

EXPERIMENTO DIDÁTICO SOBRE CROMATOGRAFIA GASOSA: UMA ABORDAGEM ANALÍTICA E AMBIENTAL

José Carlos P. Penteado*, Dulce Magalhães e Jorge C. Masini

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, CP 26077, 05513-970 São Paulo - SP, Brasil

Recebido em 16/10/07; aceito em 16/4/08; publicado na web em 3/10/08

DIDACTIC EXPERIMENT ON GAS CHROMATOGRAPHY: AN ENVIRONMENTAL AND ANALYTICAL APPROACH. This paper describes an experiment to teach the principles of gas chromatography exploring the boiling points and polarities to explain the elution order of a series of alcohols, benzene and *n*-propanone, as well as to teach the response factor concept and the internal standard addition method. Retention times and response factors are used for qualitative identification and quantitative analysis of a hypothetical contamination source in a simulated water sample. The internal standard *n*-propanol is further used for quantification of benzene and *n*-butanol in the water sample. This experiment has been taught in the instrumental analysis course offered to chemistry and oceanography students.

Keywords: benzene; internal standard; contamination.

INTRODUÇÃO

Entre os métodos de separação, a cromatografia tem grande aplicabilidade em áreas tão diversas como ambiental, farmacêutica, análises clínicas, medicina legal e outras. A cromatografia permite separar e quantificar componentes com características físico-químicas muito semelhantes, tais como dioxinas e furanos,¹ em misturas complexas. O limite de detecção obtido pela cromatografia pode ser cerca de 100 a 1000 vezes menor que aquele obtido por outros métodos de separação.²

O processo de separação ocorre através da distribuição dos componentes da amostra entre duas fases: uma fase fixa de grande área superficial (fase estacionária), que é percolada por um fluido (fase móvel) em uma direção definida.³ A fase móvel pode ser um gás inerte, um líquido ou um fluido supercrítico, dependendo do tipo de cromatografia utilizada. A fase estacionária deve ser imiscível com a fase móvel, podendo ser colocada numa coluna ou depositada em uma superfície plana. As fases móvel e estacionária são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre elas de modo distinto. Os analitos fortemente retidos pela fase estacionária movem-se mais lentamente na fase móvel e, conseqüentemente, são eluídos posteriormente aos componentes com baixa interação com a fase estacionária. Essa retenção seletiva dos componentes da amostra pela fase estacionária é uma importante característica e resulta em migrações diferenciadas dos compostos de interesse. De acordo com o estado físico da fase móvel utilizada, a cromatografia em coluna pode ser classificada em cromatografia gasosa (gás inerte), cromatografia líquida⁴ (líquido) ou cromatografia com fluido supercrítico (fluido no estado supercrítico).^{3,5}

Com mais de um século de existência, a cromatografia, iniciada por Michael S. Tswett,⁶ participou direta ou indiretamente de pesquisas que foram laureadas com 12 prêmios Nobel (1937 a 1972).³

Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa^{8,9} é uma das mais importantes técnicas analíticas disponíveis atualmente. Em curto espaço de tempo tornou-

se a principal técnica para separação e determinação de compostos voláteis e/ou volatilizáveis. O poder de resolução excelente alcançado permite a determinação de dezenas de compostos diferentes em matrizes complexas.¹⁰ Outro diferencial da técnica vem a ser sua grande sensibilidade e elevada detectabilidade. Por exemplo, o limite de detecção para o pesticida halogenado Lindane pode atingir valores tão baixos quanto 10^{-16} mol mL⁻¹ empregando-se o detector de captura de elétrons.¹¹ A cromatografia gasosa pode ser aplicada em amostras gasosas, líquidas ou sólidas, desde que os analitos sejam voláteis ou possam ser volatilizados sem sofrer decomposição térmica.

A cromatografia gasosa classifica-se, de acordo com a natureza da fase estacionária, em cromatografia gás-sólido (CGS) e cromatografia gás-líquido (CGL). A fase estacionária pode ser um sólido (CGS) ou um líquido imobilizado sobre um suporte inerte (CGL), sendo que a CGL é a mais versátil e seletiva forma de cromatografia a gás, devido à grande diversidade de fases líquidas disponíveis.

Em linhas gerais, os principais componentes de um cromatógrafo a gás são: cilindro de gás, injetor, forno, coluna, detector, sistema de controle do instrumento e aquisição de dados.

