UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Química

SILVANA ODETE PISANI

**Contribuições para o desenvolvimento de método
por GC×GC para a análise de nitro-HPAs
em material particulado no ar**

Versão corrigida da Tese defendida
Conforme Resolução CoPGr 5890

O original encontra-se disponível na
Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
08/02/2013

SILVANA ODETE PISANI

**Contribuições para o desenvolvimento de método
por GC×GC para a análise de nitro-HPAs
em material particulado no ar**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em Ciências (Programa: Química)*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lilian Rothschild

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pisani, Silvana Odete

P674c Contribuições para o desenvolvimento de método por GCxGC
para análise de nitro-HPAs em material particulado no ar /
Silvana Odete Pisani. -- São Paulo, 2013.
151p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.

Orientador: Carvalho, Lilian Rothschild Franco de

1. Métodos de separação : Análise química 2. Cromatografia :
Química analítica I. T. II. Carvalho, Lilian Rothschild Franco
de, orientador.

543.08 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**“Contribuições para o desenvolvimento de método por
GCxGC para a análise de nitro-HPAs em material
particulado no ar”**

SILVANA ODETE PISANI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutora em Ciências –
Programa: Química.

Aprovada por:

Profa. Dra. Lilian Rothschild
Orientadora e Presidente

Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago
IQ - USP

Prof. Dr. Jorge Cesar Masini
IQ - USP

Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis
FFCLRP - USP

Prof. Dr. Fabio Augusto
IQ - UNICAMP

SÃO PAULO
20 de maio de 2013

Aos meus pais **Maria e Vittorio**, que em vida sempre me apoiaram, compreenderam, incentivaram, e agora me ajudam e protegem.

À minha irmã **Maria Ângela**, que nos deixou precocemente.

À minha irmã **Ana Maria**, pelo seu apoio incondicional e incentivo irrestrito para a conclusão deste trabalho.

Ao meu tio **Padre Carlos** pelas orações, atenção e afeto.

Ao meu irmão **Gilberto** e esposa, e queridos sobrinhos: **Victor, Pietro, Julia e Nicole**, pelo acolhimento e carinho.

À **Chela** pela amizade fraternal e compreensão.

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido realizado sem a participação inestimável de cada uma das pessoas a seguir, por isso sou sinceramente muito agradecida à (ao):

Prof^a Dr^a Lilian Rothschild, pela sua confiança em meu trabalho, grande dedicação na orientação, apoio irrestrito e compreensão nos momentos difíceis.

Luiz Bravo, Diretor da empresa Nova Analítica, por sua ampla colaboração e interesse neste trabalho e por me proporcionar as condições necessárias para eu levá-lo a bom termo.

Daniela Cavagnino, pelos seus ensinamentos sobre GCxGC, dedicação no esclarecimento das minhas dúvidas e interesse na solução das dificuldades operacionais.

Prof. Dr. Fabio Augusto, Prof. Dr. Marcio P. Pedroso, Stanislaw Bogusz Jr., Leandro W. Hantao, do IQ-UNICAMP, pelos esclarecimentos e interesse em um trabalho em colaboração.

Kely F. Souza e Eduardo Dias, pelos extratos orgânicos e soluções de padrões cedidos para as minhas análises e pela amizade e companhia. Marcelo L. A. Lopes, André M. de Souza, Auzébio Valvassori Filho e Ivan A. Petroni, do Laboratório de Estudos do Meio Ambiente do IQ-USP, pela amizade. Aos técnicos de laboratório Renato V. do Nascimento Jr. e Luciana S. Cunha, pela disponibilidade, colaboração e amizade.

Marcos Macedo, Danilo Pierone, Vinicius Almeida, Sidnei Moura, Nelson Silveira, Carlos Cavalheiro, Fabio Moraes, Henrique Melo, Amauri Filho, Cleyton Mendes, Renato Boeche, da Nova Analítica, pelo esforço em solucionar os problemas instrumentais.

Teresa Guzzo e Dr^a Maria Antonieta Frasson Leme, que me socorreram no momento mais difícil desse período de doutorado.

Cibele, Milton, Emiliano e Paulo, da SPG, e a todos os demais funcionários do IQ-USP que sempre me atenderam com atenção e simpatia. Funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, em especial à Adriana e Leila, que muito me ajudaram na recuperação da literatura científica.

Amigas e amigos que muito me incentivaram a concluir este trabalho.

FAPESP pelo financiamento deste trabalho de pesquisa.

RESUMO

(Pisani, S. O.) **Contribuições para o desenvolvimento de método por GCxGC para a análise de nitro-HPAs em material particulado no ar**, 2013 (151 p). Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Química Analítica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrados (nitro-HPAs) são potencialmente genotóxicos, por isso existe um grande interesse na determinação analítica desses compostos no material particulado no ar. Os nitro-PAHs são emitidos diretamente para a atmosfera pela combustão incompleta ou podem ser formados *in situ* a partir dos HPAs precursores.

Neste trabalho, são apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento de um método de análise de nitro-HPAs (1-nitronaftaleno, 2-nitronaftaleno, 1-nitropireno, 2-nitropireno, 2-nitrofluoranteno, 3-nitrofluoranteno, 1,3-dinitropireno, 1,6-dinitropireno, 2-nitrofluoreno, 6-nitrocriseno, 7-nitrobenzo(a)antraceno, 9-nitroantraceno e 9-nitrofenantreno) por GCxGC. A separação destes compostos por GCxGC pode simplificar a etapa de pré-tratamento do extrato orgânico oriundo do material particulado no ar.

A GCxGC promove a separação em duas colunas com mecanismos de separação diferentes, conectadas em série, o que resulta em uma capacidade de separação maior. O sistema GCxGC empregado neste trabalho possui um injetor com programação de temperatura (PTV), um modulador criogênico de dois jatos de CO₂ líquido (*Dual Jet*) e um detector por ionização em chama (FID). A separação foi feita empregando a fase estacionária apolar 5% fenil polisilfenilene siloxano na primeira coluna (30 m / 0,25 mm / 0,25 µm) e a semipolar 14% cianopropilfenil polisiloxano na segunda coluna (1 m / 0,10 mm / 0,10 µm).

Diferentes condições cromatográficas foram testadas, como: programação de temperatura no PTV, de 40-90°C até 350°C, com taxa de aquecimento de 2,2 e 14,5°C/s; programação de temperatura no forno, de 40-90°C até 300°C, com taxa de aquecimento de 2, 2,5 e 3°C/min; períodos de modulação de 3, 4 e 5s. O volume

injetado foi 2 μ L, no modo *splitless*; a vazão do gás de arraste (He) foi constante e igual a 1 mL/min e o detector FID foi operado em 120 Hz.

As larguras de pico medidas em 10% da altura variaram de 167 a 350ms para 1-nitronaftaleno e 6-nitrocriseno, respectivamente, e a capacidade de pico para o conjunto de colunas de separação usado foi estimada em cerca de 9800.

Parâmetros de validação, tais como os limites de detecção (200 a 500 ng/mL) e de quantificação (650 a 1600 ng/mL) para alguns nitro-HPAs foram determinados. Para a quantificação, foram testados os métodos por padronização interna e externa, sendo que, através dos resultados deste trabalho, pode-se mostrar que a determinação de nitro-HPAs por GCxGC com o modulador empregado é possível se for feita através do método de padronização interna.

O sistema GCxGC empregado causou dificuldades operacionais, principalmente na conexão das colunas e na modulação. Perdas de massa de analito foram detectadas nas análises por GCxGC, muito provavelmente causadas por uma conexão parcial das colunas. Isso poderia ser evitado se a conexão fosse feita pela fusão das colunas a um conector de vidro adequado a essa finalidade. Picos modulados divididos foram observados com frequência, o que comprometeu a precisão e exatidão dos resultados. A divisão dos picos ocorreu de modo aleatório dificultando a identificação da causa mais provável para a sua ocorrência.

Cromatogramas GCxGC de extratos orgânicos não fracionados de particulados no ar, oriundos de queima direta de palha de cana-de-açúcar, de região afetada pela queima de cana-de-açúcar e de área urbana da cidade de São Paulo, mostraram a potencialidade do método.

Palavras-chave: cromatografia gasosa bidimensional abrangente, PTV-GCxGC-FID, modulador criogênico de dois jatos de CO₂ líquido, *Dual Jet*, nitro-HPAs, material particulado no ar.

ABSTRACT

(Pisani, S. O.) **Contributions to the GCxGC method development for the analysis of nitro-PAHs in airborne particulate material**, 2013 (151 p). PhD Thesis – Post-graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAHs) are potentially genotoxic, so there is a great interest in the analytical determination of these compounds in airborne particulate matter. The nitro-PAHs are emitted directly into the atmosphere by incomplete combustion or may be formed *in situ* from PAHs.

In this work, results obtained from the development of an analytical method for nitro-PAHs by GCxGC are presented. The nitro-PAHs studied were: 1-nitronaphthalene, 2-nitronaphthalene, 1-nitropyrene, 2-nitropyrene, 2-nitrofluoranthene, 3-nitrofluoranthene, 1,3-dinitropyrene, 1,6-dinitropyrene, 2-nitrofluorene, 6-nitrochrysene, 7-nitrobenzo(a)anthracene, 9-nitroanthracene and 9-nitrophenanthrene. The separation of these compounds by GCxGC should simplify the pretreatment step of the airborne particulate organic extract.

In GCxGC two capillary columns of different mechanisms of separation are coupled by an interface called modulator, which increase significantly the chromatographic resolution. The GCxGC system used in this work is equipped with a PTV injector, a dual-stage double jets CO₂ cryogenic modulator and a flame ionization detector (FID). The separation was carried out using a nonpolar stationary phase 5% methyl phenyl polysiloxane in the first column (30 m / 0.25 mm / 0.25 µm) and a semipolar 14% cyanopropyl phenyl dimethyl polysiloxane in the second column.

Different chromatographic conditions were tested: the PTV was programmed from 40-90°C to 350°C at 2.2 and 14.5°C/s; the oven was programmed from 40-90°C to 350°C at 2.0, 2.5 and 3.0°C/min; the modulation periods tested were 3, 4 and 5s. The injected volume was 2µL in splitless mode, the carrier gas (He) flow rate of 1 mL/min was constant and the FID detector was operated at 120 Hz.

Validation parameters, such as the limit of detection (200 - 500 ng/mL) and quantitation (650 - 1600 ng/mL) were determined. For quantification, the internal and

external standardization methods were tested, and through the results of this study, it can be shown that the determination of nitro-PAHs by GCxGC with the modulator used is possible if made by internal standardization method.

The GCxGC system presented operational difficulties, particularly in the column connection and in the modulation zone. A partial connection of the columns resulted in mass loss of the analytes. The connection of the columns could be more effective if it was made by fusing the columns to a glass connector suitable for this purpose. Divided modulated peaks were frequently observed, which compromised the precision and accuracy of the results. The division of the peaks occurred randomly hindering the identification of the most likely cause for its occurrence.

GCxGC chromatograms corresponding to unfractionated organic extracts of airborne particulate material from the sugarcane straw burning, from an area impacted by sugar cane burning emissions and from an urban area of São Paulo City showed the capability of the method.

Keywords: Comprehensive two-dimensional gas chromatography, PTV-GCxGC-FID, CO₂ dual jet cryogenic modulator, nitro-PAHs, atmosphere particulate material.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

¹ D	Coluna capilar da primeira dimensão
² D	Coluna capilar da segunda dimensão
1D	Unidimensional, Monodimensional
2D	Bidimensional
1D-GC	Cromatografia a gás unidimensional, monodimensional
2D-GC	Cromatografia a gás bidimensional
DCM	Diclorometano
d _f	Espessura de filme de fase estacionária
d.i.	Diâmetro interno
DPR	Desvio Padrão Relativo
U. S. EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
FE	Fase Estacionária
FID	Detector por ionização em chama
GC	Cromatografia a gás
GC-GC	Cromatografia a gás bidimensional de frações parciais (por <i>heartcut</i>)
GCxGC	Cromatografia a gás bidimensional abrangente
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC	Cromatografia a líquido de alto desempenho
I	Injeção cromatográfica (análises em triplicata de quaisquer soluções foram identificadas nas figuras pelas letras I, I' e I'')
L	Comprimento de coluna
MM	Massa molecular
MPA	Material particulado atmosférico

ms	Milissegundo
MS	Espectrômetro de massas
N	Número de pratos teóricos
n_c	Capacidade de pico de um sistema cromatográfico
1n_c	Capacidade de pico da primeira dimensão
2n_c	Capacidade de pico da segunda dimensão
tn_c	Capacidade de pico total de um sistema GCxGC
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
PI	Padrão interno
P _M	Período de Modulação
PPO	Procedimento Padrão de Operação
PTV	Vaporizador com programação de temperatura
R _T	Taxa de aquecimento
SRM	<i>Standard Reference Material</i>
SSL	Injetor <i>split/splitless</i>
t _M	Tempo morto da coluna cromatográfica
t _R	Tempo de retenção
1t_R	Tempo de retenção na coluna da primeira dimensão
2t_R	Tempo de retenção na coluna da segunda dimensão

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição da solução padrão de HPAs.....	42
Tabela 3.2 - Soluções padrão de nitro-HPAs individuais.....	43
Tabela 3.3 - Material de referência NIST SRM 1587 em metanol.....	43
Tabela 3.4 - Composição das soluções de nitro-HPAs para a construção de curvas analíticas (ng/mL).....	46
Tabela 3.5 - Fases estacionárias e dimensões das colunas empregadas.....	51
Tabela 3.6 - Condições cromatográficas mantidas constantes em todas as análises de soluções de HPAs e nitro-HPAs.....	53
Tabela 3.7 - Condições cromatográficas das análises da solução HPA/NHPA/n-alceno...	53
Tabela 3.8 - Condições cromatográficas das análises das soluções de nitro-HPAs para a construção de curvas analíticas.....	53
Tabela 3.9 - Condições cromatográficas do Procedimento Padrão de Operação.....	54
Tabela 4.1 - Número de picos primários modulados três, quatro e cinco vezes.....	73
Tabela 4.2 - Larguras de pico da coluna 2D (2w_b) medidas em 10% da altura.....	75
Tabela 4.3 - Larguras de pico obtidas com diferentes moduladores resfriados por CO_2 líquido.....	76
Tabela 4.4 - Dados obtidos do cromatograma GCxGC na Figura 4.8 e resoluções entre naftaleno e n-dodecano calculadas.....	78
Tabela 4.5 - Valores calculados para capacidades de pico da 1D (1n_c), 2D (2n_c) e do conjunto de colunas (1n_c).....	83
Tabela 4.6 - Desvios Padrão Relativos (DPR) dos tempos de retenção nas duas dimensões...	86
Tabela 4.7 - Desvios padrão relativos (2DPR) dos 2t_R obtidos com diferentes moduladores resfriados por CO_2 líquido e detector FID.....	86
Tabela 4.8 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de nitro-HPAs determinados neste trabalho e apresentados na literatura científica.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Ilustração do processo criogênico de modulação com dois jatos.....	24
Figura 1.2 - Três apresentações diferentes do resultado de uma análise por GCxGC....	26
Figura 1.3 - Cromatograma GCxGC de óleo diesel.....	31
Figura 1.4 - Segmento de um cromatograma GCxGC apresentado em três dimensões.....	38
Figura 3.1 - Fotos do modulador <i>Dual Jet</i>	47
Figura 3.2 - Representação gráfica do sistema GCxGC.....	48
Figura 3.3 - Esquema do fluxo de CO ₂ líquido.....	48
Figura 3.4 - <i>Jets</i> do modulador.....	49
Figura 3.5 - Tubulação e conexões entre o cilindro de CO ₂ e o cromatógrafo.....	50
Figura 3.6 - Limpeza do <i>jet</i>	50
Figura 3.7 - Conectores empregados na conexão das colunas capilares da GCxGC.....	51
Figura 3.8 - <i>Liners</i> de vidro borossilicato desativado avaliados.....	52
Figura 3.9 - Picos modulados de n-alcenos nas condições do PPO.....	55
Figura 4.1 - Parte da planilha de cálculo da pressão do gás de arraste com os dados referentes a este trabalho.....	62
Figura 4.2 - Curvas de N vs. p_{in}	63
Figura 4.3 - Parte da planilha de cálculo da pressão do gás de arraste.....	64
Figura 4.4 - Médias das áreas e Desvios Padrão Relativos (%): azul - <i>liner</i> com lâ de vidro (n=6); vermelho - <i>liner</i> sinterizado (n=3).....	68
Figura 4.5 - Áreas obtidas com tempos de <i>splitless</i> 2 e 3 min.....	70
Figura 4.6 - Médias das áreas obtidas com duas taxas de aquecimento do PTV.....	72
Figura 4.7 - Cromatogramas GCxGC da solução 6-NHPAs.....	74
Figura 4.8 - Cromatograma GCxGC da solução HPA/NHPA/n-alceno.....	79

Figura 4.9 - Cromatograma GCxGC da solução 13-NHPA (375 ng/mL).....	81
Figura 4.10 - Diagramas de ápices dos picos em três cromatogramas GCxGC da solução HPA/NHPA/n-alceno.....	88
Figura 4.11 - Picos bidimensionais de acenaftileno (Acn).....	89
Figura 4.12 - Picos modulados de n-C16 e InP nas injeções em triplicata da solução HPA/NHPA/n-alceno.....	91
Figura 4.13 - Cromatograma GCxGC da solução HPA/NHPA/n-alceno.....	93
Figura 4.14 - Picos modulados de 2-NFlu, 9-NAnt e BaA (PI) na triplicata da solução de NHPAs (1).....	95
Figura 4.15 - Áreas e Desvios Padrão Relativos (%) dos picos dos componentes da solução HPA/NHPA/n-alceno.....	97
Figura 4.16 - Cromatogramas GCxGC da solução 13-NHPA em triplicata.....	99
Figura 4.17 - Segmentos de cromatogramas brutos de n-alcenos.....	100
Figura 4.18 - Picos modulados da solução n-alcenos analisada segundo o PPO, após a manutenção do sistema GCxGC.....	102
Figura 4.19 - Áreas dos picos na Solução de Calibração (1).....	104
Figura 4.20 - Segmentos de mesmas dimensões de três cromatogramas GCxGC da Solução (4) de NHPAs e gráfico das áreas de cada componente dessa solução.....	106
Figura 4.21 - Curvas analíticas obtidas pelo método da padronização interna.....	108
Figura 4.22 - Gráficos dos resíduos das regressões lineares das curvas analíticas...	109
Figura 4.23 - Curvas analíticas obtidas pelo método da padronização externa.....	110
Figura 4.24 - Áreas de nitro-HPAs e seus Desvios Padrão Relativos.....	111
Figura 4.25 - Concentrações (ng/mL) da solução preparada a partir do SRM 1587 NIST.....	114
Figura 4.26 - Áreas e Desvios Padrão Relativos das áreas dos três componentes da solução de n-alcenos.....	115
Figura 4.27 - Áreas de n-alcenos obtidas por GCxGC com dois conectores diferentes entre as colunas.....	116
Figura 4.28 - Cromatograma GCxGC do extrato combinado e não fracionado de material particulado emitido diretamente da queima de palha de cana- de-açúcar.....	120

Figura 4.29 - Regiões ampliadas de cromatogramas GCxGC do Extrato queima (1).....	121
Figura 4.30 - Cromatograma GCxGC do extrato de material particulado atmosférico coletado em área afetada pela queima de cana-de- açúcar.....	122
Figura 4.31 - Cromatogramas GCxGC de extratos de MPA urbano.....	124
Figura 5.1 - Seções de dois cromatogramas (I e I') da solução n-alcanos obtidos em sequência.....	128

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Princípios operacionais da GCxGC	23
1.1.1. Mecanismo da modulação	23
1.1.2. Critério de modulação	26
1.2. Características principais da GCxGC	27
1.2.1. Ortogonalidade	27
1.2.2. Capacidade de pico	29
1.2.3. Razão Sinal/Ruído	30
1.2.4. Cromatogramas GCxGC estruturados	30
1.3. Instrumentação e programa de tratamento de dados	32
1.3.1. Modulador	32
1.3.2. Detectores	36
1.3.3. Sistemas de tratamento de dados	37
1.4. Aplicações	39
2. OBJETIVOS	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1. Padrões	42
3.1.1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)	42
3.1.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrogenados (nitro-HPAs)	42
3.1.2.1. Soluções individuais de padrões de nitro-HPAs	42
3.1.2.2. Material de referência NIST	43
3.1.3. Alcanos	44

3.2. Solventes.....	44
3.3. Soluções de padrões.....	44
3.3.1. Solução de n-alcenos para o procedimento padrão de operação.....	44
3.3.2. Solução HPA/NHPA para fins qualitativos.....	44
3.3.3. Solução HPA/NHPA/n-alceno para fins qualitativos.....	44
3.3.4. Solução 13-NHPAs para a determinação da concentração mínima detectável.....	45
3.3.5. Solução 6-NHPAs para fins qualitativos.....	45
3.3.6. Soluções de nitro-HPAs para a construção de curvas analíticas.....	45
3.4. Instrumentação e Materiais.....	46
3.4.1. Sistema dedicado à GCxGC.....	46
3.4.1.1. Cromatógrafo a gás.....	46
3.4.1.2. Descrição do modulador e da sua operação.....	47
3.4.2. Colunas cromatográficas.....	51
3.4.3. Conectores de capilares.....	51
3.4.4. <i>Liners</i>	52
3.4.5. Gases.....	52
3.5. Condições cromatográficas.....	52
3.6. Procedimento padrão de operação.....	54
3.7. Identificação dos picos cromatográficos.....	55
3.8. Curvas Analíticas.....	56
3.9. Extratos orgânicos de material particulado.....	56
3.9.1. Extrato orgânico de material particulado emitido diretamente da queima de palha de cana-de-açúcar.....	56

3.9.2. Extrato orgânico de material particulado atmosférico coletado em área afetada pela queima de cana-de-açúcar.....	57
3.9.3. Extratos orgânicos de material particulado atmosférico coletado em área urbana da cidade de São Paulo.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
4.1. Desenvolvimento de metodologia para a determinação de HPAs e nitro-HPAs em extrato orgânico de MPA por GCxGC.....	58
4.1.1. Proposição de colunas.....	58
4.1.2. Critério para escolha da vazão do gás de arraste.....	60
4.1.3. Critério de escolha da programação de temperatura do forno de colunas.....	65
4.1.4. Estudo experimental das condições de introdução da amostra na coluna.....	66
4.1.4.1. Tipo de <i>liner</i>	67
4.1.4.2. Tempo de <i>splitless</i>	69
4.1.4.3. Programação de temperatura no injetor PTV.....	70
4.1.5. Definição do período de Modulação.....	73
4.2. Avaliação do desempenho do sistema GCxGC.....	75
4.2.1. Largura dos picos modulados.....	75
4.2.2. Resolução e capacidade de pico.....	77
4.2.3. Repetibilidade de tempo de retenção.....	84
4.2.3.1. Repetibilidade de 2t_R de componentes da solução HPA/NHPA/n-alceno...	87
4.2.3.2. Repetibilidade de 2t_R de componentes das soluções de nitro-HPAs.....	94
4.2.4. Repetibilidade de área.....	95
4.2.5. Avaliação do desempenho do modulador.....	99
4.2.5.1. Análise de n-alcenos.....	99
4.2.5.2. Análise de nitro-HPAs.....	103

4.3. Parâmetros de validação do método.....	107
4.3.1. Linearidade	107
4.3.2. Precisão instrumental.....	111
4.3.3. Exatidão.....	111
4.3.3.1. Análise de material de referência.....	111
4.3.3.2. Análise de padrões.....	114
4.3.4. Limites de detecção e quantificação.....	117
4.4. Análise de extratos orgânicos provenientes de MPA.....	118
4.4.1. Extrato de material particulado emitido diretamente da queima de palha de cana-de-açúcar.....	119
4.4.2. Extrato de material particulado atmosférico coletado em área afetada pela queima de cana-de-açúcar.....	121
4.4.3. Extratos de material particulado atmosférico urbano.....	123
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
5.1. Sistema GCxGC.....	126
5.1.1. Desempenho da modulação.....	126
5.1.2. Adequação do sistema GCxGC à análise de nitro-HPAs.....	130
5.2. Método de análise de nitro-HPAs por GCxGC.....	132
6. CONCLUSÕES.....	135
7. REFERÊNCIAS.....	136
APÊNDICE.....	150

1 - INTRODUÇÃO

As partículas em suspensão no ar, também chamadas de aerossóis atmosféricos, são abundantes e apresentam diversos efeitos sobre o clima, o meio ambiente e a saúde pública, o que explica o grande interesse em sua caracterização. Embora a Organização Mundial da Saúde considere a exposição ao material particulado atmosférico um problema de saúde ambiental que afeta as pessoas em todo o mundo (WHO, 2009 e 2010), ainda não foi possível estabelecer com precisão quais são as características desse material que determinam seus efeitos prejudiciais ao ser humano. Muitos estudos desenvolvidos na última década indicam que as partículas de diâmetro pequeno ($< 2,5 \mu\text{m}$), que são inaláveis e podem alcançar os alvéolos pulmonares, são constituídas de uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, muitos dos quais são tóxicos (DI FILIPPO *et al.*, 2007; MASIOL *et al.*, 2012; SCHNELLE-KREIS *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Análises químicas do material particulado atmosférico (MPA), associadas a bioensaios que determinam quais substâncias são mais ativas biologicamente, revelaram a presença significativa de compostos policíclicos aromáticos, que incluem os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados (PEDERSEN *et al.*, 2005). Sabe-se que os derivados nitrogenados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (nitro-HPAs) são genotóxicos e existe um grande interesse na determinação analítica desses compostos no MPA (COCHRAN *et al.* 2012; DI FILIPPO *et al.* 2010; ZIMMERMANN *et al.* 2012). As fontes dos nitro-HPAs para a atmosfera são as emissões diretas, como a nitração de substâncias orgânicas durante a combustão incompleta, e indiretas, como a geração *in situ* por reações atmosféricas radicalares sofridas por HPAs precursores (ALBINET *et al.* 2006; ZIMMERMANN *et al.* 2012; WEI *et al.* 2012).

Determinar a composição química orgânica do MPA é um grande desafio na química analítica ambiental, por causa da grande diversidade dos inúmeros compostos presentes nesse material, em uma faixa muito ampla de concentrações. Na exaustão de veículos e na atmosfera, as concentrações de nitro-HPAs são menores do que de HPAs, geralmente por uma ordem de grandeza. Portanto, o método analítico para a

determinação de nitro-HPAs no MPA deve ser mais sensível do que os métodos convencionais de determinação de HPAs por GC-MS. Uma melhor seletividade também é necessária para reduzir a interferência da matriz complexa que constitui o MPA (Fushimi et al., 2012).

A Agência Norte-Americana de Proteção Ambiental estabeleceu um método de determinação de HPAs no ar (U. S. EPA TO-13A, 1999) em que a coleta do MPA é feita sobre membrana filtrante de fibra de vidro ou quartzo instalada em amostrador de grandes volumes de ar (Hi-Vol). Após a coleta, o filtro carregado é submetido a extração com solvente orgânico ou fluido supercrítico e o extrato obtido é fracionado por cromatografia líquida preparativa, em fase normal. Solventes de polaridades diferentes são empregados como fase móvel, combinados em proporções que resultam em misturas desde não polares até polares. Frações de polaridades diferentes são coletadas do efluente da coluna cromatográfica, concentradas e, em seguida, analisadas. A técnica mais empregada na análise de HPAs e seus derivados é a cromatografia em fase gasosa, com detector espectrométrico de massas (GC-MS). Segundo Ramos e Brinkman (2009, p. 3), a grande capacidade de resolução das colunas capilares, associada à evolução da tecnologia dos detectores, revelou que as amostras ambientais, entre outras, são mais complexas do que se pensava há uma década. A resolução alcançada pela GC-MS convencional não é suficiente para a separação do grande número de compostos orgânicos presentes nos aerossóis atmosféricos, e a obtenção de um espectro de massas isento de interferências da matriz atmosférica continua sendo um desafio. Recursos de separação adicionais aos da GC convencional são necessários para uma caracterização mais detalhada dessas amostras (FUSHIMI *et al.*, 2012; SCHNELLE-KREIS *et al.*, 2005; VOGT; GRÖGER; ZIMMERMANN, 2007).

O poder de separação de uma coluna capilar pode ser expresso em termos de sua capacidade de pico que, segundo Giddings¹ (1967, citado por MOSTAFA; EDWARDS; GÓRECKI, 2012, p. 39), é definida como o número máximo de picos que, teoricamente, podem ser colocados lado a lado no espaço de separação unidimensional disponível em uma dada resolução. Idealmente, a capacidade de pico

¹ GIDDINGS, J.C. *Analytical Chemistry*, v. 39, p. 1027, 1967.

de uma coluna capilar convencional excede o número de analitos a serem separados, mas, na realidade, muitas amostras são complexas demais e muitas vezes a capacidade de pico máxima das técnicas convencionais de separação é superada (EDWARDS; MOSTAFA; GÓRECKI, 2011). Uma abordagem para aumentar a capacidade de pico (aumentar o poder de separação) é utilizar uma coluna mais longa, porém, isso implica em um aumento indesejável do tempo de análise. Outra alternativa é substituir a fase estacionária por uma mais seletiva, no entanto, a resolução completa de todos os analitos de amostras complexas dificilmente é alcançada. A maneira mais eficaz de aumentar o poder de separação e a capacidade de pico é através da separação multidimensional, um método introduzido por Simmons e Snyder² há mais de 50 anos (1958, citado por MOSTAFA; EDWARDS; GÓRECKI, 2012, p. 39). O termo “separação multidimensional” é interpretado por Ramos e Brinkman (2009, p. 4) da seguinte maneira: se uma separação feita por um único critério (exemplo: volatilidades diferentes) resultar em coeluição, um novo critério de separação deve ser acrescentado (exemplo: polaridades diferentes). Se a coeluição persistir, um terceiro critério de separação deve ser aplicado, e assim sucessivamente, até que a separação completa seja alcançada. Se cada critério, ou mecanismo de separação, for definido como sendo uma dimensão, a aplicação de diferentes mecanismos pode ser chamada de separação multidimensional.

