



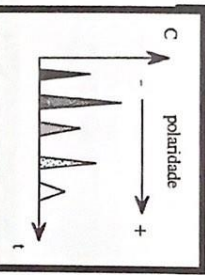
Tipos de Cromatografia Líquida

Técnicas Cromatográficas

Cromatografia de Fase Normal vs. Fase Reversa

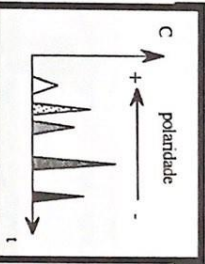
Fase Normal

- Fase estacionária polar
- Fase móvel mais apolar
- Solutos neutros, polares
- Mecanismo de retenção-adsorção
- > Polaridade soluto $\rightarrow$ > T_R



Fase Reversa

- Fase estacionária apolar
- Fase móvel mais polar
- Solutos apolares
- Mecanismo de retenção-(partição) interações apolares
- < Polaridade soluto $\rightarrow$ > T_R



Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

partido estreito, mais eficiência

Melhora H utilizando tamanho de partículas pequeno (3-10 μm)

Maior aplicabilidade

Elevada sensibilidade

Determinações quantitativas mais rigorosas

Análise de espécies termolábeis e não voláteis

Análise de espécies de grande interesse

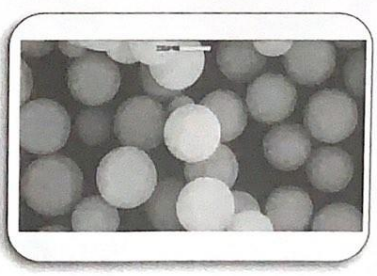
Instrumentação sofisticada

termolábeis $\rightarrow$ não têm temperatura estável

Técnicas Cromatográficas

Fase Estacionária

► Mais vulgarmente: partículas esféricas de silica sem (cromatografia de adsorção) ou com fases ligadas

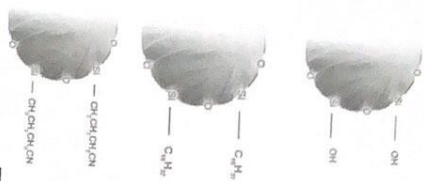


- Poros de partículas de silica esféricas, 10 nm (poros de 100 Å)
- Grupos silanol na superfície

Técnicas Cromatográficas

Fase Estacionária

- Grupos silanol da fase estacionária de sílica são ligados quimicamente a clorosilanos para produzir fases orgânicas lipofílicas



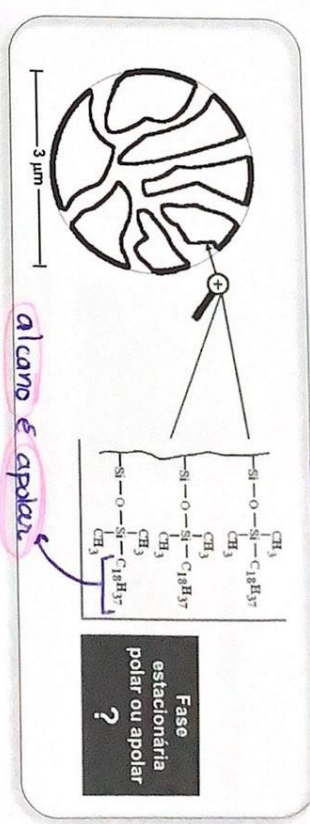
Common polar phases	Common nonpolar phases
$\text{CH}_3(\text{NH}_2)$ $\text{CH}_3(\text{C}=\text{N})$ $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH})$	$\text{R} = (\text{CH}_3)_2\text{CH}$ $\text{R} = (\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$ $\text{R} = (\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ $\text{R} = (\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ $\text{R} = (\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ $\text{R} = \text{Phenyl}$
Amino Cyano Diol	Octadecyl Oxyl Phenyl

R determina a polaridade e as propriedades da FE



Fase Estacionária

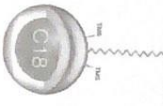
átomo eletronegativo
apolar



alcano é apolar

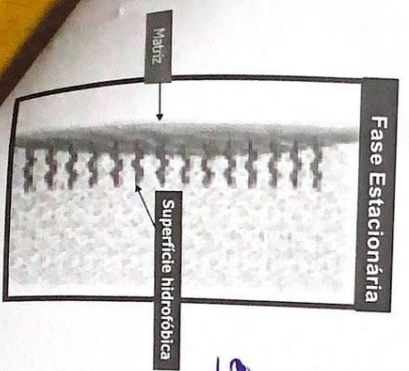
Cromatografia de Fase Reversa

Técnicas Cromatográficas



Mistura

ligado a um grupo funcional e apolar



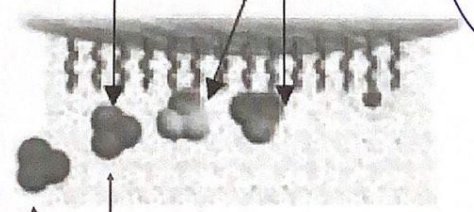
Cromatografia de Fase Reversa

Técnicas Cromatográficas

fase reversa
fase estacionária apolar

Compostos mais hidrofóbico

Composto menos hidrofóbico



Dica: Pense na água, a água é polar. Logo "hidrofóbica" é uma fobia logo o composto é apolar.

Inicialmente as moléculas hidrofóbicas ligam-se à superfície hidrofóbica.

