



Capítulo X

CROMATOGRÁFIA - TEORIA GERAL

Principles of Instrumental Analysis

Skoog, West, Holler, Nieman

Thomson Learning; ISBN: 0030020786

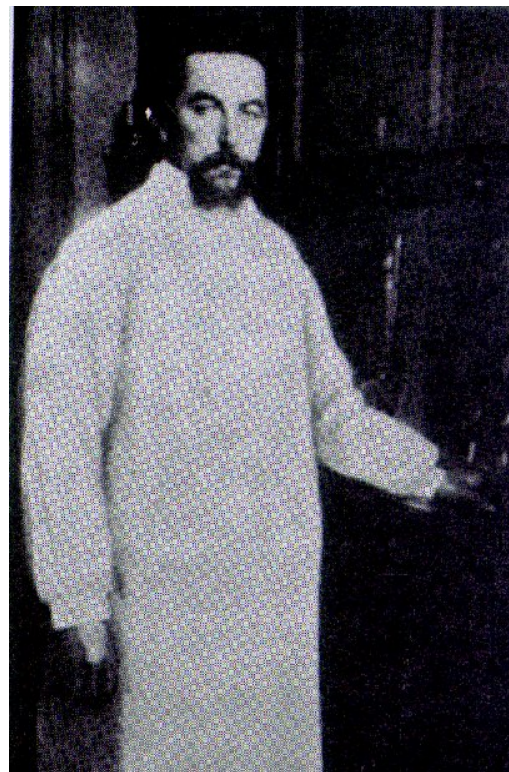
TEORIA GERAL DE CROMATOGRAFIA

Usada abundantemente

Conjunto de técnicas

Separação muito eficiente

Michael Tswett 1906



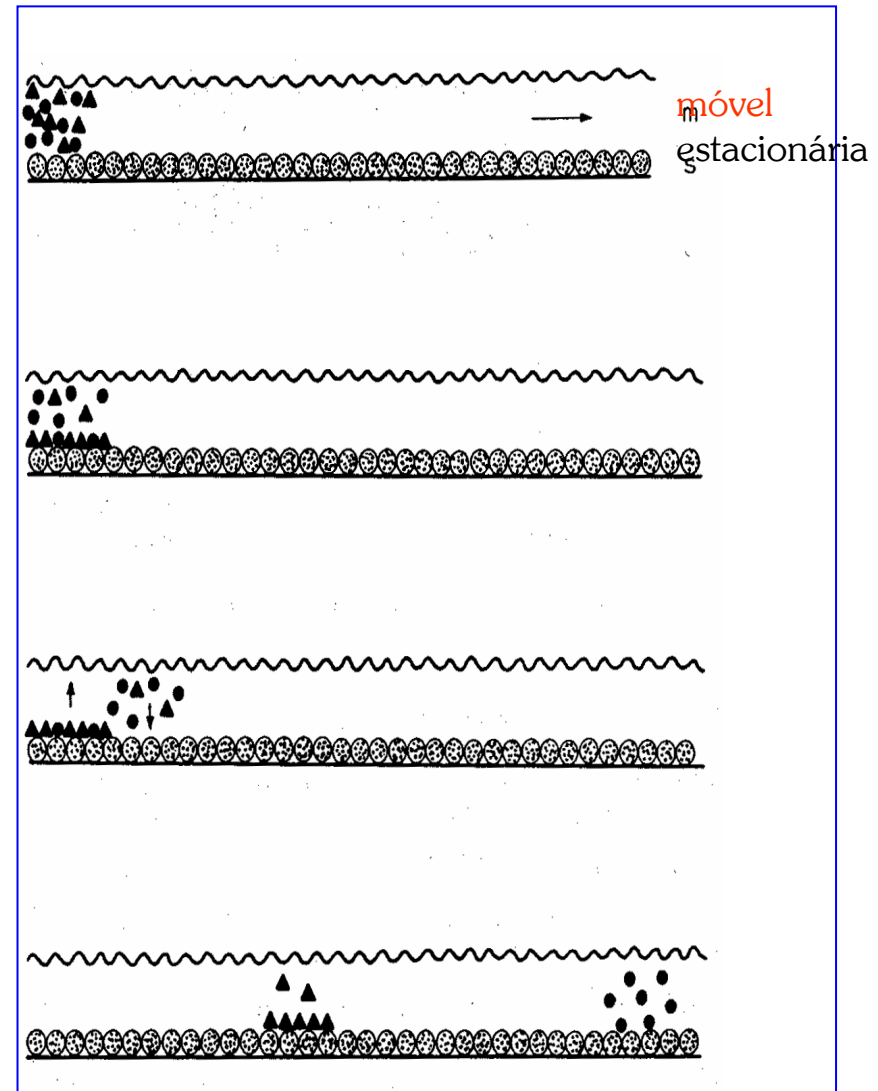
Cromatografia

Usada por Tswett para separar pigmentos de plantas.

- Desde 1906 a 1941 pouca utilização se deu à técnica.
- Em 1941 *Martin e Synge* pretenderam separar amino-ácidos da lã por extracção em contra-corrente (o que não conseguiram). Desenvolveram a *Cromatografia de Partição*.
- Em 1952, A.J.P. Martin e R.L.M. Synge receberam o Prémio Nobel devido ao trabalho desenvolvido em Cromatografia de partição líquido-líquido.
- Em 1952 começou a *Cromatografia em Fase Gasosa*.
- Em 1938 começou a *Cromatografia em Canada Fina* (TLC).

Cromatografia é um método físico de separação, na qual os componentes a serem separados se encontram distribuídos entre duas fases, sendo uma delas uma fase estacionária de grande superfície, e a outra um fluido que circula através ou “por” a primeira.

Todas as cromatografias são baseadas num tempo de retenção ou num tempo de permanência diferente para os vários solutos.



Os vários nomes dados às diferentes técnicas cromatográficas, são inconsistentes:

papel e gel	<i>devido ao suporte cromatografico.</i>
absorção e partição	<i>devido ao tipo de processo físico.</i>
gasosa	<i>devido ao estado da fase móvel.</i>
em coluna	<i>devido ao meio físico em que se processa.</i>
fase reversa	<i>porque é ao contrário do normal (?)</i>
ascendente	<i>devido “ao caminho” dos solventes.</i>

CLASSIFICAÇÃO dos MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Os métodos cromatográficos podem ser de dois tipos:

- **cromatografia em coluna** – a fase estacionária encontra-se dentro de uma coluna e a fase móvel passa através da coluna ou sob pressão ou pela força da gravidade. Quanto à natureza da fase móvel, podemos dividir a cromatografia em coluna em:

- *cromatografia líquida*
- *cromatografia gasosa*
- *cromatografia de fluídos super-críticos*

Tanto a cromatografia líquida como a gasosa ainda podem ser classificadas quanto à natureza da fase estacionária e quanto ao tipo de equilíbrio entre as duas fases

