

Aula 9

CROMATOGRAFIA GASOSA, CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E SUAS APLICAÇÕES

META

- entender os princípios da Cromatografia gasosa e sua instrumentação;
- entender os princípios da Cromatografia líquida de alta eficiência, seus diferentes tipos e instrumentação;
- estudar as fases estacionárias e colunas para cromatografia;
- estudar as aplicações da cromatografia.

OBJETIVOS

- Ao final desta aula, o aluno deverá:
- conhecer os princípios da cromatografia gasosa e líquida, suas diferenças, vantagens e desvantagens;
- conhecer as diferentes fases estacionárias utilizadas em cromatografia;
- conhecer os componentes básicos de uma cromatógrafo;
- conhecer as possíveis aplicações da cromatografia.

PRÉ-REQUISITOS

- Conhecimento dos princípios básicos da cromatografia.

Elisangela de Andrade Passos

INTRODUÇÃO

Na aula anterior foram abordados os aspectos gerais da cromatografia e seus princípios. Foram discutidos um pouco da história da cromatografia, sua evolução instrumental e a eficiência das separações cromatográficas.

Nesta aula iremos abordar os aspectos gerais da cromatografia gasosa e líquida. Iremos conhecer quais são os principais componentes de um cromatógrafo e suas implicações nas análises. Também veremos os diferentes tipos de fases estacionárias que são utilizadas em cromatografia gasosa e líquida e suas aplicações. Por fim, iremos abordar sucintamente as várias aplicações da técnica e entender quando usar a cromatografia gasosa em detrimento à cromatografia líquida e vice versa.

CROMATOGRAFIA GASOSA

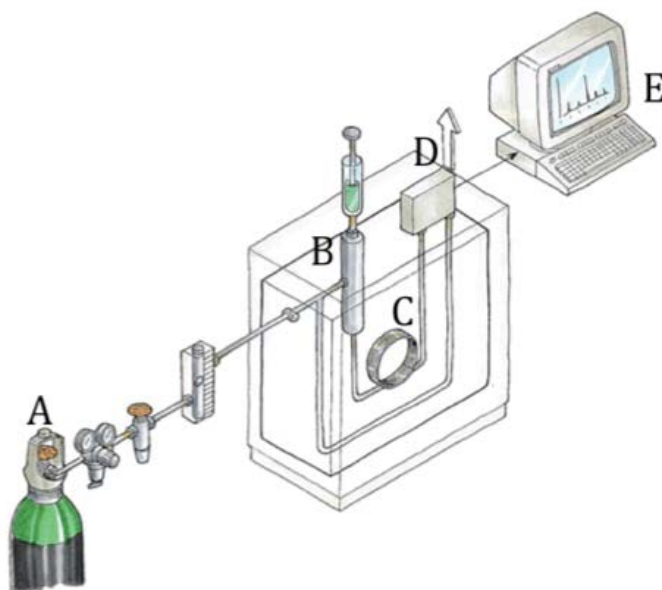
Vimos na aula anterior que o princípio básico da cromatografia é a partição de um composto entre duas fases, uma móvel e outra estacionária. Vimos também que a classificação dos tipos de separações cromatográficas é devido à fase móvel. Dessa forma, quando falamos de cromatografia gasosa, devemos entender que a fase móvel é um gás e a fase estacionária pode ser um líquido ou sólido.

Assim sendo, em cromatografia gasosa, o eluente ou fase móvel é um gás inerte, geralmente hélio, hidrogênio e nitrogênio. Na verdade, o efeito do gás de arraste na separação é mínimo, pois esta é governada mais pela volatilidade de cada componente de uma amostra e sua interação com a fase estacionária.

