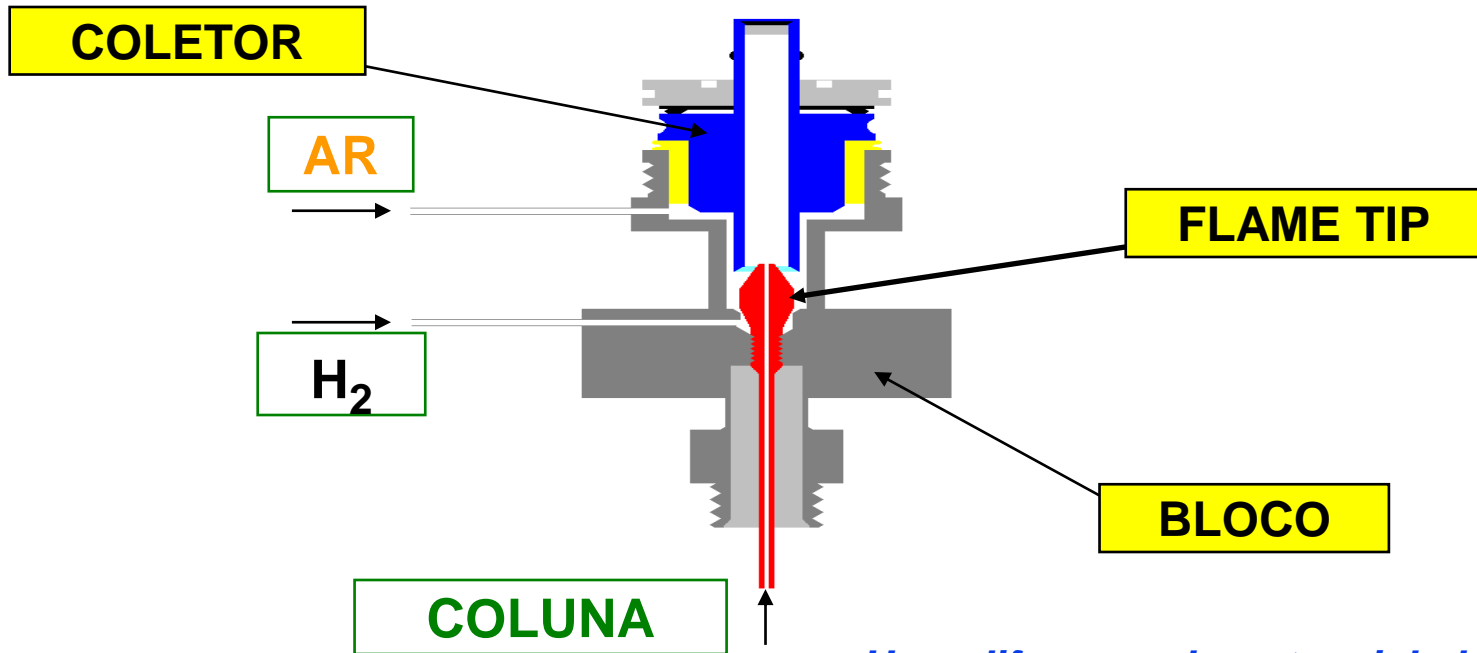


Nesse exemplo o gás de arraste é o N_2 !

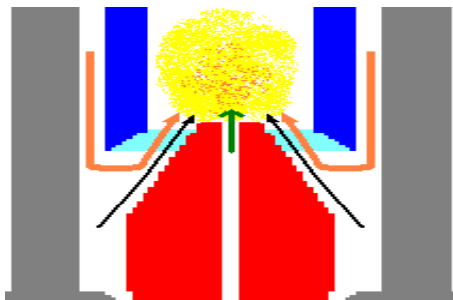


Quando um **composto orgânico** elui, ele também é queimado. Como na sua queima são formados íons, a chama passa a conduzir corrente elétrica

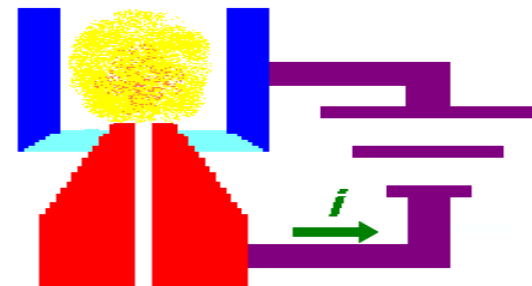
DETECTOR QUANTITATIVO: DIC



O ar e o H₂ difundem para o interior do coletor, onde se misturam ao efluente da coluna e queimam:



Uma diferença de potencial elétrico é aplicada entre o flame tip e o coletor - quando se formam íons na chama, flui uma corrente elétrica:



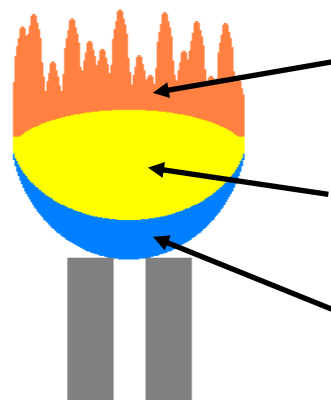
DETECTOR QUANTITATIVO: DIC

Química da Chama de Hidrogênio:

Estrutura da chama

três regiões básicas

Região de quebra Mistura dos gases, pré-aquecimento, início da quebra das moléculas de H₂, O₂ e dos analitos.



Incandescência

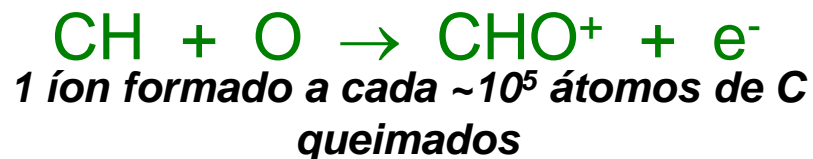
Reação

Quebra

Zona de reação Reações exotérmicas com produção e/ou consumo de radicais H, O, OH, HO₂ (provenientes do H₂), CH e C₂ (proveniente do analito) e íons CHO⁺ (analito).

Zona de incandescência Emissão de luz por decaimento de espécies excitadas: OH (luz UV), C_H e C₂ (visível).

Queima de substâncias com ligações C-H



Queima de H₂

Formam-se apenas radicais !!!

DETECTOR QUANTITATIVO: DIC

Características Operacionais

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:*

Gases nobres

H₂, O₂, N₂

CO, CO₂, CS₂

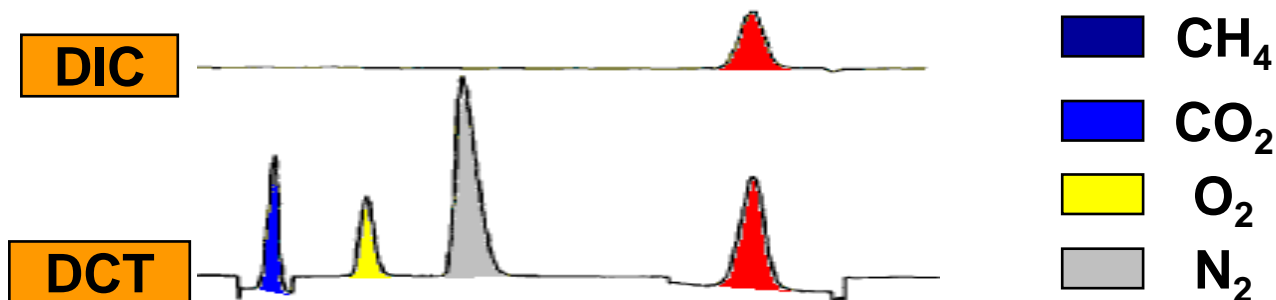
CCl₄, peralogenados

NH₃, N_xO_y

SiX₄ (X = halogênio)

H₂O

HCOOH, HCHO *



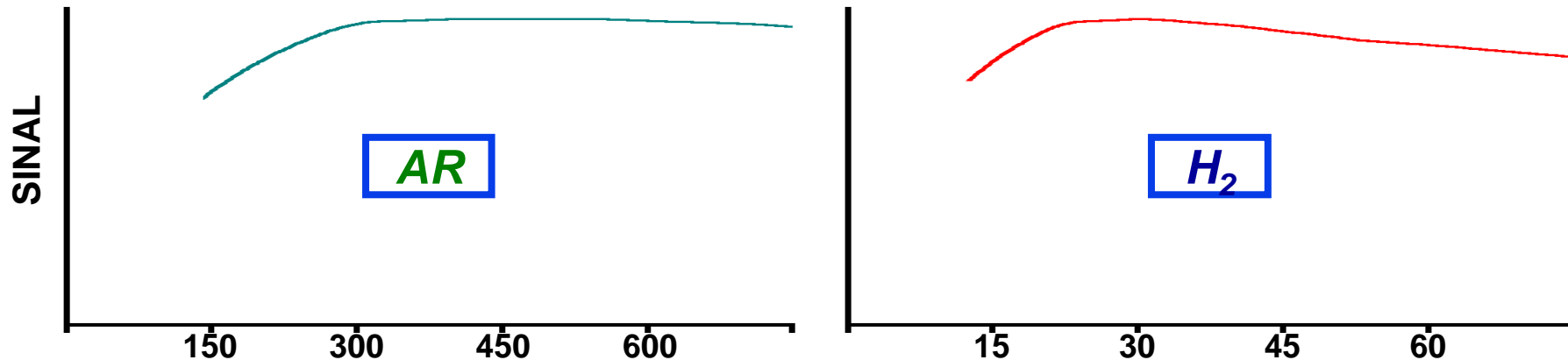
SENSIBILIDADE / LINEARIDADE QMD típicas = 10 pg a 100 pg com linearidade entre 10⁷ e 10⁸ (pg a mg)