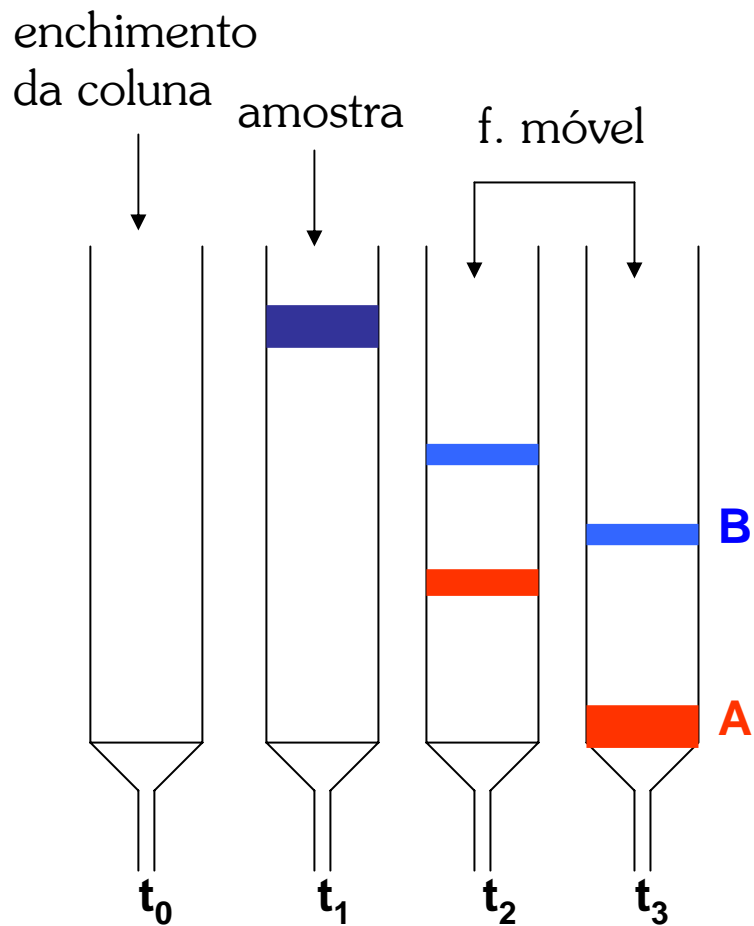
- **cromatografia planar** – cromatografia em papel ou em camada fina.

Classificação dos Métodos Cromatográficos em Coluna

Classificação Geral	fase estacionária	Equilíbrio
cromat. líquida	líq. adsorvido num sólido sólido resina permuta iónica	partição adsorção permuta iónica
cromat. fase gasosa	líq. adsorvido num sólido sólido	partição adsorção
cromat. fluido supercrítico	esp. orgânicas ligadas a uma superfície sólida	partição

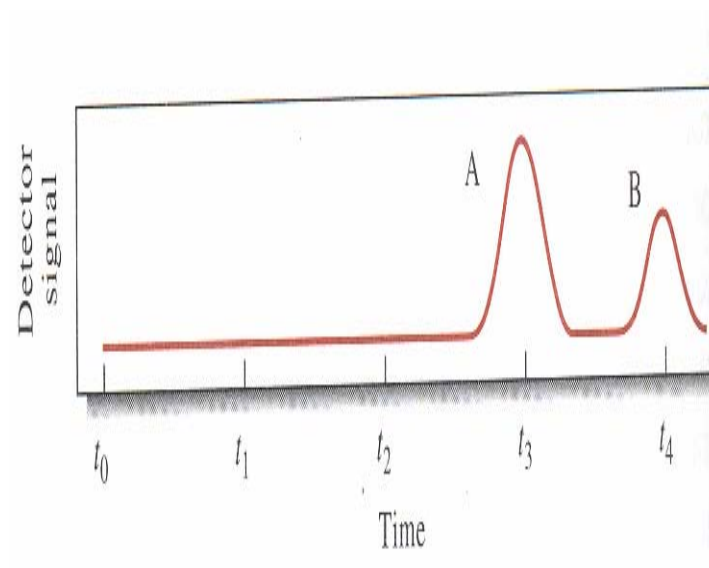
PROCESSO CROMATOGRÁFICO

Exemplo: processo em coluna



Cromatograma

Representação gráfica das concentrações dos solutos em função do tempo



DESCRIÇÃO DE UM PROCESSO CROMATOGRÁFICO

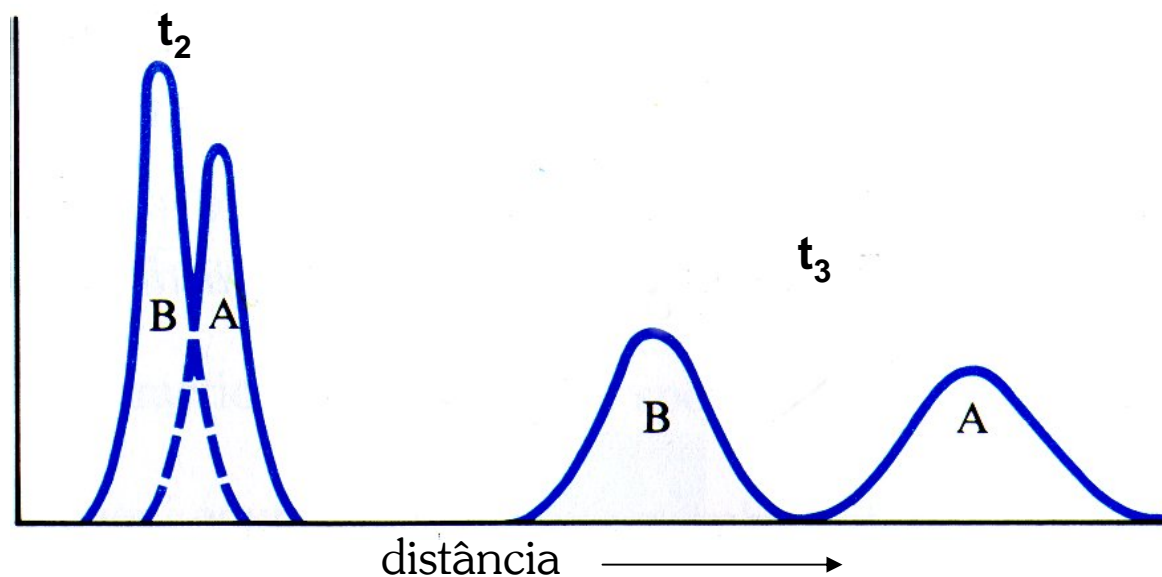
- a coluna é empacotada com a fase estacionária.
- a amostra dissolvida na fase móvel é “carregada” na coluna.
- a fase móvel é passada continuamente pela coluna arrastando a amostra.
- os componentes da amostra são separados e eluídos.
- quanto mais solúvel é um componente na fase móvel, mais depressa é eluída.
- um componente completamente insolúvel na fase móvel ficará no topo da coluna.

Eluição – processo de remoção de todos os componentes da coluna.

Eluente – solvente usado (fase móvel) para remover os componentes da coluna (fase estacionária).

Eluídos – conjunto das componentes separadas e a respectiva fase móvel.