Basicamente, podemos considerar que um sistema para cromatografia gasosa consiste de três itens básicos: Um sistema de injeção, uma coluna e seu controlador de temperatura e um detector. Dessa forma, uma amostra contendo os componentes a serem separados é colocada ou injetada em uma coluna. Esta por sua vez vai separar estes componentes enquanto os mesmos são transportados pelo gás de arraste, chegando ao detector, que fará um registro daquilo que chega até ele, normalmente relacionado à sua quantidade. Devido a sua característica, a cromatografia gasosa deve ser utilizada quando os componentes a ser separado possuírem boa volatilidade ou possam ser convertidos em compostos voláteis. Isto porque, para que haja a separação, ou melhor, para que os analitos não fiquem totalmente retidos na fase estacionária, os mesmos deverão eventualmente estar na fase móvel (equilíbrio de partição). Por isso a importância de um controlador de temperatura para a coluna, pois a volatilidade é diretamente proporcional ao aumento da temperatura, isto é, quanto mais quente, maior a quantidade de uma substância que passa da fase líquida para a fase gasosa.

INSTRUMENTAÇÃO

Como vimos anteriormente, um cromatógrafo gasoso pode ser dividido em três componentes principais, um sistema de injeção, uma coluna e seu controlador de temperatura (forno) e um detector. Claro que, por ser a fase móvel um gás, precisaremos também de um reservatório para o gás de arraste. Podemos ter também, associado ao detector um processador (computador). Além disso, dependendo do detector utilizado, este pode ou não necessitar de mais gases para o seu funcionamento (Fig. 1)



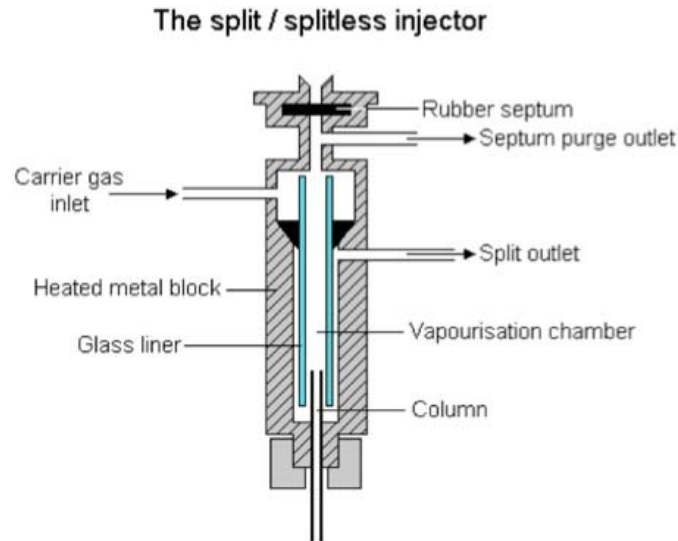
Componentes de um cromatógrafo gasoso. Reservatório do gás de arraste – A; Injetor – B; Coluna e forno – C; Detector – D; Processador do sinal do Detector – E.

Fonte: [http://hiq.linde-gas.com.br/international/web/lg/br/like35lgspgbr.nsf/repositorybyalias/ana_meth_gc/\\$file/GC_principle.gif](http://hiq.linde-gas.com.br/international/web/lg/br/like35lgspgbr.nsf/repositorybyalias/ana_meth_gc/$file/GC_principle.gif) acessado em 03/03/2011

Gás de arraste (fase móvel): Um gás de arraste tem que possuir certas características, porém a mais importante é, como citado anteriormente, ser inerte. Um gás inerte será aquele que não reage com a amostra nem com a fase estacionária nas temperaturas utilizadas na separação. Além disso, deve ter alto grau de pureza, preferencialmente barato e compatível com o detector utilizado. Normalmente em cromatografia gasosa são utilizados como gás de arraste o Hélio, o Hidrogênio ou o Nitrogênio.

