

Aula 8

CROMATOGRAFIA – INTRODUÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E PRINCÍPIOS BÁSICOS

META

Discutir a história da Cromatografia e sua evolução;
entender e classificar os diferentes tipos de cromatografia;
entender os princípios básicos que rege a cromatografia

OBJETIVOS

Ao final desta aula, o aluno deverá:
entender o processo evolutivo da cromatografia;
saber diferenciar os tipos de cromatografia;
entender e aplicar os princípios básicos da cromatografia com o intuito de obter o máximo de aproveitamento do sistema cromatográfico.

PRÉ-REQUISITOS

Conhecimento de equilíbrio químico entre diferentes fases

Elisangela de Andrade Passos

INTRODUÇÃO

Na aula anterior foram introduzidos os conceitos sobre os seguintes métodos eletroanalíticos: Potenciometria; Voltametria; e Condutimetria. Foram abordados temas como células eletroquímicas, potenciais em células eletroanalíticas e potenciais de eletrodos.

Nesta aula iremos abordar os aspectos gerais da cromatografia e seus princípios. Discutiremos também um pouco da história da cromatografia e sua evolução instrumental. Baseados no equilíbrio químico que acontece entre duas fases será possível conceber a teoria básica que rege a cromatografia e sua utilização para o melhoramento da eficiência de separações cromatográficas.

HISTÓRICO

Historicamente, os métodos de separação tem origem na antiguidade, (extração, troca iônica, etc), com a “cromatografia em papiro”, descrita por volta de 50 D.C. Bem mais tarde, já no século XIX, alguns estudos de identificação de compostos inorgânicos por cromatografia em papel, realizados por Runge foram publicados em um livro em 1850. Neste mesmo período, Schönbein e Goppelschröder, introduziram a cromatografia em papel ascendente e em 1889, Beyerlink descreveu a cromatografia em camada delgada. No entanto, foram os estudos de Michael S. Tswett, um botânico russo, publicados em 1906 que apresentaram ao mundo a cromatografia. Do grego chroma, com o significado de cor, e “grafia” também do grego graphe, significando escrever. A partir deste período, a pesquisa com cromatografia amplia-se, tornando-se instrumental. Primeiro com a cromatografia gasosa e líquida, e depois todas as variações possíveis entre fases estacionárias e fases móveis.

CLASSIFICAÇÃO

A base de todos os tipos de cromatografia está na partição dos compostos da amostra entre uma fase chamada de estacionária e outra, que se move através desta, denominada de fase móvel. As várias combinações entre fases sólidas, líquidas e gasosas é que permitem a classificação desta técnica em Cromatografia Gasosa (CG), a Cromatografia Líquida (CL) e a Cromatografia com Fluido Supercrítico (CFS) (Tab. 1).

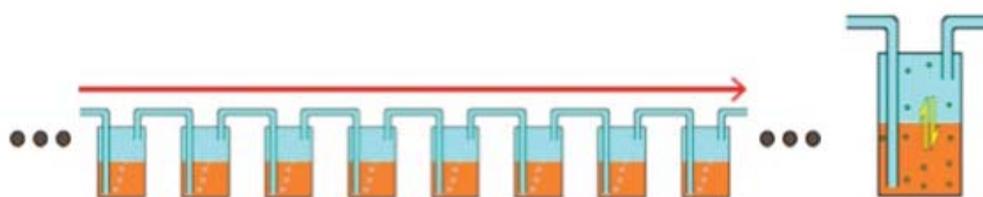
Tabela 1. Classificação da cromatografia conforme natureza das fases

Cromatografia	Fase móvel	Fase estacionária
Gasosa (CG)	Gás	Líquida
		Sólida
Líquida (LC)	Líquida	Líquida
		Sólida
Supercrítica (CFS)	Fluído supercrítico	Líquida
		Sólida

Além dessa classificação, muitas outras são possíveis, dependendo do suporte da fase estacionária (Planar ou Coluna), do tipo de interação dos compostos das amostras (adsorção, partição, exclusão, etc.), e ainda do fluxo da fase móvel, natureza da fase móvel (para Cromatografia Líquida), pressão, etc. Além disso, algumas técnicas afins, tais como a eletroforese, eletroforese capilar e a cromatografia Eletrocinética Micelar Capilar, permitem sua classificação dentro da cromatografia.