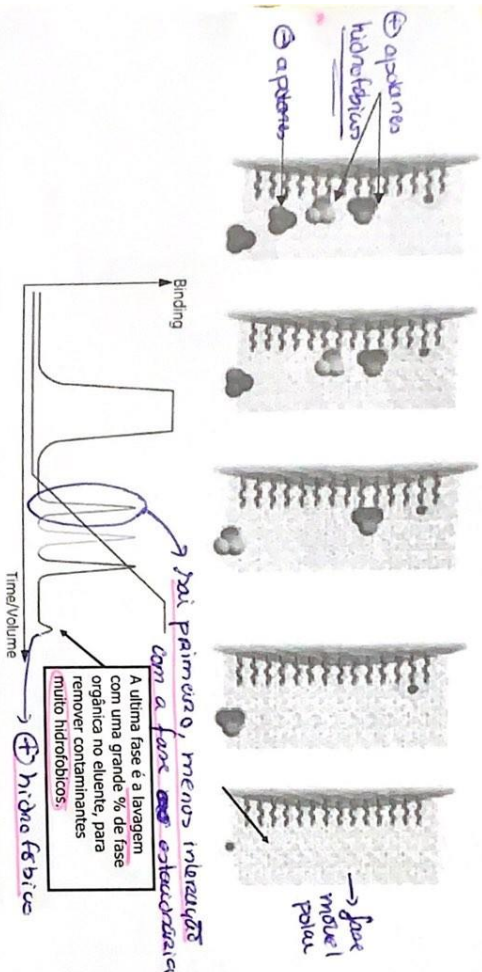
hidrofóbica → apolar

À medida que vamos aumentando a % de fase orgânica no eluente, as moléculas menos hidrofóbicas começam a ser eluídas.

As moléculas hidrofílicas são eluídas sem ficarem retidas.

Cromatografia de Fase Reversa

Técnicas Cromatográficas



Cromatografia de Fase Reversa

A fase estacionária apresenta **menor** polaridade que a **fase móvel**

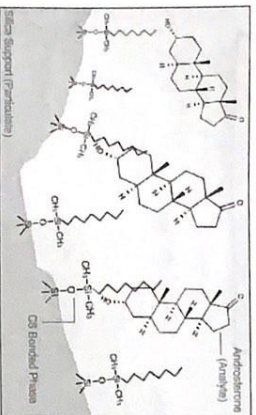
Nas **Fase estacionárias** utilizadas na cromatografia de fase reversa são usadas **cadeias orgânicas apolares (C8, C18)** ou **polares** (grupos funcionais cadeias com terminações do tipo ciano, diol, fenil, amino) **quimicamente ligadas**.

eluyente $\oplus$ forte é o mais apolar $\downarrow$ tempo de retenção $\downarrow$
 Os solventes mais usados na fase móvel:
 água, metanol e acetonitrilo.
 100% H₂O não serve
 50% H₂O, 50% ACN o tempo de retenção $\downarrow$
 20% H₂O, 80% ACN fase móvel $\oplus$ forte, pois tem **características $\oplus$ iônicas**
 Soluto, **ararancia** $\oplus$ **fácilmente**

Cromatografia de Fase Reversa

Técnicas Cromatográficas

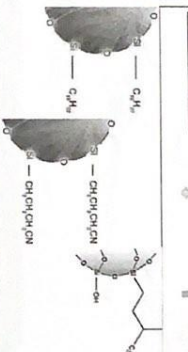
Fases estacionárias mais comuns em Cromatografia de fase reversa



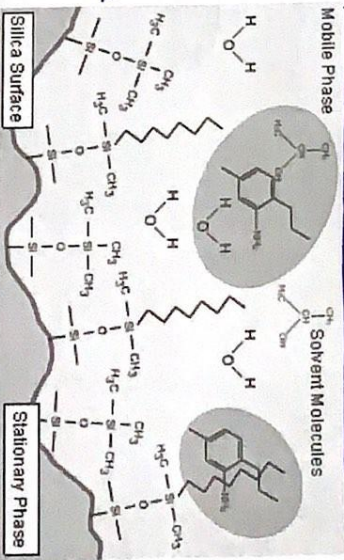
Solventes vulgarmente usados nas Fases móveis

- Propriedades do solvente
- Água
 - Metanol
 - Acetonitrilo
 - Tetrahidrofuran
- Força de eluição $\uparrow$ Polaridade $\uparrow$
- $\oplus$ apolar, $\downarrow$ melhora e $\downarrow$ eluente

Stationary Phase		
C ₁₈		
C ₈		
C ₄		
Cyano		
Phenyl		
Amino		



Força de retenção quanto se aproxima induzem um dipolo na outra molécula
 área de contacto, melhora a força de ligação intermolecular



A quantidade de água numa fase móvel determinará a força que um analito hidrofóbico é repellido para a fase estacionária, a força da sua retenção na fase estacionária..
 A natureza química da fase estacionária também irá governar a força com que o analito é retido.
 Por esta razão, a **HPLC** é uma técnica que é **impulsionada pela "seletividade"** conseguida depende da interação dos solutos com duas fases.

Cromatografia de Fase Reversa

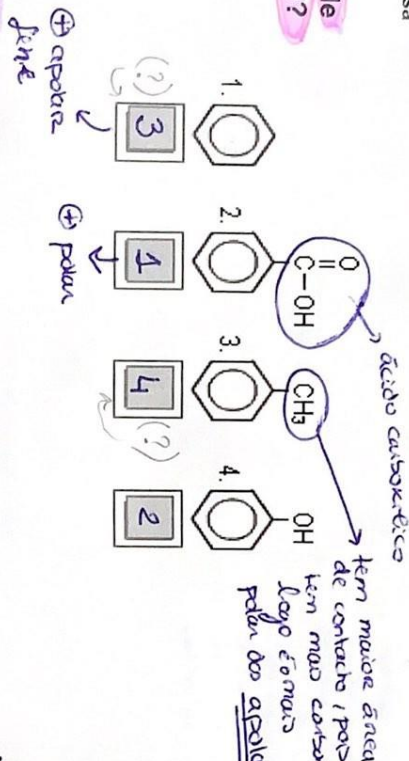
Técnicas Cromatográficas

Técnicas Cromatográficas

HPLC de fase reversa

Ordem de eluição?