Injetor: Um bom sistema de injeção, capaz de introduzir na coluna com boa reprodutibilidade uma pequena quantidade de amostra, é fundamental no processo de separação cromatográfico. O injetor mais comum utilizado em cromatografia gasosa é o Injetor do tipo Split-Splitless (Fig. 2). Esta porta de injeção é constituída por um septo (rubber septum), pelo qual o dispositivo de descarga da amostra passa (por exemplo, uma micro-seringa), um insertor (liner), utilizado para proteger a câmara de vaporização (va-

pourisation chamber), a entrada do gás de arraste (Carrier gas inlet), a saída de purga do septo (septum purge outlet) e a saída para a válvula de Split (Split outlet). Este injetor tem como função principal vaporizar a amostra, fazendo com que parte dela seja introduzida na coluna.

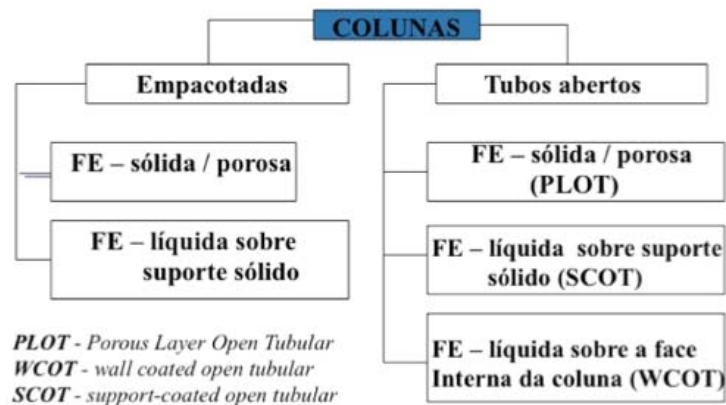


Injetor tipo Split-Splitless

<http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/splitinj.gif> acessado em 03/03/2011

Além deste tipo de injetor, outros tantos são utilizados, com menor frequência, em cromatografia gasosa, tais como Purga e Armadilha (purge and trap), Dessorção Térmica (thermal desorption), Pirolisador, entre outros.

Colunas: Podemos dizer que a coluna é o coração do processo de separação. Em sistemas de cromatografia gasosa, elas estão inseridas em um forno de temperatura variável. Podem ser classificadas de acordo com o tipo de tubo e empacotamento (Fig. 3)



Tipos de colunas para sistemas de cromatografia líquida

Normalmente, a decisão entre o uso de uma coluna empacotada ou coluna aberta está baseado no tipo de amostra a ser estudada. Quando há necessidade de determinação de gases e moléculas muito voláteis, tem-se preferência pelo uso de colunas empacotadas, pois estas apresentarão melhores resultados de resolução, por exemplo. Outro fator onde é preferível o uso de colunas empacotadas é a concentração da amostra. Se a amostra for muito concentrada no analito que se quer determinar, então opta-se pelo uso de coluna empacotada. Por outro lado, quando temos amostras complexas e com baixa concentração, utilizamos colunas tubulares, ou melhor, conhecidas como colunas capilares.

O termo coluna capilar surge devido ao seu pequeno diâmetro. Enquanto as colunas empacotadas pode ter até 5 mm de diâmetro, as colunas capilares possuem valores típicos de diâmetro em torno de 0,32 mm. Devido ao seu avanço e a possibilidade de uma infinidade de fases estacionárias, as colunas capilares são dominantes em sistemas cromatográficos gasosos, deixando as colunas empacotadas restritas às determinações de gases e compostos muito voláteis.

As colunas capilares são revestidas com uma película de Poliimida, o que confere às colunas grande flexibilidade. Internamente, elas possuem uma fina camada de fase estacionária (espessura variando entre 0,1 e 10 μm), que pode ser sólida ou líquida. É graças às inúmeras possibilidades de revestimentos (fases estacionárias), que a cromatografia gasosa com coluna capilar encontra uma vasta aplicabilidade (Tab. 1)

Tabela 1. Algumas fases estacionárias líquidas utilizadas em colunas capilares

Fase Estacionária	Nome comercial	Temperatura máxima(oC)
Polidimetilsiloxano	OV-1, HP1	350
5% fenil-polidimetilsiloxano	OV-3, DB5	350
50% fenil-polidimetilsiloxano	OV-17	250
50% trifluorpropil polidimetilsiloxano	OV-210	200
Polietileno Glicol	Carbowax 20M	250