Segundo Giddings³ (1987, citado por BERTSCH, 1999, p. 647), as separações multidimensionais são definidas por duas condições: a) os componentes da amostra devem ser submetidos a dois ou mais mecanismos de separação diferentes; b) os componentes devem permanecer separados até o final do processo.

Nas separações por cromatografia em fase gasosa, a técnica bidimensional de frações parciais ou de *heartcut* (GC–GC) emprega duas colunas com fases estacionárias de mecanismos de separação diferentes, conectadas entre si. Uma fração (ou apenas algumas frações) do efluente da primeira coluna é transferida para a segunda coluna, para uma nova separação segundo outro critério. A capacidade de

² SIMMONS, M.C.; SNYDER, L.R. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 32, 1958.

³ GIDDINGS, J.C. Concepts and comparison in multidimensional separations. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v.10, p. 319-323, 1987.

pico teórica desse sistema é a soma das capacidades de pico da primeira coluna e da segunda coluna multiplicada pelo número de frações transferidas (BERTSCH, 1999). A GC-GC é útil nas análises em que apenas um número limitado de frações da amostra deve ser melhor resolvido. Se o aumento de resolução for necessário ao longo de toda a gama de componentes da amostra, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (comprehensive two-dimensional gas chromatography - GCxGC)⁴ deve ser considerada (MOSTAFA; EDWARDS; GÓRECKI, 2012). A GCxGC pode ser definida como uma separação em duas colunas com mecanismos de separação diferentes, em que todo o efluente da primeira coluna é transferido para a segunda, preservando a separação em cada coluna (BICCHI; RUBIOLO; CORDERO, 2006). A capacidade de pico teórica da GCxGC é, aproximadamente, o produto das capacidades de pico das duas dimensões, ou seja, é significativamente maior do que as capacidades de pico da GC-GC e da 1D-GC (BERTSCH, 1999).

A primeira descrição de uma separação por GCxGC foi feita por Liu e Phillips (1991) e, atualmente, essa técnica é considerada por muitos pesquisadores a principal ferramenta analítica para a caracterização de misturas complexas (BELDEAN-GALEA *et al.*, 2012).

A evolução da GC bidimensional foi apresentada de maneira sucinta por Zini (2009) e os princípios fundamentais da GCxGC foram apresentados detalhadamente em trabalhos de revisão publicados nos anos iniciais da utilização dessa técnica (BEENS; BRINKMAN, 2005b; BERTSCH, 1999 e 2000; DALLÜGE; BEENS; BRINKMAN, 2003; GÓRECKI; HARYNUK; PANIC, 2004; ONG; MARRIOTT, 2002a; PHILLIPS; BEENS, 1999;) e mais recentemente (ADAHCHOUR *et al.*, 2006a; DORMAN *et al.*, 2008; MONDELLO *et al.*, 2008; PEDROSO, 2009a, ZINI, 2009). Foram publicados também livros dedicados à GCxGC como o de Barceló e Ramos (2009), Beens (2010) e Mondello (2011).

⁴ A nomenclatura e alguns conceitos pertinentes à GCxGC foram extraídos de: Marriott; Schoenmakers; Wu, 2012; Pedroso, 2009b; Schoenmakers; Marriott; Beens, 2003; von Mühlen *et al.*, 2007a.

1.1. Princípios operacionais da GCxGC

Na GCxGC as duas colunas capilares com fases estacionárias diferentes são conectadas em série através de uma interface de transferência modulante. A primeira coluna (coluna da primeira dimensão, 1D) tem as dimensões usuais da GC convencional, isto é, 10-30 m de comprimento, 0,25-0,32 mm de d.i. e espessura de filme de fase estacionária de 0,25-1 μm . Assim sendo, a coluna 1D pode ser conectada a qualquer injetor de GC e todas as técnicas de injeção empregadas na GC convencional podem ser adotadas na GCxGC. A amostra introduzida na coluna 1D é submetida à separação dos seus componentes nessa primeira dimensão, até alcançar a interface entre as duas colunas, denominada modulador, que faz a transferência de frações sucessivas do efluente da coluna 1D para a segunda coluna (coluna da segunda dimensão, 2D). Durante o processo de transferência, a separação na 1D prossegue e, em princípio, a eluição na 2D deve ser completada antes da injeção de uma fração consecutiva do efluente da coluna 1D . Para isso, o tempo de eluição na coluna 2D deve ser muito pequeno, da ordem de poucos segundos, o que é alcançado com o emprego de colunas 2D de comprimento ao redor de 1 m. Para compensar a menor eficiência da coluna 2D curta (N pequeno), são empregadas colunas com diâmetro interno pequeno (0,10 – 0,18 mm) e filme de fase estacionária com pouca espessura (0,1 μm). A coluna 2D é conectada ao detector que deve fazer a aquisição do sinal em alta frequência (mínimo 50 Hz) para detectar os picos estreitos (50-200ms) resultantes da eluição rápida dessa coluna.

1.1.1. Mecanismo da modulação

O modulador é o componente fundamental (o "coração") da instrumentação para GCxGC porque sem ele é impossível fazer uma análise bidimensional abrangente (EDWARDS; MOSTAFA; GÓRECKI, 2011). A operação do modulador consiste em criar frações discretas e sequenciais do efluente da coluna 1D e injetá-las na coluna 2D como bandas cromatográficas, na forma de pulsos curtos e repetitivos.

Os moduladores conhecidos podem ser classificados segundo dois princípios de operação: térmicos (resfriados ou aquecidos) e à base de válvulas. Tomando como exemplo um modulador térmico criogênico de dois estágios (o tipo de modulador mais

empregado até o momento), a modulação pode ser descrita como um processo com três etapas: coleta (acumulação ou concentração) do efluente da coluna 1D , focalização da fração coletada e injeção na coluna 2D . Essas etapas são periódicas e intermitentes, isto é, no instante em que a coleta é interrompida, a focalização é iniciada e quando a focalização termina, a banda cromatográfica focalizada é injetada na coluna 2D ao mesmo tempo em que reinicia a coleta do efluente contínuo da coluna 1D .

A Figura 1.1, adaptada de Beens (2010), ilustra o mecanismo de modulação criogênica de dois estágios, com a aplicação de um jato de um fluido criogênico (dióxido de carbono líquido) diretamente sobre o início da coluna 2D . Nessa ilustração, o início da modulação ocorre com a retenção das moléculas em um pequeno segmento do capilar (Figura 1.1-1). Quando o resfriamento nesse segmento é interrompido, a fração retida é remobilizada pelo aquecimento do ar aquecido no forno, ao mesmo tempo em que um segmento anterior do capilar é resfriado para reter o efluente da coluna 1D e evitar uma interferência na separação da fração injetada na coluna 2D (Figura 1.1-2). Em seguida, a etapa inicial recomeça (Figura 1.1-3) e a modulação prossegue até o final da corrida cromatográfica.

Figura 1.1- Ilustração do processo criogênico de modulação com dois jatos. (1) início do aprisionamento do efluente da coluna 1D ; (2) injeção na coluna 2D e acumulação de uma nova fração de amostra; (3) repetição da etapa (1) com focalização da fração coletada no ponto de resfriamento anterior (adaptado de Beens, 2010).

O resultado esperado da modulação, qualquer que seja o seu mecanismo, é que um pico eluído da coluna 1D seja dividido em frações estreitas que serão submetidas sucessivamente ao processo de separação na coluna 2D . Com esta técnica, substâncias que coeluem da 1D podem ser separadas pelo mecanismo de separação diferente da 2D .

A duração de um ciclo completo de modulação, isto é, o tempo entre duas injeções sucessivas na coluna 2D é chamado de período de modulação (P_M). Idealmente, os componentes de uma fração injetada na coluna 2D devem eluir nesse período de tempo entre duas injeções. Na prática, podem ocorrer picos fora do ciclo (*wrap-around*) que é o efeito observado quando um determinado composto apresenta um tempo de eluição na coluna 2D superior ao período de modulação (VON MÜHLEN *et al.*, 2007a).

A aquisição do sinal pelo sistema GCxGC deve ser sincronizado com a modulação, de modo que os dados de tempo vs sinal possam ser convertidos de acordo com a frequência da modulação. O cromatograma gerado ao final da análise (denominado cromatograma bruto) é subdividido em pequenos cromatogramas segundo o período de modulação (Figura 1.2-a). Esses cromatogramas “rápidos” (cromatogramas da 2D) são posicionados lado a lado e perpendicularmente ao eixo x identificado pelo tempo de eluição da coluna 1D , em minutos. O eixo y contém os tempos de retenção dos picos nos cromatogramas da 2D , em segundos (Figura 1.2-b). A visualização dos cromatogramas na GCxGC geralmente é feita através de diagramas de cores (denominados cromatogramas GCxGC) (Figura 1.2-c). Nos cromatogramas GCxGC, os picos são visualizados na forma de elipses cuja coloração e dimensão estão relacionadas à intensidade do sinal. A área total referente a um analito é a soma das áreas dos picos gerados pela modulação desse analito (MONDELLO *et al.*, 2008).

Figura 1.2 – Três apresentações diferentes do resultado de uma análise por GCxGC. (a) cromatograma bruto (resposta do detector); (b) cromatogramas da coluna 2D extraídos do cromatograma bruto e posicionados lado a lado; (c) diagrama de cores (cromatograma GCxGC) obtido pela projeção de (b) em um plano.

1.1.2. Critério de modulação

Murphy, Schure e Foley (1998) demonstraram teoricamente e comprovaram experimentalmente que, quando a modulação está em fase⁵, são necessárias pelo menos três modulações por pico para que a separação alcançada na coluna 1D seja mantida na 2D . Se a fase de modulação não for considerada, são necessárias pelo menos quatro modulações por pico. Essa condição passou a ser chamada de “critério de modulação” (BEENS *et al.*, 2005a). Para atender ao critério de modulação, o período de modulação deve ser aproximadamente igual a 25% da largura do pico da

⁵ Segundo Von Mühlen *et al.* (2007a), a fase da modulação é definida pela relação entre os eventos de modulação e a distribuição do soluto entre os picos modulados.

coluna 1D . Por outro lado, os períodos de modulação empregados nas aplicações da GCxGC quase sempre variam entre 4 e 8 segundos, o que significa que os picos da coluna 1D devem ter largura entre 15 e 30 segundos. Tal condição raramente ocorre ao longo de todo cromatograma, portanto, picos estreitos de alguns compostos sofrerão apenas uma ou duas modulações e serão misturados novamente às bandas cromatográficas dos componentes vizinhos.⁶ Segundo Mondello *et al.* (2008), isso é aceitável se a separação GCxGC, como um todo, atender aos objetivos da análise.

1.2. Características principais da GCxGC

Em geral, as publicações sobre GCxGC destacam como características principais dessa técnica: a separação por dois mecanismos diferentes na mesma corrida cromatográfica (ortogonalidade), que por sua vez resulta em um grande poder de separação (capacidade de pico); um aumento da razão sinal/ruído que permite o alcance de limites de detecção significativamente baixos; e cromatogramas em duas dimensões estruturados que facilitam a identificação de componentes de amostras complexas. Essas características são discutidas brevemente a seguir.

1.2.1. Ortogonalidade

Conforme já mencionado anteriormente, uma das condições para uma separação ser bidimensional é o emprego de duas colunas com fases estacionárias (FEs) de mecanismos de separação diferentes e independentes – definidas como ortogonais (SCHOENMAKERS; MARRIOTT; BEENS, 2003; VON MÜHLEN, 2007a). Nos primeiros anos após o trabalho pioneiro de Liu e Phillips (1991), as FEs mais frequentemente empregadas eram apolar na coluna 1D e semipolar ou polar na coluna 2D , apesar de, curiosamente, a primeira separação por GCxGC ter sido feita por Liu e Phillips com a FE polar polietileno glicol na coluna 1D e a FE apolar metil silicone na 2D .

Por muito tempo, a combinação das FEs apolar na 1D e semipolar ou polar na 2D gerou controvérsias sobre sua real ortogonalidade porque, apesar do mecanismo de separação nas colunas semipolares, polares ou seletivas ser governado principalmente

⁶ Recentemente foi divulgada a disponibilidade de um sistema GCxGC comercial que permite alterar o período de modulação ao longo de uma corrida cromatográfica (www.leco.com).

pelas interações específicas, a volatilidade também contribui em algum grau para a separação nessas colunas. Isso significa que a volatilidade, que em princípio é o mecanismo que define a separação na coluna apolar 1D , está presente também nas colunas 2D , ou seja, as separações nesses conjuntos de colunas não são independentes (ortogonais). Uma justificativa muito empregada para a aceitação dessa combinação de FEs como sendo ortogonal é o fato da separação na 2D ocorrer praticamente em isoterma (a separação 2D é muito rápida em relação ao tempo total das análises GCxGC, em que as programações de temperatura são lentas, tipicamente 2-3°C/min). Portanto, em isoterma, a volatilidade não contribui para a separação na coluna 2D e a combinação de FEs apolar-(semi)polar pode ser considerada ortogonal. A verdade é que, no início das aplicações da GCxGC, as análises de derivados do petróleo eram muito usadas para exemplificar as vantagens dessa técnica e nessas análises eram empregadas FEs apolar na 1D e polar na 2D . Os cromatogramas bem resolvidos e estruturados das amostras petroquímicas fizeram que o mesmo tipo de combinação de colunas fosse usado em cerca de 80% dos trabalhos, mesmo em áreas de aplicação diferentes (ADAHCHOUR *et al.*, 2004).

A necessidade da ortogonalidade na GCxGC começou a ser questionada quando usuários dessa técnica passaram a divulgar resultados muito interessantes com conjuntos de colunas constituídos por 1D (semi)polar e 2D apolar. Um exemplo bem sucedido da inversão de polaridades nas duas dimensões é o trabalho de Vendevre *et al.* (2005), no qual os pesquisadores analisaram óleo diesel em dois conjuntos de colunas: (a) colunas 1D apolar e 2D polar (conjunto denominado “normal”); (b) colunas 1D polar e 2D apolar (conjunto denominado “inverso”). Os autores observaram que o cromatograma obtido com o conjunto de colunas inverso apresentou uma ocupação mais completa do plano de separação do que o cromatograma do conjunto normal, ou seja, a capacidade de pico foi mais eficaz com o conjunto inverso. Uma explicação para o resultado obtido com o conjunto de colunas inverso foi dada por Vendevre *et al.* (2005), através das considerações: “A retenção de um composto (i) é inversamente proporcional à sua pressão de vapor (p_i^0) e ao coeficiente de atividade em relação à fase estacionária (a_i^0). Em um sistema apolar-polar, dois analitos (i) e (j) com a mesma pressão de vapor coeluem após a primeira separação, mas podem ser

separados na segunda dimensão com base em diferenças do coeficiente de atividade ($a_i^0 \neq a_j^0$). Em um sistema polar-apolar, a separação da primeira dimensão é regulada tanto pela volatilidade quanto pelas interações moleculares específicas. Essa situação não atende aos requisitos de Giddings (1987, citado por BERTSCH, 1999, p. 647) para um sistema multidimensional porque a volatilidade está envolvida em ambos os mecanismos de separação. No entanto, os analitos coeluidos após a primeira separação ($p_i^0 a_i^0 = p_j^0 a_j^0$) podem ser separados na segunda dimensão se as suas pressões de vapor forem diferentes, o que significa que suas polaridades também são diferentes.”

Os textos mais recentes sobre as características da GCxGC afirmam que a ortogonalidade não é exatamente um objetivo e que uma boa separação depende da combinação adequada entre as dimensionalidades⁷ da amostra e do sistema de separação. Os cromatogramas GCxGC estruturados, que são uma ferramenta valiosa na identificação de famílias de compostos, não são exclusivos das separações ortogonais. Se as dimensionalidades do sistema e da amostra estiverem ajustadas adequadamente entre si, cromatogramas estruturados podem ser obtidos em condições não ortogonais.

1.2.2. Capacidade de pico

Na GCxGC, como todo o efluente da coluna ¹D é fracionado e submetido à separação na coluna ²D, todas as separações devem ser consideradas, o que torna sua capacidade de pico aproximadamente igual ao produto das capacidades de pico das duas colunas. Segundo Mondello *et al.* (2008), uma coluna capilar convencional atual tem capacidade de pico entre 500 e 1000. Considerando que a coluna ²D tem comprimento cerca de trinta vezes menor do que uma coluna convencional, sua capacidade de pico individual é pequena (15 – 30), porém o produto das duas capacidades de pico resulta em valores altos (7500 – 30000) e maiores do que qualquer outro arranjo bidimensional (ZINI, 2009). Contudo, esses valores altos estimados para a capacidade de pico da GCxGC são válidos somente se as duas colunas, quando conectadas, mantêm seu desempenho individual, e se os mecanismos de separação nas

⁷ Segundo Giddings (1995), dimensionalidade da amostra é o número de variáveis independentes que devem ser especificadas para identificar os componentes da amostra e dimensionalidade do sistema é o número de estágios com mecanismos diferentes de separação.

duas colunas são verdadeiramente independentes (ortogonais). Liu e Phillips, no seu artigo pioneiro (1991), já haviam previsto que a capacidade de pico real da GCxGC era inferior à teórica, porque o plano de separação idealmente disponível não estava acessível totalmente.

Segundo Mondello *et al.* (2008), o valor teórico da capacidade de pico da GCxGC é superestimado porque a pressão de vapor dos analitos é um parâmetro com participação importante e sempre atuante nas separações, quaisquer que sejam as fases estacionárias. Assim, não existem duas fases estacionárias com mecanismos de separação completamente independentes porque uma correlação parcial entre as duas dimensões sempre existirá. Kallio (2008, p. 21) discutiu brevemente alguns estudos realizados por Davis *et al.*, com base no método estatístico de sobreposição (SMO), que comprovam o aproveitamento parcial da capacidade de pico nas separações bidimensionais abrangentes. Mais recentemente, Davis e seus colaboradores propuseram o cálculo de capacidades de pico efetivas com o emprego de fatores de correção (DAVIS; STOLL; CARR, 2008; RUTAN; DAVIS; CARR, 2012).

Apesar da capacidade de pico efetiva da GCxGC ser inferior ao valor teórico, ela ainda é significativamente superior à capacidade de pico da 1D-GC (KALLIO, 2008).

1.2.3. Razão Sinal/Ruído

A etapa de focalização na modulação e a eluição rápida da coluna ²D resultam em picos altos e muito estreitos, em geral com 50-200ms de largura, o que aumenta a razão sinal/ruído ou, em outras palavras, aumenta a detectabilidade da GCxGC.

1.2.4. Cromatogramas GCxGC estruturados

Uma característica muito útil da GCxGC é a geração de cromatogramas estruturados por famílias de compostos, como o exemplo da Figura 1.3. Os cromatogramas estruturados representam uma grande vantagem para a análise de misturas complexas contendo famílias de compostos homólogos, uma vez que esses compostos são alinhados no plano de separação segundo perfis muito organizados e reconhecíveis. A estrutura ordenada dos cromatogramas GCxGC permite a identificação de picos desconhecidos, principalmente quando padrões e bibliotecas de

espectros de massas não estão disponíveis ou quando os espectros de massas são muito semelhantes.

Na região de eluição de compostos saturados, na Figura 1.3, foram desenhadas pequenas esferas coloridas sobre os picos de n-alcanos e ciclo-alcanos com número de carbonos crescente. As linhas coloridas foram colocadas sobre os picos dos respectivos isômeros ramificados. Esse recurso foi adotado para realçar o efeito telhado (*roof-tile effect*) que, segundo von Mühlen *et al.* (2007a), é o perfil relativo ao agrupamento dos picos de uma classe de compostos quimicamente relacionados, o qual se repete quando o número de carbonos destes compostos aumenta ou diminui. Cada conjunto alinhado de “telhas” corresponde a um grupo de compostos pertencentes a uma classe química que apresenta um determinado número de carbonos.

Figura 1.3 – Cromatograma GCxGC de óleo diesel com identificação de regiões de eluição de classes de componentes (figura extraída de CAVAGNINO; ZILIOLO; TRESTIANU, 2004).

1.3. Instrumentação e programa de tratamento de dados

1.3.1. Modulador

Desde a primeira descrição de um modulador para a GCxGC (LIU; PHILLIPS, 1991) uma grande evolução aconteceu na tecnologia dos moduladores e diversos sistemas foram desenvolvidos e aperfeiçoados. O modulador de Liu e Phillips era um modulador térmico de dois estágios, cujo princípio de operação era o de reter os componentes da amostra em um filme espesso de fase estacionária dentro de um segmento inicial da segunda coluna. Esse segmento de capilar era mantido na parte externa do forno do cromatógrafo, em temperatura ambiente, e era recoberto por um filme condutor de eletricidade (tinta à base de ouro). Os componentes da amostra que eluíam da primeira coluna eram retidos na fase estacionária da seção inicial da segunda coluna e remobilizados pelo aquecimento resultante de corrente elétrica que era aplicada em dois estágios, de modo que ocorriam as etapas de coleta e focalização antes da injeção na segunda coluna.

Nos últimos vinte anos, um grande avanço ocorreu na técnica de modulação térmica. Os moduladores térmicos mais modernos operam por resfriamento, que pode ser indireto, através de câmaras resfriadas que envolvem o capilar, ou direto, com jatos de fluidos criogênicos. Em seguida, a banda cromatográfica focalizada é remobilizada por aquecimento. Existem também moduladores que promovem o resfriamento sem o emprego de fluidos criogênicos (LIBARDONI, *et al.*, 2006; PIZZUTTI *et al.*, 2009).

A descrição das características principais dos moduladores foi feita em algumas revisões recentes (EDWARDS; MOSTAFA; GÓRECKI, 2011; SEELEY, 2012; TRANCHIDA *et al.*, 2011), e em artigos científicos e livros (BARCELÓ; RAMOS, 2009; BEENS, 2010; KRISTENSON *et al.*, 2003; PEDROSO, 2009b; ZINI, 2009).

Segundo Edwards, Mostafa e Górecki (2011), o modulador criogênico é bastante difundido entre os usuários da GCxGC por causa da sua habilidade em produzir picos estreitos e por estar disponível comercialmente através de algumas empresas fabricantes; entretanto, os moduladores à base de válvulas estão, cada vez mais, despertando o interesse dos usuários da GCxGC. Tranchida *et al.* (2011) compartilham dessa mesma opinião e preveem que nos próximos dez anos os moduladores com válvulas reduzirão o emprego dos criogênicos. Segundo esses autores, os moduladores

à base de válvulas oferecem as vantagens de uma gama mais ampla de aplicações, uma diminuição dos custos de operação, por não usarem fluido criogênico, e uma configuração do sistema cada vez mais simples. Tendo em vista essas observações recentes de estudiosos da evolução tecnológica dos moduladores para GCxGC, uma breve descrição de moduladores à base de válvulas é apresentada a seguir.

A modulação com válvula foi descrita pela primeira vez em 1998 por Bruckner, Prazen e Synovec (citado por EDWARDS; MOSTAFA; GÓRECKI, 2011, p. 2344), que instalaram uma válvula de membrana entre as duas colunas. Nesse modulador, apenas cerca de 10% do efluente da coluna ¹D era transferido para a coluna ²D, o que diminuía a sensibilidade da análise. Além disso, a válvula não suportava aquecimento acima de 175°C, o que limitava o seu emprego na análise de compostos semivoláteis. Os períodos de modulação e os tempos de análise eram pelo menos uma ordem de grandeza inferiores aos dos moduladores térmicos. No ano 2000, Seeley, Kramp e Hicks (citado por SEELEY, 2012, p. 32) alteraram o projeto do modulador anterior pela introdução de uma alça de amostragem (*loop*) que coletava o efluente da coluna ¹D. Próximo ao final do período de modulação, a fração coletada era rapidamente transferida para a coluna ²D por um fluxo auxiliar de gás de arraste em vazão alta (~15 mL/min). A vantagem desse modulador era a transferência de cerca de 80% do efluente da coluna ¹D para a ²D e a desvantagem era a vazão alta na coluna ²D, longe do valor da sua maior eficiência. Essa técnica foi chamada de modulação por fluxo diferencial.

Os primeiros trabalhos envolvendo moduladores baseados em válvulas geraram controvérsias sobre sua conformidade com a GCxGC, porque não atendiam a condição dessa técnica de transferência total entre as colunas. Porém, no Simpósio Internacional sobre Cromatografia Gasosa Multidimensional Abrangente, realizado em 2003, em Volendam (Holanda), a comunidade científica concordou em classificar essas separações como GCxGC, desde que o cromatograma resultante fosse representativo de toda a amostra.

Os moduladores à base de válvula continuaram a ser pesquisados e muitos projetos novos foram descritos na literatura. Tranchida *et al.* (2011) classificaram os moduladores à base de válvulas em dois tipos: a) a válvula (ou válvulas) é montada

“*in-line*” com o conjunto de colunas; b) uma válvula é instalada “*out-line*”. Por outro lado, Seeley (2012) propôs uma classificação em base à fração do efluente da coluna ¹D que é coletada e transferida para a coluna ²D (taxa de transferência / *duty cycle*). Segundo Seeley (2012), os moduladores à base de válvulas evoluíram segundo dois tipos: com taxa de transferência alta e com taxa de transferência baixa. O foco do desenvolvimento dos moduladores à base de válvulas, nos últimos anos, foi sobre os projetos que proporcionam taxa de transferência alta. A seguir, são mencionados alguns desses projetos.

Bueno e Seeley (2004, citado por EDWARDS; MOSTAFA; GÓRECKI, 2011, p. 2345) projetaram um sistema com dois *loops* e uma válvula solenóide. Enquanto o efluente coletado em um *loop* era transferido para a coluna ²D, a fração consecutiva era coletada no outro *loop* para a transferência seguinte. Nesse sistema, a taxa de transferência era igual a 100%, porém, sua desvantagem era a inflexibilidade da sua configuração. Se qualquer parâmetro das condições cromatográficas fosse alterado, todo o sistema precisava ser revisto e otimizado. Em 2006, Seeley e colaboradores (citado por SEELEY, 2012, p. 34) descreveram um sistema que ficou conhecido como modulador fluídico (*fluidic modulator*). Esse modulador tinha duas uniões *T* que ligavam as duas colunas a um *loop* e a uma válvula solenóide de três portas. O modulador operava em dois estágios: coleta e transferência. Durante a etapa de coleta, o efluente da coluna ¹D entrava no *loop* e um fluxo de um gás auxiliar (20 mL/min) era direcionado para a coluna ²D. A segunda etapa começava quando a válvula solenóide invertia a direção do gás auxiliar para o *loop*. A vazão mais alta desse fluxo de gás parava temporariamente o fluxo da coluna ¹D e transferia rapidamente o conteúdo do *loop* para a coluna ²D. Um problema desse modulador era a possibilidade do efluente da coluna ¹D entrar no *loop* durante a fase de injeção na coluna ²D e provocar cauda nos picos modulados ou até um aumento da linha de base entre as modulações. Esse problema foi solucionado pelos autores do projeto com uma modificação pneumática que consistiu em incluir dois tubos de diferentes resistências ao fluxo acima e abaixo da válvula solenóide. Em 2007, um modulador baseado nesse projeto passou a ser comercializado após sua adaptação para a tecnologia de fluxo capilar. O modulador comercial consiste em um dispositivo plano, em aço inoxidável

desativado, que contém os divisores de fluxo e o *loop* embutidos. O modulador é conectado a uma micro válvula solenóide de três vias, instalada ao lado do cromatógrafo. O modulador executa a etapa de coleta e, em seguida, a transferência é feita por um fluxo de gás que varre o conteúdo do *loop* para dentro da coluna ²D a uma vazão de 20 mL/min e por cerca de 0,1 s. Segundo Seeley (2012), esse modulador não contém a modificação pneumática feita no projeto original dos pesquisadores e por isso gera cromatogramas com pequenas variações na linha de base que indicam a entrada do efluente da coluna ¹D no *loop* durante a fase de injeção. Segundo Tranchida *et al.* (2011), outra desvantagem desse modulador é o fato do volume do *loop* ser fixo, o que impossibilita ao operador otimizar esse parâmetro do método em relação a diferentes combinações de colunas e vazão de gás. O projeto desse modulador fluídico continua em evolução, com melhorias introduzidas por diferentes grupos de pesquisa (SEELEY, 2012).

Outros projetos de moduladores à base de válvulas foram divulgados, como o de Wang (2008, citado por SEELEY, 2012, p. 35) que contém duas válvulas rotativas de quatro portas e dois *loops*. Condições cromatográficas como: período de modulação de 8 s, fluxo de gás auxiliar de 100 mL/min e coluna ²D de 3 m e 0,53 mm foram empregadas. O modulador foi utilizado na análise de amostras diversas em temperaturas de até 300 °C.

Uma diferença importante entre moduladores à base de válvula e térmicos é que os primeiros não concentram os analitos antes da injeção na coluna ²D, e os térmicos sim. Com os moduladores à base de válvula, a obtenção de pulsos de injeção estreitos só é alcançada com a transferência incompleta do efluente da coluna ¹D ou utilizando vazões elevadas auxiliares do gás de arraste. Essas duas medidas diminuem a sensibilidade da análise ou a resolução da separação.

A opinião de Seeley (2012), o pesquisador mais produtivo sobre moduladores à base de válvulas, é que a escolha da modulação à base de válvula, no lugar da térmica, será motivada pelo baixo custo de operação, e não por um alto desempenho.

1.3.2. Detectores

Como os picos gerados na GCxGC têm largura da ordem de milissegundos, o detector adequado deve apresentar volume interno pequeno, resposta muito rápida às variações de concentração do analito e alta frequência de aquisição de dados (50 Hz mínimo).