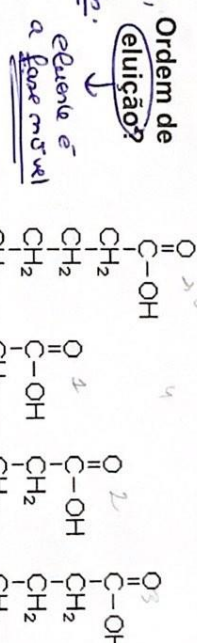
Fase reversa
Apolar



↑ oxigênio → ↑ polar

HPLC de fase reversa Fase estacionária mais comuns em Cromatografia de fase reversa

Ordem de eluição?



↑ A cadeia R é que vai interferir.

↑ e → ↑ área de contato

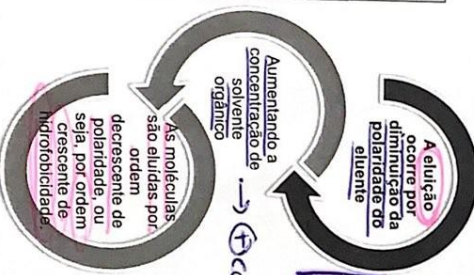
Técnicas Cromatográficas

HPLC de fase reversa

A fase estacionária é apolar, portanto hidrofóbica – Fases ligadas de C4, C8 ou C18

As regiões hidrofóbicas das moléculas interagem com a FE, logo as moléculas polares eluem imediatamente e as apolares (hidrofóbicas) ficam ligadas.	As regiões hidrofóbicas das moléculas interagem com a FE, logo as moléculas polares eluem imediatamente e as apolares (hidrofóbicas) ficam ligadas.
---	---

Quando é que é necessário a eluição por gradiente ???

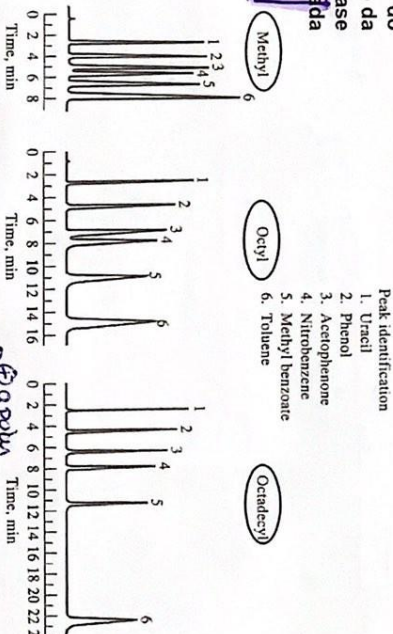


↑ polar ⇒ ↑ apolar

solvente apolar + fase estacionária polar

HPLC de fase reversa

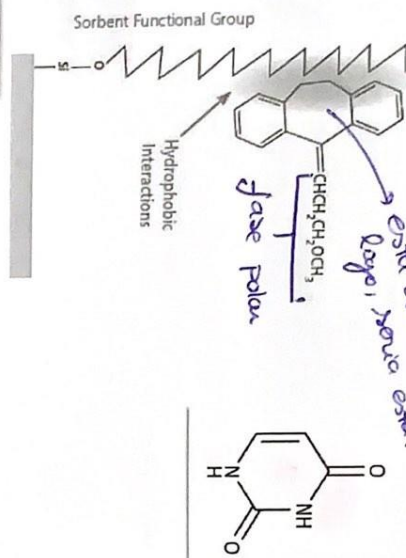
Efeito do tamanho da cadeia da fase ligada



Maior o comprimento da cadeia (maior resolução)

Maior o tempo de retenção

Fase Reversa



Cromatografia de Fase Normal.
Qual a zona da molécula que interagiria com a FE?

Técnicas Cromatográficas

Relação entre a polaridade e os tempos de eluição para a cromatografia de Fase normal e de fase reversas



BETTER MINDS
INTEGRATING TECHNOLOGY AND EDUCATION

O soluto **mais** polar elui primeiro

O tempo de eluição **decrece** ao **diminuir** a polaridade da FM

FM com polaridade elevada

Cromatografia de Fase Reversa

→ fast expansion

FM com polaridade média

Polaridade dos solutos: $A > B > C$

⊕ polar



A
B
C

Relação entre a polaridade e os tempos de eluição

cromatografia de
Fase normal e de
fase reversa

Cromatografía de Fase Normal

FM com polaridade baixa

③ pokan ← Time → A

FM com polaridade média

O soluto **menos** polar
elui primeiro

potatoona-ria poten

Polaridade dos solutos: $A > B > C$

Técnicas Cromatográficas

Série eluotrópica

Polaridade

[illegible]

Técnicas Cromatográficas

Força de um eluente

Eluentes que interagem fortemente com os solutos designam-se por eluentes fortes

Fase Reversa - Eluente forte - eluente mais apolar

Fase Normal - Eluente forte - eluente mais polar

Eluente $\odot$ forte

$\downarrow$ tempo de retenção

picos $\odot$ juntos

$\downarrow$ tempo de reat.

Fase Reversa

FE apolar

FE polar

Seleção do eluente
Mudar a força do eluente para melhorar a separação

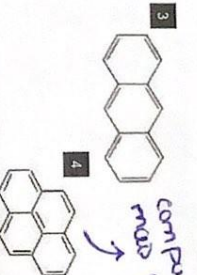
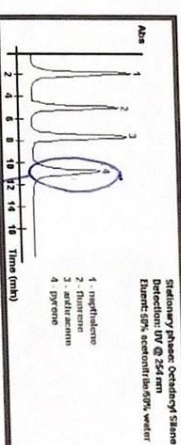
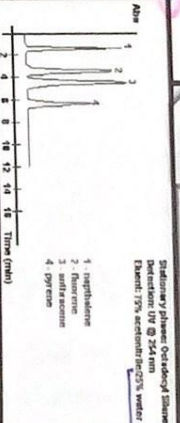
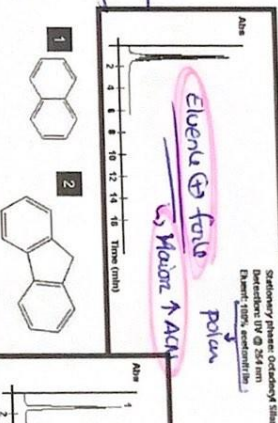
Eluente $\odot$ forte

$\hookrightarrow$ Maior $\uparrow$ ACN

Qual o tipo de cromatografia?
O eluente é mais forte em que situação?