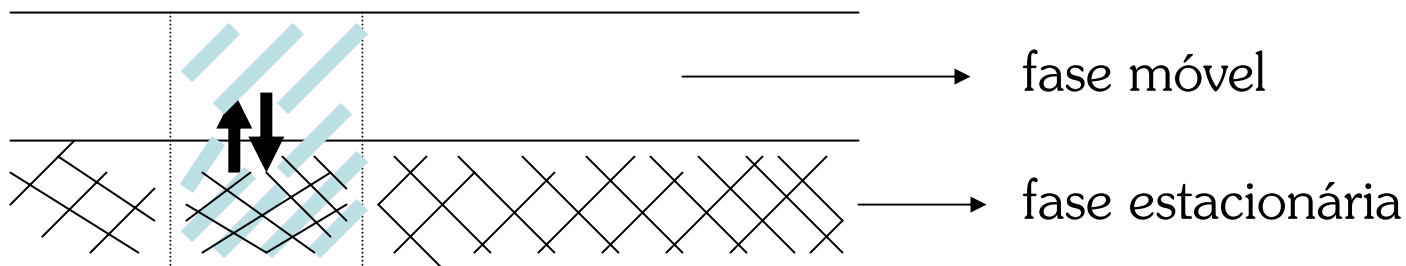
Efeito da velocidade de migração e alargamento das bandas



o alargamento das bandas é inevitável

Apesar de o alargamento das bandas ser inevitável, é possível encontrar condições experimentais que resultam numa melhor resolução do cromatograma.

A eficiência de uma coluna cromatográfica em separar dois componentes depende em parte da velocidade relativa com que as duas espécies são eluídas. Estas velocidades dependem do equilíbrio de distribuição das várias espécies entre a fase móvel e a fase estacionária.



$$K_D = \frac{C_{est}}{C_{móvel}}$$

Coeficiente de Partição

C_{est} – concentração na fase estacionária

$C_{móvel}$ – concentração na fase móvel

Quanto maior o valor de K_D mais tempo o soluto permanece na fase estacionária.

A fracção de tempo total que uma molécula passa na fase móvel está directamente relacionada com a fracção da população total presente na fase móvel:

fracção de tempo na f. móvel = $\frac{n^\circ \text{ moléculas f. móvel}}{n^\circ \text{ total de moléculas}}$

$$\Delta t_M = \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_E V_E}$$

$$\Delta t_M = \frac{\frac{C_M V_M}{C_M V_M + \frac{C_E V_E}{K_D}}}{\frac{C_M V_M}{C_M V_M + \frac{C_E V_E}{K_D}}} = \frac{1}{1 + K_D \frac{V_E}{V_M}} = \frac{1}{1 + K'}$$

$$K' = K_D \frac{V_E}{V_M}$$

Factor de Capacidade

$$K' = \frac{C_E V_E}{C_M V_M} \Rightarrow \frac{\text{n}^\circ \text{ moles f. estacionária}}{\text{n}^\circ \text{ moles f. móvel}}$$

K' dá-nos uma medida do comportamento do soluto num determinado processo cromatográfico.

O soluto entra no processo cromatográfico e “move-se” da fase móvel para a fase estacionária.

A *velocidade de eluição*, pode ser relacionada com a velocidade linear da fase móvel.

u - velocidade linear da fase móvel

velocidade de eluição = $u \cdot \Delta t_M$

$$vel = u \cdot \frac{1}{1 + K'}$$

A *velocidade de eluição* depende de:

- velocidade da fase móvel, u
- razão dos volumes da fase estacionária e da fase móvel
- coeficiente de distribuição, K_D

Para um dado processo cromatográfico, a velocidade da fase móvel e a razão V_E/V_M são constantes. A razão porque os solutos são eluídos com velocidades diferentes é devido ao facto de terem diferentes valores de K_D .

O tempo que leva um componente a atravessar uma coluna de comprimento L , é o *tempo de retenção*, t_R :

$$t_R = \frac{\text{comprimento}}{\text{velocidade}} \Rightarrow t_R = \frac{L}{u} (1 + K')$$

Tempo de Retenção

$$t_R = t_M (1 + K')$$

t_M – tempo da fase móvel, tempo requerido para a fase móvel atravessar a coluna.

Por conveniência, usa-se muitas vezes o parâmetro de volume de retenção, pois é uma grandeza que indica a quantidade de volume da fase móvel que é necessária para eluir o soluto.

Sabendo que: *volume = tempo x caudal* $V_R = t_R \times F$

temos: $V_R = V_M (1 + K') = V_M + K_D \frac{V_E}{V_M} V_M$

$$V_R = V_M + K_D V_E$$

Volume de Retenção

V_M – volume morto (“vazio”) da coluna. É o espaço da coluna não ocupado pela fase estacionária.

V_E – volume da fase estacionária

O tempo de retenção depende do tipo de coluna e condições experimentais (temperatura, caudal, etc). Este efeito de variáveis operacionais pode ser eliminado se os valores forem referidos a uma substância padrão.

A substância padrão tem que ser medida nas mesmas condições experimentais.

Antes de se calcular a razão de dois tempos de retenção é necessário subtrair o tempo requerido para eluir um componente não retardado.

Todos os componentes têm que atravessar o comprimento L da coluna, pelo que passam uma mesma fracção de tempo na fase móvel. Sendo assim, o que interessa é ter em conta o tempo que passam na fase estacionária.

$$\alpha = \frac{t_R - t_M}{t_R^* - t_M} = \frac{V_R - V_M}{V_R^* - V_M} = \frac{K_D}{K_D^*}$$

retenção relativa
ou
factor de selectividade

* *substância padrão*

Outro parâmetro utilizado nas técnicas cromatográficas é *razão de retenção*, R_f :

$$R_f = \frac{t_M}{t_M + t_E}$$

Razão de Retenção

$R_f = 1$ soluto não retido

$R_f = 0$ soluto não solúvel na f. móvel

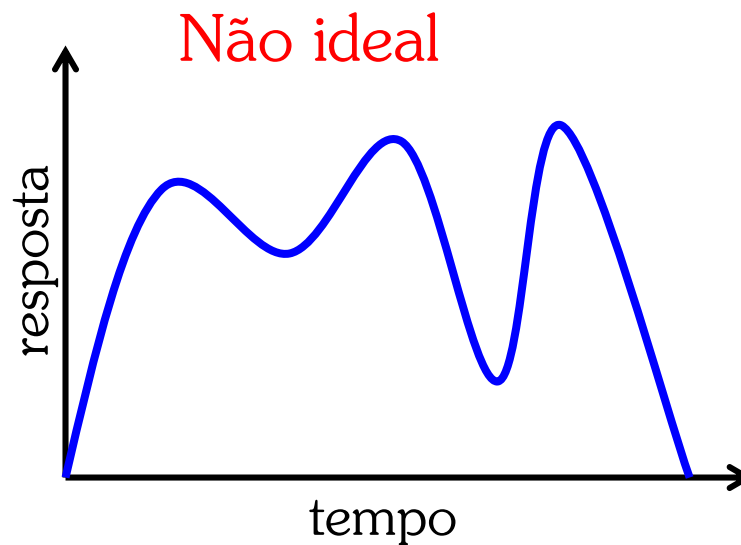
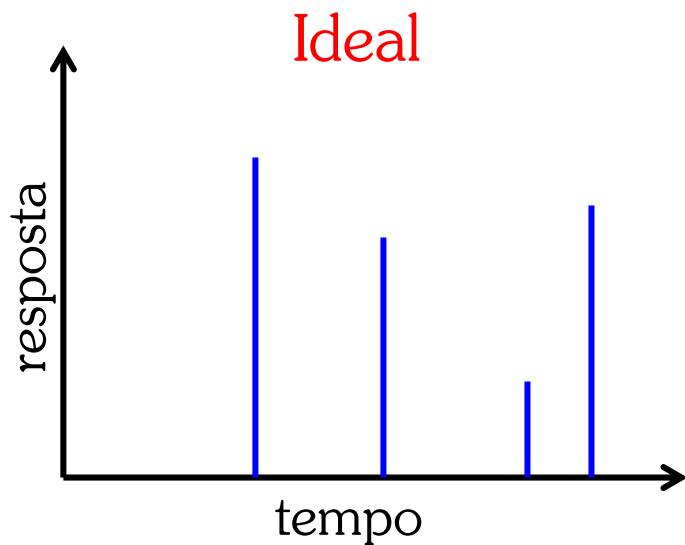
Este parâmetro pode ser escrito de modos diferentes:

$$R_f = \frac{v}{v_M} = \frac{t_M}{t} = \frac{d_{\text{solute}}}{d_{\text{solvente}}} = \frac{V_M}{V}$$

R_F

d - distância

FORMA do CROMATOGRAMA



Um processo é tanto mais eficiente quanto mais perto estiver do cromatograma ideal.