O detector de ionização em chama (FID) foi o primeiro detector empregado na GCxGC, por causa da sua rapidez na ionização e aquisição do sinal, além do seu volume interno desprezível, que minimiza a contribuição do detector ao alargamento dos picos. O detector de captura de elétrons (ECD), que apresenta alta sensibilidade e seletividade para compostos organohalogenados, foi adaptado para a GCxGC. Um projeto miniaturizado (μ ECD) comercial tem cela de detecção com volume de 150 μ L, que é um volume cerca de dez vezes menor do que no ECD convencional. Outros detectores foram empregados em análises por GCxGC, como o detector fotométrico de chama (FPD), de emissão atômica (AED), termoiônico (TID) e quimiluminescente (SCD e NCD). Um trabalho de revisão sobre as tecnologias de detecção adequadas à GCxGC (exceto a espectrometria de massas) foi apresentado por Von Mühlen *et al.* (2006a).

O detector espectrométrico de massas (MS) é de grande utilidade na 1DGC para a identificação de picos desconhecidos e para a elucidação da composição de picos sobrepostos; porém, algumas coeluições requerem metodologias complexas de deconvolução de picos ou um conhecimento aprofundado dos processos de fragmentação das moléculas, ou ainda, espectrômetros de massas (MS) de tecnologia avançada e onerosa (MONDELLO *et al.*, 2008). A deconvolução espectral na 1D-GC-MS frequentemente falha, quando os picos que coeluem tem massas iguais, ou quando existe a presença de sinais interferentes constantes (*background*). Essa dificuldade pode ser muito reduzida com o acoplamento GCxGC-MS. Pode-se dizer que a GCxGC é um sistema multidimensional complementar ao MS ou que o detector espectrométrico de massas é uma dimensão de separação adicional à GCxGC (SCHNELLE-KREIS *et al.*, 2005).

No acoplamento GCxGC-MS, a velocidade de aquisição de dados do MS deve ser suficiente para garantir a integridade dos dados e reconstruir com exatidão o

cromatograma a partir dos espectros de massas. O detector ideal para esse acoplamento é o espectrômetro de massas por tempo de voo (ToF-MS), que tem frequência de aquisição de 50 a 500 Hz. Espectrômetro de massas quadrupolares modernos, com “varredura rápida”, têm sido acoplados à GCxGC em aplicações em que o intervalo de massas pode ser reduzido. Mondello *et al.* (2008) elaboraram um trabalho de revisão sobre as aplicações da GCxGC-MS ToF e quadrupolar.

1.3.3. Sistemas de tratamento de dados

Os programas para GCxGC devem ter grande velocidade de aquisição e tratamento dos dados. O cromatograma bruto de uma separação GCxGC é unidimensional e deve ser transformado pelo programa para um cromatograma bidimensional, de acordo com os eventos de modulação. Através dos tempos de retenção nas colunas 1D e 2D , o programa identifica os picos modulados de uma mesma substância e os agrupa em um único pico. Para a atribuição desses dois tempos de retenção ser feita com exatidão, são necessárias quatro informações: o instante da injeção na coluna 1D , o tempo de eluição da coluna 1D , o instante da injeção na coluna 2D e o tempo de eluição da coluna 2D . Entretanto, somente duas dessas informações são determinadas: o instante da injeção na coluna 1D e o tempo de eluição da coluna 2D . A natureza do processo de modulação restringe o instante da injeção na coluna 2D a um múltiplo inteiro do período de modulação. O tempo de eluição da coluna 1D é vinculado ao ciclo de modulação (um evento de modulação completo) imediatamente precedente à injeção na segunda coluna (MICYUS; SEELEY; SEELEY, 2005). O cálculo dessas duas informações (o instante da injeção na coluna 2D e o tempo de eluição da coluna 1D) é feito pelo programa específico dedicado à GCxGC.

O cromatograma de uma separação bidimensional pode ser apresentado como um diagrama de cores (denominado cromatograma GCxGC) (Figura 1.2-c) cujos eixos são definidos pelos tempos de retenção em cada uma das duas colunas. Se a intensidade do sinal for plotada no eixo z , o cromatograma terá uma apresentação tridimensional (Figura 1.4). Outras formas de apresentação também são usadas, como os diagramas de ápices e de contorno, e o cromatograma reconstruído em 1D (VON MÜHLEN, *et al.*, 2007a).

Após a integração de todos os picos modulados, do agrupamento dos picos pertencentes a um mesmo analito e cálculo da área de cada analito, através da soma das áreas dos respectivos picos modulados, é feita a quantificação. Todos os métodos convencionais de quantificação podem ser usados na GCxGC.

De fato, a interpretação dos resultados gerados pela GCxGC, principalmente com o emprego de detectores espectrométricos de massas, requer um tratamento de dados mais sofisticado do que a 1D-GC. Um trabalho de revisão (MATOS; DUARTE; DUARTE, 2012) discute o estado da arte no processamento de dados obtidos em cromatografia bidimensional (2D-GC), desde o pré-tratamento até a quantificação dos picos identificados. Esse trabalho identifica as principais tendências no processamento de dados da 2D-GC abrangente e as lacunas e necessidades de pesquisa que devem ser abordadas neste campo.

Figura 1.4 – Segmento de um cromatograma GCxGC de diesel apresentado em três dimensões. Fonte: Thermo Fisher Scientific.

1.4. Aplicações

Inicialmente, a GCxGC foi aplicada nas análises de derivados do petróleo por causa da grande adequação da técnica à caracterização desses produtos. A geração de cromatogramas estruturados permite a análise de grupos de compostos presentes nas amostras petroquímicas (Figura 1.3). Em seguida, outras aplicações da GCxGC foram bem sucedidas nas áreas de óleos essenciais, aromas e fragrâncias, alimentos e resíduos de pesticidas em alimentos, ambiental, amostras biológicas, análises toxicológicas e forenses, outras. Alguns trabalhos de revisão das aplicações da GCxGC estão disponíveis (ADAHCHOUR *et al.*, 2006b; ADAHCHOUR; BEENS; BRINKMAN, 2008; CORTES *et al.*, 2009; DORMAN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010).

Especificamente na área ambiental atmosférica, que é a área de interesse deste trabalho de pesquisa, a GCxGC tem sido empregada na análise de compostos orgânicos voláteis (ARSENE *et al.*, 2011; HAMILTON, 2010), compostos orgânicos voláteis emitidos por plantas (KALLIO *et al.*, 2006), material particulado de fumaça de cigarro (GROGER *et al.*, 2008) e caracterização de aerossóis atmosféricos (FUSHIMI *et al.*, 2012; GOLDSTEIN *et al.*, 2008; SCHNELLE-KREIS *et al.*, 2005; VOGT; GRÖGER; ZIMMERMANN *et al.*, 2007).

Na caracterização da composição química orgânica do material particulado atmosférico (MPA), a capacidade da GCxGC em separar os analitos por volatilidade, na primeira dimensão e por polaridade na segunda dimensão, possibilita a eliminação da etapa de fracionamento do extrato orgânico das amostras de MPA em frações de polaridades diferentes. A separação de HPAs e seus derivados por GCxGC, sem o prévio fracionamento por cromatografia líquida preparativa, já foi relatada por Fushimi *et al.* (2012) e Schnelle-Kreis *et al.* (2005). Indubitavelmente, a eliminação da etapa de fracionamento é bastante vantajosa, porque torna o procedimento analítico mais rápido e a confiabilidade nos resultados maior.

Neste trabalho, serão apresentados os resultados obtidos no desenvolvimento de um método de análise para a determinação de nitro-HPAs por GCxGC. Como foi mencionado anteriormente, os nitro-HPAs são poluentes tóxicos presentes no MPA, e por esse motivo existe um grande interesse na área de Química Analítica Ambiental em estabelecer métodos analíticos eficientes que permitam a separação desses compostos-alvo dos outros inúmeros componentes da matriz atmosférica. A etapa de separação recebe uma atenção especial porque em geral ela é o fator limitante para a confiabilidade da identificação e quantificação (PANIC; GÓRECKI, 2006).

A GCxGC apresenta um grande potencial para a resolução de coeluições, porém, a otimização de um método executado por essa técnica requer uma abordagem diferente e mais complexa do que a 1D-GC. A temperatura e a vazão do gás de arraste, por exemplo, influenciam as colunas da GCxGC de modo diferente, porém não independente (VAN GEEM et al., 2010). Um aumento na vazão resulta na diminuição da retenção na coluna ¹D e na diminuição da temperatura de eluição dessa coluna (T_e) que é a temperatura da corrida na coluna ²D mantida no mesmo forno. A combinação da vazão maior e temperatura menor na coluna ²D pode resultar em um aumento ou diminuição da retenção nessa coluna e é impossível prever intuitivamente qual das duas possibilidades é a mais provável. Além disso, existem novos parâmetros na GCxGC a serem ajustados, como o período de modulação (SANZ, 2009, p. 57). Segundo Kallio (2008, p.65), uma análise GCxGC bem sucedida requer uma escolha adequada das colunas, da rampa de aquecimento do forno, da vazão do gás de arraste e das características técnicas do detector, como frequência de aquisição de dados e volume morto.

Além disso, tratando-se de uma técnica analítica ainda em desenvolvimento, é importante investigar alguns parâmetros cromatográficos que indicam a qualidade do desempenho da instrumentação, como a largura na base do pico modulado (2w_b), a repetibilidade do tempo de retenção na segunda coluna (2t_R) e a eficiência do modulador em aprisionar frações do efluente da coluna ¹D e reinjetá-las na coluna ²D na forma de bandas estreitas. As etapas do desenvolvimento de um método por GCxGC foram realizadas com base nos fundamentos teóricos dessa técnica cromatográfica e nos princípios gerais que orientam a prática em química analítica.

2 - OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a aplicação da cromatografia em fase gasosa bidimensional abrangente (GCxGC) com modulador criogênico de dois jatos de dióxido de carbono líquido na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrados (nitro-HPAs) em material particulado no ar.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Estabelecer as condições cromatográficas para a separação, identificação e quantificação de padrões de nitro-HPAs por GCxGC, com a instrumentação composta por injetor com programação de temperatura, modulador criogênico de dois jatos de dióxido de carbono líquido e detector por ionização em chama, através de estudo teórico-experimental.

2.2.2. Avaliar a viabilidade de aplicação da técnica GCxGC, com a instrumentação citada anteriormente, para a determinação de nitro-HPAs em extratos orgânicos não fracionados provenientes de material particulado no ar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Padrões

3.1.1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

Solução contendo dezesseis HPAs prioritários (conforme U.S. EPA Method 610) em metanol:diclorometano (1:1) da SUPELCO (USA). Os componentes dessa solução e as respectivas abreviaturas e concentrações estão listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição da solução padrão de HPAs.

Componente	Abreviatura	Concentração (µg/mL)
acenafteno	Ace	1022
acenaftileno	Acn	2047
antraceno	Ant	101,5
benzo(a)antraceno	BaA	101,6
benzo(a)pireno	BaP	102,8
benzo(b)fluoranteno	BbF	204,8
benzo(ghi)perileno	BgP	204,1
benzo(k)fluoranteno	BkF	103,0
criseno	Cri	102,7
dibenzo(a,h)antraceno	DaA	203,4
fenantreno	Fen	101,2
fluoranteno	Flt	204,0
fluoreno	Flu	204,5
indeno(1,2,3-CD)pireno	InP	102,0
naftaleno	Naf	1013
pireno	Pir	102,2

3.1.2. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrogenados (nitro-HPAs)

3.1.2.1. Soluções individuais de padrões de nitro-HPAs

Quatorze soluções diferentes de nitro-HPAs em tolueno cujos componentes, abreviaturas e concentrações estão listados na Tabela 3.2. Fornecedor AccuStandard Inc. (USA), exceto de 2-nitropireno e 2-nitrofluoreno cujo fornecedor foi Chiron AS (Noruega). A escolha desses nitro-HPAs foi definida pela toxicidade e abundância no material particulado atmosférico (CECINATO, 1999; ZIELINSKA; SAMY, 2006).

Tabela 3.2 - Soluções padrão de nitro-HPAs individuais.

nitro-HPA	Abreviatura	Concentração (µg/mL)
1,3-dinitropireno	1,3-DNPir	100,8
1,6-dinitropireno	1,6-DNPir	100,3
1-nitronaftaleno	1-NNaf	100,6
1-nitropireno	1-NPir	100,6
2-nitrofluoranteno	2-NFlt	100*
2-nitrofluoreno	2-NFlu	101,4
2-nitronaftaleno	2-NNaf	102,3
2-nitropireno	2-NPir	200*
3-nitrofluoranteno	3-NFlt	100,4
6-nitrobenzo(a)pireno	6-NBaPir	100,0
6-nitrocriseno	6-NCri	98,4
7-nitrobenzo(a)antraceno	7-NBaAnt	99,4
9-nitroantraceno	9-NAnt	99,6
9-nitrofenantreno	9-NFen	100,2

*Fornecido sem certificado de análise.

3.1.2.2. Material de referência NIST

“Standard Reference Material 1587 Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Methanol”. Fornecedor NIST (National Institute of Standards and Technology - USA). Os componentes dessa solução e as respectivas concentrações estão listados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Material de referência NIST SRM 1587 em metanol.

Componente	Concentração (µg/mL) ^a
2-NFlu	7,64 ± 0,31
9-NAnt	3,96 ± 0,09
3-NFlt	7,30 ± 0,05
1-NPir	7,07 ± 0,22
7-NB(a)Ant	7,32 ± 0,18
6-NCri	6,42 ± 0,09
6-NB(a)Pir	4,80 ^b

^a Valores certificados

^b A concentração do 6-NB(a)Pir é fornecida somente como informação. Os dados analíticos para o 6-NB(a)Pir apresentaram a maior incerteza e maior variabilidade entre os *vials*. A solubilidade desse composto na solução do SRM parece ser limitada (informação registrada no certificado de análise do SRM 1587 fornecido pelo NIST).

3.1.3. Alcanos

n-dodecano (n-C12), n-tetradecano (n-C14) e n-hexadecano (n-C16), fornecidos pela Merck como compostos de referência para cromatografia a gás.

3.2. Solventes

Diclorometano (DCM) da Mallinckrodt Chemicals, grau de pureza para HPLC e UV; e hexanos (95% n-hexano) da Mallinckrodt Chemicals, grau de pureza para HPLC e UV.

3.3. Soluções de padrões

Foram empregadas três classes de compostos (alcanos, HPAs e nitro-HPAs) normalmente presentes nas matrizes estudadas.

3.3.1. Solução de n-alcanos para o procedimento padrão de operação

Uma solução contendo n-C12, n-C14 e n-C16 foi preparada na concentração de 20 µg/mL de cada n-alcano em hexano.

3.3.2. Solução HPA/NHPA para fins qualitativos

Uma alíquota de 100 µL da solução padrão de HPAs (item 3.1.1) foi transferida para balão volumétrico de 1 mL e o volume completado com hexano. Uma alíquota de 50 µL dessa solução foi transferida para balão volumétrico de 1 mL no qual foram adicionados 50 µL de cada solução padrão dos nitro-HPAs: 2-NFlu, 9-NAnt, 3-NFlt, 1-NPir, 7-NBaAnt, 6-NCri (item 3.1.2.1). O volume foi completado com hexano. Esta solução contém os dezesseis HPAs prioritários pela EPA e seis nitro-HPAs presentes no SRM 1587 NIST.

3.3.3. Solução HPA/NHPA/n-alcano para fins qualitativos

O procedimento de preparação de solução do item 3.3.2 foi repetido e 250 µL da solução de n-alcanos (item 3.3.1) foram adicionados ao balão volumétrico de 1 mL. O volume foi completado com hexano. Além dos componentes da solução HPA/NHPA esta solução contém n-C12, n-C14 e n-C16.

3.3.4. Solução 13-NHPAs para a determinação da concentração mínima detectável

A partir das quatorze soluções de padrões de nitro-HPAs mencionadas no item 3.1.2 foi preparada uma solução estoque contendo 5 µg/mL de cada nitro-HPA com exceção do 2-NPir presente na concentração de 10 µg/mL. A partir dessa solução estoque, foram preparadas soluções com concentrações de 1000, 875, 625, 500, 375, 250, 125, 100 e 50 ng/mL de cada nitro-HPA, sendo que para o 2-NPir as concentrações foram o dobro desses valores.

Nos cromatogramas dessas soluções não foi possível detectar o pico do 6-nitrobenzo(a)pireno, nem mesmo no cromatograma da solução individual desse nitro-HPA. Por causa dessa observação e da informação do NIST sobre esse mesmo nitro-HPA presente no SRM 1587 [Tabela 3.3(b)], foram avaliados apenas treze componentes nas soluções de nitro-HPA preparadas.

3.3.5. Solução 6-NHPAs para fins qualitativos

A partir de soluções padrão de nitro-HPAs individuais (item 3.1.2.1) foi preparada uma solução contendo: 2-NFlu, 9-NAnt, 3-NFlt, 1-NPir, 7-NB(a)Ant, 6-NCri (componentes presentes no material de referência NIST SRM1587), na concentração de 5 µg/mL cada.

3.3.6. Soluções de nitro-HPAs para a construção de curvas analíticas

Cinco soluções de concentrações diferentes de nitro-HPAs foram preparadas por diluição do material de referência NIST SRM 1587 com DCM. Em cada solução foram adicionados 500 ng/mL de benzo(a)ntraceno como padrão interno, conforme método de análise adotado pelo NIST para esse material de referência. As concentrações destas soluções estão apresentadas na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Composição das soluções de nitro-HPAs para a construção de curvas analíticas (ng/mL).

Componente	Solução 1	Solução 2	Solução 3	Solução 4	Solução 5
2-NFlu	191	382	764	1146	1528
9-NAnt	99,0	198	396	594	792
B(a)A (P.I.)	500	500	500	500	500
3-NFlt	183	365	730	1095	1460
1-NPir	177	354	707	1061	1414
7-NB(a)Ant	183	366	732	1098	1464
6-NCri	161	321	642	963	1284
6-NB(a)Pir	120	240	480	720	960

Por causa da informação do NIST sobre o 6-nitrobenzo(a)pireno presente no SRM 1587 [Tabela 3.3(b)] e da observação feita no item 3.3.4. sobre esse nitro-HPA, esse componente não foi avaliado, apesar do seu pico ter sido detectado nos cromatogramas das soluções da Tabela 3.4.

3.4. Instrumentação e Materiais

3.4.1. Sistema dedicado à GCxGC

3.4.1.1. Cromatógrafo a gás

As análises por GCxGC foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo TRACE GCxGC (Thermo Fisher Scientific – Italy) configurado com modulador criogênico de dois estágios (*Dual Jet*) resfriados por CO₂ líquido, injetor com programação de temperatura (PTV), detector por ionização em chama (FID) com velocidade de aquisição de até 300 Hz e programa HyperChrom (Thermo Fisher Scientific – Italy) para a aquisição e o tratamento dos dados. O cromatógrafo foi acoplado a um injetor automático de amostras, modelo TriPlus (Thermo Fisher Scientific – Italy).

O detector por ionização em chama (FID) foi adotado por causa da sua alta frequência de aquisição do sinal, volume morto desprezível e estabilidade ao longo do tempo por ser pouco afetado pelas condições instrumentais.

3.4.1.2. Descrição do modulador e da sua operação

O modulador criogênico instalado no cromatógrafo TRACE GCxGC é baseado no projeto de Beens *et al.* (2001) que consiste em resfriar direta e alternadamente dois segmentos distintos da coluna capilar. No primeiro segmento ocorre a concentração de frações do efluente da coluna 1D e no segundo a focalização. Cada banda cromatográfica focalizada é em seguida remobilizada pelo ar aquecido do forno e introduzida na coluna 2D . O fluido criogênico empregado deve ser o dióxido de carbono.

Esse sistema modulador é composto por duas partes:

- a) suporte da coluna e de dois bocais metálicos (*jets*) de saída do CO_2 líquido; esse suporte é instalado na base do forno e fixa a coluna sobre os *jets* que são imóveis; é necessário um alinhamento perfeito entre a coluna e os *jets*, para que o jato de CO_2 atinja exatamente o capilar, como mostrado pela elipse desenhada sobre a foto da Figura 3.1-a.
- b) duas válvulas solenóide de duas vias (Asco, Florham Park, NJ, USA), uma válvula agulha e tubulação de aço-inox, todas externas ao forno (Figura 3.1-b).

Figura 3.1 – Fotos do modulador *Dual Jet*. (a) Modulador dentro do forno; a elipse branca foi desenhada para destacar o resfriamento da coluna; (b) Válvula agulha e duas válvulas solenóide na parte externa do forno.

A conexão entre o cilindro de CO₂ e o cromatógrafo é feita diretamente, sem o uso de válvula reguladora de pressão. Deve ser utilizado cilindro com pescador e sem sobrepressão de outro gás, porque o sistema modulador apresenta um limite de pressão igual a 70 bar, que é um valor pouco superior à pressão interna no cilindro de aproximadamente ≈ 58 bar a 21 °C (pressão de equilíbrio entre as fases líquida e gasosa de CO₂). O CO₂ líquido é transferido do cilindro até o cromatógrafo através de um tubo de aço-inox de 1/8" de diâmetro externo e cerca de 1,20 m de comprimento. Uma distância superior a 2 metros entre o cilindro e o cromatógrafo resulta em queda de pressão significativa e resfriamento ineficaz da coluna. As saídas das válvulas solenóide são conectadas aos dois *jets* através de tubos de aço-inox. Os esquemas apresentados nas Figuras 3.2 e 3.3 elucidam a montagem desse sistema.

Figura 3.2 - Representação gráfica do sistema GCxGC: (1) injetor; (2) coluna ¹D; (3) conector dos dois capilares; (4) modulador *Dual Jet*; (5) entrada do CO₂ líquido; (6) válvula solenóide 1; (7) *jet* 1; (8) válvula solenóide 2; (9) *jet* 2; (10) coluna ²D; (11) detector; a modulação é feita no início da coluna ²D.

Figura 3.3 - Esquema do fluxo de CO₂ líquido: (1) entrada na parte traseira do cromatógrafo; (2) válvula agulha em "T"; (3) válvula solenóide 1 (esquerda); (4) válvula solenóide 2 (direita); (5) saída da válvula 1; (6) saída da válvula 2; (7) *jet* 1 (esquerdo); (8) *jet* 2 (direito).

O *jet* é construído em latão e contém internamente um tubo de aço-inox de 0,7 mm de d.i. ao qual são soldados sete capilares com cerca de 0,1 mm de d.i. cada (Figura 3.4-a). Na foto da Figura 3.4-b são visíveis os sete orifícios capilares enfileirados que formam uma cortina de CO₂ que atinge a coluna capilar (ver Figura 3.1-a).

As válvulas solenóide abrem alternadamente durante o mesmo período de tempo que é igual à metade do período de modulação. Um módulo eletrônico embutido no cromatógrafo é responsável

pela sincronização entre a ativação das válvulas do modulador e a aquisição do sinal pelo detector. O resfriamento da coluna ocorre pela expansão do CO₂ líquido (efeito Joule-Thompson) na saída de cada *jet* e atinge cerca de 100°C abaixo da temperatura do forno. No instante em que o fluxo de CO₂ no *jet* é interrompido, o ar quente que circula no forno aquece a região resfriada e os compostos retidos são remobilizados. Os *jets* são acionados alternadamente para evitar que parte dos analitos passe pelo modulador sem ser aprisionada (*solute breakthrough*). Quando a válvula (1) está aberta, o CO₂ líquido flui através do *jet* (1) e ocorre a etapa de concentração. Quando a válvula (2) está aberta, ocorre a etapa de focalização no *jet* (2). Quando a válvula (2) fecha, a banda cromatográfica focalizada é introduzida na coluna ²D e um novo ciclo de modulação começa. O período de modulação pode ser programado de 0,1 a 30 s, em intervalos de 0,1 s, e permanece constante durante toda a análise. A vazão do CO₂ pode ser ajustada através de uma válvula agulha [Figura 3.3-(2)], mas o sistema não oferece um modo de monitoramento da temperatura de resfriamento. O início da modulação pode ser posterior ao início da corrida cromatográfica pela definição no método de um tempo de retardo para a abertura das válvulas. Este recurso é usado quando os primeiros picos do cromatograma não são compostos alvo da análise e

Figura 3.4 – *Jets* do modulador. (a) Esquema do *jet*: (1) bloco de latão; (2) tubo de aço-inox de 0,7 mm de d.i.; (3) solda entre tubo de aço-inox e capilares; (b) Foto dos *jets* na qual são visíveis os sete orifícios capilares.

quando é necessário diminuir os gastos com o consumo de CO₂. Em condições normais, um cilindro com 25 Kg de CO₂ é suficiente para 5:00-5:30 h de análises.

Figura 3.5 - Tubulação e conexões entre o cilindro de CO₂ e o cromatógrafo; (1) conexão ao cilindro (contém filtro de 20 µm); (2) tubo de aço-inox (1/8"); (3) suporte de filtro *screen* (10 µm); (4) porca hexagonal para conexão ao cromatógrafo.

Como o CO₂ líquido atravessa tubos capilares de 0,1 mm d.i. nos *jets*, qualquer partícula que possa obstruir esses capilares deve ser eliminada antes de chegar ao modulador. Para isso, são empregados dois filtros no percurso do fluido: um filtro sinterizado (20 µm) dentro do conector do cilindro e uma tela filtrante (*screen*) (10 µm) dentro de um suporte VALCO instalado próximo à entrada do CO₂ no cromatógrafo (Figura 3.5).

Se apesar dos elementos filtrantes

instalados na tubulação ocorrer o entupimento de um *jet*, ele deve ser retirado do sistema e desobstruído pela passagem de um filamento metálico e flexível por cada orifício, conforme Figura 3.6. A passagem de solventes orgânicos através do *jet* por sucção e posterior secagem podem também ser necessárias.

O modulador *Dual Jet* é adequado para a análise GCxGC de amostras que contenham compostos-alvo com ponto de ebulição próximo ou acima de 100°C.

Figura 3.6 - Limpeza do *jet* pela passagem de um filamento metálico e flexível por cada orifício.

3.4.2. Colunas cromatográficas

As colunas capilares empregadas estão listadas na Tabela 3.5.

Tabela 3.5 - Fases estacionárias e dimensões das colunas empregadas.

Fase estacionária	Dimensões (L (m)/ d.i. (mm)/ d _f (μm)*	Marca / Fabricante
5% fenil polisilfenilene siloxano [♦]	30 x 0,25 x 0,25	BPX-5 / SGE
5% fenil polisilfenilene siloxano [♦]	7 x 0,32 x 0,25	BPX-5 / SGE
50% fenil polisilfenilene siloxano [♦]	10 / 0,10 / 0,10	BPX-50 / SGE
14% cianopropilfenil dimetil polisiloxano	10 / 0,10 / 0,10	BP-10 / SGE

* L: comprimento; d.i.: diâmetro interno; d_f: espessura de filme.

[♦] Segundo o fabricante das colunas BPX-5 e BPX-50, ambas as colunas são indicadas para GC-MS porque apresentam pouco sangramento da fase estacionária.

3.4.3. Conectores de capilares

Para conectar as duas colunas da GCxGC foram utilizados conectores Press-Tight[®] de vidro borosilicato desativado, fornecidos pela Restek USA (PN 20429) [Figura 3.7 (a)]. A conexão das colunas por esses conectores foi difícil e causou frequentemente vazamento do gás de arraste, principalmente nas temperaturas altas das análises cromatográficas.

No final dos trabalhos experimentais, o conector metálico SilTite[™] μ-Union (SGE, PN 073560) foi testado [Figura 3.7 (b)]. Por ter dimensões muito reduzidas, esse conector apresenta volume morto desprezível, massa térmica pequena, além de proporcionar uma conexão fácil e eficiente entre as colunas, mesmo em temperaturas altas. As anilhas desse conector são de aço-inoxidável desativado.

Figura 3.7 – Conectores empregados na conexão das colunas capilares da GCxGC. (a) conectores de vidro Press-Tight[®] (Restek); (b) SilTite[™] μ-Union (SGE), (1): conector porca, (2) anilha, (3) encaixe macho na porca.

3.4.4. Liners

Dois *liners* de vidro borossilicato desativado (Thermo Fisher Scientific, Italy) foram testados: (a) com lã de vidro e (b) com a parede interna sinterizada em toda sua extensão (Figura 3.8). O *liner* com a parede interna sinterizada foi empregado nas análises das soluções dos padrões de HPAs e nitro-HPAs porque foi o mais adequado nas condições cromatográficas adotadas, com injeção no modo *splitless*.

Figura 3.8 - *Liners* de vidro borossilicato desativado avaliados: (a) com lã de vidro, (b) com parede interna sinterizada.

3.4.5. Gases

Hélio como gás de arraste, ar sintético, hidrogênio e nitrogênio (gás auxiliar) para o detector FID, fornecidos pela Air Products, com grau de pureza 99,999% mínimo. Dióxido de carbono (99,5%) fornecido pela Air Products em cilindro com pescador, sem sobrepressão de outro gás.

3.5. Condições cromatográficas

Diferentes condições cromatográficas foram empregadas para as diferentes soluções de padrões e extratos orgânicos analisados. Na Tabela 3.6 estão apresentadas as condições cromatográficas mantidas constantes nas análises de HPAs e nitro-HPAs. As condições cromatográficas da Tabela 3.7 foram empregadas nas análises das soluções HPA/NHPA/n-alceno e 13-NHPAs, enquanto que as condições da Tabela 3.8 foram empregadas nas análises da solução 6-NHPAs e das soluções de nitro-HPAs para a construção de curvas analíticas.

Tabela 3.6 - Condições cromatográficas mantidas constantes em todas as análises de soluções de HPAs e nitro-HPAs.