Detectores: Após o analito atravessar a coluna, ele é direcionado para um ou mais detectores. Sua passagem ou chegada ao detector produz um sinal que é proporcional à quantidade ou concentração presente no detector em um dado momento. O sinal produzido, que varia entre os diferentes tipos de detectores, é escritos na forma de um gráfico, denominado de cro-

matograma, que mostra a magnitude do sinal versus o tempo. Ou seja, como vimos na aula anterior, o pico cromatográfico informará além da quantidade de material correspondente ao analito, o seu tempo de retenção na coluna.

A resposta de um detector varia de acordo com a classe de compostos analisados. O detector de condutividade térmica, por exemplo, é denominado de detector universal, pois pode ser utilizado para a detecção de qualquer composto. Já o detector fotométrico de chamas, é utilizado para a determinação de compostos contendo enxofre e/ou fósforo.

Independente do tipo de detector, as características fundamentais que eles devem apresentar são: Alta sensibilidade, estabilidade, boa linearidade e de preferência que tenha um volume interno pequeno.

A seguir são apresentados alguns detectores, seu princípio de análise e aplicações (Tab. 2)

Tabela 2. Comparação entre alguns detectores utilizados em Cromatografia gasosa.

Detector	Princípio	Aplicação
TCD Detector de condutividade térmica	Mudança de condutividade	Universal
FID Detector de ionização em chama	Queima e ionização	Universal para hidrocarbonetos
ECD Detector de captura de elétrons	Compostos eletronegativos capturam elétrons	Seletivo para halogênios
PID Detector de fotoionização	Compostos ionizados por luz UV	Seletivo para aromáticos

LEIA MAIS

Para entender as informações acima citadas leia o artigo intitulado “Acoplamento cromatografia gasosa - espectrometria de absorção atômica em estudos de especiação: uma revisão“ que estão disponíveis na plataforma. Em seguida, faça um resumo sucinto das principais idéias de cada texto.

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

A cromatografia líquida, tal qual vimos anteriormente, é também um processo onde a separação de um composto ocorre pelo equilíbrio deste entre duas fases. Neste caso, entre uma fase estacionária sólida ou líquida e

uma fase móvel líquida. Historicamente, a cromatografia líquida não necessita necessariamente de uma instrumentação adequada, bastando dispor de uma coluna recheada com a fase estacionária por onde passa a fase móvel.

No entanto, devido os avanços tecnológicos, muito tem sido desenvolvido em relação a técnica cromatográfica, e não seria a Cromatografia Líquida a única a não experimentar esse desenvolvimento. Por isso, ela é conhecida normalmente como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Este fato, por si só, torna a cromatografia líquida de alta eficiência o tipo mais versátil e mais amplamente empregado de cromatografia por eluição.

O tipo e classificação de cromatografia líquida de alta eficiência é geralmente definido pelo mecanismo de separação ou pelo tipo de fase estacionária (Tab. 3).

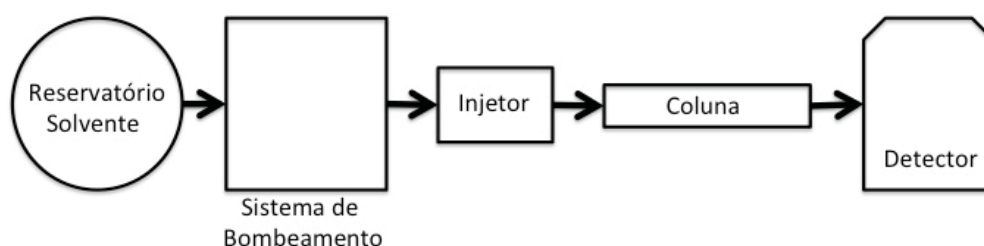
Tabela 3. Classificação simplificada da cromatografia líquida