DETECTOR QUANTITATIVO: DIC

Características Operacionais

VAZÕES DE GASES Além do gás de arraste, as vazões de alimentação de ar (comburente) e hidrogênio (combustível) devem ser otimizadas.

Gráficos Sinal x Vazão de Gases típicos:



O sinal se mantém aproximadamente constante em uma larga faixa de vazões de ar e H₂



VARIAÇÕES NAS VAZÕES DE AR E H₂ AFETAM APENAS MARGINALMENTE O SINAL = MAIORES REPRODUTIBILIDADE E REPETIBILIDADE

DETECTOR QUANTITATIVO: DIC

Características Operacionais

FATORES DE RESPOSTA O fator de resposta de um determinado composto é aproximadamente proporcional ao número átomos de carbono. Presença de heteroelementos diminui o fator de resposta.

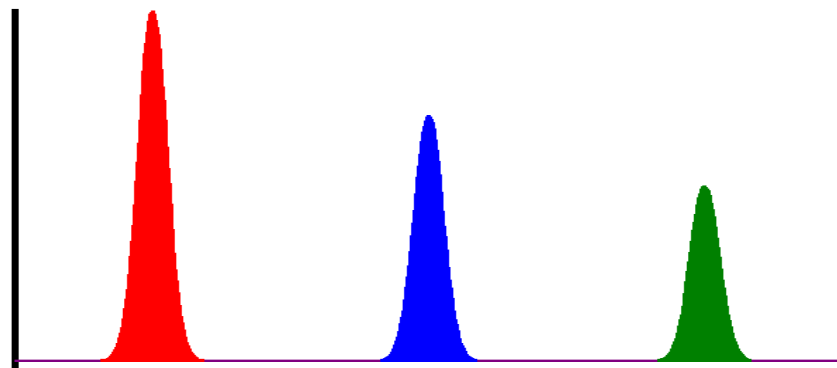
Número Efetivo de Carbonos (NEC) Prevê com ~20% de aproximação o fator de resposta de um composto.

$$S \propto NEC = \sum X$$

(X = Contribuição de cada átomo ao NEC)

Átomo	X
C alifático	+1,00
C aromático	+1,00
C olefiníco	+0,95
C carbonila	+0,00
O álcool prim.	-0,60
Cl alifático	-0,12

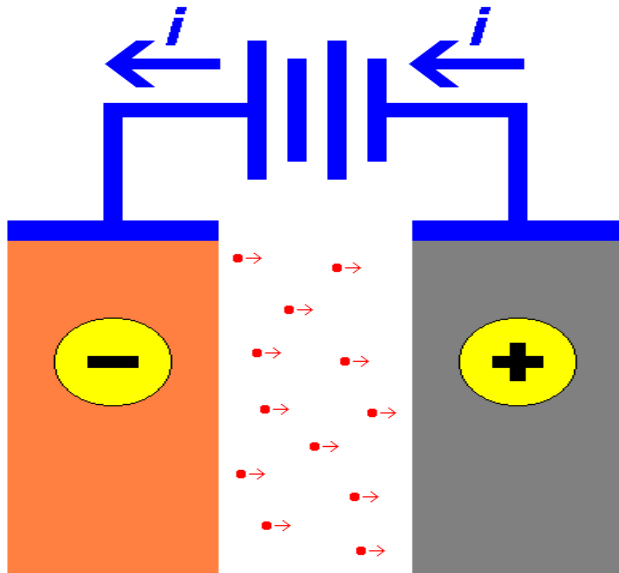
Mistura com quantidades equimolares de:



DETECTOR QUANTITATIVO

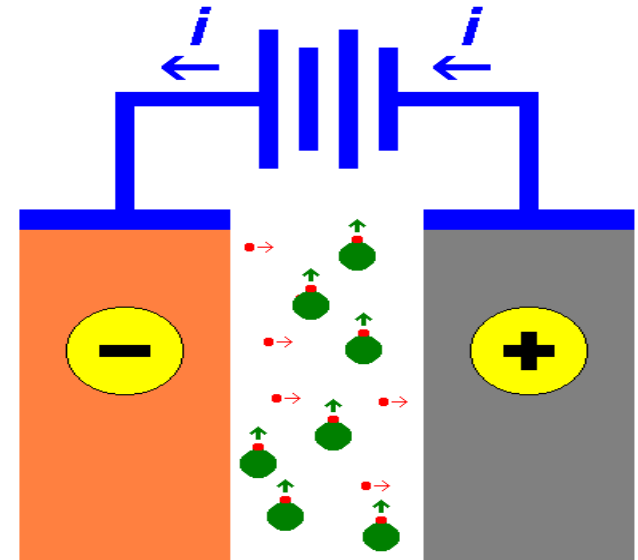
Detector por Captura de Elétrons (DCE)

PRINCÍPIO Supressão de um fluxo de elétrons lentos (termais) causada pela sua absorção por espécies eletrofílicas

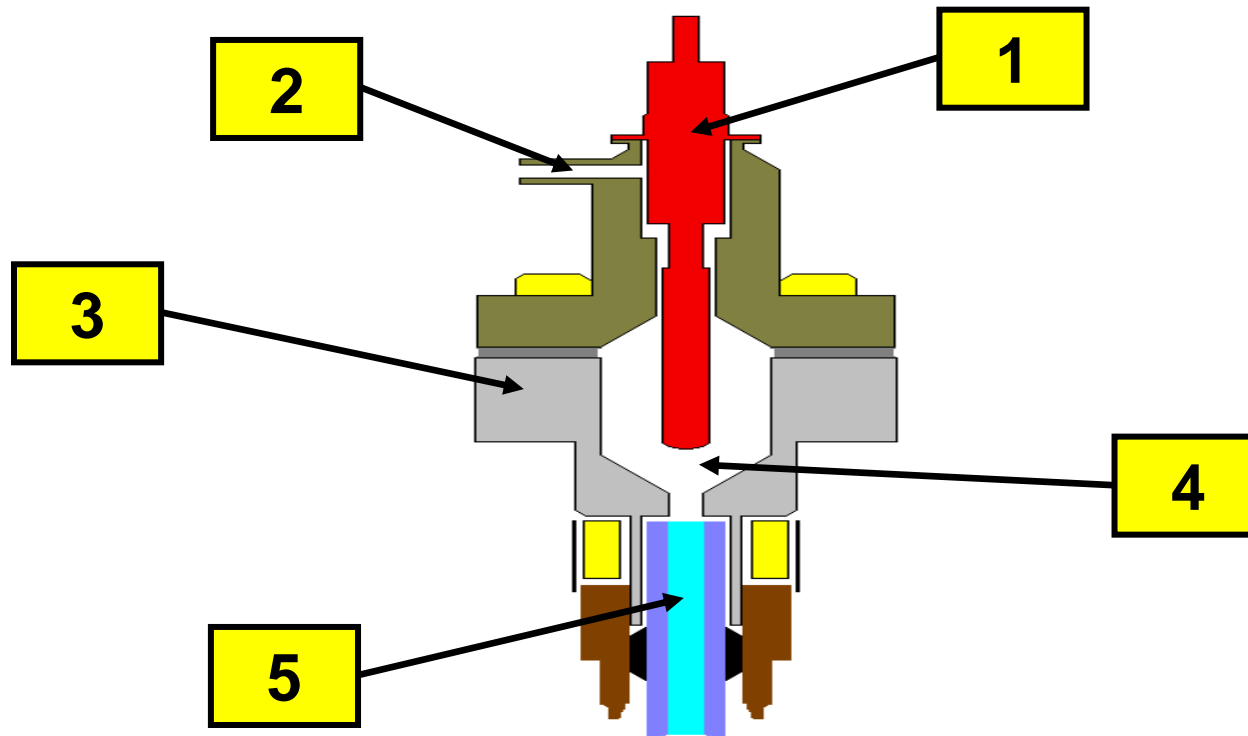


Um fluxo contínuo de elétrons lentos é estabelecido entre um ânodo (fonte radioativa β -emissora) e um cátodo.