Coluna ¹ D:	5% fenil metil polisiloxano (30 m / 0,25 mm / 0,25 µm)		
Coluna ² D:	14% cianopropil fenil metil polisiloxano (1 m / 0,10 mm / 0,10 µm)		
INJETOR PTV		DETECTOR FID	
Modo de injeção:	<i>Splitless</i>	Temperatura (°C):	300
Tempo de <i>Splitless</i> (min):	2	Frequência de aquisição (Hz):	120
Vazão de <i>Split</i> (mL/min):	100	Vazão de gases (mL/min)	
AMOSTRADOR AUTOMÁTICO		[H ₂ /ar/N ₂ auxiliar]:	40/350/30
Volume de amostra injetado (µl):	2		
GÁS DE ARRASTE: hélio, 1,0 mL/min em vazão constante			

Tabela 3.7 - Condições cromatográficas das análises da solução HPA/NHPA/n-alceno.

FORNO		INJETOR PTV	
Temperatura inicial (°C):	40	Temperatura inicial (°C):	50
Tempo inicial (min):	2	Tempo inicial (min):	1
Taxa de aquecimento (°C/min):	3	Taxa de aquecimento (°C/s):	14,5
Temperatura final (°C):	300	Temperatura final (°C):	350
Tempo final (min):	3	MODULADOR	
		Períodos de modulação (s):	4 e 5
		Tempo de retardo da modulação (min):	10

Tabela 3.8 - Condições cromatográficas das análises das soluções de nitro-HPAs para a construção de curvas analíticas.

FORNO		INJETOR PTV	
Temperatura inicial (°C):	50	Temperatura inicial (°C):	50
Tempo inicial (min):	3	Tempo inicial (min):	1
Taxa de aquecimento (1) (°C/min):	20	Taxa de aquecimento (°C/s):	14,5
Temperatura em patamar (1) (°C):	200	Temperatura final (°C):	350
Tempo em patamar (1) (min):	1	MODULADOR	
Taxa de aquecimento (2) (°C/min):	2,5	Período de modulação (s):	4
Temperatura final (°C):	300	Tempo de retardo da modulação (min):	20
Tempo em patamar final (min):	3,5		
Tempo total de análise (min):	55		

As soluções de n-alcenos foram analisadas com as condições cromatográficas descritas em um Procedimento Padrão de Operação, desenvolvido pelo fabricante do cromatógrafo com a finalidade de avaliar a funcionalidade do instrumento. Essas condições estão apresentadas na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Condições cromatográficas do Procedimento Padrão de Operação.

Coluna ¹ D:	5% fenil polisiloxano (7 m / 0,32 mm / 0,25 µm)
Coluna ² D:	14% cianopropilfenil dimetil polisiloxano (1 m / 0,1 mm / 0,1 µm)
Temperatura do injetor:	230°C
Modo de injeção:	<i>Split</i> (razão de <i>split</i> 20:1)
Volume de amostra injetado:	1 µL
Programação de temperatura do forno:	70°C (1 min), 3°C/min, 170°C (1 min)
Vazão do gás de arraste (hélio):	1 mL/min (vazão constante)
Período de modulação:	3 s
Temperatura do detector FID:	250°C
Frequência de aquisição de dados:	300 Hz

3.6. Procedimento Padrão de Operação (PPO)

O PPO é um documento oficial do fabricante do cromatógrafo no qual estão descritos um procedimento de operação a ser seguido para testar a funcionalidade do instrumento e um critério para qualificá-la como aceitável ou não.

Segundo o PPO, após a instalação do conjunto de colunas da Tabela 3.9, o analista deve verificar os itens a seguir:

- Não deve haver vazamento nas conexões da tubulação de CO₂ nem entupimento nos filtros;
- O fluxo de CO₂ através dos *jets* deve ser homogêneo e nenhum orifício pode estar obstruído;
- A distância entre os *jets* e a coluna ²D deve ser cerca de 3 mm;
- Os orifícios dos *jets* devem estar alinhados com a coluna ²D;
- O jato de CO₂ deve resfriar um segmento de cerca 4-5 mm da coluna ²D;
- Não deve haver vazamento de gás de arraste na conexão entre as duas colunas.

Em seguida, o cromatógrafo deve ser programado com as condições cromatográficas da Tabela 3.9 e a solução n-alcenos (item 3.3.1) deve ser analisada. A obtenção de picos modulados semelhantes aos apresentados na Figura 3.9, quanto ao número de picos e seu aspecto, atesta que o sistema GCxGC apresenta um desempenho considerado aceitável pelo fabricante.

Figura 3.9 – Picos modulados de n-alcenos nas condições do PPO. O número de picos e seu aspecto constituem o critério de qualificação da funcionalidade do sistema como aceitável. (Imagens extraídas de documento oficial do fabricante do cromatógrafo.)

3.7. Identificação dos picos cromatográficos

Os picos dos HPAs foram identificados por comparação com a ordem de eluição destes compostos empregando coluna apolar 5% fenil metil polisiloxano, informada pelo fabricante da solução padrão de HPAs (item 3.1.1) em um certificado de análise. Essa identificação foi confirmada em trabalhos realizados por outros integrantes do laboratório com GC-MS.

A identificação dos nitro-HPAs foi feita por comparação com os tempos de retenção dos respectivos padrões injetados individualmente.

Os n-alcanos, por serem substâncias apolares, eluem da coluna apolar na ordem crescente de seu ponto de ebulição e são pouco retidos na coluna polar. Estas informações foram suficientes para a identificação dos picos dos três n-alcanos (C12, C14, C16) no plano de separação.

3.8. Curvas analíticas

As soluções de nitro-HPAs do item 3.3.6 foram analisadas em triplicata nas condições cromatográficas da Tabela 3.8. Foram construídas curvas analíticas para dois métodos de calibração: externa e interna. No método de calibração interna o benzo(a)antraceno foi empregado como padrão interno, conforme método de análise adotado pelo NIST para o material de referência SRM 1587.

3.9. Extratos orgânicos de material particulado

Três extratos orgânicos de material particulado no ar obtidos por outros integrantes do laboratório foram analisados por GCxGC.

3.9.1. Extrato orgânico de material particulado emitido diretamente da queima de palha de cana-de-açúcar

Folhas secas de cana-de-açúcar foram queimadas em ambiente confinado (capela de laboratório) (DIAS, 2011). Três amostras de material particulado emitido diretamente da queima foram coletadas sobre filtro de quartzo recoberto com Teflon[®], com o emprego de um amostrador de baixo volume (Low-Vol) e uma bomba de sucção de ar. Após a amostragem os filtros foram submetidos a extração Soxhlet com diclorometano e os extratos orgânicos foram concentrados em evaporador rotativo a 40°C sob pressão reduzida. Os três extratos não fracionados foram combinados em um único extrato que foi submetido à análise por GCxGC.

3.9.2. Extrato orgânico de material particulado atmosférico coletado em área afetada pela queima de cana-de-açúcar

Uma amostra de material particulado atmosférico foi coletada na cidade de Ourinhos – SP, situada em uma região de cultivo de cana-de-açúcar (SOUZA; DIAS; CARVALHO, 2012).

A amostra foi coletada em filtro de fibra de vidro, utilizando amostrador de grande volume (Hi-Vol), durante 24h. Após a coleta 1/5 do filtro foi submetido à extração Soxhlet com diclorometano e o extrato orgânico foi concentrado em evaporador rotativo a 40°C sob pressão reduzida. O extrato foi analisado por GCxGC sem fracionamento prévio.

3.9.3. Extratos orgânicos de material particulado atmosférico coletado em área urbana da cidade de São Paulo

Duas amostras de material particulado atmosférico (MPA) foram coletadas na cidade de São Paulo, em um local afetado predominantemente por emissões veiculares, tanto de veículos pesados movidos a diesel, quanto de veículos de passeio movidos a álcool e gasolina.

A coleta do MPA foi feita sobre filtro de microfibras de quartzo em amostrador de grande volume (Hi-Vol), durante 24h. Após a amostragem, metade de cada filtro carregado foi submetida a extração Soxhlet com diclorometano e os extratos orgânicos foram concentrados em evaporador rotativo a 40°C sob pressão reduzida. Os dois extratos individuais foram analisados por GCxGC sem fracionamento prévio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, o estudo das condições cromatográficas para a análise de nitro-HPAs por GCxGC, a avaliação do desempenho do sistema GCxGC, a avaliação de alguns parâmetros de validação do método estudado e a aplicação da GCxGC na análise de extratos orgânicos de material particulado no ar são apresentados.

4.1. Desenvolvimento de metodologia para a determinação de nitro-HPAs em extrato orgânico de MPA por GCxGC

4.1.1. Proposição de colunas

No desenvolvimento de um método GCxGC a escolha das duas colunas analíticas deve ser feita considerando FEs com interações diferentes com os componentes da amostra. Na prática, para aproveitar o conhecimento já adquirido na 1D-GC, a coluna usualmente empregada na separação dos compostos-alvo é definida como uma das dimensões da GCxGC e a segunda dimensão é escolhida entre colunas com mecanismos de separação diferentes.

A coluna mais frequentemente empregada na análise de HPAs e seus derivados por 1D-GC contém a FE não polar 5% fenil metil polisiloxano (denominada 5% fenil) (ALBINET *et al.*, 2006; HAVEY *et al.*, 2006; OUKEBDANE *et al.*, 2010; POSTER *et al.*, 2006; TSAKAS; SITARAS; SISKOS, 2010; U.S. EPA, 1999). Para os nitro-HPAs a FE mais usual é a 50% fenil metil polisiloxano (denominada 50% fenil), de média polaridade (CRIMMINS; BAKER, 2006; DI FILIPPO *et al.*, 2010; KAWANAKA *et al.*, 2007; VALLE-HERNÁNDEZ *et al.*, 2010). Essas colunas têm, em geral, 30 m de comprimento (L), 0,25 mm de diâmetro interno (d.i.) e 0,25 µm de espessura do filme de FE (d_f).

Na análise de HPAs e seus derivados por GCxGC, a combinação de FEs mais relatada na literatura é do modo convencional ou normal, com a FE não polar 5% fenil na coluna ¹D. Como FE na coluna ²D, duas alternativas são apresentadas:

a) FE de média polaridade 50% fenil (AMADOR-MUNOZ *et al.*, 2008; CAVAGNINO *et al.*, 2003; FUSHIMI *et al.*, 2012; OCHIAI *et al.*, 2007; ONG *et al.*, 2003; ÖZEL *et al.*, 2009; RUIZ-JIMENEZ *et al.*, 2011; WELTHAGEN; SCHNELLE-

KREIS; ZIMMERMANN, 2003). Segundo Van De Weghe *et al.* (2006, p. 92) a interação entre os compostos aromáticos com os grupos fenila da FE 50% fenil resulta na separação dos compostos por famílias, incluindo, por exemplo, a separação entre os componentes alifáticos dos aromáticos presentes em frações complexas do petróleo. Uma vantagem adicional da FE fenil metil polisiloxano é sua resistência térmica que a torna adequada à análise de compostos com pontos de ebulição altos.

b) FE polar como o polietileno glicol (denominada PEG) ou semipolar como a 14% cianopropilfenil dimetil polisiloxano (denominada cianopropil) (ADAM *et al.*, 2007, 2009; KALLIO *et al.*, 2003, 2008; SCHNELLE-KREIS *et al.*, 2005). Segundo Adam *et al.* (2007), pares de elétrons livres em FE polares e semipolares, como a PEG e a cianopropil, promovem uma melhoria na separação de compostos oxigenados e nitrogenados por causa das interações dipolo permanente - dipolo permanente entre os compostos e a FE.

Com base nas informações da literatura apresentadas nos parágrafos anteriores, o conjunto de colunas usado inicialmente neste trabalho foi com a FE 5% fenil polisilfenilene siloxano na coluna ¹D e 50% fenil polisilfenilene siloxano na coluna ²D (ambas as colunas apresentam pouco sangramento de fase estacionária). Conforme orientação do fabricante do cromatógrafo, foi instalado no modulador um segmento de capilar (≈ 10 cm / 0,1 mm / d_f 0,1 μ m) com FE cianopropil para aumentar a eficiência da modulação. Uma extremidade desse capilar foi conectada à coluna ¹D e a outra extremidade à ²D, ou seja, foram empregados dois conectores Press-Tight™, um em cada extremidade do capilar. Com essa configuração, entretanto, não foi possível manter o conjunto de colunas isento de vazamento de gás de arraste através dos conectores e estabelecer uma sequência de operação. Assim, um outro conjunto de colunas foi montado com a mesma coluna ¹D (FE 5% fenil) e uma nova coluna ²D com FE cianopropil, de modo que a modulação continuou sendo feita na FE cianopropil com apenas um conector entre as colunas.

Quanto às dimensões das colunas na GCxGC, as mais usuais são 25-30 m (L), 0,25-0,32 mm (d.i.) e 0,25 μ m (d_f) para a coluna ¹D e 0,8-1,5 m (L), 0,1 mm (d.i.) e 0,1 μ m (d_f) para a ²D. Neste trabalho as dimensões das colunas empregadas foram de 30 m / 0,25 mm / 0,25 μ m na ¹D e 1 m / 0,10 mm / 0,10 μ m na ²D.

4.1.2. Critério para escolha da vazão do gás de arraste

Na GCxGC a coluna 2D , por ter diâmetro interno menor do que a coluna 1D , atua como uma restrição e provoca uma alta resistência ao fluxo. Em consequência, a pressão de entrada do gás de arraste na coluna 1D deve ser alta. Como as duas colunas são conectadas em série, a vazão do gás nas colunas é a mesma, porém, a velocidade linear é bastante diferente (KALLIO, 2008, p. 29). Não existe um valor de pressão de entrada que resulte em velocidade ótima do gás de arraste nas duas colunas, isto é, não existe uma pressão na qual ambas as colunas possam operar com seu melhor desempenho. Um compromisso deve ser assumido no qual uma coluna é operada nas proximidades da sua faixa de velocidade ótima enquanto que na outra a velocidade do gás está em uma região de eficiência menor, porém sem comprometer a separação esperada (BEENS *et al.*, 2005a).

No cromatógrafo empregado neste trabalho, as colunas em série estão localizadas em um único forno. Nessa situação tanto a vazão do gás de arraste como a temperatura do forno influenciam simultaneamente a separação nas duas dimensões. Um aumento da vazão resulta na diminuição da retenção nas duas colunas e na diminuição da temperatura de eluição (T_e) de um pico da coluna 1D (em programação de temperatura). Como a T_e é também a temperatura na qual ocorre a separação na coluna 2D (praticamente em isoterma) a diminuição da T_e acarreta um aumento na retenção na 2D - esses dois efeitos que ocorrem simultaneamente na coluna 2D podem anular um ao outro. É, portanto, difícil escolher as dimensões apropriadas das colunas e as condições necessárias para a realização de uma separação específica (BEENS *et al.*, 2005a; ONG *et al.*, 2002b).

Beens, Tijssen, e Blomberg (1998) desenvolveram um modelo matemático que correlaciona a eficiência das colunas da GCxGC com a velocidade linear média do gás de arraste. Com base nesse modelo matemático, Beens *et al.* (2005a) escreveram um programa de cálculo em Excel[®] (Microsoft Office)⁸ que gera as curvas de eficiência (N) versus pressão de entrada do gás de arraste (p_{in}). Esse programa é muito simples de ser utilizado e requer do usuário apenas algumas informações de fácil obtenção, como

⁸ Esse programa de cálculo pode ser obtido mediante solicitação aos autores.

o tipo de gás de arraste empregado, as dimensões das duas colunas, um valor de temperatura esperada nas proximidades do meio da corrida cromatográfica e a fórmula molecular de uma substância que elui nessa temperatura. A partir desses dados as curvas de ' N vs p_{in} '⁹ para cada coluna são geradas.

Através desse programa de cálculo, a vazão do gás de arraste foi escolhida para o conjunto de colunas empregado neste trabalho. A Figura 4.1 apresenta algumas células da planilha de cálculo nas quais foram introduzidas as dimensões das duas colunas capilares: L (m) / d.i. (μm) / d_f (μm) iguais a (30/250/0,25) e (1,0/100/0,1), a temperatura de 154°C e a fórmula molecular do fluoreno ($\text{C}_{13}\text{H}_{10}$). O fluoreno foi o componente escolhido porque elui em 154°C que é aproximadamente a metade da temperatura máxima da corrida (290°C).

Após a inserção dos dados apresentados na Figura 4.1, o programa gerou o gráfico na Figura 4.2 que indica o valor de pressão de entrada próximo a 150 kPa como sendo o valor que resulta em maior eficiência (N) na coluna ²D. Na mesma figura é apresentada uma curva que indica o 'critério de modulação'¹⁰ para cada valor de pressão.

⁹ A p_{in} foi escolhida pelos autores no lugar da velocidade linear média para que as curvas das duas colunas possam ser apresentadas no mesmo gráfico.

¹⁰ Para preservar a resolução alcançada na ¹D o período de modulação deve ser $\approx 1,5\sigma$.

GCxGC calculator		Helium carrier gas	
Version 2.1 08-08-2005		Only change values in green box	
INPUT FIELDS			
Properties column 1			
dc [μm] =	250	μm	
L [m] =	30	m	
df [μm] =	0,25	μm	
Properties column 2			
dc [μm] =	100	μm	
L [m]=	1	m	
df [μm] =	0,1	μm	
Temperature settings			
Temperature (column 1 and 2) [°C]=	154	°C	
Pressure settings			
Start inlet P [kPa] =	10	kPa (over)	
Final inlet P [kPa]=	600	kPa (over)	
Outlet P [kPa] =	100	kPa (abs)	
Capacity factor* column 1 [-] =	4	(-)	
Capacity factor* column 2 [-] =	4	(-)	
Coating efficiency column 1 (%) =	90	%	
Coating efficiency column 2 (%) =	90	%	
Compound info			
N° of Carbon atoms:	13		
N° of Hydrogen atoms:	10		
N° of Oxygen atoms:	0		
N° of Nitrogen atoms:	0		
N° of Chlorine atoms:	0		
N° of Sulphur atoms:	0		
N° of aromatic rings:	3		
*Capacity factor now called Retention factor (k'): ideally between one and five.			

Figura 4.1 - Parte da planilha de cálculo da pressão do gás de arraste, na qual os dados referentes a este trabalho foram introduzidos nas células verdes (ver texto). Programa desenvolvido por Beens *et al.* (2005a).

Figura 4.2 - Curvas de N vs. p_{in} para o conjunto de colunas de dimensões: 30 m/0,25 mm/0,25 μm e 1,0 m/0,1 mm/0,1 μm (L/d.i./ d_f). A linha vermelha é a curva da coluna ^1D , azul da ^2D e a linha com marcadores é a curva do critério de modulação (ver texto). Programa desenvolvido por Beens *et al.* (2005a).

Na Figura 4.3 estão apresentados alguns resultados dos cálculos efetuados pelo programa. As células destacadas em amarelo indicam a pressão ótima (151,6 kPa) do gás de arraste que resulta no maior valor de N (10426) na coluna ^2D . Como em GCxGC é preferível trabalhar no modo ‘vazão constante’ ao invés de ‘pressão constante’, a vazão ótima foi determinada a partir da aplicação de 150 kPa do gás hélio no conjunto de colunas instalado no forno do cromatógrafo, em temperatura constante e igual a 154°C. Nessa condição, o valor indicado pelo cromatógrafo para a vazão nas colunas foi próximo a 1 mL/min. Esse foi o valor de vazão constante de gás de arraste empregado nas análises realizadas.

	Pmid [bar abs]	Large P column 1 (-)	Av. lin. veloc. Column 1 (cm/s)	Av. lin. veloc. Column 2 (cm/s)	H column 1 (um)	H column 2 (um)	N column 1 (-)	N column 2 (-)	Plates/time column 1 (s-1)	Plates/time column 2 (s-1)	Modulation Criterion (-)
Inlet P kPa											
10	1,06	1,0400E+00	1,1	7,3	7690	1232	3901	812	1	59	0,32
°											
°											
°											
139,8	1,92	1,2489E+00	12,5	112,2	381	97	78842	10333	328	11591	1,04
151,6	2,00	1,2557E+00	13,4	121,9	348	96	86158	10426	384	12708	1,07
163,4	2,09	1,2617E+00	14,3	131,6	322	96	93141	10390	443	13669	1,10
°											
°											
°											
305	3,12	1,2996E+00	24,4	245,0	232	153	129550	6532	1052	16002	1,19

Figura 4.3 - Parte da planilha de cálculo da pressão do gás de arraste. As células destacadas em amarelo indicam a pressão de entrada do gás de arraste hélio que resulta no maior valor de N na coluna ²D do conjunto de colunas (30 m/0,25 mm/0,25 µm) e (1,0 m/0,1 mm/0,1 µm). Programa desenvolvido por Beens *et al.* (2005a).

4.1.3. Critério de escolha da programação de temperatura do forno de colunas

Na 1D-GC a programação da temperatura é definida de tal modo que uma separação suficiente seja alcançada em um tempo de análise aceitável. Na GCxGC, a situação é mais complexa porque, além da separação na primeira coluna, a programação da temperatura atua sobre a retenção na segunda coluna e consequentemente no período de modulação (DALLUGE *et al.*, 2002). Em geral, uma taxa de aquecimento lenta é adotada na GCxGC para que a separação rápida na coluna ²D ocorra praticamente em temperatura constante. Dessa maneira o mecanismo de separação por diferença de volatilidade não atua na coluna ²D e o conjunto de colunas se aproxima mais da ortogonalidade (BEENS, 2010, p. 19).

Na prática, uma estimativa da taxa de aquecimento pode ser feita pela equação (1) que é aplicável a todas as programações de temperatura na GC capilar (BLUMBERG; KLEE, 2000).

$$\text{Taxa de aquecimento (}^{\circ}\text{C/min)} = \frac{10 (^{\circ}\text{C})}{t_M (\text{min})} \quad \text{Equação (1)}$$

onde t_M é o tempo morto, isto é, o tempo necessário para uma substância que não interage com a FE eluir da coluna.

O t_M pode ser calculado pela razão entre o comprimento da coluna e a velocidade linear média do gás de arraste ($t_M = L/\mu$). Como na GCxGC a coluna ²D tem comprimento pequeno (≈ 1 m) e velocidade do gás de arraste alta (≈ 130 cm/s) o t_M do conjunto de colunas pode ser considerado igual ao t_M da coluna ¹D.

No conjunto de colunas escolhido, a coluna ¹D tem comprimento igual a 30 m e velocidade linear média igual a 13,4 cm/s (Figura 4.3), portanto o tempo morto é igual a 3,7 min e a taxa de aquecimento calculada pela equação (1) é igual a 2,7 $^{\circ}\text{C/min}$.

Foram empregadas taxas de aquecimento diferentes, segundo a volatilidade dos componentes das soluções analisadas: para a solução HPA/NHPA/n-alcane, cujo componente mais volátil elui em torno de 100 $^{\circ}\text{C}$ e o menos volátil em torno de 290 $^{\circ}\text{C}$, foi empregada a taxa de aquecimento de 2 $^{\circ}\text{C/min}$; para a solução 6-NHPA cujas temperaturas de eluição (T_e) variam de 220 a 300 $^{\circ}\text{C}$ foram empregadas duas taxas de aquecimento, de 50 até 200 $^{\circ}\text{C}$ a 20 $^{\circ}\text{C/min}$ e até 300 $^{\circ}\text{C}$ a 2,5 $^{\circ}\text{C/min}$; a solução 13-

NHPA, cujas T_e variam de 160 a 300°C foi empregada a taxa de aquecimento de 3°C/min.

4.1.4. Estudo experimental das condições de introdução da amostra na coluna

O desafio principal na transferência de uma amostra para dentro da coluna cromatográfica é manter a integridade química dessa amostra. Assim como na 1D-GC, também na GCxGC a introdução da amostra na coluna é uma etapa crucial da análise, da qual dependem a precisão e exatidão dos resultados. Somando-se a isso as características de amostras oriundas de matrizes complexas, com inúmeras substâncias quimicamente diferentes e presentes em faixas amplas de níveis de concentração, fica evidente a necessidade de uma investigação detalhada dessa etapa do procedimento analítico.

A técnica de introdução da amostra com programação de temperatura, adotada neste trabalho, pode ser dividida em quatro etapas: introdução da amostra no injetor (injeção), vaporização, transferência e limpeza da câmara de vaporização. Cada uma dessas etapas apresenta diferentes parâmetros que devem ser estudados porque podem afetar a recuperação dos analitos. A otimização desses parâmetros pode ser feita pela comparação das áreas dos picos dos analitos em condições diferentes (GÓMEZ-RUIZ *et al.*, 2009; HOH; MASTOVSKA, 2008; YUSA *et al.*, 2006).

Neste trabalho, alguns parâmetros do PTV foram adotados a partir de informações coletadas na literatura, enquanto outros foram investigados experimentalmente. A temperatura inicial do PTV foi definida em um valor próximo ao ponto de ebulição do solvente DCM, a exemplo de Albinet *et al.* (2006, p. 108) e Crimmins e Baker (2006, p. 6767), em seus trabalhos de determinação de HPAs em MPA. A injeção de 2 µL de amostra no modo *splitless* é uma recomendação da U. S. EPA (1999, p. 9). Sabe-se que no modo *splitless*, o volume do *liner* é um fator limitante do volume de amostra que pode ser introduzido no injetor. Porém, quando um PTV é empregado, alíquotas maiores de amostra podem ser injetadas em *liners* de mesmo volume empregados no injetor SSL. Isso é possível porque no PTV a vaporização e transferência da amostra são progressivas, o que minimiza a ocorrência de *backflash*, o fenômeno que ocorre quando o volume de vapor é superior ao volume

do *liner*. O *backflash* deve ser evitado porque pode causar contaminação cruzada (*carryover*), áreas não reprodutíveis e um aumento não linear da área do pico com um aumento do volume injetado (GÓMEZ-RUIZ *et al.*, 2009; KLEE, 2005; MISSELWITZ; COCHRAN, 2011).

O PTV do cromatógrafo empregado utiliza *liners* com 120 mm de comprimento e 2 mm de d.i. que, segundo o fabricante, comportam 1 ou 2 µl de amostra no modo PTV-*splitless* e 3 a 10-20 µl no modo PTV-*delayed splitless*¹¹. Neste trabalho, o volume de 2 µL foi adotado no modo PTV-*delayed splitless*, com um atraso de 1 min no início da programação de temperatura no PTV.

Os parâmetros do PTV investigados experimentalmente foram:

4.1.4.1. Tipo de *liner*

O *liner* tem um papel relevante nas etapas de introdução e transferência da amostra para a coluna. Para o emprego do injetor PTV, as literaturas científica e técnica indicam o emprego de *liners* com enchimento ou chicanas para conter a amostra líquida antes e durante o processo de vaporização, e reter resíduos não voláteis (HOH; MASTOVSKA, 2008; KLEE, 2005; Restek Technical Guide, 2002).

Foram avaliados dois *liners* de vidro borosilicato desativado: um com lã de vidro e outro com a parede interna sinterizada em toda sua extensão (Figura 3.8). A solução (5) de nitro-HPAs preparada para a construção das curvas analíticas (item 3.3.6) foi empregada nessa avaliação. As condições cromatográficas foram iguais em todas as corridas. As médias das áreas das replicatas e os respectivos desvios padrão relativos (DPR) estão apresentados no gráfico da Figura 4.4.

¹¹PTV-*delayed splitless* é a técnica de introdução da amostra em que o início da programação de temperatura no PTV é atrasado de modo a permitir a separação parcial entre os analitos e o solvente na fase de injeção. Uma parte do solvente é transferida para a coluna pelo fluxo do gás de arraste antes da etapa de vaporização.

Figura 4.4 - Médias das áreas e Desvios Padrão Relativos (%) obtidos na análise da solução (5) de nitro-HPAs para a construção de curvas analíticas: azul - *liner* com lâ de vidro (n=6); vermelho - *liner* sintetizado (n=3).

As áreas com *liner* sinterizado foram maiores do que com lã de vidro, com exceção do benzo(a)antraceno, único HPA na solução, e seu nitro derivado, 7-nitro-benzo(a)antraceno. Esse fato pode ser atribuído à degradação ou adsorção sobre a lã de vidro dos nitro-HPAs na solução. Mol *et al.* (1995, p. 124) em seu estudo sobre a inércia de enchimentos em *liners* para PTV, relatou a degradação de compostos lábeis ou polares com o emprego de lã de vidro silanizada. Como os nossos dados experimentais com lã de vidro também indicam perda de analitos, o *liner* de vidro borossilicato desativado e com a superfície interna sinterizada foi escolhido.

4.1.4.2. Tempo de *splitless*

O tempo de *splitless*, isto é, o período em que a válvula de *split* permanece fechada durante a injeção, vaporização e transferência, deve ser suficiente para que toda a amostra vaporizada seja transferida para a coluna, porém, não excessivo ao ponto de provocar picos alargados e com cauda (Restek Technical Guide, 2002). Para o injetor PTV, pode ser necessário um tempo de *splitless* maior do que para o SSL, porque no primeiro a vaporização e transferência completas ocorrem após o tempo decorrido desde a injeção até o final da programação de temperatura (KLEE, 2005).

A determinação do tempo de *splitless* adequado é feita experimentalmente pela injeção de uma amostra com tempos de *splitless* crescentes. Quando as áreas dos picos dos componentes da amostra não aumentarem com o aumento do tempo de *splitless*, o valor deste parâmetro será o menor tempo que originou o máximo das áreas (JANSSEN, 1998). O tempo de *splitless* frequentemente relatado na literatura científica sobre a determinação de HPAs em MPA é igual ou próximo a dois minutos (ALBINET *et al.*, 2006; CRIMMINS; BAKER, 2006; DI FILIPPO *et al.*, 2010; OUKEBDANE *et al.*, 2010; PORTET-KOLTALO *et al.*, 2009).