CAHA



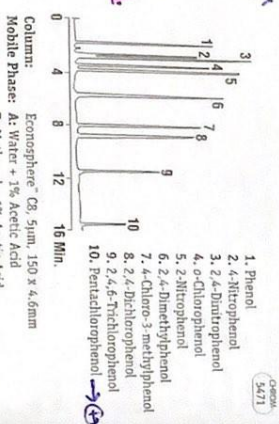
Técnicas Cromatográficas

Tipos de Eluição

Fase estacionária $\rightarrow$ apolar
Fase móvel (eluente):
início: 50% H₂O; 50% metanol
fim: 25% H₂O; 75% metanol

aumento da apolaridade

força do eluente



Proporciona um gradiente (metanol e água) para a separação destes compostos?

CAHA

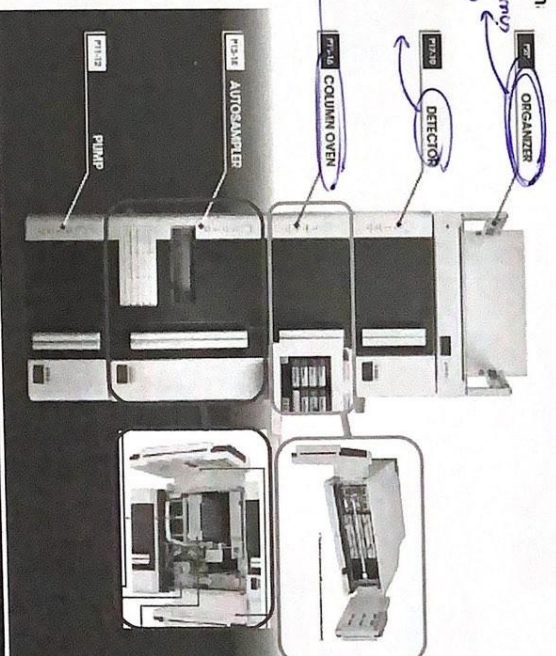
Crom.

onde colocamos os frascos

meio utilizado

tem que ter a temperatura controlada

liquida tem temperaturas não m altas



Crom

ORGANIZER

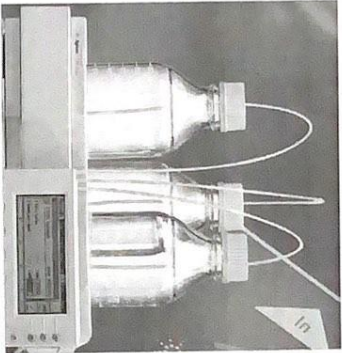


* The photo is a column oven with a column management system (optional).

Técnicas Cromatográficas

Cromatografo de HPLC

Componentes básicos



- ▶ Reservatórios de solventes → solventes com elevada pureza
- ▶ Antes da fase móvel ser introduzida no sistema - **Remoção de gás dissolvido** :
- ▶ Desgaseificador a vácuo online (caso o equipamento possua)
- ▶ Borbulhamento com um gás inerte (He)
- ▶ **Sonificação** por 5 a 10 minutos (ultrassons)

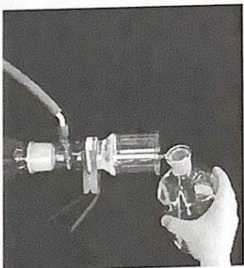
Tem de verificar se o sistema tem ar, através da verificação da pressão

← Nenhum solvente em extra no sistema em sua desgasificação e filtrado! →

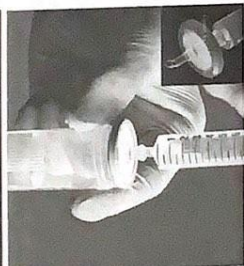
Retem partículas

Cromatografo de HPLC

Cuidados



Filtração de soluções obtidas a partir da solubilização de sólidos (geralmente soluções tampão) é necessária para evitar que materiais particulados sejam introduzidos no sistema cromatográfico (membranas de 0,22 ou 0,45 µm, compatíveis com a fase móvel)

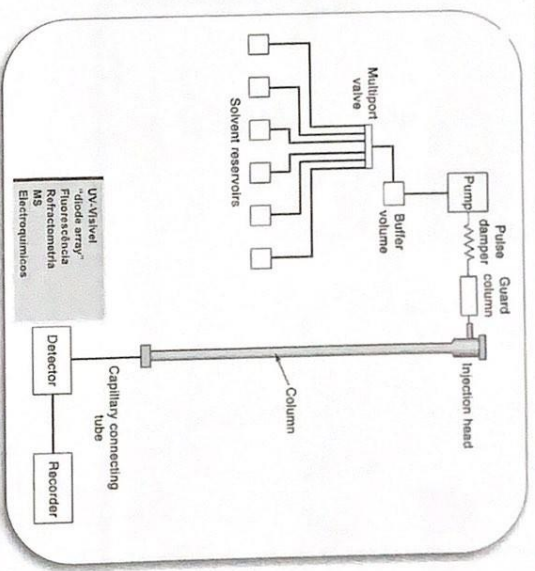


Filtração das amostras usando filtros de seringa com porosidade de 0,22 ou 0,45 µm.