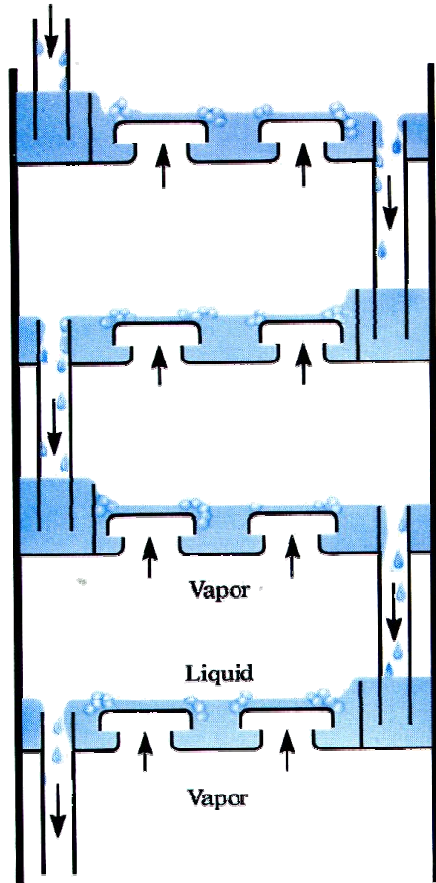
MÉTODOS PARA DESCREVER A EFICIÊNCIA DE UMA COLUNA

Existem dois termos que usados como uma medida quantitativa da eficiência de uma cromatografia em coluna:

- altura dos pratos teóricos, H
- número de pratos teóricos, N

TEORIA DOS PRATOS TEÓRICOS

Esta teoria tem grande analogia com o processo de destilação e método de extracção descontínua em contra-corrente.



Prato Teórico - comprimento de coluna que é necessário para se atingir o equilíbrio entre duas fases.

O processo cromatográfico é um exemplo do método de Craig. Os pratos teóricos corresponderão às unidades (ampolas) de transferência. Cada “caixa” é um prato teórico. Ver exemplo da figura seguinte.

Modelo para a Separação Cromatográfica

Espécie A ($D_A=0.5$) dissolve-se igualmente na fase est. e na fase móvel

Espécie B ($D_B=0.33$) dissolve-se 75% na fase móvel

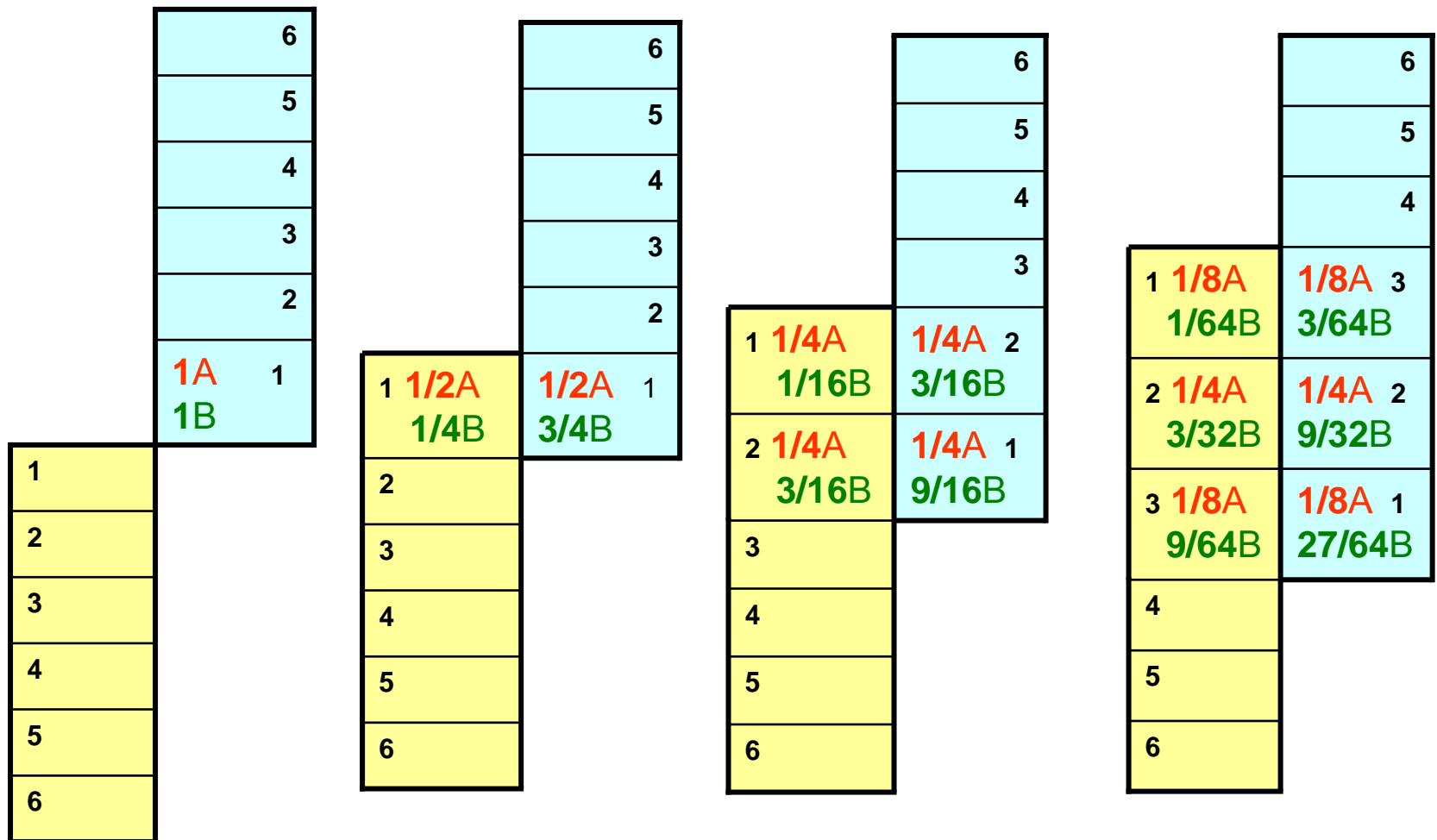
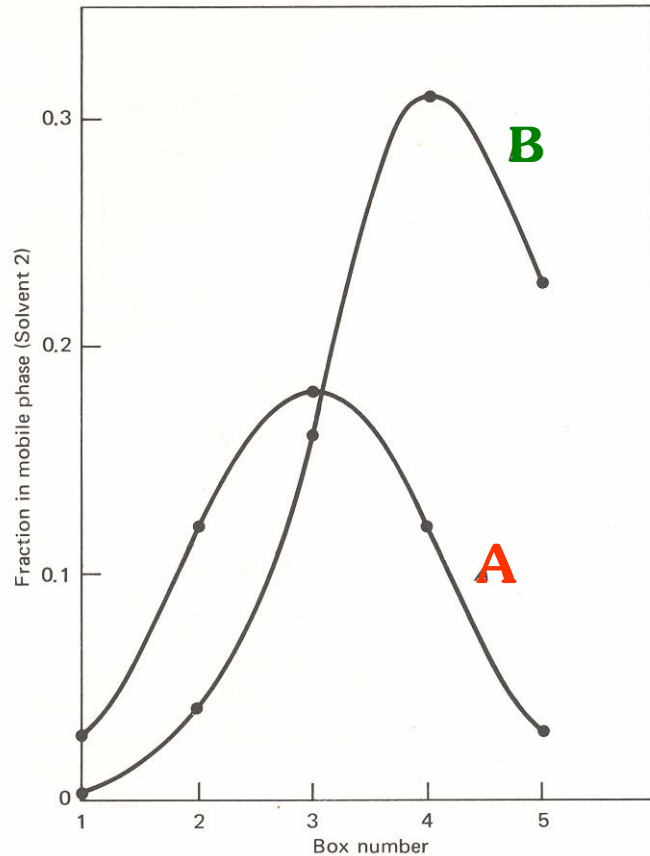
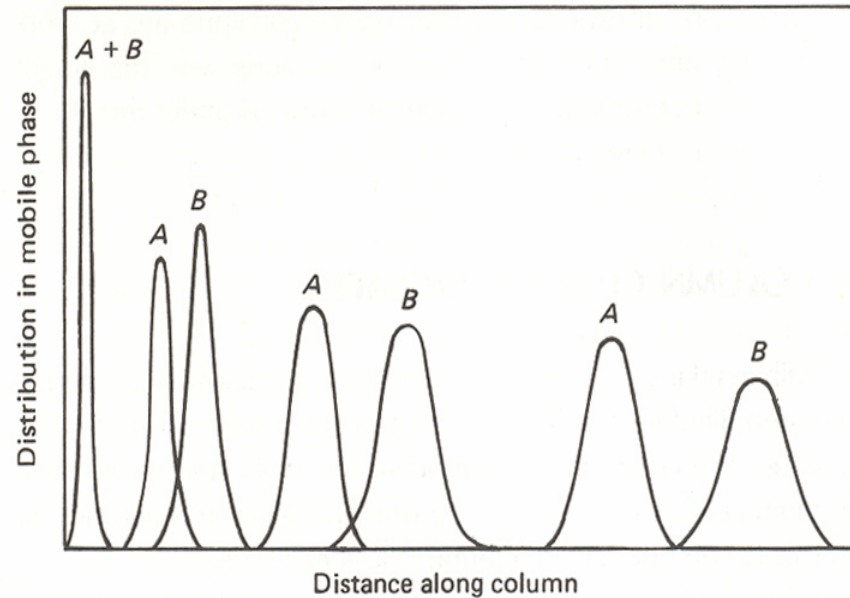