Inicialmente a amostra é introduzida no injetor aquecido (com o auxílio de uma micro-seringa), onde é vaporizada e transferida com o auxílio do gás de arraste para a coluna cromatográfica colocada dentro de um forno pré-aquecido. Os componentes das amostras são eluídos e conduzidos para o detector conectado na saída da coluna. O detector emite um sinal elétrico que é registrado graficamente sob a forma de picos.

Trabalhos didáticos envolvendo cromatografia gasosa redigidos em língua portuguesa têm sido pouco explorados neste periódico. Com o intuito de colaborar com a divulgação e ensino da cromatografia, apresentamos uma proposta de experimento para a disciplina de análise instrumental com enfoque na introdução à cromatografia gasosa para alunos de graduação em Química e áreas correlatas. Este experimento explora a investigação da contaminação por solventes orgânicos em águas. Para isso, os alunos deverão investigar quatro fontes de contaminação em duas amostras de água. Entre os solventes adicionados destaca-se o benzeno, uma substância reconhecidamente carcinogênica, considerada a quinta substância de maior risco, segundo os critérios do programa das Nações Unidas.⁷

*e-mail: jocapen@iq.usp.br

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

Foi utilizado o cromatógrafo a gás modelo Varian GC-3800 (Palo Alto, CA, USA) com detector de ionização em chama (250 °C), injetor (250 °C) com divisão de fluxo na razão 1:25, coluna capilar HP-Innowax (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (J&W, USA) empregando N₂ como gás de arraste, com fluxo constante de 1 mL min⁻¹. A temperatura inicial foi de 80 °C (1 min), seguida por taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até 120 °C, com tempo total de corrida de 6 min. O volume de injeção foi igual a 1,0 µL. A aquisição e o processamento de dados foram feitos com o programa Star Advanced versão 4.52 da Varian.

Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados (isobutanol, *n*-propanol, *n*-propanona, benzeno, *n*-pentanol) foram procedentes da Merck Brasil (Rio de Janeiro, RJ, Brasil) com teores maiores que 98%. A água desionizada foi obtida pelo sistema Milli-Q, apresentando resistividade maior que 18 MΩ cm⁻¹. Foram preparadas as seguintes misturas de soluções de referência, conforme mostrado na Tabela 1: A – isobutanol (500 mg L⁻¹) e *n*-pentanol (500 mg L⁻¹); B – *n*-propanona (500 mg L⁻¹) e *n*-pentanol (500 mg L⁻¹); C – benzeno (350 mg L⁻¹) e *n*-butanol (81 mg L⁻¹); D – benzeno (88 mg L⁻¹) e *n*-butanol (324 mg L⁻¹); padrão interno (PI) *n*-propanol (500 mg L⁻¹) e as amostras W – benzeno (175 mg L⁻¹) e *n*-butanol (40 mg L⁻¹) e H – benzeno (44 mg L⁻¹) e *n*-butanol (162 mg L⁻¹).

Tabela 1. Tempos de retenção (t_r), pontos de ebulição¹³ (PE) e constante dielétrica (ε) dos analitos presentes nas soluções A, B, C, D, W e H

Analitos	t _r (min)	PE (°C)	ε	A	B	C	D	W	H
<i>n</i> -propanona	2,319	56,05	21,01		x				
benzeno	2,734	80,09	2,28			x	x	x	x
<i>n</i> -propanol	3,147	97,20	20,80						
isobutanol	3,562	107,89	17,93	x					
<i>n</i> -butanol	4,089	117,73	17,84			x	x	x	x
<i>n</i> -pentanol	5,449	137,98	15,13	x	x				

Procedimentos

Este experimento se compõe das etapas qualitativa e quantitativa, sendo que a primeira se baseia na identificação dos compostos utilizando o tempo de retenção, enquanto a segunda etapa consiste na determinação da concentração dos analitos a partir das áreas de pico.

Etapa qualitativa

Foram injetadas, seqüencialmente, 1,0 µL das soluções A, B, C, D, W e H diluídas na razão de 1:10 em água desionizada. A seguir foram atribuídos os picos observados nos cromatogramas de cada solução. A identificação de cada componente foi realizada pelos seus respectivos tempos de retenção (t_r), que representam o tempo gasto desde o momento da injeção até a saída do ponto máximo do pico.