Na passagem de uma substância eletrofílica alguns elétrons são absorvidos, resultando uma supressão de corrente elétrica.



DETECTOR QUANTITATIVO: DCE



1 Ânodo (*fonte radioativa β - emissora*)

2 Saída de gases

3 Cátodo

4 Cavidade

5 Coluna cromatográfica

DETECTOR QUANTITATIVO: DCE

Características Operacionais

FONTE RADIOATIVA *O ânodo deve estar dopado com um isótopo radioativo β^- - ou α - emissor*

Emprego universal em DCE comerciais:

^3H (β^- , 0,02 MeV)

*Sob a forma de Ta^3H_3
Maior sensibilidade
 T_{det} deve ser $< 225^\circ\text{C}$*

^{63}Ni (β^- , 0,06 MeV)

*Usado como $^{63}\text{Ni}^0$
Maior linearidade
Útil até $\sim 400^\circ\text{C}$*

^{63}Ni preferido em equipamentos modernos

- Maior durabilidade ($t_{1/2} = 100 \text{ a x } 12 \text{ a}$ para ^3H)
- Maior estabilidade térmica
- Menor risco de uso (radioatividade)

Raramente usados:

^{85}Kr , ^{90}Sr , ^{99}Tc , ^{147}Pm , ^{241}Am , ^{226}Ra

DETECTOR QUANTITATIVO: DCE

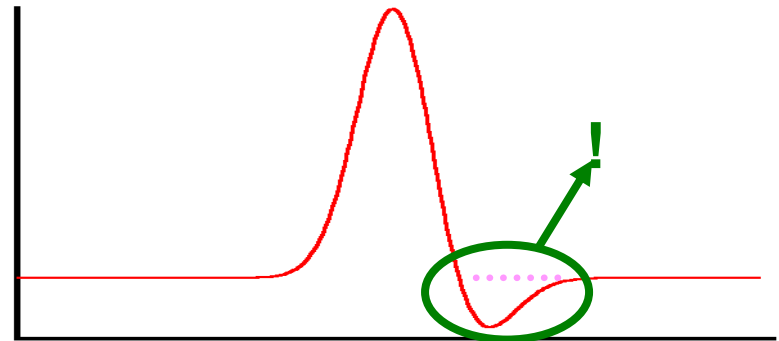
Características Operacionais

GÁS DE ARRASTE *Funcionamento do DCE é muito dependente da natureza do gás de arraste*

MAIS USADOS: $\left[\begin{array}{c} \text{N}_2 \\ \text{Ar} + 5\% \text{CH}_4 \end{array} \right]$ *Geram eletrons lentos quando bom-bardeados com β^-*

O gás deve ser o mais puro possível !!!
(traços de H_2O e O_2 comprometem o sinal do DCE)

→
Adsorção de contaminantes sobre os eletrodos causa deformação nos picos



VAZÃO DE GÁS DE ARRASTE *Sinal depende diretamente da vazão de gás fluindo no detector*

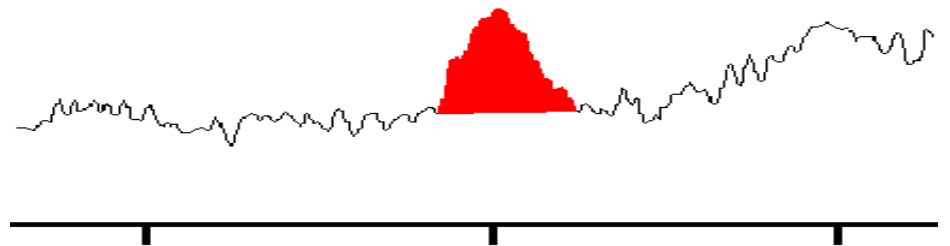
$A \propto \frac{1}{F}$ → $F \downarrow$ → Sinal \uparrow