PRINCÍPIOS DAS SEPARAÇÕES CROMATOGRÁFICAS

Embora os mecanismos de retenção para os vários tipos de cromatografia diferem entre si, todos são baseados no estabelecimento, como já foi mencionado, de um equilíbrio dos compostos presentes em uma amostra, entre uma fase estacionária e uma fase móvel. A Figura 1 ilustra a separação dos componentes de uma amostra em uma coluna cromatográfica.



Princípio das separações cromatográficas

(Fonte: <http://www.slideshare.net/b.cortez/cromatografia-principios-cg>, acessado em 28/02/2011)

Uma pequena alíquota de amostra é colocada no topo da coluna, recheado com a fase estacionária e adicionada de solvente. Uma vez na coluna, a amostra é carregada (eluída) com um solvente apropriado (fase móvel) adicionado à coluna. Os componentes individuais da amostra interagem diferentemente com a fase estacionária e a fase móvel,

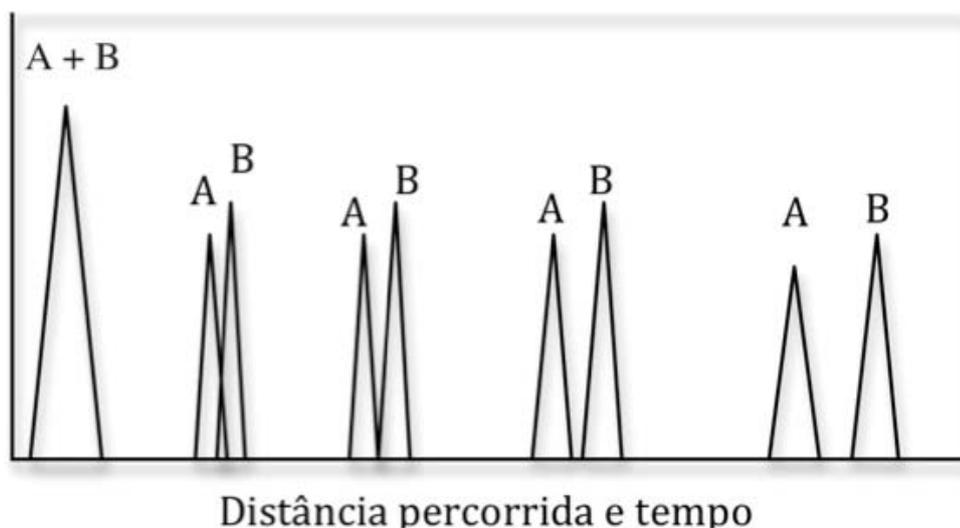


Assim, podemos escrever uma constante de distribuição entre as duas fases, segundo equação (1):

$$K_c = \frac{[A]_{est}}{[A]_m} \quad (1)$$

Onde $[A]_{est}$ é a concentração da espécie A na fase estacionária no equilíbrio e $[A]_m$ é a concentração de A na fase móvel. Essa constante de equilíbrio é governada pela temperatura, o tipo de composto e as fases móveis e estacionárias empregadas na separação. Dessa forma, por exemplo, espécies com alto valor de K_c têm maior afinidade pela fase estacionária, e portanto ficarão mais retidas na coluna cromatográfica.

