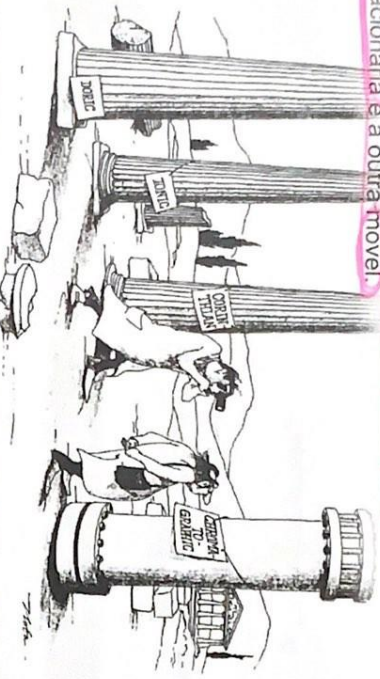


Definição IUPAC:

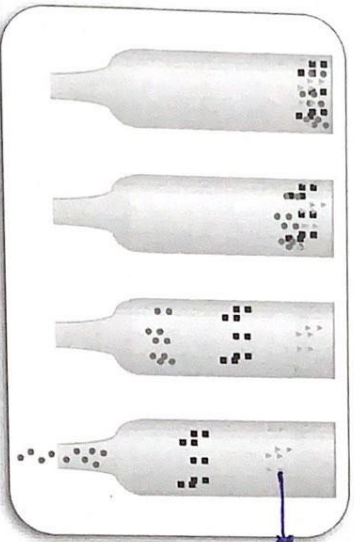
A Cromatografia é um método usado essencialmente na separação de componentes de uma amostra, na qual os componentes se distribuem entre duas fases, uma estacionária e a outra móvel.

CROMATOGRAFIA → separa e quantifica depois



Técnicas Cromatográficas

Princípios da Separação Cromatográfica



Os Δ induzem mas facilmente com a fase móvel, pois demoram mais tempo a sair

- ▶ Todas as técnicas cromatográficas são baseadas no equilíbrio de solutos entre uma fase estacionária e uma móvel
- ▶ Um pequeno volume de amostra é colocado no topo da coluna (preenchida com partículas da fase estacionária)
- ▶ A fase móvel é bombeada para passar ao longo da coluna e o soluto move-se na coluna a diferentes velocidades determinadas pelo seu equilíbrio entre as duas fases

Técnicas cromatográficas

Fase estacionária

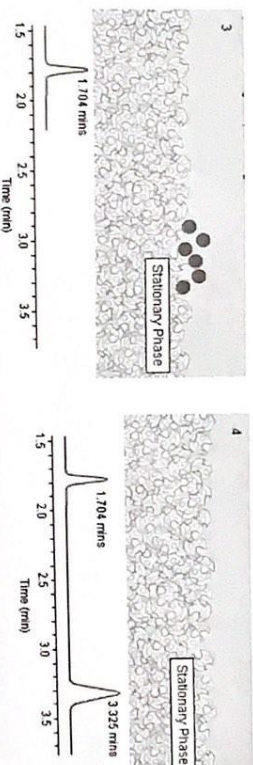
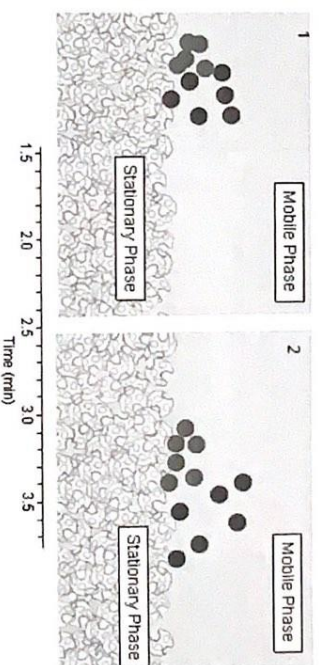
pode ser empacotada numa coluna, espalhada em camada, distribuída como um filme, etc

Fase Móvel

Desloca a amostra, pode ser líquida ou gasosa

Os componentes da amostra distribuem-se de forma diferente entre as duas fases

Técnicas Cromatográficas



Objectivos da análise por cromatografia

Separação

Cromatografia Preparativa

(obter uma dada quantidade de produto puro com elevada produtividade) $\Rightarrow$ purificação da amostra

Cromatografia Analítica

(obter o máximo de informação ($> n^\circ$ de picos) acerca da composição de uma mistura, no mínimo espaço de tempo)