Cromatografo de HPLC

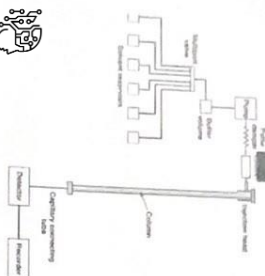
Componentes básicos



Técnicas Cromatográficas

Cromatografo de HPLC Componentes básicos

Pré-coluna



Filtros e Pré-coluna para remover componentes fortemente adsorvidos que não eluiriam e matéria particulada

tem o mesmo enchimento da coluna

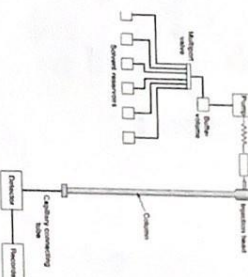
utilizo para poupar a coluna de alguns danos de partículas sólidas, compostos muito fortemente adsorvidos



BETTER MINDS

Cromatografo de HPLC Componentes básicos

Pré-coluna



Aumenta o tempo de vida da coluna analítica

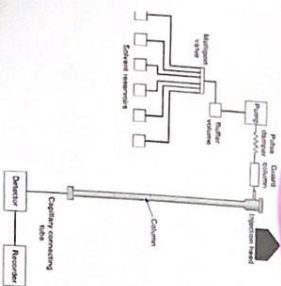
Elimina substâncias que se ligam de maneira irreversível

Elimina matéria em suspensão e outros contaminantes

Preenchimento - semelhante à coluna analítica (tamanho de partícula maior)

Cromatografo de HPLC Componentes básicos

Injector



Cuidado a bei

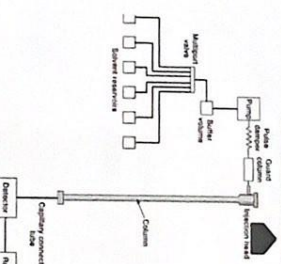
→ não entrar dentro de ar no loop;

→ verificar se a seringa não tem ar, pois assim insete novo quantidade de amostra.

CALHOU

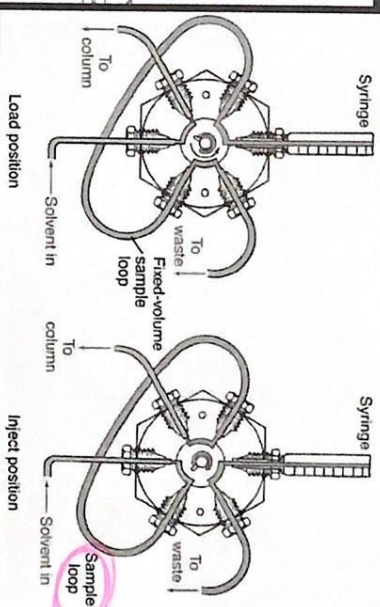
Cromatografo de HPLC Componentes básicos

Injector



Injector

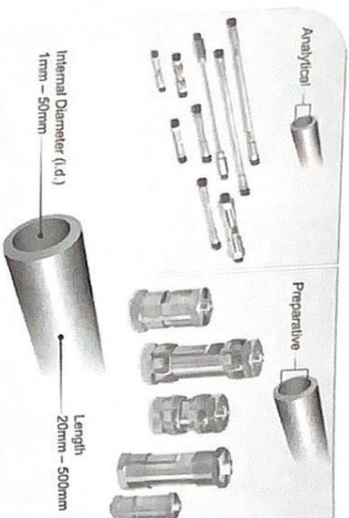
— Geralmente um injector de loop



Técnicas Cromatográficas

Cromatografo de HPLC Colunas

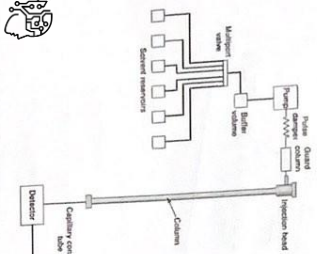
As colunas utilizadas em HPLC são geralmente de aco inoxidável



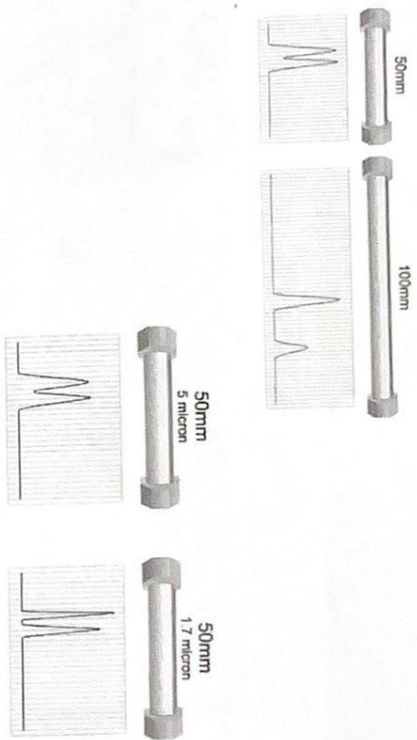
Técnicas Cromatográficas

Temperatura influência na eficácia da separação

↑ T ↑ difusão de solutos
↓ tempo de retenção



Colunas - Eficiência Comprimento e Tamanho das partículas



Cromatografia Gasosa

Cromatografia em Fase Gasosa:

A Cromatografia em fase gasosa é a mais adequada para a análise de

compostos gasosos

ou voláteis termicamente estáveis

(ou que facilmente se podem transformar em compostos voláteis).

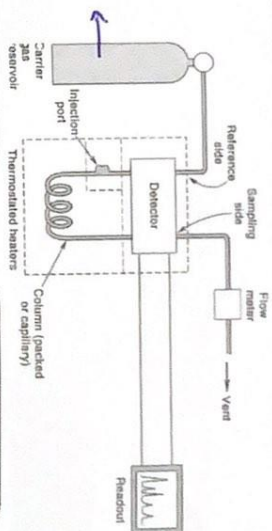
uso de reação de derivatização



após tem o papel de transportar a amostra, não interfere com o produto natural extraído

Cromatógrafo de Fase Gasosa Esquema

gás de arraste



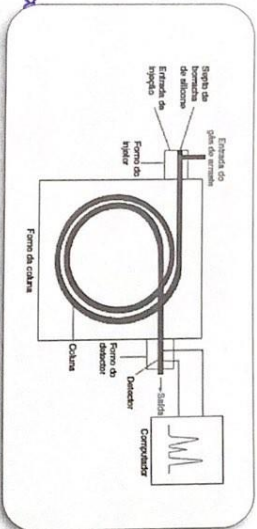
Pressões entre 10-50 psi (reguladores de pressões)

Gases (Fase móvel): Ne, Argon, H₂

Velocidade de fluxo constante se a pressão de entrada for constante - medidores ou reguladores de fluxo no início da coluna

Cromatógrafo de Fase Gasosa Esquema

A amostra volátilizada (carde vapor) não entra na câmara



A amostra é injectada através dum septo na porta aquecida onde é vaporizada e introduzida em um fluxo de gás de arraste para a coluna aquecida.