A Figura 2 ilustra a distribuição de duas espécies A e B em uma coluna cromatográfica durante a separação. Se medirmos a concentração da espécie que deixa a coluna em um determinado tempo, o gráfico resultante será denominado cromatograma. Note que a medida que ocorre a separação, os picos correspondentes aos compostos separados (ou analitos) vão alargando. Esse alargamento, apesar de indesejável, não significa a perda do analito, pois a área sob o pico continua a mesma.

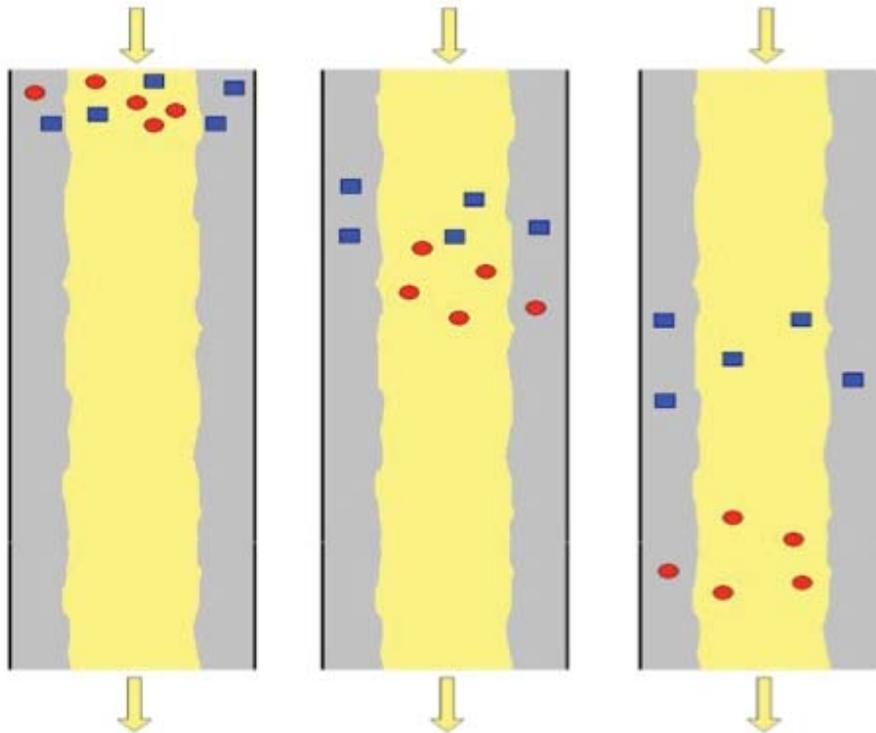


Distribuição de duas substâncias A e B em uma típica separação cromatográfica.

TEORIA BÁSICA

O alargamento dos picos em um cromatograma (Fig. 2) ocorre devido a uma série de fatores, influenciando na eficiência da separação. Baseado em alguns parâmetros obtidos no próprio cromatograma, podemos medir a eficiência de uma coluna cromatográfica e avaliar os fatores que contribuem para isto. Assim, temos:

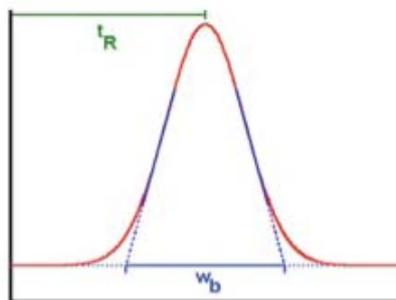
Pratos Teóricos (N): A eficiência de uma separação de uma coluna pode ser medida em termos de número de pratos teóricos. Um prato teórico pode ser pensado como sendo o equilíbrio de partição que acontece em um determinado intervalo de tempo, ou seja, cada “estágio de equilíbrio” é chamado de Prato Teórico (Fig. 3).



Representação esquemática da série de estágios independentes onde acontece o equilíbrio entre o analito dissolvido na fase estacionária e na fase móvel.