DETECTOR QUANTITATIVO: DCE

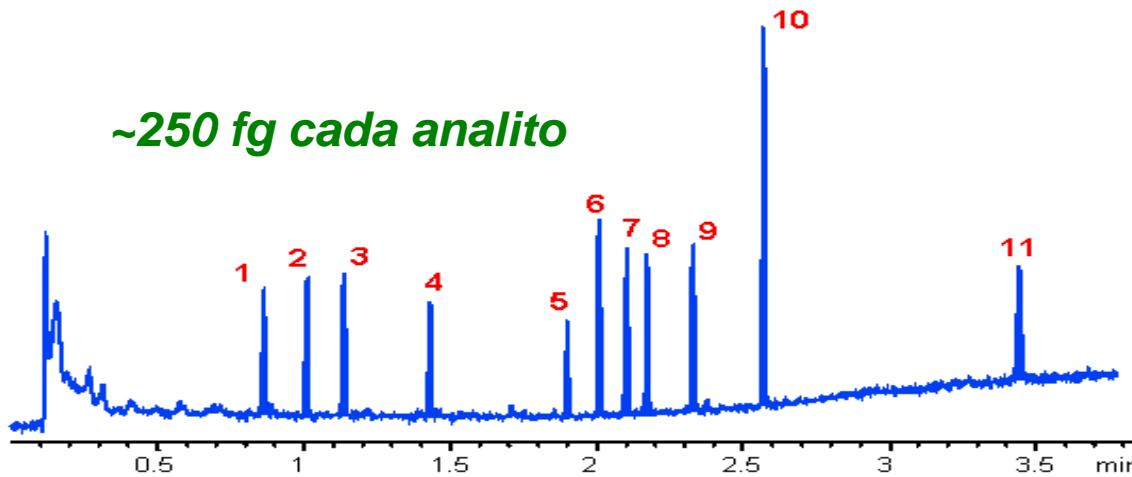
Características Operacionais

SENSIBILIDADE / LINEARIDADE QMD = 0,01 pg a 1 pg (organoclorados),
linearidade ~ 10^4 (pg a ng)

10 fg Lindano (C_6H_6)
 μ -ECD HP-6890



~250 fg cada analito



- PESTICIDAS**
- 1 Tetracloro-m-xileno
 - 2 α - BHC
 - 3 Lindano
 - 4 Heptachlor
 - 5 Endosulfan
 - 6 Dieldrin
 - 7 Endrin
 - 8 DDD
 - 9 DDT
 - 10 Metoxychlor
 - 11 Decaclorobifenila

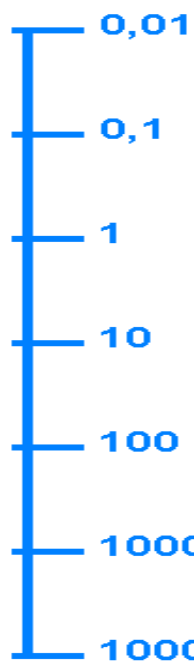
O DCE É O DETECTOR PREFERENCIAL PARA ANÁLISES DE TRAÇOS DE ORGANOHALOGENADOS E SIMILARES

DETECTOR QUANTITATIVO: DCE

Características Operacionais

SELETIVIDADE / FATORES DE RESPOSTA Valores de *S* maximizados para compostos eletrofílicos

S típicos (clorobenzeno: *S* = 1)