Classificação	Fase Estacionária	Mecanismo de Separação
Líquido-líquido ou partição	Líquido Adsorvido em um sólido	Partição entre líquidos imiscíveis
Líquido-sólido ou adsorção	Sólido	Adsorção
Troca iônica	Resina de troca iônica	Troca Iônica
Exclusão por tamanho	Gel polimérico	Filtração

Podemos ainda ampliar a classificação da cromatografia líquida de alta eficiência de partição com base nas polaridades relativas das fases estacionária e móvel. Dessa forma, temos: Cromatografia de fase normal, onde a fase estacionária é polar e a fase móvel é apolar e a Cromatografia em fase reversa, onde a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar.

INSTRUMENTAÇÃO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é um tipo de cromatografia que emprega uma fase móvel líquida e uma fase estacionária finamente dividida. Por esta razão, a cromatografia líquida requer o uso de equipamentos sofisticados capazes de suportar altas pressões. Basicamente, um cromatógrafo líquido pode ser dividido em 5 partes: Reservatório e sistema de tratamento de solventes; Sistema de bombeamento; Injetor; Coluna e Detector (Fig. 4)



Esquema de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência

Reservatório e Sistema de Tratamento de Solventes: o reservatório consiste em um ou mais recipientes onde o solvente utilizado como fase móvel é armazenado e o sistema de tratamento consiste em um aparelho degasificador, que retira os gases dissolvidos na fase móvel. Quando apenas um solvente é utilizado ou quando dois ou mais solventes são utilizados em proporções fixas durante toda a separação, esta é chamada de eluição isocrática. Quando a mistura de solventes varia durante a análise, é chamada de eluição gradiente.

Sistema de Bombeamento: É um sistema de uma ou mais bombas que geram altas pressões, com boa reprodutibilidade de vazão, resistência à corrosão, etc. Há três tipos básicos de bombas utilizadas em cromatografia líquida de alta eficiência: a de seringa acionada por rosca; a bomba recíproca e a bomba pneumática de pressão constante.

Injetor: O método mais empregado em cromatografia líquida de alta eficiência para introdução da amostra é baseado em um sistema de alça de amostragem, onde um determinado volume é colocado na alça e depois liberado para a coluna através da mudança da direção do fluxo da fase móvel. Esse sistema de alça também é empregado mesmo quando o equipamento dispõe de auto-amostrador.

Coluna: Assim como na cromatografia gasosa, existe uma variedade imensa de colunas para cromatografia líquida. Estas colunas consistem de um tubo de aço inoxidável recheado com a fase estacionária. Por esta razão, varia em comprimento, diâmetro, tamanho de partícula e tipo de fase estacionária, dependendo da aplicação. Uma coluna analítica típica para cromatografia líquida de alta eficiência tem entre 10 e 30 cm de comprimento, 0,4 – 1,0 cm de diâmetro e tamanho de partícula 3-5 μm . Já as colunas preparativas são mais robustas, com diâmetro que pode chegar a 5 cm. As fases estacionárias mais utilizadas em cromatografia em fase reversa são as de sílica ligada a cadeias carbônicas de 18 ou 8 átomos (C18 ou C8, respectivamente) e em fase normal a de sílica.

Detector: Um detector ideal deve ser sensível a pequenas concentrações de todos os analitos, fornecer uma resposta linear e não causar alargamento dos picos eluídos. Além disso, ele deve ser insensível às variações de temperatura e composição do solvente. Os tipos de detectores mais utilizados em cromatografia líquida são os de índice de refração, muito utilizado na

determinação de açúcares; fluorescência, para determinação de compostos aromáticos e arranjo de fotodiodo, que vem substituindo o UV-VIS, na determinação de compostos que absorvem a radiação ultravioleta ou visível.