Gráfico da distribuição de **A** e **B** ao longo da coluna após 5 adições de solvente



B ao ser mais solúvel na fase móvel, sai 1^o da coluna e espalha-se menos originando uma banda mais estreita.

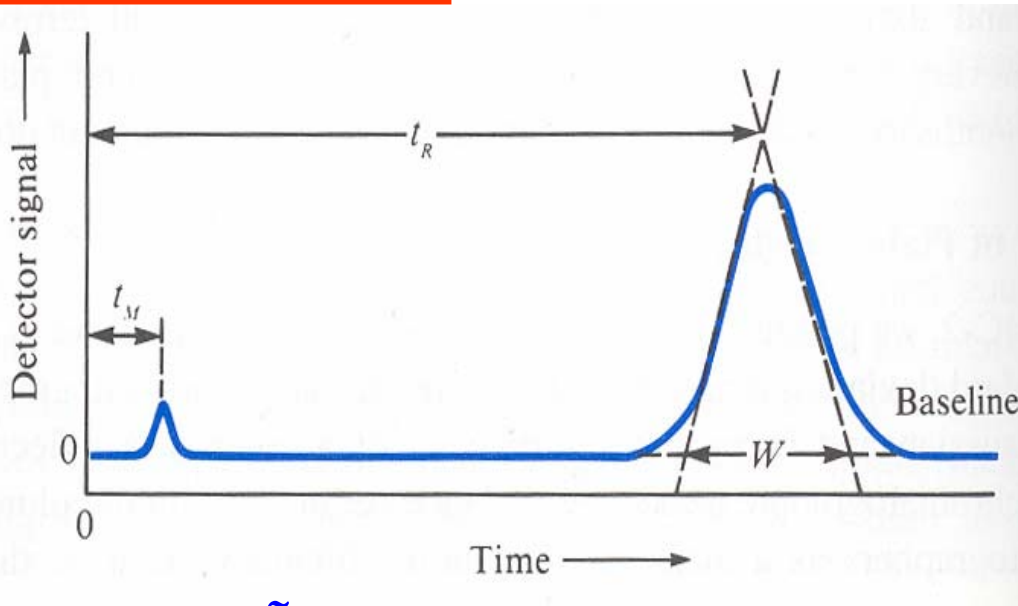


Quanto maior o número de pratos teóricos, mais eficiente é o processo cromatográfico. O número de pratos teóricos, N_t , pode ser obtido através do cromatograma, utilizando as expressões:

$$N_t = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

número de pratos teóricos

$$N_t = 5.54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2$$



w – largura da banda

t_R – tempo de retenção

$w_{1/2}$ – largura a meia altura

ATENÇÃO às unidades de t_R e w

O número de pratos teóricos não depende só do comprimento da coluna, mas também de quase todas as variáveis existentes na cromatografia (Ex: solvente, fase estacionária, temperatura, caudal)

Para um dado t_R , quanto maior o número de pratos teóricos calculado menor a largura do pico (mais perto do ideal).

Como se aumenta o número de pratos teóricos?

- Aumentando o comprimento da coluna. N_T é directamente proporcional a L . Se se duplicar o comprimento L , duplica-se N_T e t_R .

No entanto, todos os picos ficarão mais afastados uns dos outros, mas também mais largos por um factor de $\sqrt{2}$.