Etapa quantitativa

Com auxílio de uma pipeta volumétrica transferiu-se 1,00 mL da solução C e 1,00 mL da solução de PI (500 mg L⁻¹) para um balão volumétrico de 10 mL, completando o volume com água desionizada. O mesmo procedimento foi repetido para as soluções D, W e

H. Um volume de 1,0 µL de cada uma destas soluções foi injetado seqüencialmente no cromatógrafo a gás para a determinação das áreas de pico correspondentes a cada um dos analitos, previamente identificados pelos respectivos tempos de retenção.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa qualitativa

Os resultados de tempo de retenção médios obtidos na etapa qualitativa são apresentados na Tabela 1 em comparação com a composição das soluções, bem como com os pontos de ebulição e constantes dielétricas dos componentes das misturas. Observa-se que a cromatografia gasosa é uma técnica com grande aplicação na determinação simultânea de compostos voláteis e semi-voláteis, tais como álcoois,¹² cetonas e hidrocarbonetos. A separação cromatográfica das diferentes famílias de compostos orgânicos foi possível devido às características físico-químicas dos analitos, tais como ponto de ebulição e constante dielétrica,¹³ parâmetro este que é relacionado com a polaridade das substâncias e que determina a afinidade pela fase estacionária (polar, no presente experimento). Entre todos os componentes, a *n*-propanona é o primeiro componente a ser eluído apesar de apresentar a constante dielétrica mais elevada. Este fato ocorre devido principalmente a sua alta volatilidade (56,05 °C). O segundo componente é o benzeno, que, entre os compostos estudados, é o mais apolar (ε 2,28). Essa característica faz com que tenha baixa afinidade pela fase estacionária (polar), sendo eluído rapidamente. A partir do benzeno, temos o grupo dos alcoóis com 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal. Esses alcoóis têm características polares (ε 15,13 –20,8), sofrendo uma maior interação com a fase estacionária. Entretanto, para estes alcoóis, o ponto de ebulição vem ser a característica dominante na ordem de eluição.

Na solução A (isobutanol e *n*-pentanol), o primeiro componente a ser eluído é o isobutanol. O isobutanol apresenta maior constante dielétrica que o *n*-pentanol, de modo que, baseando-se apenas nos dados de polaridade, se esperaria que o isobutanol fosse o último composto a ser eluído da coluna. Entretanto, o ponto de ebulição do isobutanol é cerca de 30 °C menor que o *n*-pentanol, de modo que para compostos cuja diferença de polaridade não seja elevada, a volatilidade se torna o principal parâmetro que define a ordem de eluição. No caso da solução B (*n*-propanona e *n*-pentanol), a *n*-propanona é o primeiro componente a ser eluído, seguido pelo *n*-pentanol. Com base apenas na polaridade, a *n*-propanona deveria ser eluída por último, pois apresenta uma constante dielétrica maior que o *n*-pentanol e, portanto, possui uma maior afinidade com a fase estacionária. No entanto, é eluída primeiro, pois seu ponto de ebulição é cerca de três vezes menor que o do *n*-pentanol. Em relação às soluções C, D, W e H (benzeno e *n*-butanol), o benzeno é eluído antes do *n*-butanol. Nesse caso os valores de constante dielétrica e ponto de ebulição justificam a ordem de eluição, pois o benzeno é menos polar e tem ponto de ebulição menor que o *n*-butanol.

O princípio do funcionamento do detector de ionização de chama (DIC) baseia-se na combustão dos compostos na chama. Os compostos não suscetíveis à combustão, como água, CO₂ e compostos inorgânicos em geral, não apresentam sinal mensurável neste detector.³ O sinal elétrico enviado pelo detector é registrado graficamente sob a forma de pico, cuja área é proporcional à concentração do analito. O perfil cromatográfico da solução C e da amostra W, bem como da solução D e amostra H são semelhantes (Figura 1). Na Figura 1a, o pico com maior intensidade vem a ser o benzeno (solução C e amostra W), enquanto que na Figura 1b isso ocorre com o *n*-butanol (solução D e amostra H). Essa observação pode ser constatada numericamente na Tabela 2, onde estão descritos os resultados das áreas obtidas nos cromatogramas e as relações de áreas entre benzeno e *n*-butanol para as soluções C e D e as amostras W e H.