Identificação

Quantificação dos componentes da amostra em estudo

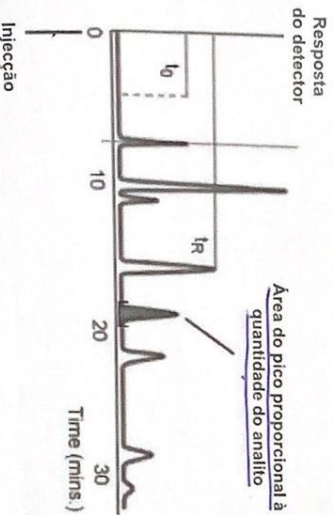
Bombeamento do solvente para a coluna

Cromatograma

t_R - tempo de retenção - identificação do analito
 t_0 - tempo morto - solvente não retido $\rightarrow$ percorrer apenas a coluna

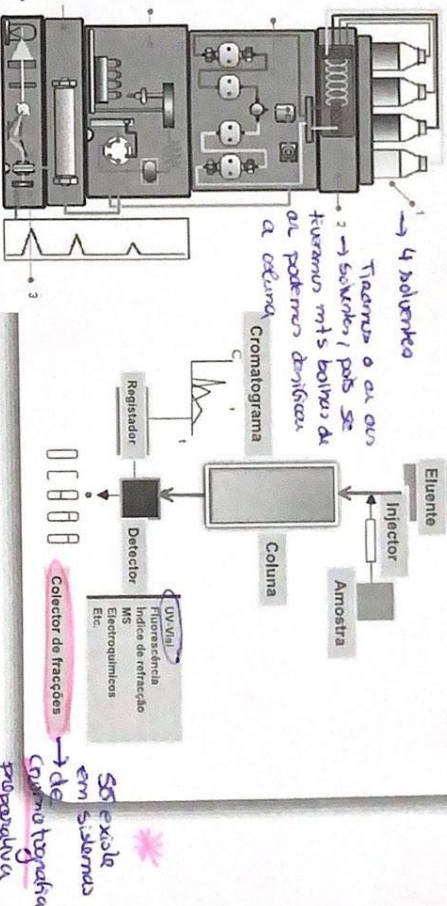
Área do pico proporcional à quantidade do analito $\rightarrow$ A área é proporcional à quantidade de analito

Resposta do detector / sinal do analito:
 $\rightarrow$ compostos separados $\rightarrow$ contornos dos picos
 $\rightarrow$ estes eficientemente separados $\rightarrow$ Sm, Rpg
 têm uma boa separação.

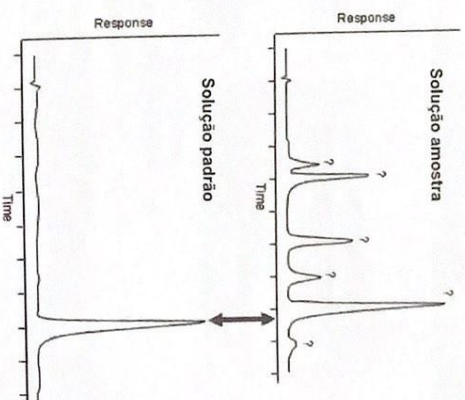


SISTEMA CROMATOGRÁFICO

ESQUEMA GERAL



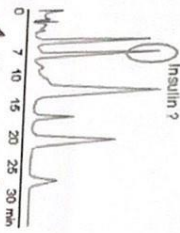
Análise qualitativa



Análise qualitativa Amostra reforçada

Adiciona-se à amostra uma quantidade conhecida de uma solução padrão de insulina

Solução amostra



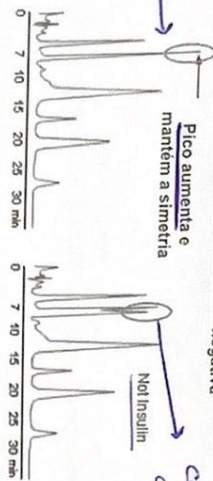
Identificação positiva

Pico aumenta e mantém a simetria

Identificação negativa

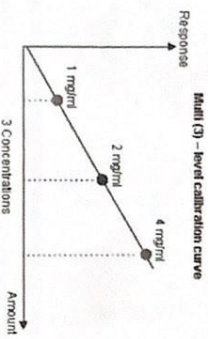
Not Insulin

Como adicionamos insulina, adicionamos uma espécie nova, então se extraí o pico, logo, não é insulina!