APLICAÇÕES DA CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método empregado de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Nenhum outro método é tão eficaz e de aplicação tão generalizada quanto à cromatografia. Ela permite que sejam determinados diversos compostos em uma única análise. É muito utilizada na indústria alimentícia, no controle de qualidade de seus produtos, na indústria farmacêutica, para separação de princípios ativos. É também utilizada para o monitoramento ambiental e em indústria de petróleo. Enfim, é infindável o número de possíveis aplicações da cromatografia, e este número continua crescendo.

PARA SABER MAIS

Se você se interessou pelo tema e deseja saber mais, consulte os capítulos 31 e 32 do livro Fundamentos de Química Analítica, 8a Edição, Editora Thomson, escrito pelos autores Skoog, West, Holler e Crouch.

CONCLUSÃO

O advento da cromatografia gasosa e cromatografia líquida tem trazido inúmeros benefícios à indústria e à pesquisa. Suas várias possibilidades, onde é possível analisar desde o conteúdo de gases presentes na atmosfera até a concentração de um determinado princípio ativo em um novo medicamento, nos remete a pensar como isso tudo seria feito sem o auxílio desta técnica. Assim sendo, vimos que as determinações cromatográficas são de fundamentais importância para a ciência hoje em dia.



RESUMO

Devido a sua aplicação, podemos dividir a cromatografia em gasosa e líquida. A primeira faz uso de uma fase móvel gasosa, enquanto a segunda, a fase móvel é líquida. Em ambas, a fase estacionária pode ser sólida ou líquida, sendo este líquido, muitas vezes, ligado a um sólido. Um equipamento para cromatografia pode ser dividido em 3 partes: Um sistema de injeção, uma

coluna de separação e um detector. Claro que as necessidades tecnológicas ampliam um instrumento com muitas outras partes, como por exemplo, um processador para o sinal do detector. A sílica é de fundamental importância em cromatografia, seja como parte da estrutura das colunas capilares em cromatografia gasosa, ou como fase estacionária em cromatografia líquida. Não obstante suas diferenças, a cromatografia encontra vasta aplicação, isto muito provavelmente à sua grande versatilidade dado os diferentes tipos possíveis de fases móveis e estacionárias.



ATIVIDADES

1. Qual a diferença entre cromatografia gás-líquido e cromatografia gás-sólido?
2. Quando devo usar uma coluna preparativa em cromatografia líquida de alta eficiência?

COMENTARIO SOBRE AS ATIVIDADES

1. Ambas são classificadas como cromatografia gasosa por possuírem um gás como fase móvel, no entanto, na cromatografia gás-líquido, a fase estacionária é um líquido (polidimetilsiloxano, por exemplo). Sua separação baseia-se no princípio de partição entre a fase móvel e a fase estacionária. Já na cromatografia gás-líquido, a fase estacionária é um sólido e a adsorção tem papel importante na separação.
2. Por definição, uma coluna preparativa, como o próprio nome nos remete a pensar, é uma coluna onde o processo de separação tem como objetivo isolar, em grande quantidade, uma determinada porção da amostra ou um único analito. Assim sendo, se existe a necessidade de separar um princípio ativo de um determinado extrato de planta para testes bioquímicos, uma grande quantidade destes compostos precisa ser isolada, digamos, alguns miligramas. É nessa situação que se faz uso de coluna preparativa, lembrando é claro que, o instrumento deve ser capaz de suportar grandes pressões pois as colunas preparativas são muito maiores do que as colunas analíticas



AUTO-AVALIAÇÃO

- Entendo os princípios da cromatografia gasosa e líquida, suas diferenças, vantagens e desvantagens?
- Consigo diferenciar as fases estacionárias utilizadas em cromatografia?
- Sinto-me capaz de apontar quais são os componentes básicos de um cromatógrafo?
- Conheço as possíveis aplicações da cromatografia?



PRÓXIMA AULA

Na próxima aula discutiremos os métodos de preparo de amostra para análise instrumental.

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.
- CAMPOS R.C.; GRINBERG, P. **Acoplamento cromatografia gasosa - espectrometria de absorção atômica em estudos de especiação: uma revisão** Química Nova, v.24, n.2, p.220-227, 2001.