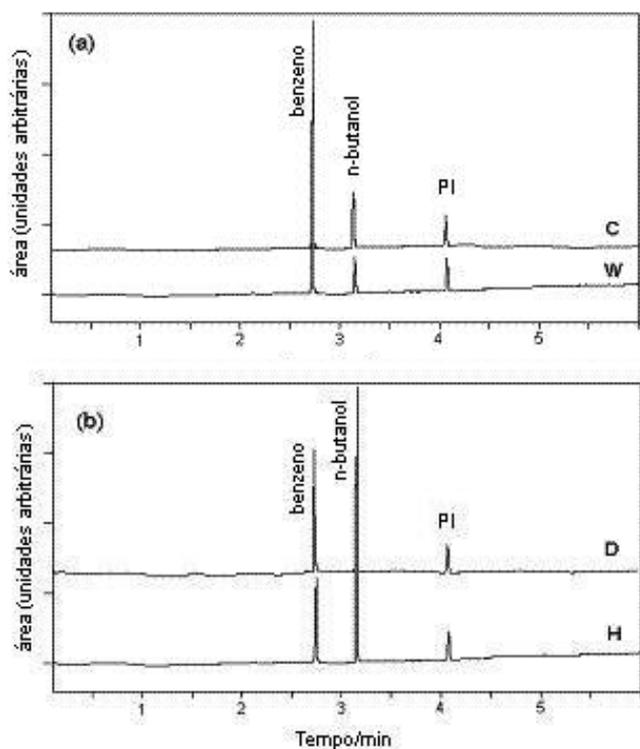


Figura 1. Cromatogramas obtidos da amostra W em comparação com a solução de referência C (1a) e amostra da amostra H em comparação com a solução de referência D (1b)

Uma vez que a relação de área entre o benzeno e o *n*-butanol da solução C é 7,49, pode-se inferir que é esta a fonte de contaminação da amostra W, para a qual a relação de área destes dois compostos é de 7,53. De modo similar, pode-se inferir que a solução D (relação 0,47) é a fonte de contaminação da amostra H (relação 0,40).

Etapa quantitativa

A quantificação dos analitos foi feita pelo método de adição de padrão interno, que consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância (padrão interno) na amostra a ser analisada e no padrão, relacionando então as duas áreas obtidas.¹⁴ O padrão interno aumenta a precisão dos resultados ao minimizar as incertezas introduzidas especialmente pela injeção da amostra, mas também por variações de vazão e das condições da coluna.¹⁵⁻¹⁷ Neste experimento o padrão interno selecionado foi o *n*-propanol cujo tempo de retenção está depois do benzeno e *n*-butanol.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos dos fatores de resposta dos analitos benzeno e *n*-butanol para os padrões C e D e as concentrações calculadas para as amostras W e H.

Concentrações nas amostras W e H

A determinação das concentrações de benzeno e *n*-butanol foi feita a partir da adição de padrão interno, no caso *n*-propanol, na concentração de 500 mg L⁻¹. Para isso, a primeira etapa envolve a obtenção do chamado fator de resposta (F) do detector para os dois analitos, o qual é definido como:¹⁸

$$F = \frac{\left(\frac{A_p}{C_p}\right)}{\left(\frac{A_{PI}}{C_{PI}}\right)} \quad (1)$$

onde A_p e C_p são a área de pico e concentração de um padrão do analito (benzeno ou *n*-butanol), obtidos com os cromatogramas das soluções C ou D, enquanto A_{PI} e C_{PI} são a área de pico e concentração do padrão interno (*n*-propanol 500 mg L⁻¹), respectivamente. De posse do fator de resposta, e reescrevendo a Equação 1, a concentração do analito na amostra pode ser calculada a partir da Equação 2:

$$C_x = \frac{A_x \cdot C_{PI}}{F_x \cdot A_{PI}} \quad (2)$$

onde C_x é a concentração do analito X na amostra desconhecida, F_x é o fator de resposta para este analito e A_x é a sua respectiva área de pico, obtida dos cromatogramas das soluções W ou H.

Embora teoricamente os fatores de respostas obtidos nas soluções padrões C e D deveriam ser os mesmos, na prática houve uma diferença para o benzeno e *n*-butanol (Tabela 2). Essa variação ocorreu provavelmente devido a diferenças entre as concentrações dos analitos nas soluções C e D. Assim, o cálculo das concentrações dos analitos nas soluções das amostras W e H foi feito empregando os fatores de resposta das soluções de referência C e D, respectivamente.