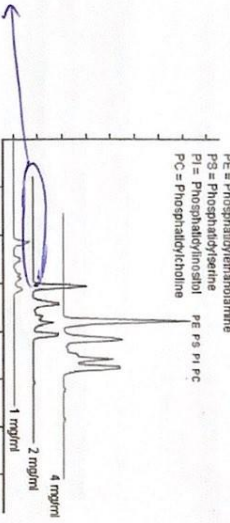
Técnicas Cromatográficas

Análise Quantitativa



PE = Phosphatidylethanolamine
PI = Phosphatidylinositol
PC = Phosphatidylcholine

fase estacionária bem feita

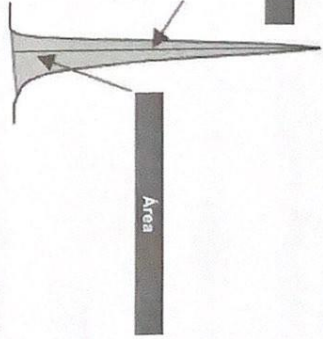


Análise Quantitativa

→ o tempo retardo ou análise quantitativa

Altura do pico

Area



Técnicas Cromatográficas

Fases móveis

o gás tem forças de transporte ao longo da coluna

Fases Estacionárias

Matriz → suporte onde está a fase estacionária

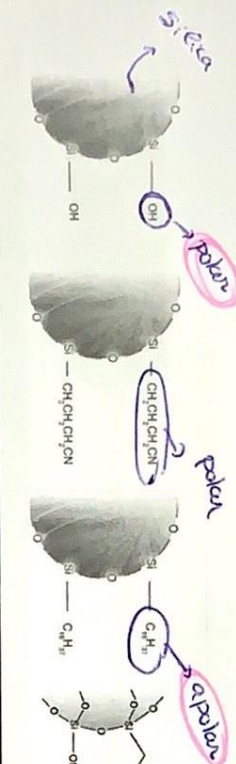
o grupo ligam-se a ela
é o suporte, não afeta a fase estacionária.

- ▶ Para os casos em que a fase móvel usada é líquida, a operação é designada por cromatografia líquida (LC)
- ▶ Para a separação de compostos mais voláteis, a cromatografia gasosa (CG), que usa uma fase móvel gasosa
- ▶ Formados por uma matriz de material natural ou sintético. Possuem uma estrutura micro-cristalina com uma superfície interna acessível aos solutos. Podem ligar-se a estas matrizes diferentes ligandos que constituirão o sítio de ligações

Material	Matriz
Polissacarídeos	Dextrano Agarose Celulose
Polímeros orgânicos sintéticos	Policríamida Poliestireno
Material inorgânicos	Sílica porosa Vidro poroso etc
Material compostos	Policríamida-agarose Sílica porosa-dextrano etc.

→ not reactive

- A introdução de novas estruturas químicas na superfície da matriz, modifica a fase estacionária de forma a promover a interação com as (bio)moléculas presentes na amostra.



Saber o que é mais
pau e o que é
menos pau

↳ Polar
(proteína da tripla
ligação)

► Equilíbrio das fases

(Ajuste das fases móvel e estacionária)

- **Lavagem** ou Remoção do material não ligado

▶ Eluição da(s) molécula(s)

(por alteração da composição da fase móvel)

Regeneração/Limpeza

(Desolgação e lavagem do mte. por parte da estacionária)

Obrigamos a sair o
e não conseguimos tirar
nada.

Eluição

O transporte da amostra ao longo da coluna e a remoção dos seus componentes da coluna – eluição - pode ser realizado de diferentes formas:

50% metanol SO_2 , H_2O
 ↓
 a composição da fase
 móvel é constante ao
 longo da coluna
 cromatográfica

Grazdrenhi

inicio $\rightarrow$ 50 : 50
10min $\rightarrow$ 30 : 70

allora
gradimento a fine
mobile

- ▶ **Isocrática:** a composição do eluente (solvente único ou mistura de solventes) é constante ao longo da análise – a interação soluto/suporte é constante

aliente: a composição do eluente é alterada durante a análise – a interacção soluto/suporte é variável

melhora a separação e reduz o tempo de processo

- Separação isocrática e por gradiente

Se um eluente não permitir uma eluição suficientemente rápida de todos os componentes então utiliza-se uma eluição por gradiente.

$\text{OH} \rightarrow \text{é polar}$, pois ocorre uma grande $\neq$ de eletronegatividades (eletronegativo) e H (eletronegativo).

A ligação resultante é de um dipolo elétrico, com a carga positiva negativa no 0 e a carga positiva positiva no R.

* $C_{18}H_{37}$ → é um hidrocarboneto, um alcano e é considerado par álcool simples.

os alcalinos, por natureza, não apertarem / pois as
ligações sempre entre C e H têm uma distribuição
de cargas uniforme e não criam dipolos significativos
nas moléculas.

- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN} \rightarrow \bar{\epsilon}$ polar. A $\neq$ de eletronegatividade entre carbono e H $\bar{\epsilon}$ acentuadamente pequena, contribuindo pouco para a polaridade. No entanto a ligação entre C e o N $\bar{\epsilon}$ mais polar devido à $\neq$ de eletronegatividade entre esses dois átomos.