Para avaliar experimentalmente se dois minutos de tempo de *splitless* são suficientes para a transferência completa dos nitro-HPAs investigados neste trabalho, a solução 13-NHPA (1 µg/mL) foi analisada duas vezes com tempo de *splitless* igual a dois minutos e uma vez com três minutos. As áreas obtidas com três minutos foram ligeiramente menores ou aproximadamente iguais às obtidas com dois minutos (Figura 4.5), com exceção do 7-nitro-benzo(a)antraceno, que foi ligeiramente maior com três

minutos. Essa pequena variação entre as áreas pode ser interpretada como um erro indeterminado (LEITE, 1998, p. 38). As médias e os desvios correspondentes não foram calculados porque não foram feitas triplicatas das injeções. A partir desses dados, o tempo de *splitless* igual a dois minutos foi considerado suficiente para transferir a massa de 28 ng de nitro-HPAs (2 µL da solução 13-NHPAs) para dentro da coluna.

Figura 4.5 - Áreas obtidas com tempos de *splitless* 2 e 3 min (I = injeção).

4.1.4.3. Programação de temperatura no PTV

A introdução da amostra no PTV é feita em uma temperatura inicial baixa que em seguida é aumentada rapidamente até um valor alto o suficiente para a vaporização da amostra (KLEE, 2005).

No cromatógrafo empregado, o PTV pode ser programado com qualquer taxa de aquecimento até um valor máximo de 14,5°C/s. Para avaliar se essa taxa máxima é uma condição drástica para a injeção de nitro-HPAs, suspeitos de sofrerem degradação térmica (Albinet *et al.*, 2006; CHOW *et al.*, 2007; CRIMMINS; BAKER, 2006), duas velocidades de aquecimento foram avaliadas: (a) = 14,5°C/s e (b) = 2,2°C/s.

Para a velocidade de aquecimento 14,5°C/s foram feitas injeções em triplicata e calculados os desvios padrão das áreas que estão indicados por barras sobre as colunas azuis no gráfico da Figura 4.6. Para a velocidade de aquecimento 2,2°C/s foram feitas duas injeções e calculadas as médias das áreas apresentadas nas colunas vermelhas no mesmo gráfico. Nas duas análises com taxa de aquecimento menor, o tempo de *splitless* foi igual a três minutos, para compensar o tempo maior para atingir a temperatura máxima do PTV. Os resultados apresentados na Figura 4.6 indicam que as áreas obtidas com a velocidade de aquecimento 14,5°C/s foram maiores, exceto para 9-NAnt, 9-NFen, 3-NFlt, 1-NPir e 1,3-DNPir, que considerando os desvios padrão não apresentam diferença significativa entre as duas condições investigadas. Se a taxa de aquecimento alta causasse degradação térmica dos nitro-HPAs investigados, deveriam ser encontradas áreas menores nos cromatogramas obtidos nesta condição drástica. Como a diferença nas taxas de aquecimento do PTV não causou alteração significativa nas áreas dos picos desses nitro-HPAs, foi adotada a velocidade de aquecimento 14,5°C/s que reduz a duração da etapa completa de introdução da amostra na coluna.

Figura 4.6 - Médias das áreas obtidas com duas taxas de aquecimento do PTV: azul = 14,5°C/s (n=3); vermelho = 2,2°C/s (n=2).

4.1.5. Definição do período de modulação

Segundo Welke *et al.* (2012, p. 126), o período de modulação é um parâmetro muito importante na GCxGC porque afeta a detectabilidade, a separação e o formato do pico. Durante um P_M ocorrem as etapas de concentração, focalização e injeção da banda cromatográfica na coluna 2D .

Três períodos de modulação diferentes foram testados: 3, 4 e 5s. A solução HPA/NHPA foi analisada com P_M igual a 4 s e a solução HPA/NHPA/n-alceno com P_M igual a 5 s. As demais condições cromatográficas foram mantidas iguais nas duas corridas. Na Tabela 4.1 estão apresentados: a) os números de picos primários que apresentaram três, quatro ou cinco modulações em função dos P_M de quatro ou cinco segundos; b) a altura do pico modulado mais intenso (ápice) do 9-NAnt tomado como referência da detectabilidade porque eluiu na metade aproximada da corrida; c) a resolução na coluna 2D entre benzo(b)fluoranteno e benzo(k)fluoranteno que apresentaram a menor separação no cromatograma.

Tabela 4.1 - Número de picos primários modulados três, quatro e cinco vezes; altura do ápice do 9-NAnt modulado; e resolução na coluna 2D entre BbF e BkF em função dos períodos de modulação de 4 e 5 s.

	$P_M = 4$ s	$P_M = 5$ s
Três modulações por pico da 1D (*):	nenhum	13 de 24 picos (54,2%)
Quatro modulações por pico da 1D (♦):	9 de 24 picos (37,5%)	11 de 24 picos (45,8%)
Cinco modulações por pico da 1D (♣):	15 de 24 picos (62,5%)	nenhum
Altura do ápice do 9-NAnt (mV):	1190093	1544539
Resolução na coluna 2D entre BbF e BkF:	0,17 (os dois picos foram modulados 4 vezes cada)	0,10 (os dois picos foram modulados 3 vezes cada)

(*) três é o nº de modulações aceitável; (♦) quatro é o nº de modulações que atende ao critério de modulação; (♣) cinco é um nº de modulações acima do necessário.

O cromatograma obtido com período de modulação igual a cinco segundos apresentou a vantagem de uma maior detectabilidade porque o sinal do 9-NAnt foi 30% mais intenso (altura do ápice), porém, com período de modulação igual a quatro segundos a resolução entre BbF e BkF na coluna 2D foi superior. A escolha de um P_M

que resulte em maior resolução ou maior detectabilidade ou maior espaço 2D de separação deve ser feita em função da complexidade das amostras a serem analisadas quanto à sua composição química e níveis de concentração dos analitos. Nas análises das soluções de HPAs, nitro-HPAs e n-alcenos realizadas foram empregados os dois P_M (4 e 5 s).

A solução 6-NHPAs também foi analisada com dois P_M diferentes: três e quatro segundos. Com P_M igual a 3 s todos os seis picos de nitro-HPAs na solução foram modulados cinco vezes e com P_M igual a 4 s quatro vezes. O ápice do 9-NAnt obtido com $P_M = 4$ s foi 14% mais intenso. Como os seis picos de nitro-HPAs nessa solução estão bem separados (Figura 4.7) o P_M de 4 s foi adotado ao invés do P_M de 3 s que poderia oferecer maior resolução.

Figura 4.7 - Cromatogramas GCxGC da solução 6-NHPAs: (a e b) com P_M 3 s; (c e d) com P_M 4 s; 1: 2-NFlu, 2: 9-NAnt, 3: 3-NFlt, 4: 1-NPir, 5: 7-NBaA, 6: 6-NCri, x= desconhecido.

4.2. Avaliação do desempenho do sistema GCxGC

Segundo Dutriez *et al.* (2009), apesar da alta capacidade de resolução dos sistemas GCxGC, coeluições de picos podem ocorrer especialmente se vários componentes da amostra apresentarem propriedades físico-químicas semelhantes. Por isso, é necessário determinar seu desempenho com critérios de avaliação adaptados para a técnica GCxGC.

Considerando o sistema como sendo composto pela instrumentação (cromatógrafo e modulador), pelo conjunto de colunas e condições cromatográficas definidas no item 4.1, os seguintes parâmetros indicativos da qualidade do desempenho foram avaliados:

4.2.1. Largura dos picos modulados

Uma característica essencial da GCxGC é gerar picos estreitos, resultantes do processo de modulação e da alta velocidade linear do gás na segunda dimensão. A largura de base dos picos da coluna 2D (2w_b) é um parâmetro importante porque dela depende a capacidade de pico do sistema GCxGC. Segundo Mondello *et al.* (2008, p. 106), a 2w_b depende da eficiência do modulador, da seletividade e da espessura do filme de FE na segunda dimensão, da programação de temperatura no forno de colunas e da vazão do gás de arraste. Em geral, os valores de 2w_b variam entre 100 e 500ms.

A partir de um cromatograma das soluções HPA/NHPA/alcano e 13-NHPA foram tomadas as larguras em 10% da altura dos picos modulados de maior intensidade. A Tabela 4.2 apresenta as médias das larguras em cada cromatograma e os valores mínimo e máximo com indicação do analito que apresentou essa largura.

Tabela 4.2 - Larguras de pico da coluna 2D (2w_b) medidas em 10% da altura.

	Média [mín. (analito) / máx. (analito)] ms
Solução HPA/NHPA/alcano ($P_M = 5$ s)	264 [168 (n-C12) / 348 (BaA)]*
Solução 13-NHPA ($P_M = 4$ s)	224 [167 (1-NNaf) / 350 (6-NCri)]

*Foram excluídos dessa média os picos de Naf, Acn e Ace que estão presentes na solução em concentração cerca de vinte vezes superior aos demais componentes e apresentam assimetria.

Se as larguras de pico da Tabela 4.2 forem confrontadas com alguns dados da literatura científica obtidos para HPAs com diferentes moduladores resfriados por CO₂ líquido (Tabela 4.3), observa-se uma semelhança entre os valores, o que indica um desempenho aceitável do sistema GCxGC empregado quanto à geração de picos modulados estreitos.

Tabela 4.3 - Larguras de pico obtidas com diferentes moduladores resfriados por CO₂ líquido.

² w _b (ms)	Modulador	Analito	Referência
125	Semirotativo	Criseno	KALLIO, 2008
130 – 240*	<i>Dual Jet</i> – Thermo Scientific	HPAs	CAVAGNINO <i>et al.</i> , 2003
430	Longitudinal (LMCS)	Fluoreno	MARRIOTT <i>et al.</i> , 2000

* Larguras em 10% da altura

4.2.2. Resolução e capacidade de pico

Segundo Giddings (in: H. J. Cortes - Ed., **Multidimensional Chromatography; Techniques and applications**, Marcel Dekker, New York, NY, 1990, citado por ADAM *et al.*, 2008a, p.174), a resolução entre dois compostos em um sistema bidimensional pode ser expressa pela equação (2):

$$R_s (2D) = \sqrt{({}^1R_s)^2 + ({}^2R_s)^2} \quad \text{Equação (2)}$$

onde 1R_s e 2R_s são as resoluções na primeira e segunda dimensões, respectivamente.

Na GC×GC, as resoluções entre dois compostos A e B na primeira [${}^1R_s (A, B)$] e segunda [${}^2R_s (A, B)$] dimensões podem ser expressas através das equações (3) e (4) respectivamente (ADAM *et al.*, 2008b):

$${}^1R_s (A, B) = \sqrt{\left(\frac{2 ({}^1\delta)}{{}^1w_{bA} + {}^1w_{bB}} \right)^2} \quad \text{Equação (3)}$$

$${}^2R_s (A, B) = \sqrt{\left(\frac{2 ({}^2\delta)}{{}^2w_{bA} + {}^2w_{bB}} \right)^2} \quad \text{Equação (4)}$$

onde:

- ${}^1\delta$ e ${}^2\delta$ são calculados com os tempos de retenção nos ápices dos picos A e B nas duas dimensões:
 ${}^1\delta = {}^1t_{RB} - {}^1t_{RA}$ e ${}^2\delta = {}^2t_{RB} - {}^2t_{RA}$
- ${}^2w_{bA}$ e ${}^2w_{bB}$ são as larguras nas bases dos picos modulados mais intensos de A e B.
- ${}^1w_{bA}$ e ${}^1w_{bB}$ são as larguras dos picos A e B na 1D , calculadas como o produto do número de picos modulados pela duração de um período de modulação.

No cromatograma GC×GC da solução HPA/NHPA/n-alceno da Figura 4.8 pode-se observar que o pico do naftaleno (pico 4) e do n-dodecano (pico 1) apresentam tempos de retenção coincidentes na primeira dimensão e bastante distintos na segunda dimensão. A resolução entre esses dois componentes nas duas dimensões ($R_s 2D$) foi

calculada através das Equações (2 a 4) e dos dados apresentados na Tabela 4.4. Os valores de resolução calculados também estão apresentados na mesma tabela.

Tabela 4.4 - Dados obtidos do cromatograma GCxGC na Figura 4.8 e resoluções entre naftaleno e n-dodecano calculadas.

Parâmetros da Equação (1)	Valores	Parâmetros da Equação (2)	Valores
$^1t_{R-Naf}$	14,9 min	$^2t_{R-Naf}$	0,98 s
$^1t_{R-n-C12}$	15,1 min	$^2t_{R-n-C12}$	0,46 s
nº de picos modulados (Naf)	6	$^2W_{bNaf}$	0,0049 min
nº de picos modulados (n-C12)	4	$^2W_{bn-C12}$	0,0029 min
Período de modulação	5 s		
$^1R_s = 0,58$		$^2R_s = 2,22$	
$R_s \text{ 2D} = 2,3$			

Os valores de resolução calculados indicam uma separação quase inexistente entre naftaleno e n-dodecano na primeira dimensão ($^1R_s = 0,58$). Isso equivale a esperar a mesma ausência de separação entre esses dois compostos quando analisados pela técnica 1D-GC com a mesma coluna capilar e nas mesmas condições cromatográficas. Porém, o valor da resolução entre Naf e n-C12 na segunda dimensão ($^2R_s = 2,22$) foi superior a 1,5 o que significa separação até a linha de base (CIOLA, 1998, p. 30). A separação entre o Naf e n-C₁₂ observada nesse cromatograma é um exemplo do potencial da técnica GCxGC em separar compostos que coeluem de colunas capilares empregadas na 1D-GC. A separação entre os padrões de Naf e n-C12 na Figura 4.8 evidencia a possibilidade da separação de compostos-alvo presentes no MPA, como os HPAs, de interferentes da matriz atmosférica, como as parafinas e iso-parafinas oriundas da queima de combustíveis derivados do petróleo.

Figura 4.8 - Cromatograma GCxGC da solução HPA/NHPA/n-alcano. 1: n-C12; 2: n-C14; 3: n-C16; 4: Naf; 5: Acn; 6: Ace; 7: Flu; 8: Fen; 9: Ant; 10: Flt; 11: 2-NFlu/Pir; 12: 9-NAnt; 13: BaA; 14: Cri; 15: 3-NFlt; 16: 1-NPir; 17: BbF; 18: BkF; 19: 7-NBaAnt; 20: BaP; 21: 6-NCri; 22: InP; 23: DaA; 24: BgP.

No mesmo cromatograma da solução HPA/NHPA/n-alcano (Figura 4.8), porém, foram observados 24 picos ao invés dos 25 esperados, referentes aos 25 componentes da solução. A possibilidade de coeluição de dois componentes foi confirmada pelos valores muito próximos encontrados para os tempos de retenção do 2-nitrofluoreno e pireno nas duas dimensões (1t_R e 2t_R). Esses valores foram determinados por injeções independentes de soluções de HPAs e de nitro-HPAs:

Solução de HPAs (item 3.1.1) Pir: $^1t_R = 62,1$ min; $^2t_R = 1,97$ s

Solução 6-NHPAs (item 3.3.5) 2-NFlu: $^1t_R = 62,1$ min; $^2t_R = 1,92$ s

Portanto, o pico assinalado com o número '11' na Figura 4.8, o qual apresenta $^1t_R = 62,0$ min e $^2t_R = 1,90$ s foi considerado como sendo resultante da coeluição do 2-nitrofluoreno e pireno nas condições cromatográficas empregadas.

Sabe-se da teoria básica da cromatografia que na ausência de separação entre os ápices de dois picos a maneira mais eficiente de melhorar a resolução é alterar o valor do fator seletividade. Em cromatografia a gás a alteração da seletividade é feita pela troca da fase estacionária. Para esse caso específico da separação de 2-NFlu e Pir por GCxGC, uma tentativa de aumentar a resolução poderia ser substituir a FE cianopropil empregada na coluna 2D pela FE 50% fenil, que tem maior afinidade pela molécula apolar do pireno. Outra tentativa poderia ser o emprego de um conjunto de colunas inverso.

No cromatograma GCxGC da solução 13-NHPA (Figura 4.9) foi observada uma separação crítica entre os isômeros 2- e 3-nitrofluoranteno. Na análise da solução com concentração de 500 ng/mL a resolução entre os isômeros na primeira dimensão (1R_s) foi igual a 1,0 e na segunda (2R_s) igual a 0,04. A resolução nas duas dimensões (R_s 2D) foi igual a 1,0 ou seja, as condições adotadas na GCxGC não aumentaram a resolução alcançada na 1D-GC. O mesmo ocorreu na análise da solução com concentração menor (375 ng/mL), porém, como esperado, com resoluções mais altas: $^1R_s = 1,3$; $^2R_s = 0,07$; R_s 2D = 1,3. Nesse caso de separação entre isômeros um aumento da resolução poderia ser alcançado com um aumento dos pratos teóricos, pelo aumento do comprimento das colunas, ou com uma diminuição da taxa de aquecimento, mas essas soluções teriam a desvantagem de um aumento do tempo de análise que nas condições adotadas já é longo (1h:20min).

Figura 4.9 - Cromatograma GCxGC da solução 13-NHPA (375 ng/mL). 1: 1-NNaf; 2: 2-NNaf; 3: 2-NFlu; 4: 9-NAnt; 5: 9-NFen; 6: 2-NFlt; 7: 3-NFlt; 8: 1-NPir; 9: 2-NPir; 10: 7-NBaAnt; 11: 6-NCri; 12: 1,3-DNPir; 13: 1,6-DNPir. A região ampliada destaca os picos de 2- e 3- NFlt.

Fushimi *et al.* (2012) analisaram HPAs e derivados por GCxGC em condições cromatográficas diferentes das adotadas neste trabalho, que incluíram as fases estacionárias 5% fenil na coluna ¹D e 50% fenil na ²D e as dimensões das colunas ¹D: 60 m, 0,25 mm, 0,10 μm e da ²D: 1,5 m, 0,10 mm, 0,10 μm. Apesar do maior número de pratos teóricos das colunas empregadas e da FE 50% fenil na ²D, com afinidade pelos anéis aromáticos dos analitos, os autores também obtiveram tempos de retenção muito próximos para os dois isômeros: 2-NFlt (¹t_R = 20,612 min / ²t_R = 1,965 s) e 3-NFlt (¹t_R = 20,612 min / ²t_R = 2,170 s) (não foram apresentados os valores de resolução). Os autores, porém, quantificaram esses isômeros mal resolvidos com o emprego de um detector espectrométrico de massas triplo-quadrupolo, operado no modo de monitoramento seletivo de reações (selected-reaction monitoring, SRM). A determinação dos isômeros foi feita por espectrometria MS/MS com diferentes

combinações de íons monitorados. O 2-NFIt foi determinado pela subtração do valor do 3-NFIt (determinado com a combinação de íons MS_1 : 247 e MS_2 : 217) da soma do 2- e 3-NFIt (determinada com uma combinação diferente de íons MS_1 : 247 e MS_2 : 189). Essas observações feitas sobre a separação de 2- e 3-NFIt são um exemplo de como o acoplamento da GCxGC com a espectrometria de massas pode significar uma solução mais rápida do que a otimização das condições cromatográficas para o alcance da resolução necessária. De fato, Mondello *et al.* (2008, p. 101) afirmaram: “A combinação da espectrometria de massas como uma terceira dimensão a um sistema GCxGC resulta na ferramenta analítica atualmente mais poderosa para substâncias voláteis e semi-voláteis”.

Por outro lado, Zini (2009, p. 36) considera que: “Quando se trata de separação de misturas complexas, a atenção deve ser focada preferencialmente no número total de zonas de picos separáveis ao invés de focá-la na resolução de pares de picos. Neste caso, emprega-se um parâmetro distinto, que é a capacidade de pico, n_c .”

A capacidade de pico pode se calculada através da Equação (5):

$$n_c = 1 + \frac{N^{1/2}}{4} \ln\left(\frac{t_{R\max}}{t_{R\min}}\right) \quad \text{Equação (5)}$$

onde:

N = número de pratos teóricos

$t_{R\min}$ = tempo de retenção do primeiro componente

$t_{R\max}$ = tempo de retenção do último componente

Na GCxGC a capacidade de pico total do sistema (n_c) é o produto das capacidades de pico das duas dimensões 1D e 2D (1n_c e 2n_c , respectivamente):

$$n_c = ^1n_c \cdot ^2n_c$$

Na prática, segundo Marriott (in: Marriott P. J. 2002, **Multidimensional Chromatography**. Ed.: Mondello L., Lewis A.C., Bartle D. John Wiley & Sons, p. 82; citado por KALLIO, 2008, p. 22), n_c pode ser calculada aproximadamente considerando:

$$^1n_c = \text{Tempo de análise} / ^1w_{bi}$$

$$^2n_c = \text{Período de modulação} / ^2w_{bi}$$

onde:

$$^1w_{bi} \text{ (largura na base de um pico } i \text{ na } ^1D)$$

$$^2w_{bi} \text{ (largura na base do pico modulado } i)$$

Tomando como referência o pico do fluoreno, que é simétrico e elui próximo à metade da corrida, a 1n_c do sistema GCxGC em uso foi calculada com os dados apresentados na Tabela 4.5. Os valores de n_c calculados também estão apresentados na mesma tabela e evidenciam o aumento da capacidade de pico da GCxGC (1n_c) em relação à 1D-GC (1n_c).

Tabela 4.5 - Valores calculados para capacidades de pico da 1D (1n_c), 2D (2n_c) e do conjunto de colunas ($^t n_c$) a partir dos dados obtidos no cromatograma GCxGC da Figura 4.8 para o fluoreno.

Tempo de análise	107 min = 6420 s	$^1n_c = 428$ $^t n_c = 9844$ $^2n_c = 23$
$^1w_{bFlu}$	(5 s) × (3 picos modulados) = 15 s	
Período de modulação	5 s	
$^2w_{bFlu}$	0,22 s	

Segundo Kallio (2008, p. 21), embora a capacidade de pico teórica da GCxGC não seja usufruída integralmente, ela é superior se comparada à capacidade de pico da 1D-GC. Essa afirmação pode ser constatada através dos valores apresentados na Tabela 4.5, que indicam uma capacidade de pico para o conjunto de colunas empregado nas condições cromatográficas deste trabalho ($^t n_c = 9844$) cerca de vinte vezes superior à capacidade de pico da coluna convencional ($^1n_c = 428$).

4.2.3. Repetibilidade de tempo de retenção

O tempo de retenção (t_R) de uma substância na coluna cromatográfica é um parâmetro importante para a sua identificação. É necessário ocorrer a coincidência do t_R de um analito com o de uma substância padrão, analisados nas mesmas condições cromatográficas, para que, em conjunto com outras evidências experimentais, a identificação seja positiva. Na técnica GCxGC cada pico cromatográfico é caracterizado por dois tempos de retenção, um na primeira dimensão (1t_R) e outro na segunda (2t_R), o que possibilita um maior grau de certeza na identificação em comparação com a 1D-GC. O 1t_R é definido como o tempo decorrido entre o instante da introdução da amostra na coluna e a chegada do analito no modulador, enquanto que 2t_R é o tempo gasto pelo analito para eluir do modulador ao detector (SANZ, 2009, p.52). Para uma identificação ser positiva na GCxGC é necessário ocorrer a coincidência entre 1t_R e 2t_R de analitos e padrões, e a repetibilidade desses tempos de retenção de corrida para corrida (SHELLIE; XIE; MARRIOTT, 2002). A precisão e a exatidão dos tempos de retenção 1t_R e 2t_R são pré-requisitos para uma identificação confiável (MITREVSKI *et al.*, 2011).

Cromatógrafos a gás modernos executam controles rígidos dos parâmetros que influem diretamente nos tempos de retenção, como pressão do gás de arraste e temperatura, o que favorece a boa repetibilidade dos t_R . Na GCxGC, a repetibilidade dos t_R na primeira dimensão é comparável à 1D-GC, porém, na segunda dimensão é mais dependente da reprodutibilidade do período de modulação do que das condições cromatográficas (BEENS, 2010, p. 48). Se não houver repetibilidade dos tempos de início de cada ciclo de modulação de corrida para corrida, e sincronização entre esses tempos e o início da coleta do sinal no detector, não haverá repetibilidade dos t_R dos picos no plano 2D. Além disso, como a separação na segunda dimensão é muito rápida, qualquer pequena variação instrumental, como oscilação da vazão da fase móvel ou da temperatura, afeta significativamente os 2t_R dos compostos. (SHELLIE; XIE; MARRIOTT, 2002; VON MÜHLEN, *et al.* 2006b). No cromatógrafo a gás empregado neste trabalho a sincronização entre a modulação e a detecção do sinal é automática. A determinação dos 1t_R e 2t_R é feita considerando o sinal de maior

intensidade de um composto modulado como sendo o ápice, o qual define os tempos de retenção nas duas dimensões.

As repetibilidades de 1t_R e 2t_R foram avaliadas através de análises em replicata de quatro soluções diferentes: HPA/NHPA/n-alceno, 13-NHPA e duas soluções de nitro-HPAs preparadas para a construção de curvas analíticas [soluções (1) e (5)]. Para cada componente (i) das soluções, foram obtidos seus $^1t_{Ri}$ e $^2t_{Ri}$, e calculadas as médias das replicatas (1Média_i e 2Média_i) e respectivos desvios padrão relativos (1DPR_i e 2DPR_i). Em seguida, foram calculadas as médias de 1DPR_i e 2DPR_i que foram consideradas como DPR das médias dos tempos de retenção na primeira e segunda dimensões, respectivamente (1DPR e 2DPR). Esses cálculos foram feitos através das equações apresentadas a seguir:

Equações de cálculo:

Para coluna 1D	Para coluna 2D
$^1Média_i = \frac{\sum ^1t_{Ri}}{n}$	$^2Média_i = \frac{\sum ^2t_{Ri}}{n}$
$^1DPR_i \% = \frac{^1DP_i}{^1Média_i} \times 100$	$^2DPR_i \% = \frac{^2DP_i}{^2Média_i} \times 100$
$^1DPR = \frac{\sum ^1DPR_i}{m}$	$^2DPR = \frac{\sum ^2DPR_i}{m}$
onde:	onde:
1Média_i = média dos t_R do componente i na coluna 1D	2Média_i = média dos t_R do componente i na coluna 2D
1DPR_i = DPR da média dos t_R do componente i na coluna 1D	2DPR_i = DPR da média dos t_R do componente i na coluna 2D
1DPR = média dos 1DPR_i	2DPR = média dos 2DPR_i
n = número de replicatas; m = número de componentes em cada solução	

Os valores médio, mínimo e máximo dos DPR das médias dos t_R calculados para cada solução, em cada dimensão, estão apresentados na Tabela 4.6. Os valores de 1DPR são menores que 2DPR , ou seja, a repetibilidade foi melhor para 1t_R do que para 2t_R , como era esperado.

Tabela 4.6 - Desvios Padrão Relativos (DPR) das médias dos tempos de retenção nas duas dimensões.

Solução	¹ DPR médio (mín / máx) %	² DPR médio (mín / máx) %
HPA/NHPA/n-alceno (n = 3) (m = 24)	0,15 (0,00 / 0,97)	2,6 (1,1 / 7,3)
13-NHPA (n = 3) (m = 13)	0,04 (0,01 / 0,17)	1,5 (0,90 / 2,2)
Solução de NHPAs (1) (n = 3) (m = 7)	0,02 (0,00 / 0,04)	4,7 (2,0 / 7,6)
Solução de NHPAs (5) (n = 3) (m = 7)	0,01 (0,00 / 0,08)	2,0 (1,1 / 2,9)

n: número de replicatas;

m: número de picos que tiveram seus t_R medidos;¹DPR e ²DPR: Desvios Padrão Relativos na primeira e segunda dimensões, respectivamente.

Alguns dados da literatura sobre a repetibilidade de 2t_R em sistemas com moduladores resfriados por CO₂ líquido estão apresentados na Tabela 4.7. Os valores de ²DPR obtidos (Tabela 4.6) foram superiores aos relatados nessas referências, inclusive dos valores informados por Cavagnino *et al.* (2003) que utilizou o mesmo sistema GCxGC deste trabalho de pesquisa.

Tabela 4.7 - Desvios padrão relativos (²DPR) das médias dos 2t_R obtidos com diferentes moduladores resfriados por CO₂ líquido e detector FID.

² DPR (%)	Modulador	P _M (s)	Analitos	Referência
< 1	LMCS	5	Óleo essencial com 43 analitos	SHELLIE; XIE; MARRIOTT, 2002
≈ 1	LMCS	6	Anfetaminas	MITREVSKI <i>et al.</i> , 2011
≈ 1	LMCS	3	Ésteres metílicos de ácidos graxos	XIE; MARRIOTT; ADAMS, 2003
1,7 (*)	LMCS	3 e 6 (**)	Ésteres metílicos de ácidos graxos	VLAEMINCK <i>et al.</i> , 2007
1,5	Semi-rotativo	2 e 4 (**)	HPAs	KALLIO, 2003, p. 54
< 1	Dual Jet Thermo	4	HPAs	CAVAGNINO <i>et al.</i> , 2003

(*) Valor médio dos DPR dos 2t_R de 26 componentes. Valor mínimo = 0,31% e máximo = 5,3%.(**) A repetibilidade foi independente do P_M.

Com o intuito de encontrar possíveis causas que expliquem os valores altos de desvio padrão relativo dos tempos de retenção obtidos para a segunda dimensão, principalmente para a solução HPA/NHPA/n-alceno e solução de nitro-HPAs (1), os cromatogramas dessas soluções foram examinados em detalhes.

4.2.3.1. Repetibilidade dos 2t_R de componentes da solução HPA/NHPA/n-alceno

Nos três diagramas de ápices da solução HPA/NHPA/n-alceno (Figura 4.10), foram traçadas linhas vermelhas que interceptam o eixo y do diagrama (I) exatamente sobre os 2t_R do acenaftileno (nº 5), n-hexadecano (nº 3) e indeno-pireno (nº 22), que são os componentes da solução que apresentaram os valores mais altos de DPR das médias dos 2t_R : 7,3; 6,2 e 4,7% respectivamente. Nos outros diagramas (I' e I'') as linhas vermelhas auxiliam na observação da variação dos 2t_R desses três e de outros analitos na triplicata.