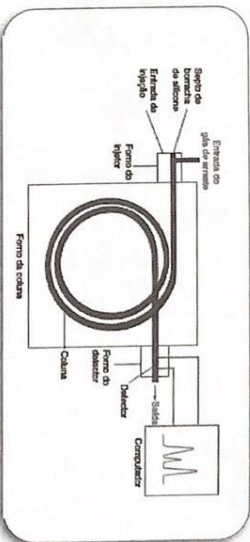
O analito no estado de vapor distribui-se entre a fase estacionária e o gás de arraste (F₁ móvel).

O equilíbrio rápido de fase gasosa → N e R elevados

Os analitos separados são arrastados até ao detector aquecido.

o o detector vai analisar substâncias voláteis, logo temo de aquecer a que temo os meus compostos estão no estado volátil (temperaturas elevadas).

Cromatógrafo de Fase Gasosa Esquema



O registo deste sinal em função do tempo é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa

As substâncias separadas saem da coluna, misturadas no gás de arraste e passam por um detector, dispositivo que gera um sinal eléctrico proporcional à quantidade de material eluído.

Técnicas Cromatográficas

Colunas para CG

Coluna de enchimento

Comprimento: 2-6 m
Diâmetro Interno: 2-5 mm
com fase estacionária (sólidos adsorventes ou adsorventes que se fixavam à superfície uma pequena quantidade de líquido)



Coluna Capilar

Comprimento: 100 m
DI: 150-300 µm
Natureza química dos revestimentos internos podem ter diferentes polaridades



→ **utilizados**

amplamente
usada

Colunas Capilares

Comparadas com as colunas empacotadas, as colunas capilares oferecem:

- Maior resolução
- Menor tempo de análise
- Maior sensibilidade
- Menor capacidade de amostra

→ **menor custo separação**
tem a desvantagem

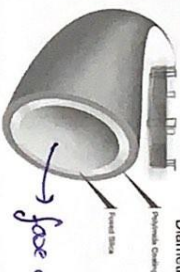
► **FSOT: Colunas capilares de sílica fundida**

São as mais utilizadas

Silicofundida de alta pureza com quantidades mínimas de óxidos metálicos

Altamente resistentes e flexíveis

Diâmetros internos de 0,15 - 0,32 mm



→ **boa estabilidade**



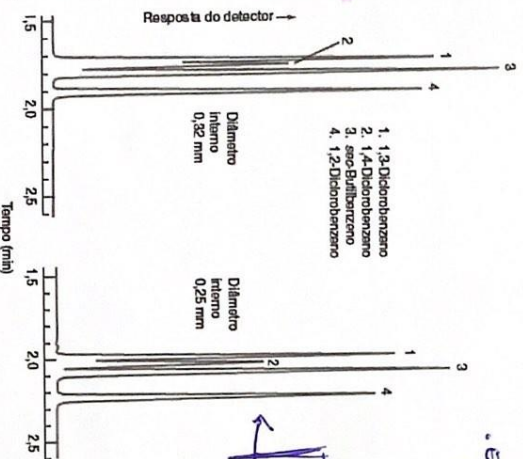
Técnicas Cromatográficas

Técnicas Cromatográficas

Efeito do diâmetro

interno na
resolução de
uma coluna
capilar

CAIM
Este tipo de cromatografia
não há # de percurso,
pelo qd temos 4 bandas
mais estreitas.

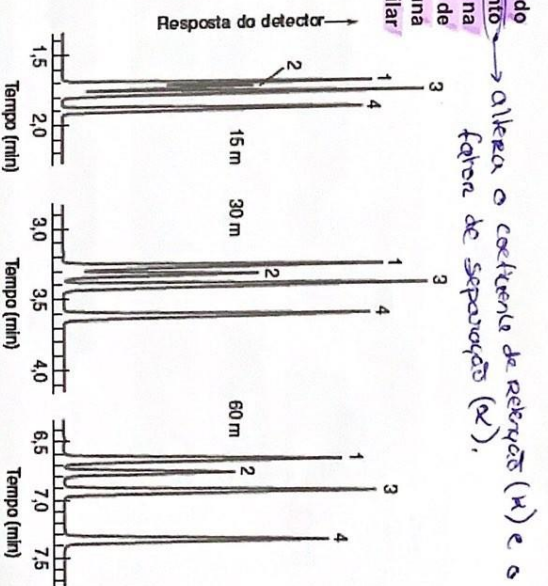


• **Eficiência de separação**
muito grande

Diminuição do diâmetro
→ **resolução**

Efeito do comprimento

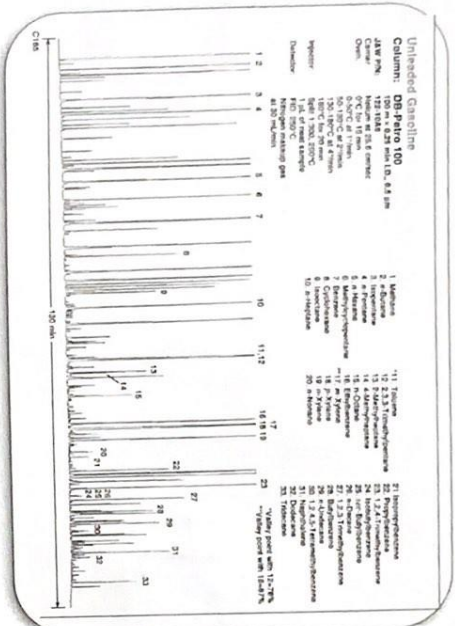
da coluna na
resolução de
uma coluna
capilar