- Dimuindo a altura de cada prato teórico, ou seja aumentando o número de pratos teóricos por unidade de comprimento.

$$H = \frac{L}{N_T} = \frac{L}{16} \left(\frac{w}{t_R} \right)^2$$

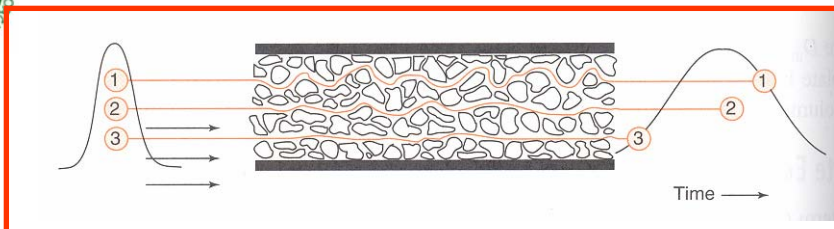
H - altura equivalente do prato teórico

H (abreviatura de HETP) – **H**eight **E**quivalent to a **T**heoretical **P**late

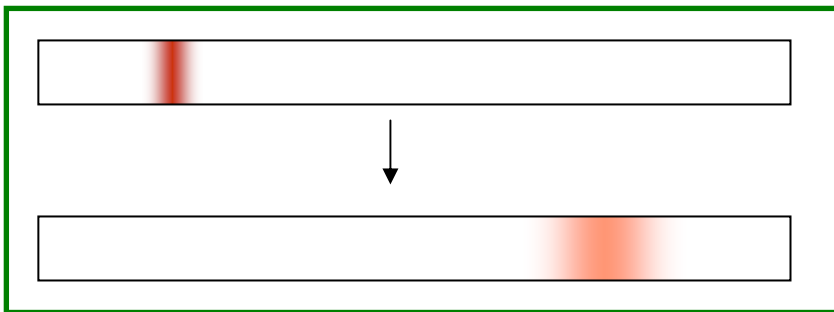
Como variar o valor de H?

Quanto menor a altura do prato teórico, mais estreita é a banda obtida no cromatograma. Van Deemter demonstrou que o alargamento de uma banda é devido à soma de vários efeitos inter-dependentes :

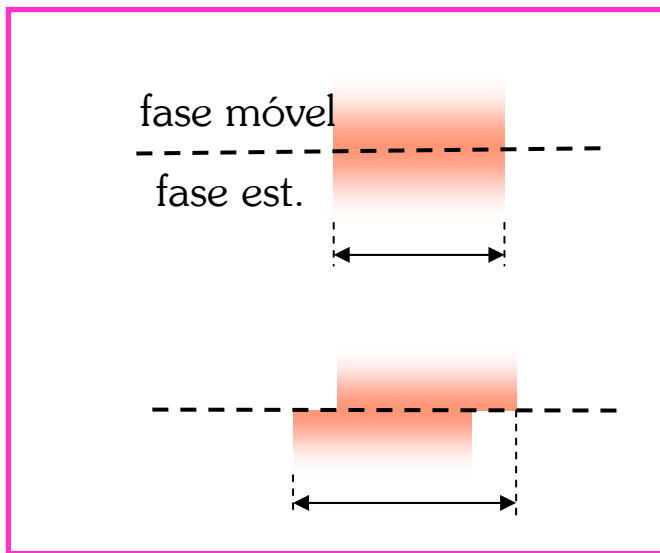
- **A** - empacotamento da coluna ou estrutura da fase estacionária.
- **B** – difusão do soluto (gradiente de concentração) das altas para as baixas concentrações.
- **C** – equilíbrio entre fase móvel e fase estacionária.



A – difusão de Eddy



B – difusão longitudinal



C – transferência de massa

$$\begin{array}{l}
 \mathbf{H} = \text{contribuição} \\
 \text{de percursos} \\
 \text{não ideais} \\
 \\
 \mathbf{Difusão de} \\
 \mathbf{Eddy} \\
 \\
 \mathbf{+} \\
 \\
 \text{contribuição} \\
 \text{de difusão ao} \\
 \text{longo da} \\
 \text{coluna} \\
 \\
 \mathbf{Difusão} \\
 \mathbf{longitudinal} \\
 \\
 \mathbf{+} \\
 \\
 \text{contribuição} \\
 \text{situação de} \\
 \text{não equilíbrio} \\
 \\
 \mathbf{transferência} \\
 \mathbf{de massa}
 \end{array}$$

$$\mathbf{H} = \mathbf{A} + \mathbf{B}/\mathbf{u} + \mathbf{C}\mathbf{u}$$

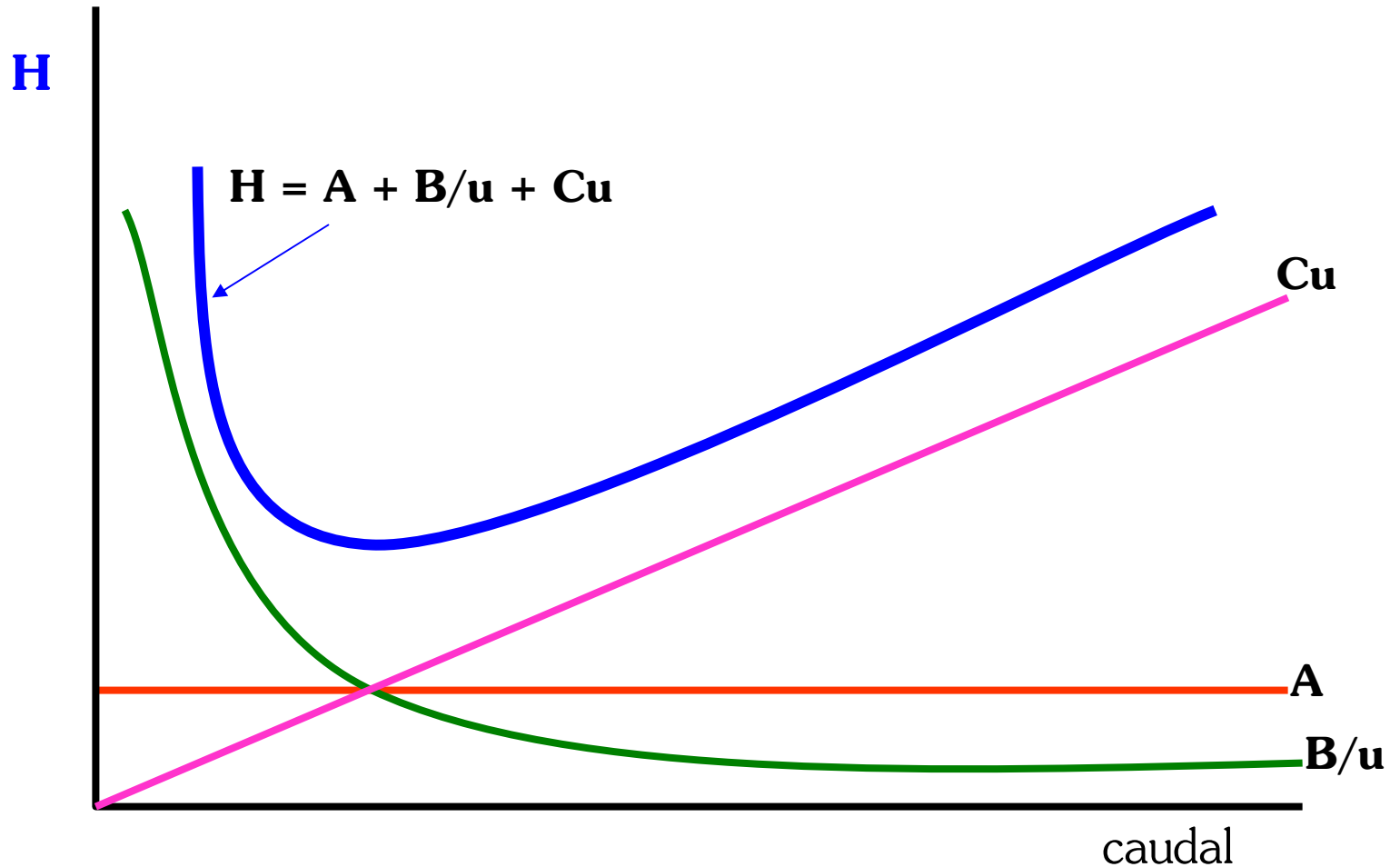
EQUAÇÃO DE
VAN DEEMTER

u – velocidade da fase móvel (caudal)

A , B e C são constantes para uma dada coluna e uma dada fase estacionária.