Fonte: <http://www.slideshare.net/b.cortez/cromatografia-principios-cg>, acessado em 28/02/2011

Baseado nas informações obtidas a partir do cromatograma (Fig. 4), podemos obter o número de pratos teóricos de uma coluna, ou seja, podemos medir sua eficiência. Quanto maior o número de pratos teóricos apresentado por uma coluna, maior será sua eficiência. Assim sendo, o número de pratos teóricos podem ser obtido da seguinte maneira:



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

Obtenção do número de pratos teóricos a partir dos dados do cromatograma

onde N é o número de pratos de uma coluna, T_R é o tempo de retenção de um determinado composto e w_b é a largura do pico, medido em unidades de tempo.

Altura Equivalente de um Prato Teórico (H): Podemos definir como sendo a altura de cada estágio de equilíbrio que acontece ao longo de uma separação cromatográfica. Matematicamente, pode-se escrever a equação (2):

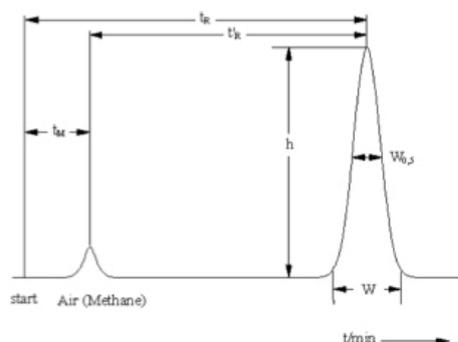
$$H = \frac{L}{N} \quad (2),$$

onde L é comprimento da coluna. Uma coluna eficiente apresenta H pequeno, ou seja, quanto menor o H mais eficiente será a coluna cromatográfica.

Fator de retenção ou capacidade (k'): Como a medida das concentrações do analito A em cada uma das fases é impraticável, podemos obter, a partir da equação fundamental e dos dados do cromatograma uma relação entre o fator de retenção e o tempo de retenção do analito, como segue (Fig. 5):

$$\text{Equação Fundamental da Cromatografia} \quad V_R = V_M + K_c V_s \quad (3),$$

onde t_R e t_M são os tempos de retenção e tempo morto do analito A , respectivamente.



$$k' = \frac{\text{mols}A_{est}}{\text{mols}A_m} \Rightarrow k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Obtenção do fator de retenção ou capacidade a partir dos dados do cromatograma.

(Fonte: <http://www.tu-cottbus.de/zal/zal/prakt/orgaanal.htm> acessado em 28/02/2011)

Seletividade (α): Também conhecida como fator de separação, é uma medida da separação entre dois picos em um cromatograma. Se temos dois picos A e B , o primeiro com tempo de retenção igual a t_{rA} e o segundo com o tempo de retenção t_{rB} , podemos obter o valor α da seguinte maneira,

$$\alpha = \frac{t_{rB} - t_M}{t_{rA} - t_M} = \frac{t_B}{t_A} \quad (4)$$

Resolução (R_s): Assim como a seletividade, é uma medida da separação de dois picos em um cromatograma. A resolução, no entanto, leva também em consideração a largura dos picos, portanto, torna-se uma ferramenta muito mais útil do que a própria seletividade. Considerando dois picos A e B, com tempos de retenção t_{rA} e t_{rB} e largura w_A e w_B , podemos calcular a resolução através da relação:

$$R_s = \frac{2(t_{rB} - t_{rA})}{w_A + w_B} \quad (5)$$

Assim sendo, otimizando todos os parâmetros supracitados, pode-se chegar à melhor separação cromatográfica possível, com picos bem separados e resolvidos.

LEIA MAIS

Para entender as informações acima citadas leia o artigo intitulado “Cromatografia: uma breve revisão” que estão disponíveis na plataforma. Em seguida, faça um resumo sucinto das principais idéias de cada texto.