Figura 4.10 - Diagramas de ápices dos picos em três cromatogramas GCxGC da solução HPA/NHPA/n-alcano. 1: n-C12; 2: n-C14; 3: n-C16; 4: Naf; 5: Acn; 6: Ace; 7: Flu; 8: Fen; 9: Ant; 10: Flt; 11: 2-NFlu/Pir; 12: 9-NAnt; 13: BaA; 14: Cri; 15: 3-NFlt; 16: 1-NPir; 17: BbF; 18: BkF; 19: 7-NBaA; 20: BaP; 21: 6-NCri; 22: InP; 23: DaA; 24: BgP. As linhas paralelas em vermelho cortam o eixo y sobre os t_R dos picos 3, 5 e 22 do diagrama I.

A Figura 4.11 apresenta os picos bidimensionais do acenaftileno em dois cromatogramas diferentes: (a) um dos cromatogramas da triplicata da solução HPA/NHPA/n-alcano e (b) um cromatograma da solução HPA/NHPA/n-alcano diluída (1:1). Os fatores de assimetria desses picos (calculados pelo *software* Hyperchrom em 5% da altura) são diferentes da unidade (mín. 0,4; máx. 4,3), o que indica assimetria. Segundo Pápai e Pap (2002), entre as causas mais importantes da assimetria em cromatografia está a sobrecarga (*overload*) da coluna. A concentração do acenaftileno nessas soluções é cerca de vinte vezes superior às concentrações da maioria dos outros componentes. As massas de acenaftileno introduzidas na coluna - cerca de 25 ng na análise da solução diluída - provavelmente superaram sua capacidade de amostra.

Figura 4.11 - Picos bidimensionais de acenaftileno (Acn). (a) solução HPA/NHPA/n-alcano; (b) solução HPA/NHPA/n-alcano diluída (1:1).

Shellie, Xie, e Marriott (2002) também observaram valores mais altos de DPR das médias de t_R para os componentes presentes em maior quantidade na amostra e atribuíram essa observação à possível saturação de uma ou das duas colunas capilares. A saturação da coluna 2D ocorre frequentemente na GCxGC com modulador térmico, o qual coleta e focaliza porções do efluente da coluna 1D em bandas muito estreitas e concentradas, que são transferidas para a coluna 2D . Dessa forma, mesmo que a quantidade de analito introduzida na coluna 1D não tenha provocado a sua saturação, a coluna 2D , que apresenta pouca capacidade de amostra por causa do seu diâmetro interno pequeno (0,1 mm) e filme de fase estacionária fino (0,1 μ m), pode ser saturada (HARYNUK; GORECKI; ZEEUW, 2005). A saturação de uma coluna cromatográfica

gera picos assimétricos com seus ápices deslocados para tempos de retenção maiores, o que dificulta a identificação (KALLIO, 2008; PÁPAI; PAP, 2002). Observando o aspecto dos picos bidimensionais de acenaftileno na Figura 4.11, pode-se dizer que ocorreu saturação nas duas colunas capilares, porque nas duas dimensões o sinal é mais intenso na parte anterior dos picos do que na posterior. Neste caso, a falta de repetibilidade dos 2t_R observada para o acenaftileno pode ser explicada pela saturação das colunas capilares.

A mesma explicação não justifica, porém, a falta de repetibilidade dos 2t_R do n-hexadecano, cuja concentração é cerca de dez vezes inferior àquela do acenaftileno. Os fatores de assimetria dos picos de n-C16 são próximos à unidade (mín. 1,0; máx. 1,2), portanto, são considerados picos simétricos e não sugerem a ocorrência de saturação da coluna. Do mesmo modo, como a concentração do indeno-pireno é cerca de vinte vezes inferior à concentração de Acn, seria improvável atribuir as variações nos 2t_R do InP à saturação da coluna.

Por outro lado, os picos modulados de n-C16 e InP nos três cromatogramas brutos da solução HPA/NHPA/n-alceno (Figura 4.12) apresentam diferenças nos 1t_R dos picos mais intensos (ápices) no cromatograma (I) em relação aos outros dois cromatogramas (I' e I''). Essas diferenças são exatamente iguais a um período de modulação, neste caso 5s. Conforme mencionado no item 4.1, a temperatura de eluição (T_e) de um pico da coluna 1D (em programação de temperatura) é a temperatura da corrida na coluna 2D (praticamente em isoterma) mantida no mesmo forno. Uma pequena variação na T_e causará então uma alteração na retenção da coluna 2D (de eluição rápida) e conseqüentemente uma alteração no 2t_R .

Na Figura 4.12 pode-se observar também uma variação na fase de modulação no cromatograma I' em relação aos outros dois cromatogramas. As causas para essa observação podem ter sido uma pequena variação nas condições cromatográficas (ex: vazão do gás de arraste e/ou temperatura do forno) e/ou uma falha no controle automático dos períodos de modulação. As diferenças de 1t_R e das fases da modulação nos três cromatogramas podem explicar a variabilidade encontrada nos 2t_R do n-C16.

Figura 4.12 - Picos modulados de n-C16 (esquerda) e InP (direita) nas injeções em triplicata (I, I' e I'') da solução HPA/NHPA/n-alcano. As escalas no eixo x (t_R) e eixo y (intensidade de sinal) são as mesmas para cada analito. As setas vermelhas em I'' (InP) indicam picos alargados distanciados de um período de modulação (5 s).

No caso do InP, duas observações no cromatograma I'' da Figura 4.12 chamam a atenção: a) a presença de dois picos adicionais, alargados e separados entre si por cinco segundos, que corresponde a um período de modulação (assinalados pelas setas vermelhas) e b) a diminuição da intensidade dos picos de InP em relação aos outros dois cromatogramas. O mesmo cromatograma visualizado em duas dimensões (Figura 4.13) revela a ocorrência de sinais sob os picos de alguns dos componentes da solução

HPA/NHPA/n-alceno. Ampliando a região de eluição desses picos, desde o pico de benzo(a)antraceno até benzo(g)pireno [Figura 4.13 (b)], fica evidente que os sinais são duplicações dos picos dos padrões. Essa observação pode ser explicada pelo fenômeno chamado de *solute breakthrough* que, segundo Pedroso (2009b, p. 23) ocorre quando parte dos analitos passa pelo modulador sem ser aprisionada. Como o modulador empregado é criogênico, o *solute breakthrough* indica que a temperatura de modulação não é baixa o suficiente para reter completamente todas as moléculas do analito durante o período de modulação. Esse fenômeno ocorre principalmente para compostos muito voláteis ou presentes em concentrações altas. Porém, os HPAs e nitro-HPAs na região ampliada não são voláteis (pontos de ebulição de 438 a 536°C) e suas massas injetadas foram apenas cerca de 2,5 ng cada.

Outro fenômeno que pode provocar alterações nos picos modulados por modulador resfriado por dióxido de carbono líquido é uma eventual ineficiência do ar circulante no forno aquecido em remobilizar rapidamente as bandas cromatográficas. Este fenômeno ocorre principalmente para os compostos pouco voláteis. Se isso ocorrer, as bandas cromatográficas são introduzidas gradualmente na coluna ²D, gerando picos alargados.

Qualquer que tenha sido o fenômeno ocorrido, as alterações da área e do formato dos picos modulados do indeno-pireno observadas na Figura 4.12 (I'') podem explicar as variações observadas nos ²t_R desse composto.

Figura 4.13 - Cromatograma GCxGC da solução HPA/NHPA/n-alceno: (a) cromatograma completo; (b) região ampliada com elipse vermelha desenhada sobre os picos duplicados.

4.2.3.2. Repetibilidade de 2t_R de componentes das soluções de nitro-HPAs

A solução de nitro-HPAs (1) apresentou os valores mais altos de DPR dos 2t_R entre as quatro soluções avaliadas (Tabela 4.6), entretanto seus componentes têm concentrações oito vezes inferiores do que na solução (5) que apresentou DPR menores. Portanto, o efeito de saturação das colunas não é a causa para as variações de 2t_R observadas. Por outro lado, o exame dos cromatogramas brutos da solução (1) revelou a ocorrência de picos distorcidos. Na Figura 4.14 estão apresentados segmentos desses cromatogramas com setas e círculos vermelhos que sinalizam caudas nos picos modulados dos três componentes da solução que apresentaram os valores mais altos de DPR: 2-NFlu, 9-NAnt e BaA. Também nesse caso a distorção do formato dos picos pode explicar as variações dos 2t_R .

Figura 4.14 - Picos modulados de 2-NFlu, 9-NAnt e BaA (PI) na triplicata (I, I', I'') da solução de NHPAs (1). Setas e círculos vermelhos indicam *breakthrough* dos padrões.

4.2.4. Repetibilidade de área

Depois da aquisição dos dados de um cromatograma, o programa Hyperchrom executa as seguintes operações: a) integração convencional da área de todos os picos; b) reconhecimento dos picos modulados que pertencem à mesma substância; c) somatória das áreas desses picos que resulta na área total correspondente a cada substância.

A repetibilidade das áreas totais dos componentes das soluções HPA/NHPA/n-alcano e 13-NHPA foi avaliada nos mesmos cromatogramas em que a repetibilidade dos tempos de retenção foi avaliada (Figuras 4.8 a 4.14). As áreas e desvios padrão relativos obtidos na triplicata da solução HPA/NHPA/n-alcano estão apresentados na Figura 4.15, em que duas escalas com diferença de uma ordem de grandeza foram usadas para as áreas, por causa da diferença de concentração do naftaleno, acenaftileno e acenafteno em relação aos demais componentes da solução (Tabela 3.1). Os DPR das médias das áreas dos componentes mais voláteis, desde o naftaleno até o 9-nitroantraceno, foram iguais ou inferiores a 10%, enquanto que para os menos voláteis, desde o benzo(a)antraceno até o benzo(ghi)perileno, os DPR variaram de 13,9 a 53,3%, com exceção do benzo(b)fluoranteno que apresentou DPR igual a 8,6%. Se essas análises tivessem sido feitas com injetor SSL aquecido, a variabilidade das áreas dos componentes menos voláteis poderia ser atribuída a uma possível discriminação na agulha da microseringa no momento da injeção. Porém, esse efeito não é esperado com o injetor PTV empregado.

Figura 4.15 - Áreas e Desvios Padrão Relativos (%) dos picos dos componentes da solução HPA/NHPA/n-alcano. I, I' e I'' são as mesmas injeções em triplicata da Figura 4.10.

Na Figura 4.15 pode-se observar que a partir do naftaleno até o fluoranteno as áreas no terceiro cromatograma da triplicata (I'') foram ligeiramente superiores às áreas em I e I', que por sua vez foram muito próximas entre si. Essa tendência porém não foi mantida até o final do cromatograma, uma vez que a partir de 2-NFlu/Pir as áreas de I foram sempre maiores. O cromatograma I'' da Figura 4.15 é o mesmo que está apresentado na Figura 4.13, onde é possível constatar a ocorrência de divisões dos picos a partir do benzo(a)antraceno até o último componente. A ocorrência dessas divisões no final do cromatograma I'' pode explicar a diminuição das áreas nesse cromatograma, mas não no cromatograma I' que não apresentou divisões dos picos na Figura 4.12 para n-C16 e InP (cromatograma I' completo não apresentado).

Uma nova triplicata da solução HPA/NHPA/n-alceno foi feita nas mesmas condições cromatográficas, porém sem modulação. A média dos DPR das médias das áreas dos picos não modulados foi igual a 2,1% (mín. 1,6 e máx. 3,2%) e as áreas chegaram a ser o dobro das áreas dos picos modulados que apresentaram divisões. Esses resultados indicam estar na modulação a causa da falta de repetibilidade de área e a diminuição das áreas no cromatograma I'' (Figura 4.15).

Divisões dos picos também foram observadas nos três cromatogramas da solução 13-NHPA na Figura 4.16. Essa triplicata apresentou valores de DPR das áreas entre 2,2 e 44,6%, por outro lado, esses cromatogramas são os mesmos que na Tabela 4.6 apresentaram os menores valores de DPR dos 2t_R . Portanto, para essa solução de nitro-HPAs a divisão dos picos pode ter sido a causa da falta de repetibilidade das áreas, indicada pelos valores altos dos seus DPR, porém ela não afetou a boa repetibilidade dos 2t_R .

Em vista da ocorrência frequente da divisão dos picos nos cromatogramas GCxGC, o sistema de modulação empregado foi avaliado quanto ao seu desempenho.

4.2.5. Avaliação do desempenho do modulador

4.2.5.1. Análise de n-alcenos

Segundo o fabricante do cromatógrafo, a funcionalidade do sistema GCxGC deve ser avaliada nas condições experimentais descritas em um documento intitulado Procedimento Padrão de Operação (PPO) (item 3.6), o qual prevê a análise da solução de n-alcenos (item 3.3.1) nas condições cromatográficas da Tabela 3.9. Esse documento apresenta um critério qualitativo de avaliação segundo o qual o funcionamento do sistema GCxGC é considerado adequado e aceitável quando são obtidos picos modulados semelhantes, quanto ao número e aspecto, aos picos da Figura 4.17-(a).

Para avaliar o desempenho do modulador, a solução de n-alcenos foi analisada conforme o PPO e os picos obtidos estão apresentados na Figura 4.17-(b), na qual

pode-se observar um alargamento acentuado da base dos picos, indicados pelas setas vermelhas. Essa análise foi repetida inúmeras vezes e o aspecto dos cromatogramas obtidos variou desde semelhante ao apresentado no PPO até muito diferente (esses cromatogramas não são apresentados).

Figura 4.17 – Segmentos de cromatogramas brutos de n-alcenos: (a) picos modulados extraídos do PPO; o número de picos e seu aspecto são considerados o critério de aceitação do bom desempenho da instrumentação; (b) picos obtidos em uma análise da solução de n-alcenos; as setas sinalizam as caudas que indicam mau desempenho.

Sabe-se que a eficiência da modulação criogênica em reter e remobilizar os compostos está relacionada diretamente à temperatura de resfriamento da zona de modulação: quanto mais alta, mais difícil será reter os compostos mais voláteis, e quanto mais baixa, mais difícil será remobilizar os compostos menos voláteis (BEGNAUD *et al.*, 2009). O modulador *Dual Jet* em uso não permite, porém, o controle nem o monitoramento da temperatura de modulação. A orientação do fabricante ao usuário é que seja garantido o maior fluxo possível de CO₂ líquido na saída dos *jets* para assegurar um resfriamento eficiente da coluna. Para que isso ocorra é importante evitar perda de carga entre o cilindro e os *jets*, instalando o cilindro o mais próximo possível do cromatógrafo e assegurando a inexistência de vazamentos e entupimentos no trajeto do CO₂ líquido. Essa orientação foi sempre observada, com a instalação do cilindro atrás da bancada do cromatógrafo e a verificação frequente da existência de vazamentos e entupimentos.

Apesar dos cuidados em garantir o maior fluxo possível de CO₂ nos *jets* e um resfriamento eficiente da coluna, foi observada a ocorrência intermitente de alargamento da base dos picos de n-alcenos. Como o sistema não atendeu ao critério apresentado no PPO para aprovação da sua funcionalidade, foram executadas as seguintes alterações no cromatógrafo:

- a) Substituição das duas válvulas solenóide por válvulas novas iguais e do mesmo fabricante;
- b) Limpeza da tubulação de CO₂ líquido, com solventes orgânicos;
- c) Limpeza dos *jets* com solventes orgânicos e passagem do filamento metálico em todos os orifícios capilares, como na Figura 3.6;
- d) Isolamento térmico da tubulação de CO₂ líquido que passa sob o forno de colunas.

Os itens (a) a (c) foram executados porque nas superfícies internas desses materiais foi constatada a presença de resíduo preto provavelmente oriundo dos cilindros de CO₂. O item (d) foi uma tentativa de diminuir a provável transferência de calor do forno para a tubulação que contém o CO₂ líquido.

Após as modificações realizadas no cromatógrafo e no seu sistema modulador, a solução de n-alcenos foi analisada em replicatas e foram obtidos cromatogramas de acordo com o esperado no PPO (Figura 4.18).

Figura 4.18 – Picos modulados da solução n-alcanos analisada segundo o PPO, após as alterações feitas no sistema GCxGC.

O desempenho do modulador foi considerado aceitável e as análises das soluções de padrões de nitro-HPAs foram retomadas.

4.2.5.2. Análise de nitro-HPAs

As soluções que contém seis nitro-HPAs e o padrão interno benzo(a)antraceno, preparadas para a construção de curvas analíticas [soluções (1) a (5) do item 3.3.6], foram analisadas em replicatas. Para cada componente dessas soluções foram calculadas as médias das áreas e os respectivos desvios padrão relativos.

Na triplicata da Solução (1) foram encontrados valores de DPR entre 36,1 e 54,2% que indicaram falta de repetibilidade de área (Figura 4.19-a). Nos dois últimos cromatogramas da triplicata (não apresentados) foi observada divisão dos picos dos componentes da solução, o que deve ter provocado a variação nas áreas medidas. Uma possível causa para a divisão observada poderia ter sido um resfriamento ineficiente no modulador pelo fato da carga útil no cilindro de CO₂ estar no final (carga consumida por 5h:40min de análises). O cilindro foi substituído por outro com carga completa, porém uma nova análise da Solução (1) apresentou novamente divisão dos picos. A tela filtrante (*screen*) de CO₂ foi inspecionada e nela foi encontrada grande quantidade de resíduo sólido. Após a troca do *screen* uma nova triplicata da Solução (1) foi feita e os DPR calculados variaram de 29,3 a 43,2% indicando novamente uma falta de repetibilidade de área (Figura 4.19-b). Porém, entre os seis cromatogramas realizados nessas duas triplicatas foi possível identificar três cromatogramas com valores de área próximos, que resultaram em DPR entre 6,9 e 24,2%. Um desses cromatogramas pertence à primeira triplicata e os outros dois pertencem à segunda (Figura 4.19-c). As médias das áreas nesses três cromatogramas foram empregadas na construção das curvas analíticas.

Figura 4.19 - Áreas dos picos na Solução de Calibração (1) (I = injeção).

- (a) primeira triplicada da Solução (1);
- (b) segunda triplicada da Solução (1);
- (c) áreas escolhidas de (a) e (b) para a construção das curvas analíticas.

Com a Solução (2) também foi observada falta de repetibilidade de área na primeira triplicata, porque os valores de DPR variaram entre 59 e 84%. Como os cromatogramas apresentaram divisão dos picos, o cilindro de CO₂ que já havia sido consumido por mais de 4h foi substituído. O cromatograma obtido na sequência ainda apresentou divisão dos picos o que motivou a inspeção do sistema em busca de vazamento e/ou entupimento, mas nenhuma irregularidade foi encontrada. Mais um cromatograma da Solução (2) foi obtido e como a divisão dos picos persistia, os dois *jets* de CO₂ foram desconectados e submetidos a uma limpeza exaustiva de seus capilares pela passagem de solventes e do filamento metálico como na Figura 3.6. Em seguida, uma nova triplicata da Solução (2) foi obtida na qual a repetibilidade das áreas foi melhor, apresentando valores de DPR entre 4,4 e 15,7%. Uma situação semelhante ocorreu com a Solução (3) que na primeira triplicata apresentou valores de DPR variando entre 52 e 72%. Após a substituição do cilindro de CO₂, que já havia sido usado por cerca de 4h:30min, uma nova triplicata resultou em boa repetibilidade de área, com valores de DPR entre 1,5 e 4,6%. As médias das áreas na segunda triplicata das Soluções (2) e (3) foram empregadas na construção das curvas analíticas.

Na triplicata da Solução (4) foram obtidos valores de DPR variando entre 35 e 41% que indicam novamente falta de repetibilidade das áreas. Porém, os três cromatogramas GCxGC não apresentaram divisão dos picos que pudesse justificar essa observação (Figura 4.20). Outra causa para a variação das áreas poderia ter sido a perda de massa na etapa de introdução da amostra na coluna ou através da conexão entre as duas colunas. Para avaliar essas possibilidades, o septo foi inspecionado e todas as conexões dentro do forno foram verificadas, mas nenhum ponto de vazamento foi localizado. Sabe-se que a conexão entre as colunas feita pela aderência da poliimida dos capilares a um conector de vidro está sujeita a vazamentos sob temperaturas altas, por isso a função “teste de vazamento” do cromatógrafo foi acionada com o forno em temperatura constante de 200°C e pressão do gás de arraste igual a 241 kPa. Mesmo nessa condição o teste indicou ausência de vazamento. Como não foi identificada uma possível causa para a falta de repetibilidade, as médias das áreas da triplicata da Solução (4) foram empregadas somente na construção das curvas analíticas pelo método de calibração interna.

Figura 4.20 – Segmentos de mesmas dimensões de três cromatogramas GCxGC da Solução (4) de NHPAs e gráfico das áreas de cada componente dessa solução: (1): 2-NFlu; (2): 9-NAnt; (3): BaAnt (PI); (4): 3-NFlt; (5): 1-NPir; (6): 7-NBaAnt; (7): 6-NCri; (I: injeção).

Na sequência, a Solução (5) foi analisada em triplicata e os valores de DPR variaram entre 0,49 e 4,7%, indicando uma repetibilidade das áreas muito boa.

A repetição das análises das soluções de nitro-HPAs e as intervenções na instrumentação que se mostraram necessárias durante a sequência de análises descrita exemplificam a complexidade operacional encontrada neste trabalho e o longo tempo consumido para a obtenção de resultados satisfatórios.

Sabe-se que os fatores que contribuem para a dispersão dos valores de área dos picos cromatográficos em replicatas são erros na introdução da amostra no injetor, discriminação ou degradação dos componentes da amostra na transferência para a coluna, interações que resultem em picos assimétricos e, especificamente na GCxGC, vazamento na conexão entre as colunas e modulação ineficiente. Apesar dos cuidados tomados para minimizar os efeitos desses fatores, todos eles podem ter contribuído, de

modo combinado ou não, para a flutuação das áreas nos cromatogramas das soluções analisadas.

4.3. Parâmetros de validação do método

A validação de um método analítico requer um grande número de análises para que a qualidade das estimativas das figuras de mérito não seja afetada. Apesar do número limitado de replicatas feitas neste trabalho, por causa do longo tempo das análises e do grande consumo de gás carbônico, algumas figuras de mérito foram estimadas com base na revisão de Ribani *et al.* (2004) e no livro de Lanças (2004).

4.3.1. Linearidade

A linearidade foi determinada por intermédio das curvas de calibração construídas com os valores de área plotados em função das concentrações dos seis nitro-HPAs: 2-NFlu, 9-NAnt, 3-NFlt, 1-NPir, 7-NB(a)Ant, 6-NCri. O tratamento matemático aplicado foi o método de regressão linear que fornece o coeficiente de correlação (r), o qual permite uma estimativa da linearidade (RIBANI *et al.*, 2004). As médias das áreas determinadas nas análises das soluções de nitro-HPAs (item 4.2.5.2) foram empregadas sem tratamentos estatísticos de rejeição de valores, e segundo dois métodos de padronização, interna e externa.

As curvas analíticas da padronização interna foram construídas com cinco pontos e os valores de r^2 (calculados pelo programa Microsoft Office Excel[®], 2007) foram iguais a 0,99 (Figura 4.21). Os gráficos dos resíduos da regressão linear aplicada distribuem-se aleatoriamente em torno da média zero, indicando que o modelo linear é adequado (Figura 4.22).

Figura 4.21 - Curvas analíticas obtidas pelo método da padronização interna.

Figura 4.22 - Gráficos dos resíduos das regressões lineares das curvas analíticas na Figura 4.21.

Para as curvas da padronização externa apenas quatro pontos puderam ser empregados por causa da falta de repetibilidade de área apresentada no item 4.2.5.2 para a Solução (4) de NHPAs. Apenas o 2-nitrofluoreno apresentou r^2 igual a 0,99, enquanto que os demais nitro-HPAs apresentaram r^2 iguais a 0,98.

Figura 4.23 - Curvas analíticas obtidas pelo método da padronização externa.

Esses resultados indicam que o emprego de um padrão interno diminuiu o efeito da dispersão dos valores de área e que, como é sabido, o método da padronização interna é preferível em relação ao método da padronização externa para uma quantificação de maior precisão e exatidão. O padrão interno empregado [benzo(a)antraceno], porém, não é adequado para a análise de extratos de MPA por ser um HPA comumente encontrado na atmosfera. O composto 4-nitro-p-terfenil tem sido

empregado como padrão interno na determinação de nitro-HPAs por ser uma substância ausente no MPA e por apresentar propriedades químicas e físicas similares aos compostos-alvo (JINHUI; LEE, 2000; TSAKAS; SITARAS; SISKOS, 2010). Cabe ressaltar que os trabalhos relatados na literatura científica adotaram o 4-nitro-p-terfenil quando a instrumentação empregada foi um cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons (GC-ECD). Quando o cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas como detector, foram empregados HPAs deuterados como padrões internos (CRIMMINS; BAKER, 2006). O 4-nitro-p-terfenil seria um padrão interno adequado para a técnica GCxGC-FID, porém não estava disponível no laboratório.

4.3.2. Precisão instrumental

Segundo Ribani *et al.*, a precisão pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV), calculado através da equação: $\text{DPR (\%)} \text{ ou } \text{CV (\%)} = \text{desvio padrão} / \text{média} \times 100$.

A precisão instrumental, a qual é medida por injeções repetitivas e sequenciais da mesma amostra, seguidas pela determinação da estimativa do DPR de todas as injeções, foi avaliada e discutida no item 4.2.3 para valores de tempo de retenção e no item 4.2.5 para as áreas dos picos de soluções de padrões.

4.3.3. Exatidão

4.3.3.1. Análise de material de referência

Segundo Ribani *et al.* (2004), um dos processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método é fazer a análise de materiais de referência e comparar os valores obtidos com os valores certificados.

Uma solução de nitro-HPAs preparada a partir do material de referência SRM 1587 NIST (item 3.1.2.2) foi analisada em triplicata nas condições cromatográficas empregadas nas análises para construção das curvas analíticas (Tabela 3.8). As áreas obtidas e os desvios padrão relativos calculados estão apresentados na Figura 4.24(a), na qual se observa uma diminuição das áreas do primeiro para o terceiro cromatograma. Nos respectivos cromatogramas não foram visíveis as duplicações dos

picos nem foram identificados vazamentos de gás de arraste que pudessem justificar a falta de repetibilidade de área observada. Uma nova triplicata foi feita nas mesmas condições cromatográficas, porém sem modulação, para avaliar se o volume da alíquota tomada pelo amostrador automático poderia estar afetado por um erro causado pela alta volatilidade dos solventes [metanol e diclorometano (1:1)]. As áreas e os desvios padrão relativos da triplicata sem modulação estão apresentados na Figura 4.24(b), ao lado das áreas encontradas no primeiro cromatograma da triplicata feita com modulação. As áreas sem modulação foram próximas às áreas do primeiro cromatograma com modulação, e apresentaram valores de DPR baixos (2,6 a 11,7%), ou seja, a repetibilidade foi boa. Esses resultados indicam que a suspeita de erro de amostragem não se confirmou como provável causa para a falta de repetibilidade de área na triplicata com modulação. Por outro lado, ao término das análises em triplicata com modulação o cilindro de gás carbônico havia sido consumido por 4h:40min, isto é, sua carga útil estava no final e, apesar de não ter sido visível uma divisão significativa dos picos nos cromatogramas, pode ter ocorrido um resfriamento ineficiente no modulador. Essa possibilidade não foi verificada, isto é, não foram feitas novas análises da mesma solução após substituição do cilindro de CO₂.

Figura 4.24 – Áreas de nitro-HPAs e Desvios Padrão Relativos das médias: (a) Injeções em triplicata da solução preparada a partir do SRM 1587 NIST, com modulação; (b) áreas do cromatograma GCxGC 'I' e de uma triplicata da mesma solução, sem modulação.

As áreas apresentadas na Figura 4.24(a) foram empregadas no cálculo das concentrações de nitro-HPAs pelo método de padronização interna e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.25 ao lado das concentrações certificadas pelo NIST. Levando em conta os desvios padrão da média dos resultados, apresentados como barras sobre as colunas, as concentrações calculadas foram próximas das certificadas, exceto para o 2-nitrofluoreno e o 7-nitro-benzo(a)antraceno.

Figura 4.25 – Concentrações (ng/mL) da solução preparada a partir do SRM 1587 NIST calculadas pelo método de padronização interna (vermelho); certificadas (preto).

As observações feitas neste item comprovam a maior adequação do método de padronização interna para a melhoria da exatidão na quantificação de nitro-HPAs por GCxGC com a instrumentação em uso.

4.3.3.2. Análise de padrões

A solução de n-alcenos (item 3.3.1) foi analisada em duas configurações diferentes quanto às colunas capilares:

- a) Com apenas uma coluna conectada entre o injetor e o detector, isto é, por 1D-GC.

b) Com duas colunas conectadas entre si por um conector universal de vidro Press-Tight™, isto é, um conjunto de colunas para GCxGC, porém sem modulação (modulador desativado).

As condições cromatográficas foram as mesmas nas duas situações e estão apresentadas na Tabela 3.9, excluindo o parâmetro de modulação. Os resultados estão apresentados na Figura 4.26, na qual fica evidente que, apesar da boa repetibilidade das áreas, seus valores absolutos nas duas situações foram muito diferentes. As áreas obtidas com apenas uma coluna cromatográfica foram cerca de seis vezes superiores às áreas obtidas com as duas colunas conectadas por um Press-Tight™ de vidro.

Figura 4.26 – Áreas e Desvios Padrão Relativos das áreas dos três componentes da solução de n-alcenos analisada por 1D-GC (preto) e com duas colunas conectadas por um conector universal de vidro Press-Tight™ (vermelho).

Como nesse teste a única diferença foi a configuração das colunas, a diminuição das áreas nas análises com duas colunas conectadas pode ser atribuída a perdas de massa na conexão. Deve também ser destacado que esse teste foi realizado após a verificação da ausência de vazamento de gás de arraste, feita automaticamente pelo cromatógrafo mantido em 50°C, e também manualmente com o forno aberto em

temperatura ambiente. Isso indica que a não detecção de vazamento de gás de arraste em temperaturas próximas à ambiente não garante a ausência de vazamento durante uma análise com programação de temperatura.