hidrocarbonetos e esteres alifáticos, dienos

álcoois, cetonas e aldeídos alifáticos, aminas, nitrilas, mono - Cl, mono - F

enóis, oxalatos, mono - Br, di - Cl, hexa - F

tri - Cl, cloretos de ácidos, alquil - Pb, anidridos

mono - I, di - Br, tri - Cl, mono - nitro, CS₂

di - I, tri - Br, poli - Cl, di - nitro, 1,2 - dicetonas, fumaratos, organo - Hg

Comparando-se organohalogenados

$I > Br > Cl > F$

Terc > Sec > Prim

Tri > Di > Mono

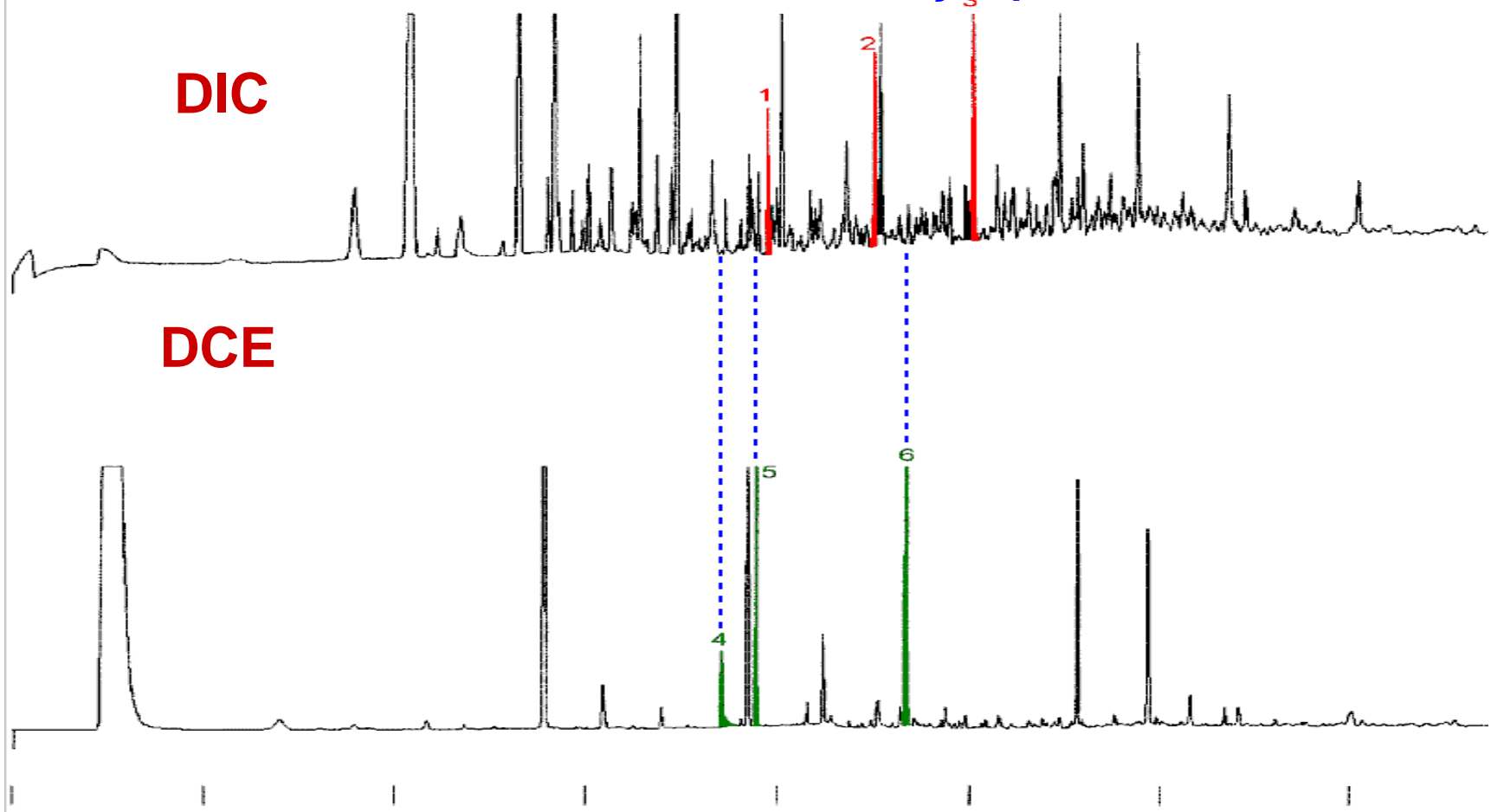
$\alpha > \beta > \gamma$

trans > cis

DETECTOR QUANTITATIVO: DCE

Aplicações

Contaminantes em ar atmosférico - detecção paralela DIC + DCE



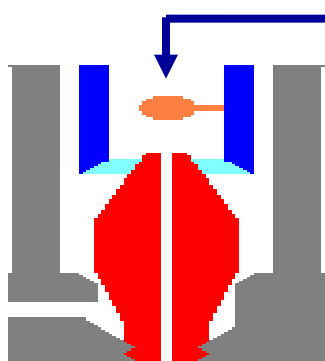
1, 2, 3 - Hidrocarbonetos aromáticos

4, 5, 6 - Hidrocarbonetos clorados

DETECTOR QUANTITATIVO

Detector de Nitrogênio – Fósforo (DNF)

Modificação do DIC altamente seletiva para compostos orgânicos nitrogenados e fosforados