As concentrações obtidas de benzeno e *n*-butanol nas amostras W e H foram próximas aos dos valores esperados, conforme mostrado na Tabela 2, indicando que o método de padronização interna foi eficiente na quantificação dos analitos. As concentrações de benzeno encontradas neste experimento são elevadas quando comparadas com alguns valores reportados na literatura.²⁰ Porém, recentemente foram divulgados acidentes desastrosos no Rio Songhua (China), onde ocorreram vazamentos de enormes quantidades de benzeno e nitrobenzeno.²¹ Este acidente afetou o abastecimento de milhões de habitantes tendo um custo estimado de remediação de US\$ 3,8 bilhões.²²

CONCLUSÕES

O experimento proposto pode ser facilmente implementado em laboratórios de ensino de graduação em Química e áreas correlatas. Os pontos discutidos fornecem ao docente flexibilidade na abordagem didática e despertam o interesse dos alunos na aplicabilidade

Tabela 2. Resultados de áreas e suas relações, bem como as concentrações obtidas dos analitos benzeno e *n*-butanol

Solução	Áreas			Relação benzeno/ <i>n</i> -butanol	Fator de Resposta		Concentração das amostras ^a (mg L ⁻¹)	
	benzeno	<i>n</i> -butanol	PI		benzeno	<i>n</i> -butanol	benzeno	<i>n</i> -butanol
C	3328	444	241	7,49	19,7273	11,3724		
W	1429	190	210	7,53			172,5 ± 0,2	39,7 ± 0,1
D	649	1377	196	0,47	18,8138	10,8418		
H	304	741	191	0,40			42,3 ± 0,3	178,9 ± 0,5

^aAs concentrações esperadas de benzeno e *n*-butanol eram, respectivamente, 175 e 39,7 mg L⁻¹ na amostra W e 44 e 162 mg L⁻¹ na amostra H.

da cromatografia gasosa. Neste experimento foi feita uma simulação de contaminação de benzeno em água, pois em condições reais a concentração máxima de benzeno em água potável permitida pela legislação é de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (CETESB).¹⁹

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Pavuk, M.; Patterson, D. G.; Turner, W. E.; Deedham, L. L.; Ketchum, N. S.; *Chemosphere* **2007**, *68*, 62.
2. Harvey, D.; *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill: New York, 2000.
3. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.
4. Manfredi, A. L. P.; Collins, C. H.; Manfredi, J. E.; *Quim. Nova* **1983**, *6*, 103.
5. Lanças, F. M.; *Cromatografia em Fase Gasosa*, Acta: São Carlos, 1993.
6. Ettre, L. S.; *Chromatographia* **2000**, *51*, 7.
7. McMichael, A. J.; *Carcinogenicity of benzene, toluene and xylene: epidemiological and experimental evidence*, IARC Sci Publ., 1988.
8. Collins, R. L.; Aquino Neto, F. R.; Silva, J. R. P.; *Quim. Nova* **1988**, *11*, 4.
9. Collins, C. H.; Berg, R. G.; Valente, A. L. P.; Kugler, W.; Murta, A. L. M.; *Quim. Nova* **1982**, *5*, 115.
10. Focant, J. F.; Sjoin, A.; Patterson, D. G. J.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1040*, 227.
11. Grob, R. L.; *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th ed., John Wiley & Sons: Hooboken, 2004.
12. Musshoff, F.; *J. Chromatogr., B* **2002**, *781*, 457.
13. *Handbook Chemistry and Physics*, 87th ed., CRC Press: San Francisco, 2006.
14. Ciola, R.; *Fundamentos da Cromatografia a Gás*, Edgard Blücher: São Paulo, 1985.
15. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
16. Magge, J. A.; Antony, H. C.; *J. Chem. Educ.* **1999**, *76*, 252.
17. Cazes, J.; *Encyclopedia of Chromatography*, Marcel Dekker: New York, 2004.
18. Rice, G. W.; *J. Chem. Educ.* **1987**, *64*, 1055.
19. Ministério da Saúde, Portaria nº 518, 25/3/2004, cap. 4, art. 14; *Norma de qualidade de água para consumo humano*.
20. Owens, J. E.; Niermeyer, E. D.; *Environ. Pollut.* **2006**, *140*, 506.
21. Zhu, L.; Ma, B.; Zhang, L.; Zhang, L.; *Chemosphere* **2007**, *68*, 10.
22. http://english.gov.cn/2006-01/10/content_152926.htm, acessada em Outubro 2007.