→ **altera o coeficiente de retenção (k') e o fator de separação (α)**

Técnicas Cromatográficas

Cromatograma de gás de uma mistura complexa utilizando uma coluna capilar



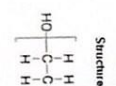
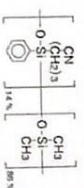
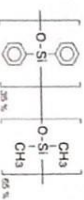
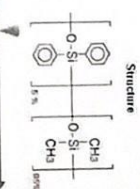
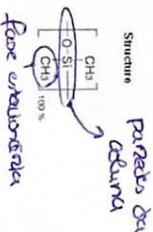
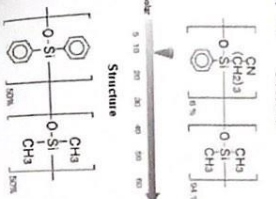
- Centenas de compostos são separados e medidos por CG usando amostras muito pequenas
- Colunas capilares têm resoluções particularmente elevadas

Técnicas Cromatográficas

Fases estacionárias polares vs apolares

100 % Dimethylpolysiloxane

↑ da polaridade F_E
 retém melhor os compostos



nao retage quimicamente com os compostos

Características de uma Fase Estacionária

Ligada quimicamente ao suporte (evitar que seja arrastada)

Baixa volatilidade - T_{eb} 100°C superior à temperatura máxima de trabalho da coluna

Estabilidade térmica e quimicamente inerte

Boas propriedades para interagir com os solutos

Bom solvente diferencial, isto é, além de dissolver os constituintes da amostra deve fazê-lo com solubilidades suficientemente diferentes para que eles possam ser separados

tem propriedades para interagir com os solutos

Técnicas Cromatográficas

Programa de Temperatura

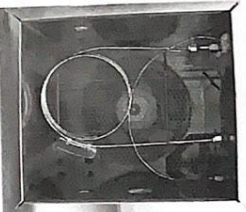
Isotérmico

Rampa Contínua

Rampa por patamares

último patamar bem acima do p.e. do menos volátil

No último patamar a T está acima do ponto de ebulição do menos volátil
 precisa de mais T para volatilizar



Técnicas Cromatográficas

Programa de Temperatura

Temperatura do injetor

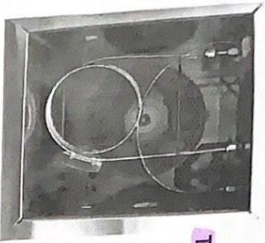
- ▶ Para uma evaporação total dos componentes da amostra o injetor deve estar, de uma maneira geral, 30 a 50 °C acima da temperatura de vaporização do menos volátil

Temperatura do detector

- ▶ 30 a 50 °C acima da temperatura de vaporização do componente menos volátil

Temperatura da coluna

- ▶ Pode iniciar 10 a 20 °C abaixo da temperatura de vaporização do mais volátil
- ▶ Subir em rampa e terminar a uma temperatura acima do menos volátil
- ▶ Usar gradientes se houver várias famílias de compostos (com volatilidades significativamente diferentes)

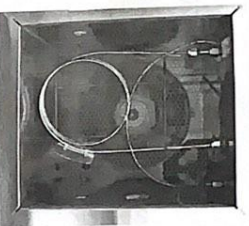


Técnicas Cromatográficas

Forno termostático e Controle de temperatura da Coluna

A temperatura da coluna é uma variável importante

- ▶ Necessidade de controle rigoroso ($\pm 0,1^\circ \text{C}$) / controle dos tempos de retenção: gamas entre - 50° e + 450 °C
- ▶ Depende do p.e. das amostras e do grau de separação pretendido
- ▶ Em amostras complexas, onde os p.e. dos analitos são muito diferentes, deve utilizar-se um programa de temperaturas, aumentando esta continuamente à medida que avança a separação
- ▶ O aumento de temperatura reduz os tempos de retenção

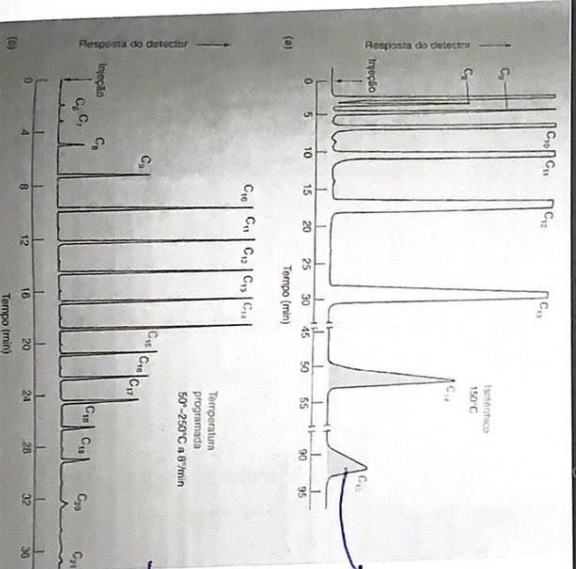


A temperaturas elevadas existem menos moléculas em interação com a fase estacionária e mais na fase móvel, levando a uma migração mais rápida ($< t_R$)

Técnicas Cromatográficas

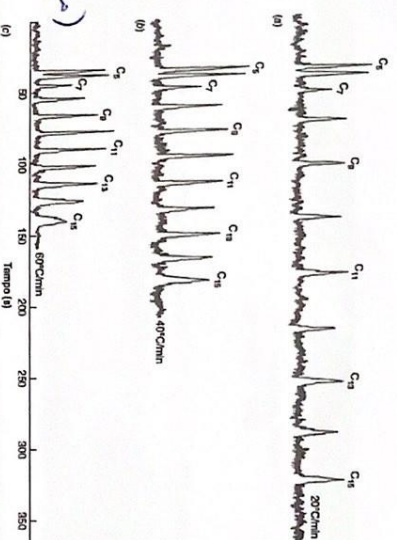
Técnicas Cromatográficas

Cromatografia gasosa para separação de alcanos com programação de temperatura isotérmico vs Gradiente



Programação de temperatura

A temperatura de uma coluna é elevada durante a separação para aumentar a pressão de vapor do analito e diminuir os tempos de retenção dos últimos componente a serem eluídos