Os fenómenos que provocam alargamento nas bandas, uns são proporcionais ao caudal, outros inversamente proporcionais ao caudal e outros independentes do caudal, como se pode ver na Figura seguinte:

REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EQUAÇÃO DE VAN DEEMTER



Em colunas empacotadas no laboratório, os três termos da equação de Van Deemter contribuem para o alargamento das bandas.

Para colunas de HPLC, o termo $A=0$.

Como a difusão longitudinal em gases é muito mais rápida do que em líquidos, o parâmetro B , tem valores mais elevados em cromatografia de fase gasosa do que em cromatografia líquida, razão pela qual o caudal óptimo em cromatografia de fase gasosa é mais elevado do que em cromatografia líquida.

A transferência de massa diminui com o aumento de temperatura, devido ao aumento do coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária. O aumento de temperatura permite aumentar o caudal sem diminuição da resolução.

Como calcular o valor dos parâmetros A, B e C da equação de Van Deemter?

Obter 3 cromatogramas a 3 diferentes velocidades da fase móvel.
Calcular para cada velocidade, o valor de H:

$$H = \frac{L}{16} \left(\frac{w}{t_R} \right)^2$$

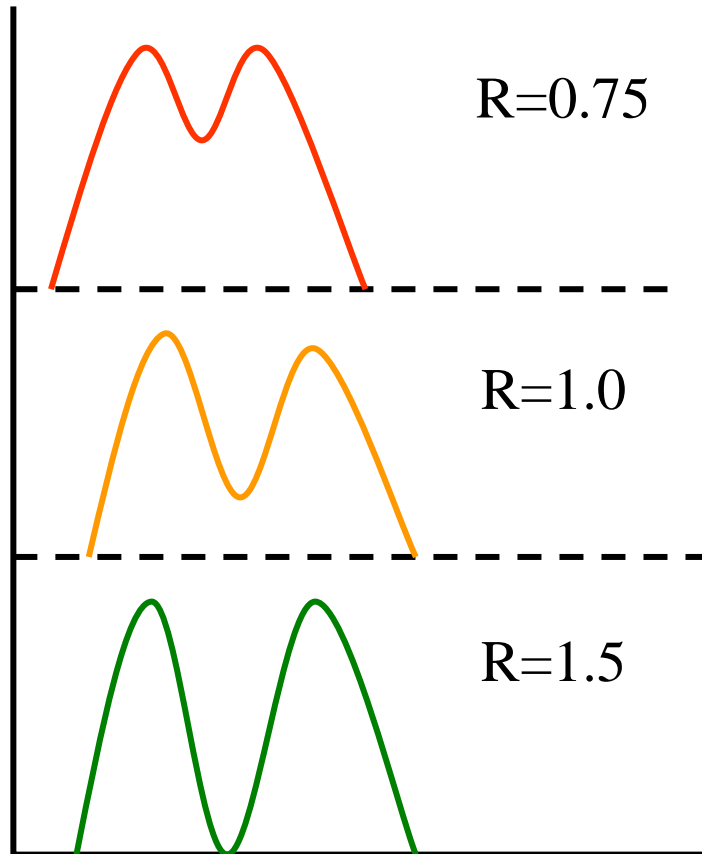
e resolver o sistema de 3 equações a 3 incógnitas (A, B e C).

Como calcular a velocidade óptima da fase móvel?

A velocidade óptima corresponde ao valor mínimo de H $\Rightarrow (dH/du)=0$.

RESOLUÇÃO

A resolução de uma coluna, fornece uma medida quantitativa da capacidade dessa coluna separar 2 solutos.



$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{w_A + w_B}$$

$$R = \frac{2(V_B - V_A)}{w_A + w_B}$$

Relação entre Resolução e características de um Soluto

Dois solutos A e B com tempos de retenção de tal modo que:

$$w_A \approx w_B \approx w$$

sabendo que: $N_T = 16 \frac{t_R^2}{w^2} \Rightarrow w = \frac{4t_R}{\sqrt{N_T}}$

resolução: $R = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{w} \Rightarrow R = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{(t_R)_B} \times \frac{\sqrt{N_T}}{4}$

relembrando que: $t_R = t_M(1+K') = t_M + t_M K'$

$$R = \frac{t_M + t_M K'_B - t_M + t_M K'_A}{t_M + t_M K'_B} \times \frac{\sqrt{N_T}}{4}$$

$$R = \frac{t_M (K'_B - K'_A)}{t_M (1 + K'_B)} \times \frac{\sqrt{N_T}}{4} \Rightarrow R = \frac{K'_B - K'_A}{1 + K'_B} \times \frac{\sqrt{N_T}}{4}$$

retenção relativa $\Rightarrow \alpha = \frac{K'_B}{K'_A} \Rightarrow R = \frac{K'_B - \frac{K'_B}{\alpha}}{1 + K'_B} \times \frac{\sqrt{N_T}}{4}$

$$R = \frac{\alpha K'_B - K'_B}{1 + K'_B} \times \frac{\sqrt{N_T}}{4} \Rightarrow R = \frac{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) K'_B}{1 + K'_B} \times \frac{\sqrt{N_T}}{4}$$

dividindo ambos os termos por K'_B :

$$R = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \left(\frac{K'_B}{1 + K'_B}\right) \times \frac{\sqrt{N_T}}{4}$$

Por vezes torna-se útil, saber qual o número de pratos teóricos necessários para se obter uma determinada resolução:

$$N_T = 16R^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + K'_B}{K'_B} \right)^2$$

Uma vez obtido um número de N_T para uma dada resolução, se se considerar que H (alturado prato) é constante, é necessário modificar o comprimento L da coluna: $H = L/N_T$

Esta é a única forma de se obter tal valor. As grandezas α e K' mantêm-se constantes apesar de mudanças nos valores de L e N_T .

Quando os dois solutos A e B são muito difíceis de separar ($K'_A \approx K'_B$) as equações tomam a forma:

$$\alpha = \frac{K'_B}{K'_A} \approx 1 \quad K'_A \approx K'_B \approx K'$$

$$R = (\alpha - 1) \left(\frac{K'}{1 + K'} \right) \frac{\sqrt{N_T}}{4} \quad N_T = 16R^2 \left(\frac{1}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + K'}{K'} \right)^2$$

Relação entre Resolução e o Tempo de Retenção

$$t_R = \frac{\text{comprimento}}{\text{velocidade}} = \frac{L}{v}$$

$$v_B = \frac{L}{(t_R)_B} \quad v_B = u \left(\frac{1}{1 + K'_B} \right) \quad L = N_T \times H$$

u – velocidade da fase móvel

$$(t_R)_B = \frac{N_T H (1 + K'_B)}{u} \quad \text{substituindo em:} \quad N_T = 16R^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + K'_B}{K'_B} \right)^2$$

vem:

$$t_R = \frac{16R^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + K'_B)^3}{(K'_B)^2}$$

Esta expressão permite saber o tempo necessário para separar (eluir) um componente, com uma dada resolução.