Um conector metálico SilTite™ μ -Union [Figura 3.7(b)] foi empregado em substituição ao conector de vidro Press-Tight™. Uma solução de n-alcenos foi analisada nas condições cromatográficas da Tabela 3.9 e as áreas obtidas estão apresentadas na Figura 4.27 ao lado de áreas obtidas com o conector de vidro. As áreas obtidas com a microunião metálica foram cerca de 50% maiores do que as obtidas com o conector de vidro. Esse aumento de área é pequeno se comparado à diferença entre as áreas na Figura 4.26 e talvez indique que ocorreu perda de analitos também com a microunião. Testes adicionais devem ser feitos para avaliar a eficiência da microunião metálica em evitar vazamento de gás de arraste na conexão entre as duas colunas da GCxGC.

Figura 4.27 – Áreas de n-alcenos obtidas por GCxGC com dois conectores diferentes entre as colunas: (a) e (b) conector de vidro Press-Tight™; (c) conector metálico SilTite™ μ -Union.

Perdas de massa de analito, como as observadas nos testes descritos neste item, podem levar a resultados não confiáveis, principalmente tratando-se de análises de

quantidades muito pequenas de compostos-alvo, como geralmente são as análises de matrizes ambientais. Uma conexão de colunas mais efetiva pode ser alcançada pela fusão do final da coluna ¹D ao início da coluna ²D. Essa solução está disponível comercialmente e é feita com o emprego de um conector de vidro desativado, que é fundido às colunas através de aquecimento e pressão de ar (<www.nlisis.com>).

4.3.4. Limites de detecção e quantificação

Segundo Ribani *et al.* (2004, p.777), o limite de detecção (LD) de um procedimento analítico corresponde à menor concentração de um analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e o limite de quantificação (LQ) corresponde à menor concentração de um analito que pode ser medida. Ambos podem ser calculados de três maneiras diferentes: visualmente, através da relação sinal-ruído e/ou dos parâmetros da curva analítica. Os dados de LD e LQ de nitro-HPAs determinados por GC e divulgados na literatura científica são calculados com mais frequência através da relação sinal-ruído, que foi o método de cálculo adotado também neste trabalho.

Em um cromatograma GCxGC de branco da coluna, a amplitude do sinal (mVolt) foi medida nas regiões de eluição de seis nitro-HPAs: 2-NFlu, 9-NAnt, 3-NFlt, 1-NPir, 7-NBaAnt, 6-NCri (os mesmos contidos nas soluções usadas na construção das curvas analíticas). Considerando essas medidas como ruído, os respectivos LDs foram calculados como sendo a concentração que gera um sinal três vezes maior do que o ruído e os LQs como a concentração que gera um sinal dez vezes maior do que o ruído. Os valores de LD e LQ determinados neste trabalho estão apresentados na Tabela 4.8, na qual estão apresentados também valores de LD e LQ localizados na literatura científica sobre a determinação de nitro-HPAs por GC.

Tabela 4.8 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) de nitro-HPAs determinados neste trabalho e apresentados na literatura científica.

LD	Sistema	Referência
200 a 500 ng/mL	GCxGC-FID	Neste trabalho
200 a 500 ng/mL	GC-NPD	ZIELINSKA; SAMY, 2006
0,1 - 0,8 ng/mL	GC-MS (NICI) (SIM)	DI FILIPPO <i>et al.</i> , 2010
5 a 100 ng/mL	GC-MS (EI) (SIM)	PORTET-KOLTALO <i>et al.</i> , 2009
LQ		
650 a 1600 ng/mL	GCxGC-FID	Neste trabalho
12 a 50 ng/g	GC-MS (EI) (SIM)	OUKEBDANE <i>et al.</i> , 2010
0,12 a 0,24 pg	GC-MS (NICI) (SIM)	ALBINET, <i>et al.</i> , 2006

GC-MS: cromatografia em fase gasosa - espectrometria de massas; NICI: ionização química de íon negativo; EI: ionização eletrônica; SIM: monitoramento de íon selecionado.

A faixa de valores de LD: 200 a 500 ng/mL, determinada neste trabalho, é coincidente com a faixa divulgada por Zielinska e Samy (2006), que analisaram nitro-HPAs por cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio e fósforo. Os valores menores de LD foram encontrados para nitro-HPAs analisados por GC-MS com ionização química negativa e modo de monitoramento de íon selecionado (Tabela 4.8). Segundo Cochran *et al.* (2012) a ionização química de íon negativo apresenta sensibilidade para nitro-PAHs duas vezes superior à ionização por impacto de elétron. Os valores de LQ também foram menores quando nitro-HPAs foram determinados por GC-MS com ionização eletrônica ou ionização química negativa e modo de monitoramento de íon selecionado.

4.4. Análise de extratos orgânicos provenientes de MPA

A aplicação da GCxGC na análise do extrato orgânico de MPA tem como objetivo explorar a grande capacidade de separação dessa técnica, para alcançar o benefício da redução ou até da eliminação da etapa de pré-tratamento da amostra.

A separação entre os interferentes da matriz e os compostos-alvo, que a GCxGC possibilita, poderia tornar desnecessária a etapa de *clean up* da amostra. A característica da GCxGC de gerar cromatogramas estruturados por classes de

compostos, poderia eliminar o pré-fracionamento do extrato orgânico por cromatografia líquida preparativa.

Tendo em vista essa potencialidade da técnica GCxGC, as condições cromatográficas investigadas foram aplicadas na análise de extratos orgânicos não fracionados. Os resultados obtidos estão descritos a seguir.

4.4.1. Extrato de material particulado emitido diretamente da queima de palha de cana-de-açúcar [Extrato queima (1)]

O extrato orgânico combinado de três amostras de MPA coletadas conforme descrito no item 3.9.1 foi submetido à análise por GCxGC, sem fracionamento prévio, nas condições cromatográficas da Tabela 3.7 (condições adotadas para as análises da solução HPA/NHPA/n-alcano).

O cromatograma GCxGC obtido está apresentado na Figura 4.28, na qual foram sobrepostas as janelas de identificação definidas na análise da solução HPA/NHPA/n-alcano. Nesse cromatograma, foram observados sinais cromatográficos dentro das janelas dos n-alcenos n-C14 e n-C16, e de alguns HPAs (Naf, Acn, Fen, Flt, BaA, Cri, BkF e BaP), porém, apenas Acn e Fen, além dos n-alcenos, tiveram sua identificação confirmada através da adição da solução HPA/NHPA/n-alceno (técnica de *spiking*).

Na Figura 4.29, as regiões de eluição do Acn e Fen no cromatograma do Extrato queima (1) e no cromatograma após o *spiking* estão ampliadas em escalas iguais. Ao lado da janela do Acn (5) foi mantida a janela do Ace (6) como referência. Comparando as seções (a) e (b) da Figura 4.29 pode-se observar a provável presença de Acn no Extrato queima (1). O mesmo tipo de comparação pode ser feito entre as seções (c) e (d) para o Fen (8) e Ant (9).

Os n-alcenos e os HPAs detectados não foram quantificados. Não foram detectados sinais para os nitro-HPAs incluídos na solução HPA/NHPA/n-alceno (2-NFlu, 9-NAnt, 3-NFlt, 1-NPir, 7-NBaAnt e 6-NCri).

Figura 4.28 - Cromatograma GCxGC do extrato combinado e não fracionado de material particulado emitido diretamente da queima de palha de cana-de-açúcar; os retângulos vermelhos são as janelas de identificação dos componentes da solução HPA/NHPA/n-alcano e são numerados apenas aqueles que incluem sinais visíveis de n-C14 (2), n-C16 (3), Naf (4), Acn (5), Fen (8), Flt (10), BaA (13), Cri (14), BkF (18) e BaP (20).

Figura 4.29 - Regiões ampliadas de cromatogramas GCxGC do Extrato queima (1): (a) pico 2D do Acn (5) e janela (6) mantida como referência; (b) com *spiking*: Acn (5) e Ace (6); (c) pico 2D do Fen (8) e janela (9) como referência; (d) com *spiking*: Fen (8) e Ant (9).

4.4.2. Extrato de material particulado atmosférico coletado em área afetada pela queima de cana-de-açúcar

O extrato orgânico proveniente de uma amostra de MPA coletada conforme descrito no item 3.9.2 foi analisado nas condições cromatográficas da Tabela 3.7, sem fracionamento prévio. O cromatograma GCxGC obtido está apresentado na Figura 4.30, na qual as janelas de identificação definidas na análise da solução HPA/NHPA foram sobrepostas. Nesse cromatograma foram observados sinais cromatográficos dentro das janelas de identificação dos HPAs: Naf, Fen, Ant, Flt, BaA, Cri, BbF, BkF, BaP, InP e BgP, e de um nitro-HPA: 7-NBaAnt, porém não foi feita adição de padrão para confirmação desses sinais.

Figura 4.30 - Cromatograma GCxGC do extrato de material particulado atmosférico coletado em área afetada pela queima de cana-de-açúcar. Os retângulos vermelhos são as janelas de identificação dos componentes da solução HPA/NHPA e estão numerados apenas aqueles que incluem sinais visíveis de Naf (4), Fen (8), Ant (9) Flt (10), BaA (13), Cri (14), BbF (17), BkF (18), 7-NBaAnt (19), BaP (20), InP (22) e BgP (24).

4.4.3. Extratos de material particulado atmosférico urbano

Os extratos de duas amostras de MPA coletadas conforme descrito no item 3.9.3 foram analisados nas condições cromatográficas da Tabela 3.8, que foram as condições adotadas nas análises das soluções de padrões de nitro-HPAs para a construção das curvas analíticas. Esses extratos foram analisados nessas condições para permitir a quantificação de nitro-HPAs através do método de padronização externa.

Os cromatogramas GCxGC obtidos estão apresentados na Figura 4.31, na qual foram sobrepostas as janelas de identificação definidas na análise das soluções de padrões de nitro-HPAs. Os cromatogramas da Figura 4.31(a) e (b) correspondem ao Extrato Urbano (1) e a esse mesmo extrato após a adição (*spiking*) de uma solução de padrões de nitro-HPAs, respectivamente. O cromatograma da Figura 4.31(c) corresponde ao Extrato Urbano (2). Os nitro-HPAs alvo: 2-NFlu, 9-NAnt, 3-NFlt, 1-NPir, 7-NBaAnt e 6-NCri foram detectados nos cromatogramas dos dois extratos e confirmados por *spiking*. As áreas medidas foram quantificadas através das curvas analíticas construídas pelo método de padronização externa (Figura 4.23), com exceção do 2-NFlu que coeluiu com pireno nas condições cromatográficas adotadas (item 4.2.2). As concentrações determinadas foram superiores aos limites de detecção, porém, inferiores aos limites de quantificação.

Figura 4.31 - Cromatogramas GCxGC de extratos de MPA urbano com janelas de identificação de seis NHPAs e um HPA: (a) extrato urbano (1); (b) extrato urbano (1) com adição de padrões de nitro-HPAs; (c) extrato urbano (2).

Observando a distribuição dos picos nos planos de separação nas Figuras 4.28, 4.30 e 4.31, podem-se constatar diferenças que provavelmente estão relacionadas aos tipos diferentes de extratos analisados. No cromatograma do extrato do material particulado coletado diretamente da queima de palha de cana (Figura 4.28), observa-se um número maior de picos, que sugerem uma composição mais complexa do extrato. O cromatograma da Figura 4.30, referente ao extrato oriundo de MPA de área impactada pela queima de cana, é o mais “limpo” dos três, e o cromatograma da Figura 4.31, relativo ao extrato de MPA da cidade de São Paulo, apresenta o perfil típico de amostras petroquímicas por causa das emissões veiculares.

O efeito da matriz na separação de HPAs por GCxGC foi investigada por Kallio *et al.* (2003), que avaliaram a largura e assimetria de pico, a resolução, os tempos de retenção e as áreas dos picos dos compostos-alvo, em função do aumento da quantidade de interferentes da matriz no extrato orgânico de MPA não fracionado. Foi observada uma diminuição na repetibilidade dos tempos de retenção e das áreas, com o aumento da quantidade de interferentes da matriz. Além disso, os autores observaram que na análise quantitativa dos extratos orgânicos não fracionados as concentrações baixas de HPAs foram subestimadas.

Investigações adicionais sobre a possibilidade de um método de análise por GCxGC eliminar a etapa de pré-tratamento de extratos orgânicos de MPA devem ser feitas em trabalhos futuros.

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seguir são apresentadas as considerações finais sobre o sistema GCxGC empregado e o método de análise de nitro-HPAs estudado.

5.1. Sistema GCxGC

Considerando como sistema GCxGC o conjunto composto por: vaporizador com programação de temperatura (PTV), modulador criogênico de dois jatos de CO₂ líquido (*Dual Jet*), e detector por ionização em chama (FID); e levando em conta os resultados e a vivência neste trabalho, as considerações sobre o sistema GCxGC serão divididas em dois aspectos: desempenho da modulação e adequação do sistema à determinação de nitro-HPAs em extrato orgânico de material particulado no ar. (Nota: As colunas cromatográficas serão abordadas no item sobre o método de análise.)

5.1.1. Desempenho da modulação

Os resultados obtidos nas análises por GCxGC, se avaliados sob os critérios de largura e capacidade de pico, apresentaram similaridade com os resultados esperados para essa técnica. Porém, o mesmo não pode ser afirmado quanto à precisão instrumental, uma vez que a repetibilidade dos tempos de retenção na coluna ²D foi inferior ao relatado na literatura. Quanto à repetibilidade de área de pico, foram necessárias muitas repetições das corridas cromatográficas para se alcançar áreas de nitro-HPAs adequadas para a construção de curvas analíticas, o que significou muito tempo despendido e grande consumo de gás carbônico. Na maioria dos cromatogramas em que as repetibilidades foram avaliadas, foi observada a ocorrência de divisão ou deformação dos picos, o que pode explicar a flutuação nos valores de tempo de retenção e de área de pico. A divisão e deformação dos picos modulados pelo resfriamento com CO₂ líquido e aquecimento pelo ar circulante do forno pode ser provocada por *breakthrough* dos compostos no modulador ou por uma remobilização lenta da banda cromatográfica focalizada. Embora a ocorrência de *solute breakthrough* seja visível em alguns cromatogramas de trabalhos divulgados na literatura, segundo Pedroso (2009b, p. 23), “os autores geralmente não relatam a observação desse

fenômeno e tampouco buscam soluções para evitá-lo”. E ainda, segundo Begnaud *et al.* (2009), “problemas na modulação criogênica foram discutidos em congressos, mas pouco relatados na literatura”.

Algumas causas para a ocorrência de *solute breakthrough* no modulador *Dual Jet* são: velocidade inadequada do gás de arraste, capilar inadequado para atuar como local de modulação e resfriamento insuficiente.

Beens (2010, p. 33), que é o autor do projeto do modulador *Dual Jet*, afirma que: “se a velocidade do gás de arraste for adequada à distância entre os dois *jets*, não ocorrerá *solute breakthrough*”. Beens (Ibid, p. 34) também explica que existe um pequeno atraso entre a alternância das válvulas solenóide e o efeito dessa alternância no resfriamento do capilar. Uma parte desse atraso é causada pelo tempo necessário ao movimento mecânico da válvula e outra parte é o tempo necessário para o preenchimento do tubo capilar entre a saída da válvula e o *jet*. Em geral, esse atraso é menor do que 100ms. Se a velocidade do gás de arraste for adequada à distância entre os dois *jets*, de modo que a fração coletada no primeiro *jet* alcance o segundo *jet* após 100ms, não ocorrerá *solute breakthrough* (nota: a distância entre os dois *jets* é fixada pelo suporte apresentado na Figura 3.1-a). Se a velocidade do gás de arraste for alta ao ponto da fração coletada passar pelo segundo *jet* antes de 100ms, uma parte da fração coletada não será focalizada e entrará na coluna 2D . O resultado dessa ocorrência será o aparecimento de um pico extra, com largura maior do que o pico modulado e com cauda provocada pelo gradiente entre a temperatura alta do forno e a temperatura em abaixamento no *jet*.

Em alguns cromatogramas obtidos foram observados picos extras como os descritos acima, porém, o intrigante foi que com o mesmo valor de velocidade do gás de arraste foram obtidas replicatas de cromatogramas com e sem esses picos extras. Na Figura 5.1 estão apresentados segmentos de dois cromatogramas da solução n-alcenos obtidos sequencialmente em vazão constante e igual a 1 mL/min. Na seção do cromatograma denominado I foram observados picos extras separados dos picos modulados de C16 por 2 s, que é a metade do período de modulação de 4 s, e picos extras pequenos e vizinhos aos picos modulados de C16. Na seção do cromatograma consecutivo, denominado I', foi observado apenas um pico adicional pequeno, vizinho

a um pico modulado do C16. Considerando que a vazão do gás de arraste foi constante nos dois cromatogramas, uma causa mais provável para a ocorrência dos picos adicionais de área maior no cromatograma (I) talvez tenha sido uma diminuição temporária do resfriamento no modulador.

Figura 5.1 – Seções de dois cromatogramas (I e I') da solução n-alcenos obtidos em sequência. As seções foram tomadas na região de eluição do C16. A escala nas duas seções é diferente.

Em (I): as setas vermelhas indicam picos extras separados dos picos modulados por 2 s, que é a metade do período de modulação de 4 s; as setas pretas indicam picos extras vizinhos aos picos modulados. Em (I'): apenas um pico extra, vizinho a um pico modulado, foi observado.

Quanto à adequação do capilar no modulador, mencionada como sendo a segunda causa provável para a ocorrência de *solute breakthrough*, Beldean-Galea *et al.* (2012) consideram que a modulação é uma combinação do efeito do resfriamento e das interações dos compostos com a fase estacionária (FE) no capilar onde a modulação ocorre. Se não houver interações entre os compostos e a FE, um *solute breakthrough* será observado. Apesar da influência importante da FE na modulação, esse assunto é raramente discutido na literatura científica. A modulação em capilar sem FE também é reportada (GAINES; FRYSSINGER, 2004).

Conforme mencionado no item 4.1.1, sobre o conjunto de colunas empregado neste trabalho, a modulação foi feita em capilar com a FE de média polaridade 14% cianopropilfenil polisiloxano. A escolha dessa FE está coerente com um estudo

realizado por Beldean-Galea *et al.* (2012), através do qual os autores, empregando um cromatógrafo de modelo igual ao deste trabalho, concluíram que uma FE de média polaridade é a mais adequada para a modulação criogênica com CO₂ de uma mistura de compostos com polaridades diferentes. Portanto, a FE participante da modulação neste trabalho não deveria ser uma causa das ocorrências de *solute breakthrough*.

Outro aspecto relacionado ao capilar onde a modulação ocorre é a pequena espessura do seu filme de FE (0,1 µm) que resulta em pouca capacidade de amostra. Pedroso (2009b, p. 23) afirma que o *solute breakthrough* ocorre quando a concentração dos compostos é elevada. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que uma solução de nitro-HPA diluída apresentou divisão dos picos, enquanto que uma solução com os mesmos componentes em concentração oito vezes maior não apresentou (item 4.2.3.2). Portanto, a concentração elevada não parece ser uma causa provável para explicar as observações feitas neste trabalho.

Com relação ao resfriamento insuficiente no modulador *Dual Jet*, as seguintes situações devem ser evitadas: entupimento dos orifícios no *jet* ou da tela filtrante (*screen*) do CO₂; desalinhamento do capilar em relação aos orifícios de saída do CO₂ nos *jets*; vazamento de CO₂ nas conexões da tubulação; pressão insuficiente na saída do cilindro de CO₂.

Como no período de duração deste trabalho foram observadas muitas ocorrências de divisão dos picos, em diversas ocasiões os *jets* foram limpos, mas poucas vezes foi retirado um resíduo que poderia obstruir um orifício. Por outro lado, foi necessário substituir o *screen* muitas vezes, por causa do acúmulo de resíduos que provavelmente diminuía a vazão do CO₂ líquido. Cabe aqui ressaltar a importância do emprego de gás carbônico de alta pureza, para evitar o entupimento do *screen* e dos *jets*.

O alinhamento do capilar com os orifícios dos *jets* foi feito através do ajuste de parafusos no suporte metálico preso à base do forno (Figura 3.1-a) e reajuste quando necessário. As conexões da tubulação de CO₂ sempre foram inspecionadas quanto a vazamentos. Somente após a abertura de uma conexão, como na substituição do cilindro ou na troca do *screen*, foi observado algum vazamento que foi sanado por um reaperto ou troca de uma anilha.

A pressão do CO₂ foi aquela do cilindro à temperatura ambiente. O único cuidado tomado foi o de manter a temperatura do laboratório acima de 20°C.

Alguns usuários do modulador *Dual Jet* relataram dificuldades na modulação por causa de resfriamento insuficiente na saída dos *jets* e indicaram as soluções adotadas em seus laboratórios: Vial, *et al.* (2009) alteraram a configuração original do modulador comercial pela diminuição da distância dos dois *jets* até o capilar no modulador; Vercammen, Joeri (2012, informação verbal) sugeriu a aplicação de sobrepressão de nitrogênio no cilindro de gás carbônico para aumentar o fluxo de CO₂ líquido na saída dos *jets*; Kristenson *et al.* (2003) mantiveram o cilindro de CO₂ em um banho termostaticado entre 25 e 50°C, para aumentar a pressão interna do cilindro, e também comentaram que a temperatura ótima de modulação depende do analito e da espessura da parede da coluna capilar.

Em trabalhos futuros, uma investigação sobre as possíveis causas de divisão de picos com o modulador *Dual Jet* deve ser realizada. Se a causa mais provável for um resfriamento insuficiente no modulador, os procedimentos sugeridos no parágrafo anterior para aumentar cautelosamente a pressão interna do cilindro de CO₂ devem ser testados. Porém, se a causa mais provável for um aquecimento insuficiente pelo ar circulante no forno, outras fases estacionárias dentro do capilar no modulador devem ser testadas, inclusive um capilar desativado sem fase estacionária também deve ser avaliado.

5.1.2. Adequação do sistema GCxGC à análise de nitro-HPAs

A seguir, são apresentadas considerações sobre o emprego do modulador *Dual Jet*, injetor PTV e detector FID.

Como o modulador *Dual Jet* alcança um resfriamento de cerca 100°C abaixo da temperatura do forno e não possui mecanismo de aquecimento para a remobilização da banda cromatográfica focalizada, pode-se dizer que esse modulador é adequado a compostos semivoláteis e pouco voláteis, como os nitro-HPAs. A modulação de compostos pouco voláteis por CO₂ líquido tem a vantagem da remobilização fácil e rápida desses compostos pelo aquecimento promovido pelo ar circulante no forno,

enquanto que na modulação com N₂ líquido ou resfriado é necessário um aquecimento através de jato(s) de um gás aquecido.

A operação do modulador *Dual Jet* é extremamente simples e não apresenta a necessidade de otimização de parâmetros como a duração do(s) jato(s) quente(s) nos moduladores resfriados por N₂ líquido, a distância percorrida pelas frações do eluente da coluna ¹D entre os estágios de coleta e focalização e não está sujeito ao congelamento nos *jets*, como os moduladores resfriados por N₂ líquido.

A técnica de injeção com programação de temperatura no injetor PTV tem a vantagem de diminuir a discriminação por ponto de ebulição, evitar a decomposição térmica ou catalítica e proteger a coluna de interferentes da matriz. Essa técnica é considerada como a mais universal, isto é, a mais adequada para uma gama bastante ampla de amostras (GROB, 1993; HOH; MASTOVSKA, 2008; GÓMEZ-RUIZ *et al.*, 2009). Todas essas características da técnica de injeção e do injetor PTV são bastante interessantes para a determinação de nitro-HPAs em extratos de material particulado no ar. Por outro lado, alguns grupos de pesquisa na área da química atmosférica têm se dedicado ao desenvolvimento da caracterização química do material particulado por GCxGC com o emprego de dessorção térmica (DT) dos compostos-alvo diretamente no injetor do cromatógrafo. Os filtros carregados de MPA são cortados em pedaços que são colocados no *liner* do injetor (FUSHIMI *et al.*, 2012; ÖZEL *et al.*, 2009; SCHNELLE-KREIS *et al.*, 2005; VOGT; GRÖGER; ZIMMERMANN, 2007). Ainda, um outro grupo de pesquisadores desenvolveu um sistema que coleta as partículas atmosféricas umidificadas diretamente na cela do dessorvedor térmico, por impactação inercial. Em seguida faz a dessorção térmica, a transferência dos compostos para o conjunto de colunas da GCxGC e a detecção por MS ou FID. Esse sistema é levado para o local de coleta do MPA para gerar medidas horárias dos compostos orgânicos especiados (WORTON *et al.*, 2012).

As principais vantagens da DT são a redução do tempo e do consumo de solventes nas etapas de preparação da amostra, e a possibilidade de alcançar limites de quantificação mais baixos do que o método convencional. Apesar de a DT poder apresentar limitação para a determinação de compostos-alvo termolábeis, essa técnica

deve ser investigada em trabalhos futuros de determinação de nitro-HPAs em amostras de particulado no ar.

O detector de ionização em chama (FID) tem volume interno desprezível e alta frequência de aquisição de dados (até 300 Hz), características que tornam esse detector muito útil para a GCxGC. Na análise quantitativa, o FID oferece grande confiabilidade e na análise qualitativa o seu emprego é possível, principalmente quando a amostra contém classes diferentes de compostos que podem gerar cromatogramas GCxGC estruturados (VON MÜHLEN, *et al.* 2006a).

Detectores específicos como o NPD (detector de nitrogênio e fósforo) e o NCD (detector por quimiluminescência de nitrogênio) foram empregados na determinação de compostos de nitrogênio em diesel (ADAM *et al.*, 2009; VON MÜHLEN, *et al.* 2007b) e na caracterização de nanopartículas em MPA (OCHIAI *et al.*, 2007).

O detector espectrométrico de massas (MS) é o mais adequado para a identificação dos numerosos compostos separados pela GCxGC. Até o momento, o MS por tempo de voo (TOF) é o mais compatível com a GCxGC, por causa da sua alta frequência de aquisição de espectros (50 Hz ou mais). A determinação de compostos de nitrogênio por GCxGC-MS-TOF foi relatada (OCHIAI *et al.*, 2007; ÖZEL *et al.*, 2009; VOGT *et al.*, 2007; VON MÜHLEN *et al.*, 2010). Os espectrômetros de massas quadrupolares modernos, com frequência de aquisição de 20 Hz, são empregados com confiabilidade apenas na identificação e em uma faixa reduzida de massas. Fushimi *et al.* (2012) empregaram um espectrômetro de massas triplo quadrupolo para a determinação de nitro-HPAs. Dois trabalhos de revisão recentes sobre a aplicação da GCxGC na determinação de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis na atmosfera foram publicados (ARSENE *et al.*, 2011; HAMILTON, 2010). Os moduladores, detectores e conjuntos de colunas mais empregados nessa área são apresentados nas duas revisões.

5.2. Método de análise de nitro-HPAs por GCxGC

Todos os pesquisadores envolvidos com as separações por GCxGC são unânimes ao afirmar que o desenvolvimento de um método empregando essa técnica é mais complexo do que com a 1D-GC.

Sabe-se que o desenvolvimento de um método por GCxGC deve começar pela escolha da FE e das dimensões da coluna ¹D. A adequação da coluna ¹D para a análise dos compostos-alvo deve ser verificada quanto à sua eficiência, formato dos picos e temperatura de eluição dos mesmos. A FE da coluna ²D deve ter mecanismo de separação diferente da FE da coluna ¹D. Conjuntos de coluna normal (apolar-polar) e inverso (polar-apolar) devem ser considerados. As dimensões mais adequadas para a coluna ²D devem ser testadas. A vazão do gás de arraste deve ser avaliada quanto à eficiência de separação e desempenho da modulação. A programação da temperatura do forno e o período de modulação devem ser definidos experimentalmente, considerando a resolução e a ocorrência de picos fora do ciclo. No modulador *Dual Jet* não existem parâmetros de temperatura a serem definidos, mas em outros moduladores criogênicos sim, o que aumenta a complexidade do desenvolvimento do método.

Neste trabalho, o estudo para estabelecer as condições ótimas da análise de nitro-HPAs por GCxGC foi parcialmente prejudicado por causa das dificuldades em se obter uma modulação eficiente. Em trabalhos futuros, condições cromatográficas diferentes deverão ser testadas, visando o maior aproveitamento da capacidade de pico disponibilizada pela GCxGC e a separação de componentes do extrato orgânico de particulado no ar por classes de compostos. Outros conjuntos de colunas, normal e inverso, deverão ser investigados, uma vez que uma ampla gama de colunas está agora disponível comercialmente, nas dimensões típicas das colunas ²D (2 m de comprimento e 0,10 / 0,15 / 0,18 mm de diâmetro interno). Outras programações de temperatura do forno e outros períodos de modulação deverão ser testados para o desenvolvimento de um método quantitativo aplicável a uma gama mais ampla de nitro-HPAs em MPA. Também os detectores específicos (NPD ou NCD) ou espectrométricos de massas deverão ser avaliados com a finalidade de aumentar a detectabilidade do método e a confiabilidade na identificação.

Como considerações gerais, vale destacar duas opiniões de especialistas em cromatografia e uma de estudiosos da química atmosférica sobre a GCxGC:

Para Janssen (2013), a GCxGC oferece uma vantagem adicional sobre a 1D-GC que é a seletividade maior. Na 1D-GC a volatilidade é o parâmetro principal para a definição da ordem de eluição. A polaridade da FE ou dos analitos tem um papel secundário, às vezes completamente encoberto pelo efeito da volatilidade. A GCxGC, ao contrário, permite que as contribuições da volatilidade e da polaridade sejam efetivamente dissociadas e torna possível a visualização de pequenas diferenças de retenção causadas por diferenças de polaridade.