Pérola de sal de metal alcalino:
RbCl (normal), KCl

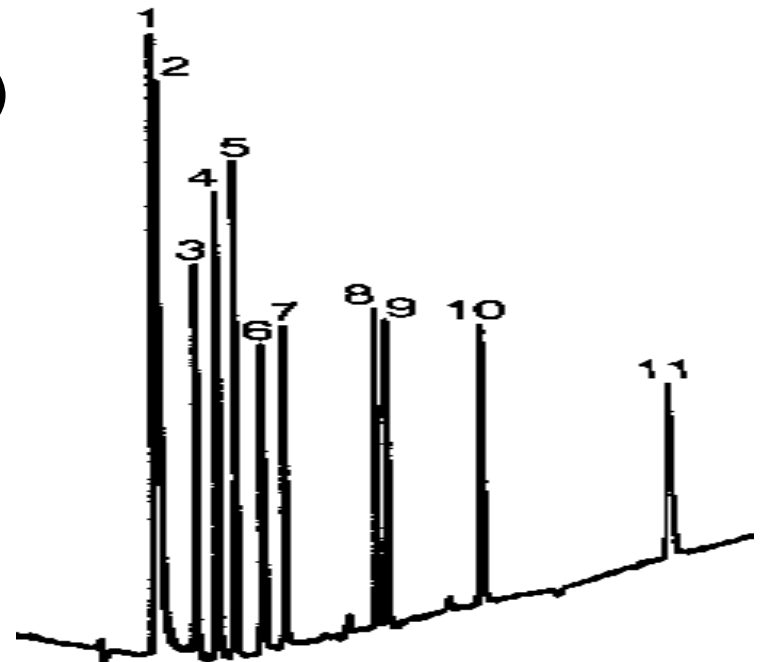
Seletividade S para fosforados ou nitrogenados: 10.000 a 100.000 > que hidrocarbonetos similares

QMD = 0,4 pg a 10 pg (N) e 0,1 a 1 pg (P)

Pesticidas Triazínicos usando DNP:

- 1 *Desetilatrazina*
- 2 *Desisopropilatrazina*
- 3 *Atraton*
- 4 *Atrazina*
- 5 *Trietazina*
- 6 *Secbumeton*
- 7 *Sebutilazina*
- 8 *Simetrin*
- 9 *Dipropretrina*
- 10 *Dimetametrina*
- 11 *Metroprotrina*

(100 pg cada)



INSTRUMENTAÇÃO: Detectores

Tabela VIII-4 – Algumas características de detectores comumente usados em cromatografia gasosa

Característica	Condutividade térmica	Ionização em chama	Captura de elétrons	Termiônico
Princípio de operação	Condutividade do gás	Chama de H ₂ + O ₂ (2.000 °C)	Perda de corrente por captura de elétrons	Plasma de H ₂ + O ₂ na presença de metal alcalino
Tempo de resposta	100-150 ms	1 ms	1-5 s	–
Temperatura máxima de operação	450 °C	400 °C	400 °C (⁶³ Ni)	300 °C
Gás de arraste	He, H ₂ , N ₂ , Ar	He, N ₂	N ₂ , Ar + 10% CH ₄	N ₂ (fosforados) He (nitrogenados)
Sensibilidade (g s ⁻¹)	6 x 10 ⁻¹⁰	9 x 10 ⁻¹³ (alcanos)	10 ⁻¹⁴ (CCl ₄)	2 x 10 ⁻¹² (Paration)
Quantidade mínima detectável (g)	10 ⁻⁸ (CH ₄)	2 x 10 ⁻¹² (alcanos)	4 x 10 ⁻¹² (⁶³ Ni)	2 x 10 ⁻¹⁰ (azobenzeno)
Estabilidade	Boa	Excelente	Regular	Regular
Faixa de linearidade	10 ⁴	10 ⁸	100 sem pulsos, 1.000 pulsado	10 ⁴
Seletividade	Universal	Compostos orgânicos	Compostos halogenados, carbonilas, nitratos etc.	Compostos contendo P ou N
Tipo	Não-destrutivo	Destrutivo	Não-destrutivo	Destrutivo
Aplicação (ex.)	Geral	Compostos orgânicos	Pesticidas clorados	Pesticidas fosforados e nitrogenados

CROMATOGRAFIA GASOSA

REFERÊNCIAS

1. AUGUSTO, F. Cromatografia a Gás – Um curso em diapositivo. Disponível em <http://chemkeys.com/br/2000/07/18/cromatografia-a-gas-curso-em-diapositivos/>, consultado em 10/05/12.
2. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. – Princípios de Análise Instrumental, Bookman, 5ª ed., Porto Alegre, 2002.
3. SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. – Princípios de Química Analítica, Thomson Learning Ltda., (8ª ed. americana), São Paulo, 2006.
4. COLLINS, C.H. (coord.) et al. – Fundamentos de Cromatografia, Editora Unicamp, 1ª ed., Campinas, 2006.
5. CIOLA, R. – Fundamentos da Cromatografia a Gás, Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 1985.