Optimização de uma Coluna

$$R = \underbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)}_{\text{blue}} \underbrace{\left(\frac{K'_B}{1 + K'_B}\right)}_{\text{red}} \times \underbrace{\frac{\sqrt{N_T}}{4}}_{\text{green}}$$

$$t_R = \frac{16R^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2 \frac{(1 + K'_B)^3}{(K'_B)^2}$$

As equações são constituídas por 3 partes:

- 1º** - O termo α é um parâmetro de selectividade que depende unicamente das propriedades de dois solutos.
- 2º** - Termo que contém K' que depende das propriedades do soluto da coluna.
- 3º** - N_T relacionada com os efeitos cinéticos que influenciam a largura das bandas.

Para otimizar as condições de uma coluna, não esquecer que os parâmetros fundamentais (α , K' e H ou N_T) podem ser “mexidos” de uma forma independente.

- α e K' podem ser mexidos, mudando a temperatura, ou a composição da fase móvel.
- N_T pode ser mudado directamente, mudando L e
- H pode ser mudado alterando a velocidade (caudal), o tamanho das partículas de “resina”, etc.

Exemplo:

Dois solutos A e B têm $t_{RA}=16.4$ min. e $t_{RB}=17.63$ min ($w_A=1.11$ min. e $w_B=1.21$ min). A coluna mede 30 cm e o tempo da fase móvel é de 1.3 min. Calcular:

- Resolução
- N_T médio
- H
- L para $R = 1.5$
- t_{RB} necessário para eluir o soluto B com novo L
- o valor de H para $R=1.5$

Resolução:

$$a) R = \frac{2(17.63 - 16.40)}{1.11 + 1.21} = 1.06$$

$$R=1.06$$

$$b) (N_T)_A = 16 \frac{16.4^2}{1.11^2} = 3493$$

$$(N_T)_B = 16 \frac{17.63^2}{1.21^2} = 3397$$

$$\bar{N}_T = \frac{3493 + 3397}{2} = 3445$$

$$N_T = 3445$$

$$c) H = \frac{L}{N_T} = \frac{30}{3445} = 8.7 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

$$H = 8.7 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

d) K' e α não mudam com o aumento de N_T e L

$$N_T = 16R^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + K'_B}{K'_B} \right)^2$$

$$(N_T)_1 = 16R_1^2 (\dots)(\dots)\text{constante}$$

1- coluna original

$$(N_T)_2 = 16R_2^2 (\dots)(\dots)\text{constante}$$

2 - nova coluna

$$\frac{\sqrt{(N_T)_1}}{\sqrt{(N_T)_2}} = \frac{R_1}{R_2} \Rightarrow \frac{\sqrt{3445}}{\sqrt{(N_T)_2}} = \frac{1.06}{1.5}$$

$$(N_T)_2 = 6.9 \times 10^3 \text{ como } L = NH$$

$$L = 6.9 \times 10^3 \times 8.7 \times 10^{-3} = 60 \text{ cm}$$

$$L = 60 \text{ cm}$$

e) da expressão com t_R e resolução:

$$\frac{(t_R)_1}{(t_R)_2} = \frac{(R_1)^2}{(R_2)^2} \Rightarrow \frac{17.63}{(t_R)_2} = \frac{(1.06)^2}{(1.5)^2}$$

$(t_R)_2 = 35 \text{ min}$ (o tempo de retenção passa a ser 2 vezes maior)

$$f) \frac{\cancel{t_{RB}}}{\cancel{t_{RB}}} = \frac{R_1^2}{R_2^2} \times \frac{H_1}{H_2} \Rightarrow \frac{(1.06)^2}{(1.5)^2} = \frac{8.7 \times 10^{-3}}{H_2}$$



$H_2 = 4.3 \times 10^{-3} \text{ cm}$ (a altura do prato teórico diminui para metade).

Variação de H

Analisando a alínea f) do exemplo anterior verifica-se que é possível melhorar a resolução, sem aumentar o valor de t_R , diminuindo o valor de H .

Diminuição do valor de H :

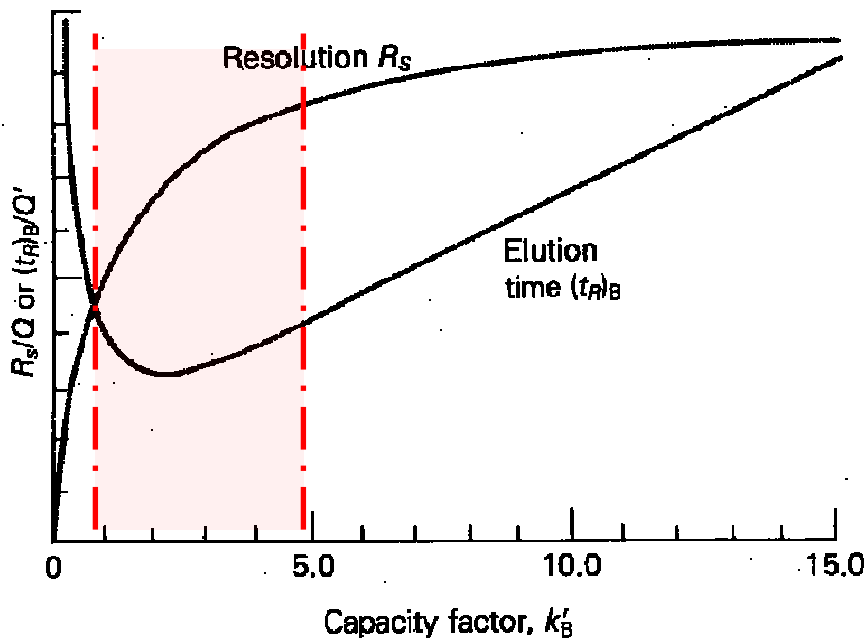
- reduzir a viscosidade da fase móvel (aumentando a temperatura).
- reduzir o tamanho das partículas.
- reduzir a velocidade de eluição.

Variação de K'_B

O aumento do valor de K'_B , produz um aumento de resolução (com aumento do tempo de eluição).

$$R = Q \frac{K'_B}{1 + K'_B} \quad t_{RB} = Q' \frac{(1 + K'_B)^3}{(K'_B)^2}$$

O valor de K' é mexido na fase gasosa por aumento da temperatura. Em fase líquida, mudando a composição da fase móvel.



- valores de $K' > 7$ são de evitar. A resolução pouco aumenta e o t_R aumenta pronunciadamente.

- t_R mínimo é obtido para $K' = 2$.

- habitualmente trabalha-se com valores de K' entre 1 e 5.



Variação de α

Quando α se aproxima da unidade, otimizar K' e aumentar N_T pode não ser suficiente para uma boa separação.

Assim é necessário mexer em α mantendo k' entre 1 e 10.

- 1) Mudar a fase móvel (composição)
- 2) Mudar o pH da fase móvel
- 3) Mudar a temperatura
- 4) Mudar a fase estacionária ?
- 5) Adicionar espécies químicas à fase estacionária

É melhor a solução 1. É pior a 5.