CONCLUSÃO

Após uma pequena introdução histórica, nesta aula foram apresentados e discutidos os princípios básicos de cromatografia e a relevância destes na melhoria dos processos de separação cromatográficas. Foram apresentados termos como Resolução, Seletividade, Prato teórico e Altura equivalente a um prato teórico. Todos estes termos são fundamentais para entender e avaliar a eficiência da análise por cromatografia.



RESUMO

Apesar da cromatografia ter evoluído nos últimos anos, o princípio de separação é válido para todos os diferentes tipos de cromatografia. É de fundamental importância o conhecimento dos princípios de equilíbrio químico, pois a separação cromatográfica nada mais é do que o equilíbrio de partição de uma analito entre duas fases, uma móvel e outra estacionária. As diferentes combinações entre fases móveis e estacionárias permitem a classificação da cromatografia em três grandes grupos: a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida e a cromatografia com fluido supercrítico. A otimização das condições cromatográficas e consequente melhora em sua eficiência pode ser avaliada a partir dos dados presentes no cromatograma, que é a resposta gráfica do processo cromatográfico. Parâmetros como Pratos Teóricos, Resolução e Seletividade são fundamentais para entender e melhorar uma separação em cromatografia.



ATIVIDADES

Dois compostos, heptano e tolueno, com tempos de retenção de 15,4 min e 16,5 min, respectivamente, foram separados em uma coluna empacotada de 1,0 m de comprimento. O tempo de retenção de uma espécie não retida foi de 1,8 min. As larguras dos picos medidas em suas bases foram 1,15 min para o heptano e 1,20 min para o tolueno. Com base nessas informações, calcule:

- A resolução dos picos
- O número de pratos teóricos em relação ao heptano
- O fator de retenção k' para o tolueno

COMENTARIO SOBRE AS ATIVIDADES

a) Dado a equação da resolução, podemos substituir os valores dos tempos de retenção dos dois analitos (Heptano e Tolueno) e suas respectivas larguras. Vale lembrar que, dado os valores de retenção, verificamos que o heptano é o primeiro composto a deixar a coluna, portanto, na equação, seu tempo será representado por t_{rA} e sua largura w_A , enquanto que o tolueno terá seu tempo de retenção descrito como t_{rB} e largura w_B . Dessa forma, substituindo os valores e resolvendo a questão, temos:

$$R_s = \frac{2(16,5 - 15,4)}{1,15 + 1,20} = 0,94$$

b) Como o número de pratos teóricos depende de um único pico no cromatograma, podemos calculá-lo em função do heptano. Uma alternativa seria calcular para ambos os analitos e obter a média. Para o heptano, precisamos apenas do seu tempo de retenção e da largura do pico. Prontamente obtemos esse valores das informações fornecidas, assim:

$$N = 16 \left(\frac{15,4}{1,15} \right)^2 = 2869$$

c) Apesar de relacionar a quantidade de analito entre duas fases, o fator de retenção de um determinado composto é função apenas do seu tempo de retenção e do tempo de retenção de um composto não retido (tempo morto), assim, utilizando os valores dados, temos:

$$k' = \frac{(16,5 - 1,8)}{1,8} = 8,2$$



AUTO-AVALIAÇÃO

- Entendo o processo evolutivo da cromatografia?
- Diferencio os tipos de cromatografia e entender a razão de sua classificação?
- Consigo entender e aplicar os princípios básicos da cromatografia?



PRÓXIMA AULA

Na próxima aula discutiremos as características da instrumentação moderna para cromatografia líquida e gasosa

REFERÊNCIAS

- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8 ed. Americana. Ed. Thomson; São Paulo, 2007.
- CHRISTIAN, G.D. *Analytical Chemistry*, 6 ed. Ed. John Wiley & Sons Inc, EUA, 2004.
- KEBBEKUS, B.B.; MITRA, S. *Environmental Chemical Analysis*. 1a Edição. Ed. CRC press company, EUA, 1998.
- DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. **Cromatografia**: uma breve revisão. *Química Nova na Escola*, n.7, 1998.