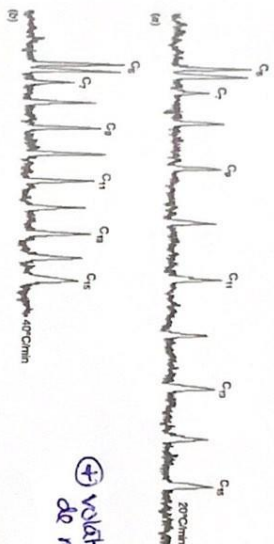


os últimos a sair
têm mais alongamento
- melhoramento do
tempo de retenção
(é rápido)
- eficiência maior (é estvel)

Técnicas Cromatográficas

Cromatografia gasosa para separação de alcanos com programação de temperatura lineares com velocidades de aquecimento 30-150°C

Se fosse usada uma temperatura constante de 20°C, os alcanos mais pesados levariam tanto tempo a sair da coluna que não seriam detectados.



⊕ volátil e tempo de retenção



Para manter uma resolução adequada dos picos que eluem primeiro, os programas normalmente incluem um período de tempo a uma temperatura baixa e constante antes de começar a elevação da temperatura

compostos semelhantes ficam mais tempo retilhos

Factores que governam a separação dos constituintes Cromatografia G-L

Volatilidade:

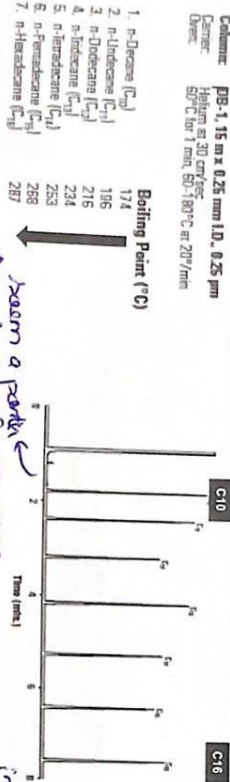
quanto mais volátil o constituinte (> a pressão de vapor) maior a tendência para permanecer vaporizado e mais rapidamente caminha pelo sistema.

Solubilidade

na fase estacionária: quanto maior a solubilidade de um constituinte, mais lenta a sua eluição ao longo da coluna. (Polaridade, grau de solubilidade dos analitos com a F.E. "igual dissolve igual")

Técnicas Cromatográficas

Figure 1: Boiling Point Elution Order for Homologous Series



Homologous series of hydrocarbons. The solutes elute in order of their increasing boiling points; however, the peaks are not spaced in proportion to their respective boiling points.

do ponto de ebulição menor

menores C/ compostos polares

The alcohols (polar) increases in retention relative to hydrocarbon (non-polar) for the DB-225 column. DB-225 is more polar than DB-1.

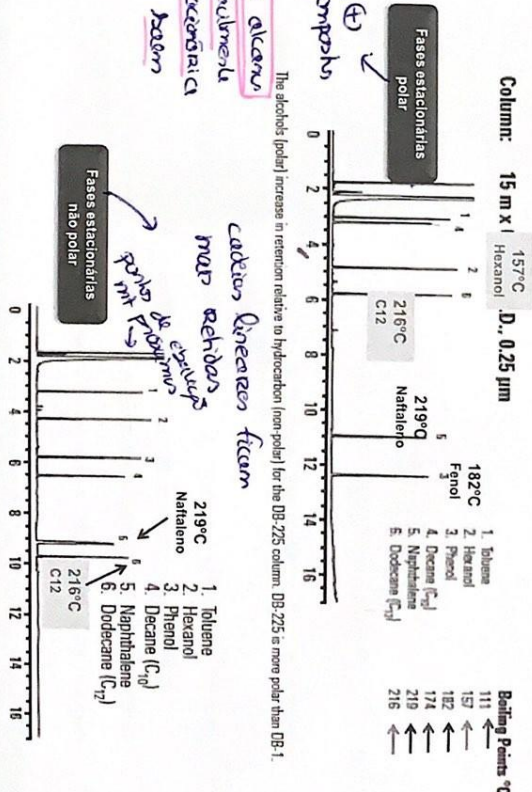


Solutes outside of the homologous series do not elute in the boiling point order.

Técnicas Cromatográficas

Figure 6: Polarity - Retention Relationship

Column: 15 m x 1/8 D., 0.25 µm



cativos lineares ficam mais retilhos

polares de menor

Fases estacionárias não polar

Fases estacionárias polares vs apolares

Fases estacionárias não polares

separam os analitos, sobretudo, por ordem do ponto de ebulição.

Fases estacionárias mais polares

(aumenta o teor da substituição com, por ex., gr. fenil ou cianopropil)
a separação é mais influenciada pela diferença nos momentos dipolares e/ou distribuição de cargas no analito (interacção entre a FE e os solutos).

→ o factor de separação
é o ponto de ebulição

Derivatização

A derivatização é uma técnica utilizada, por exemplo em cromatografia, para transformar um composto em outro com estrutura semelhante (um derivado), por meio de reacção química. Por vezes ocorre a alteração de um grupo funcional. O derivado possui propriedades diferentes, sendo por isso usado para:

- * Aumentar a volatilidade e diminuir a polaridade dos compostos
- * Reduzir a degradação térmica das amostras
- * Aumento da estabilidade térmica
- * Aumentar a resposta do detector
- * Adição de grupos funcionais que aumentem o sinal do detector
- * Melhorar a separação e reduzir o tailing

Cromatografia Gasosa

Vantagens	Desvantagens
Boa exactidão	Amostra deve ser volátil ou estar volatilizada
Precisão elevada em amostras muito pequenas	Não aplicável a amostras <u>termolábeis</u> (mL ou µL)
Eficiente, permite alta resolução	Necessidade de derivatização de alguns compostos
Elevada sensibilidade, <u>limites de detecção da ordem dos ppm e ppb</u>	Amostras complexas "suja" requerem uma extracção prévia
Elevada velocidade análise	