Edwards, Mostafa e Górecki (2011) afirmam que “o projeto de um modulador perfeito é um grande desafio, como muitos têm percebido ao longo desses últimos vinte anos”. Até o momento, não existe um único modulador que seja o mais adequado para todas as aplicações. O usuário deve escolher o modulador que seja o mais adequado à volatilidade, polaridade e concentração dos seus compostos-alvo.

Para Hamilton (2010), a GCxGC permitiu a identificação de uma quantidade significativamente maior de compostos orgânicos voláteis na atmosfera do que identificado anteriormente.

6 - CONCLUSÕES

Através dos resultados deste trabalho pode-se mostrar que a determinação de nitro-HPAs em extrato orgânico de material particulado no ar pode ser realizada por GCxGC, empregando injetor com programação de temperatura (PTV), modulador com dois jatos de dióxido de carbono líquido (*Dual Jet*), conjunto normal de colunas (fases estacionárias apolar-polar) e detector por ionização em chama (FID). A quantificação de nitro-HPAs com o emprego do modulador *Dual Jet* é possível se for feita através do método de padronização interna.

Apesar das vantagens do modulador *Dual Jet*, como: projeto isento de partes móveis, operação simples, capacidade de concentração e focalização das frações do eluente da primeira dimensão, e remobilização das frações moduladas através do aquecimento do ar no forno do cromatógrafo, algumas desvantagens devem ser consideradas. Por exemplo, o grande consumo de gás carbônico em alto grau de pureza, que torna o método oneroso, e uma inconstância em manter as condições ótimas de modulação, gerando frequentemente picos modulados divididos ou assimétricos que prejudicam a repetibilidade de área e a precisão e exatidão do método analítico.

Trata-se de um método analítico importante, uma vez que a etapa de pré-tratamento do método convencional pode ser eliminada, levando a um tempo de análise menor, custo mais baixo e confiabilidade dos resultados maior. Assim, investigações futuras mais detalhadas devem ser feitas para garantir uma configuração instrumental mais eficiente no que se refere à exatidão e precisão. Indubitavelmente, se um detector espectrométrico de massas e eventualmente um dessorvedor térmico fossem acoplados ao cromatógrafo, o método de análise para a determinação de nitro-HPAs se tornaria mais atraente.

7. REFERÊNCIAS¹²

ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; VREULS, R. J. J.; BATENBURG, A. M.; BRINKMAN, U. A. Th. Comprehensive two-dimensional gas chromatography of complex samples by using a 'reversed-type' column combination: application to food analysis. **Journal of Chromatography A**, 1054, p. 47–55, 2004.

ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN, U. A. Th. Recent Developments in Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GCxGC) I. Introduction and Instrumental Set-up. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 438–454, 2006a.

ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN, U. A. Th. Recent Developments in Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography (GCxGC) IV. Further applications, conclusions and perspectives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 540–553, 2006b.

ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; BRINKMAN, U. A. Th. Recent Developments in the Application of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 67–108, 2008.

ADAM, F.; BERTONCINI, F.; BRODUSCH, N.; DURAND, E.; THIÉBAUT, D.; ESPINAT, D.; HENNION M-C. New benchmark for basic and neutral nitrogen compounds speciation in middle distillates using comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 55–64, 2007.

ADAM, F.; VENDEUVRE, C.; BERTONCINI, F.; THIÉBAUT, D.; ESPINAT, D.; HENNION M-C. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for enhanced analysis of naphthas: New column combination involving permethylated cyclodextrin in the second dimension. **Journal of Chromatography A**, v. 1178, p. 171–177, 2008a.

ADAM, F.; BERTONCINI, F.; COUPARD, V.; CHARON, N.; THIÉBAUT, D.; ESPINAT, D.; HENNION M-C. Using comprehensive two-dimensional gas chromatography for the analysis of oxygenates in middle distillates. I. Determination of the nature of biodiesels blend in diesel fuel. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 236–244, 2008b.

ADAM, F.; BERTONCINI, F.; DARTIGUELONGUE, C.; MARCHAND, K.; THIÉBAUT, D.; HENNION M-C. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for basic and neutral nitrogen speciation in middle distillates. **Fuel** v. 88, p. 938–946, 2009.

¹² A elaboração das referências foi feita em conformidade à norma ABNT NBR 6023: Informação e documentação- Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

ALBINET, A.; LEOZ-GARZIANDIA, E.; BUDZINSKI, H.; VIILENAVE, E. Simultaneous analysis of oxygenated and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons on standard reference material 1649a (urban dust) and on natural ambient air samples by gas chromatography–mass spectrometry with negative ion chemical ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, p. 106–113, 2006.

AMADOR-MUNOZ, O.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; ARAGÓN-PINA, A.; TRAN, T. C.; MORRISON, P.; MARRIOTT, P. J. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons based on comprehensive two-dimensional gas chromatography–isotope dilution mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1201, p. 161–168, 2008.

ARSENE, C.; VIONE, D.; GRINBERG, N.; OLARIU, R. I. GCxGC-MS hyphenated techniques for the analysis of volatile organic compounds in air. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, p. 1077–1111, 2011.

BAMFORD, H. A.; BEZABEH, D. Z.; SCHANTZ, M. M.; WISE, S. A.; BAKER, J. E. Determination and comparison of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons measured in air and diesel particulate reference materials. **Chemosphere**, v. 50, p. 575–587, 2003.

BARCELÓ, D.; RAMOS, L. (Ed.). **Comprehensive two dimensional gas chromatography**. 1th Ed., 2009. Wilson & Wilson's, Comprehensive analytical chemistry, v. 55. Elsevier, Amsterdam.

BEENS, J.; TIJSEN, R.; BLOMBERG, J. Prediction of comprehensive two-dimensional gas chromatographic separations - A theoretical and practical exercise. **Journal of Chromatography A**, v. 822, p. 233–251, 1998.

BEENS, J.; ADAHCHOUR, M. VREULS, R. J. J.; VAN ALTENA, K.; BRINKMAN, U. A. Th. Simple, non-moving modulation interface for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 127–132, 2001.

BEENS, J.; JANSSEN, H.-G.; ADAHCHOUR, M.; BRINKMAN, U. A. Th. Flow regime at ambient outlet pressure and its influence in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1086, p. 141–150, 2005a.

BEENS, J.; BRINKMAN, U. A. Th. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography – A powerful and versatile technique. **Analyst**, v. 130, p. 123–127, 2005b.

BEENS, J. **Comprehensive two-dimensional gas chromatography. The state-of-separation-arts**. Versão para Revisão. 2010. Disponível em: <<http://www.chromedia.org>>. Acesso em: 15 de dezembro de 2011.

BEGNAUD, F.; DEBONNEVILLE, C.; PROBST, J. P.; CHAINTREAU A.; MORRISON, P. D.; ADCOCK, J. L.; MARRIOTT, P. J. Effects of variation in modulator temperature during cryogenic modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 3144-3151, 2009.

BEINER, K.; MONTERO, L.; WINKLER, U.; BAUER, C.; POPP, P. Determination of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in particulate matter. **Chromatographia**, v. 57, S.219-S.224, 2003.

BELDEAN-GALEA, M. S.; THIEBAUT, D.; VIAL, J.; SASSIAT, P.; BOUZIGE, M.; COMAN M-V. CO₂ Cryogenic Modulation in Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography: Influence of the stationary phase used for trapping. **Revista de Chimie**, v. 63, n^o 8, p. 754-758, 2012.

BERTSCH, W. Two-Dimensional Gas Chromatography. Concepts, Instrumentation, and Applications – Part 1: Fundamentals, Conventional Two-Dimensional Gas Chromatography, Selected applications. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 22, N^o 12, p. 647–665, 1999.

BERTSCH, W. Two-Dimensional Gas Chromatography. Concepts, Instrumentation, and Applications – Part 2: Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, N^o 3, p. 167–181, 2000.

BICCHI, C.; RUBIOLO, P.; CORDERO, C. Separation science in perfume analysis. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 384, p. 53–56, 2006.

BLUMBERG, L. M.; KLEE, M. S. Optimal Heating Rate in Gas Chromatography. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 12, n^o 9, p. 508-514, 2000.

CAVAGNINO, D.; MAGNI, P.; ZILIOLI, G.; TRESTIANU, S. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using large sample volume injection for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in complex matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1019, p. 211–220, 2003.

CAVAGNINO, D.; ZILIOLI, G.; TRESTIANU, S. Group-Type Analysis for Petrochemical Samples by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. In: PITTCON CONFERENCE, 2004. Painel. Disponível em: <<http://analiticaweb.com.br/gcxgc/>>.

CECINATO, A.; MARINO, F.; DI FILIPPO, P.; LEPORE, L.; POSSANZINI, M. Distribution of n-alkanes, polynuclear aromatic hydrocarbons and nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons between the fine and coarse fractions of inhalable atmospheric particulates. **Journal of Chromatography A**, v. 846, p. 255–264, 1999.

CHOW, J. C.; YU, J. Z.; WATSON, J. G.; HO, S. S. H.; BOHANNAN, T. L.; HAYS, M. D.; FUNG, K. K. The application of thermal methods for determining chemical composition of carbonaceous aerosols: A review. **Journal of Environmental Science and Health Part A**, v. 42, p. 1521–1541, 2007.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. Editora Edgard Blücher. 1998, 1ª edição.

COCHRAN, R. E.; DONGARI, N.; JEONG, H.; BERÁNEK, J.; HADDADI, S.; SHIPP, J.; KUBÁTOVÁ A. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxy-, nitro-, and hydroxy-oxidation products. **Analytica Chimica Acta**, v. 740, p. 93–103, 2012.

CORTES H. J.; WINNIFORD, B.; LUONG, J.; PURSCH, M. Comprehensive two dimensional gas chromatography review. **Journal of Separation Science**, v. 32, p. 883 – 904, 2009.

CRIMMINS, B. S.; BAKER, J. E. Improved GC/MS methods for measuring hourly PAH and nitro-PAH concentrations in urban particulate matter. **Atmospheric Environment**, v. 40, p. 6764–6779, 2006.

DALLÜGE, J.; VREULS, R. J. J.; BEENS, J.; BRINKMAN, U. A.Th. Optimization and characterization of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection (GCxGC-TOF MS). **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 201-214, 2002.

DALLÜGE, J.; BEENS, J.; BRINKMAN, U. A.Th. Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 69–108, 2003.

DAVIS, J. M.; STOLL, D. R.; CARR, P. W. Dependence of Effective Peak Capacity in Comprehensive Two-Dimensional Separations on the Distribution of Peak Capacity between the Two Dimensions. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 8122–8134, 2008.

DI FILIPPO, P.; RICCARDI, C.; GARIAZZO, C.; INCORONATO, F.; POMATA, D.; SPICAGLIA, S.; CECINATO, A. Air pollutants and the characterization of the organic content of aerosol particles in a mixed industrial/semi-rural area in central Italy. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 9, p. 275–282, 2007.

DI FILIPPO, P.; RICCARDI, C.; POMATA, D.; BUIARELLI, F. Concentrations of PAHs, and nitro- and methyl- derivatives associated with a size-segregated urban aerosol. **Atmospheric Environment** v. 44, p. 2742-2749, 2010.

DIAS, E. R. **Estudo em laboratório da emissão direta de oxi-HPA e HPA na queima da palha de cana-de-açúcar**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DORMAN, F. L.; OVERTON, E. B.; WHITING, J. J.; COCHRAN, J. W.; GARDEA-TORRESDEY, J. Gas Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 80, N° 12, p. 4487-4497, 2008.

DUTRIEZ, T.; COURTIADÉ, M.; THIÉBAUT, D.; DULOT, H.; BERTONCINI, F.; VIAL, J.; HENNION, M.-C. High-temperature two-dimensional gas chromatography of hydrocarbons up to n-C₆₀ for analysis of vacuum gas oils. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2905–2912, 2009.

EDWARDS, M.; MOSTAFA, A.; GÓRECKI, T. Modulation in Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography: 20 years of innovation. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 2335–2349, 2011.

FUSHIMI, A.; HASHIMOTO, S.; IEDA, T.; OCHIAI, N.; TAKAZAWA, Y.; FUJITANI, Y.; TANABE, K. Thermal desorption – comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry for determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives. **Journal of Chromatography A**, v. 1252, p. 164–170, 2012.

GAINES, R. B.; FRYSSINGER, G. S. Temperature requirements for thermal modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 380–388, 2004.

GIDDINGS, J. C. Sample dimensionality: a predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation. **Journal of Chromatography A**, v. 703, p. 3-15, 1995.

GOLDSTEIN, A. H.; WORTON, D. R.; WILLIAMS, B. J.; HERING, S. V.; KREISBERG, N. M.; PANIC, O.; GÓRECKI, T. Thermal desorption comprehensive two-dimensional gas chromatography for in-situ measurements of organic aerosols. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 340–347, 2008.

GÓMEZ-RUIZ, J. Á.; CORDEIRO, F.; LÓPEZ, P.; WENZL, T. Optimization and validation of programmed temperature vaporization (PTV) injection in solvent vent mode for the analysis of the 15 + 1 EU-priority PAHs by GC–MS. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 643–650, 2009.

GÓRECKI, T.; HARYNUK, J.; PANIC, O. The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC). **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 359–379, 2004.

GROB, Konrad. **Split and Splitless Injection in Capillary Gas Chromatography: With Some Remarks on PTV Injection (Chromatographic methods)**. Hüthig Buch Verlag Heidelberg, 1993, 3° ed. ISBN: 3778521519.

GROGER T.; WELTHAGEN W.; MITSCHKE S.; SCHAFFER M.; ZIMMERMANN R. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography mass spectrometry and different types of data analysis for the investigation of cigarette particulate matter. **Journal of Searation Science**, v. 31, p. 3366 – 3374, 2008.

HAGLUND P.; HARJU M.; DANIELSSON C.; MARRIOTT P. Effects of temperature and flow regulated carbon dioxide cooling in longitudinally modulated cryogenic systems for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 962, p. 127-134, 2002.

HAMILTON J. F. Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography to study the atmosphere. **Journal of Chromatographic Science**, v. 48, p. 274-285, 2010.

HARYNUK, J.; GORECKI, T.; ZEEUW, J. Overloading of the second-dimension column in comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, p. 21–27, 2005.

HAVEY, C. D.; McCORMICK, R. L.; HAYES, R. R.; DANE, A. J.; VOORHEES, K. J. Analysis of Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Conventional Diesel and Fischer-Tropsch Diesel Fuel Emissions Using Electron Monochromator-Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 4894-4900, 2006.

HOH, E.; MASTOVSKA, K. Large volume injection techniques in capillary gas chromatography – Review. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, p. 2–15, 2008.

JANSSEN, H.-G. **Sample Introduction Techniques for Capillary Gas Chromatography**. Monograph edited of the short course Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography - Theory and Experiments. Eindhoven University of Technology, Laboratory for Instrumental Analysis, the Netherlands. Version 3.0, November 1998.

JANSSEN, H.-G. **Introduction to Jan Beens' book**. Disponível em: <<http://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=crijeDsHqnOxmOIIecCpBoF&subNav=epvucNsHqnOxmOIIecCpBoFvE>>. Acesso em: 23 de janeiro de 2013.

JINHUI, X.; LEE, F. S.C. Quantification of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter. **Analytica Chimica Acta**, v. 416, p. 111–115, 2000.

KALLIO, M.; HYÖTYLÄINEN, T.; LEHTONEN, M.; JUSSILA, M.; HARTONEN, K.; SHIMMO, M.; RIEKKOLA, M.-L. Comprehensive two-dimensional gas chromatography in the analysis of urban aerosols. **Journal of Chromatography A**, v. 1019, p. 251–260, 2003.

KALLIO M., JUSSILA M., RISSANEN T., ANTTILA P., HARTONEN K., REISSELL A., VREULS R., ADAHCHOUR M., HYOTYLAINEN T. Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry in the identification of organic compounds in atmospheric aerosols from coniferous forest. **Journal of Chromatography A**, v. 1125, p. 234–243, 2006.

KALLIO, M. K. **Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography: Instrumental and Methodological Development**. 2008. 92 p. Academic Dissertation - Department of Chemistry, Laboratory of Analytical Chemistry, University of Helsinki, Helsinki, Finland.

KAWANAKA, Y.; SAKAMOTO, K.; WANG, N.; YUN, S.-J. Simple and sensitive method for determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust particles by gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, p. 312–317, 2007.

KLEE, M. S. **GC Inlets - An Introduction**. Agilent Technologies, Inc. Manual Part Number 5958-9468, Second edition, July 2005.

KRISTENSON, E. M.; KORYTÁR, P.; DANIELSSON, C.; KALLIO, M.; BRANDT, M.; MÄKELÄ, J.; VREULS, R. J. J.; BEENS, J.; BRINKMAN, U. A. Th. Evaluation of modulators and electron-capture detectors for comprehensive two-dimensional GC of halogenated organic compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1019, p. 65–77, 2003.

LANÇAS, Fernando M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos, RiMa Editora, 2004. 46p. Série: Métodos cromatográficos de análise V. 6. ISBN-85-7656-025-9.

LEITE, Flávio. **Validação em Análise Química**. 3º edição. Campinas, SP, Editora Átomo, 1998. 224p. ISBN 85-86491-18-7.

LIBARDONI, M.; HASSELBRINK, E.; WAITE, J. H.; SACKS, R. At-column heating and a resistively heated, liquid-cooled thermal modulator for a low-resource bench-top GCxGC. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1001–1008, 2006.

LIU, Z.; PHILLIPS, J. B. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. **Journal of Chromatographic Science**, v. 29, p. 227–231, 1991.

MARRIOTT, P. J.; KINGHORN, R. M.; ONG, R.; MORRISON, P.; HAGLUND, P.; HARJU, M. Comparison of thermal sweeper and cryogenic modulator technology for comprehensive gas chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, p. 253–258, 2000.

MARRIOTT, P. J.; SCHOENMAKERS, P.; WU, Z-Y. Nomenclature and Conventions in Comprehensive Multidimensional Chromatography - An Update. **LC GC EUROPE**, v. 25, N° 5, p. 266-275, 2012.

MASIOL, M.; HOFER, A.; SQUIZZATO, S.; PIAZZA, R.; RAMPAZZO, G.; PAVONI, B. Carcinogenic and mutagenic risk associated to airborne particle-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: A source apportionment. **Atmospheric Environment**, v. 60, p. 375-382, 2012.

MATOS, J.T.V.; DUARTE, R.M.B.O.; DUARTE, A.C. Trends in data processing of comprehensive two-dimensional chromatography: State of the art. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 31– 45, 2012.

MICYUS, N. J.; SEELEY, S. K.; SEELEY, J. V. Method for reducing the ambiguity of comprehensive two-dimensional chromatography retention times. **Journal of Chromatography A**, v. 1086, p. 171–174, 2005.

MISSELWITZ, M.; COCHRAN, J. Large Volume Splitless Injection Using an Unmodified Split/Splitless Inlet and GC-TOFMS for Pesticides and Brominated Flame Retardants. Restek Corporation, Restek Lit. Cat.# EVAN1331-UNV, 2011.

MITREVSKI, B.; VELESKA, B.; ENGEL, E.; WYNNE, P.; SONG, S. M.; MARRIOTT, P. J. Chemical signature of ecstasy volatiles by comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Forensic Science International**, v. 209, p. 11–20, 2011.

MOL, H. G. J.; HENDRIKS, P. J. M.; JANSSEN, H.-G.; CRAMERS, C. A.; BRINKMAN, U. A.Th. Large Volume Injection in Capillary GC Using PTV Injectors: Comparison of Inertness of Packing Materials. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 18, p. 124-128, 1995.

MONDELLO, L.; TRANCHIDA, P. Q.; DUGO, P.; DUGO, G. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Mass Spectrometry: A Review. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 27, p. 101– 124, 2008.

MONDELLO, L. **Comprehensive Chromatography in Combination with Mass Spectrometry**. Wiley & Sons, 2011.

MOSTAFA, A.; EDWARDS, M.; GORECKI, T. Optimization aspects of comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1255, p. 38–55, 2012.

MURPHY, R. E.; SCHURE, M. R.; FOLEY, J. P. Effect of Sampling Rate on Resolution in Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 1585-1594, 1998.

OCHIAI, N.; IEDA, T.; SASAMOTO, K.; FUSHIMI A.; HASEGAWA, S.; TANABE, K.; KOBAYASHI, S. Comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry and simultaneous nitrogen phosphorous and mass spectrometric detection for characterization of nanoparticles in roadside atmosphere. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 13–20, 2007.

ONG, R. C. Y.; MARRIOTT, P. J. A Review of Basic Concepts in Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 40, May/June, p. 276-291, 2002a.

ONG, R.; MARRIOTT, P.; MORRISON, P.; HAGLUND, P. Influence of chromatographic conditions on separation in comprehensive gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 962, p. 135–152, 2002b.

ONG, R.; LUNDSTEDT, S.; HAGLUND, P.; MARRIOTT, P. Pressurised liquid extraction–comprehensive two-dimensional gas chromatography for fast-screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. **Journal of Chromatography A**, v. 1019, p. 221–232, 2003.

OUKEBDANE, K.; PORTET-KOLTALO, F.; MACHOUR, N.; DIONNET, F.; DESBÈNE P. L. Comparison of hot Soxhlet and accelerated solvent extractions with microwave and supercritical fluid extractions for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrated derivatives strongly adsorbed on soot collected inside a diesel particulate filter. **Talanta**, v. 82, p. 227–236, 2010.

ÖZEL, M. Z.; WARD, M. W.; HAMILTON, J. F.; LEWIS, A. C.; RAVENTOS-DURAN, T.; HARRISON R. M. Analysis of Organic Nitrogen Compounds in Urban Aerosol Samples Using GCxGC-TOF/MS. **Aerosol Science and Technology**, v. 44, p. 109–116, 2009.

PANIĆ, O.; GÓRECKI, T. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) in environmental analysis and monitoring. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 386, p. 1013 - 1023, 2006.

PÁPAI, Zs.; PAP, T.L. Analysis of peak asymmetry in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 953, p. 31–38, 2002.

PEDERSEN D. U.; DURANT J. L.; TAGHIZADEH K.; HEMOND H. F.; LAFLEUR A. L.; CASS G. R. Human Cell Mutagens in Respirable Airborne Particles from the Northeastern United States. 2. Quantification of Mutagens and Other Organic Compounds. **Environmental Science Technology**, v. 39, p. 9547-9560, 2005.

PEDROSO, M. P.; GODOY, L. A. F.; FIDÉLIS, C. H. V.; FERREIRA, E. C.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC). **Química Nova**, V. 32, N° 2, p. 421-430, 2009a.

PEDROSO, M. P. **Projeto e avaliação de um modulador criogênico para cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC)**. Tese de doutorado, 2009b, (106 p.), Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, UNICAMP, Campinas, SP.

PHILLIPS, J. B.; BEENS, J. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography: A hyphenated method with strong coupling between the two dimensions. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 331–347, 1999.

PIZZUTTI, I. R.; VREULS, R. J. J.; KOK, A.; ROEHRS, R.; MARTEL, S.; FRIGGI, C.A.; ZANELLA, R. Design of a compressed air modulator to be used in comprehensive multidimensional gas chromatography and its application in the determination of pesticide residues in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 3305–3311, 2009.

PORTET-KOLTALO, F.; OUKEBDANE, K.; DIONNET, F.; DESBÈNE P. L. Optimisation of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives adsorbed on highly sorptive diesel particulate matter. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, p. 48-56, 2009.

POSTER D. L.; SCHANTZ M. M.; SANDER, L. C.; WISE, S. A. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 386, p. 859–881, 2006.

RAMOS, L.; BRINKMAN, U. A. Th. Multidimensionality in Gas Chromatography: General Concepts. In: BARCELÓ, D.; RAMOS, L. (Ed.). **Comprehensive two dimensional gas chromatography**. 1th Ed., 2009, Chapter 1, p. 3-14. Wilson & Wilson's, Comprehensive analytical chemistry, v. 55. Elsevier, Amsterdam.

Restek Corporation. **Operating Hints for Using Split/Splitless Injectors**. Technical Guide. Restek Lit. Cat. #59880, 2002.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, F. A. L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RUIZ-JIMÉNEZ, J.; PARSHINTSEV, J.; LAITINEN, T.; HARTONEN, K.; RIEKKOLA, M.-L.; PETAJA, T.; KULMALA, M. Comprehensive two-dimensional gas chromatography, a valuable technique for screening and semiquantitation of different chemical compounds in ultrafine 30 nm and 50 nm aerosol particles. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, p. 2994-3003, 2011.

RUTAN, S. C.; DAVIS, J. M.; CARR, P. W. Fractional coverage metrics based on ecological home range for calculation of the effective peak capacity in comprehensive two-dimensional separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1255, p. 267– 276, 2012.

SANZ, J. Theoretical Considerations. In: BARCELÓ, D.; RAMOS, L. (Ed.). **Comprehensive two dimensional gas chromatography**. 1th Ed., 2009, Chapter 3, p. 49-76. Wilson & Wilson's, Comprehensive analytical chemistry, v. 55. Elsevier, Amsterdam.

SCHNELLE-KREIS, J.; WELTHAGEN, W.; SKLORZ, M.; ZIMMERMANN R. Application of direct thermal desorption gas chromatography and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to time of flight mass spectrometry for analysis of organic compounds in ambient aerosol particles. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 1648–1657, 2005.

SCHOENMAKERS, P.; MARRIOTT, P. J.; BEENS, J. Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography. **LCGC Europe**, p. 1-4, June 2003.

SEELEY, J. V. Recent advances in flow-controlled multidimensional gas chromatography - Review. **Journal of Chromatography A**, v. 1255, p. 24– 37, 2012.

SHELLIE, R. A.; XIE, L.; MARRIOTT, P. J. Retention time reproducibility in comprehensive two-dimensional gas chromatography using cryogenic modulation. An intralaboratory study. **Journal of Chromatography A**, v. 968, p. 161-170, 2002.

SKOCZYNSKA, E.; KORYTAR, P.; DE BOER, J. Maximizing chromatographic information from environmental extracts by GCxGC-ToF-MS. **Environmental Science Technology**, v. 42, p. 6611–6618, 2008.

SOUZA, K. F.; DIAS, E. R.; CARVALHO, L. R. F. Measurements of PAH, nitro-PAH and oxy-PAH compounds in airborne particles from an urban area impacted by sugar cane burning emissions. Urban Environmental Pollution Congress, 2012, Amsterdam, Holanda.

TEIXEIRA, E. C.; AGUDELO-CASTAÑEDA, D. M.; FACHEL, J. M. G.; LEAL, K. A.; GARCIA, K. O.; WIEGAND F. Source identification and seasonal variation of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with atmospheric fine and coarse particles in the Metropolitan Area of Porto Alegre, RS, Brazil. **Atmospheric Research**, v. 118, p. 390–403, 2012.

Thermo Electron S.p.A., Rodano (IT). BEENS, J. **Modulator for gas chromatography**. US 6838288-B2, 4 Jan. 2005.

TRANCHIDA, P. Q.; PURCARO, G.; DUGO, P.; MONDELLO, L. Modulators for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n° 9, p. 1437-1461, 2011.

TSAKAS, M. P.; SITARAS, I. E.; SISKOS, P. A. Nitro polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter of Athens, Greece. **Chemistry and Ecology**, v. 26, n° 4, p. 251–261, August, 2010.

U. S. EPA (Environmental Protection Agency) – Method 610 - Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Appendix A to Part 136. Method for Organic Chemical Analysis of Municipal and Industrial Wastewater. July, 1982.

U. S. EPA (Environmental Protection Agency), Compendium Method TO-13A, Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Ambient Air Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Second Edition. Cincinnati, OH, USA, January 1999.

VALLE-HERNÁNDEZ, B. L.; MUGICA-ÁLVAREZ, V.; SALINAS-TALAVERA E.; AMADOR-MUÑOZ, O.; MURILLO-TOVAR, M. A.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; VIZCAYA-RUIZ, A.; Temporal variation of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons in PM10 and PM2.5 collected in Northern Mexico City. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 5429–5438, 2010.

VAN DE WEGHE, H.; VANERMEN, G.; GEMOETS, J.; LOOKMAN, R.; BERTELS, D. Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography for the assessment of oil contaminated soils. **Journal of Chromatography A**, v. 1137, p. 91–100, 2006.

VAN GEEM, K. M.; PYL S. P.; REYNIERS M. F.; VERCAMMEN J.; BEENS J.; MARIN G. B. On-line analysis of complex hydrocarbon mixtures using comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 6623-6633, 2010.

VENDEUVRE, C. R.; RUIZ-GUERRERO, R.; BERTONCINI, F.; DUVAL, L.; THIÉBAUT, D.; HENNION, M-C. Characterisation of middle-distillates by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC): A powerful alternative for performing various standard analysis of middle-distillates. **Journal of Chromatography A**, v. 1086, p. 21–28, 2005.

VIAL, J.; NOCAIRI, H.; SASSIAT, P.; MALLIPATU, S.; COGNON, G.; THIÉBAUT, D.; TEILLET, B.; RUTLEDGE, D. N. Combination of dynamic time warping and multivariate analysis for the comparison of comprehensive two-dimensional gas chromatograms. Application to plant extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2866–2872, 2009.

VLAEMINCK, B.; HARYNUK, J.; FIEVEZ, V.; MARRIOTT, P. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for the separation of fatty acids in milk. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 757–766, 2007.

VOGT, L.; GRÖGER, T.; ZIMMERMANN, R. Automated compound classification for ambient aerosol sample separations using comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, p. 2–12, 2007.

VON MÜHLEN, C.; KHUMMUENG, W.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J. Detector technologies for comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 1909–1921, 2006a.

VON MÜHLEN, C.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J. Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC). **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 765–775, 2006b.

VON MÜHLEN, C.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J. Nomenclatura na língua portuguesa em cromatografia multidimensional abrangente. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 682–687, 2007a.

VON MÜHLEN, C.; OLIVEIRA, E. C.; MORRISON, P. D.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J. Qualitative and quantitative study of nitrogen containing compounds in heavy gas oil using comprehensive two-dimensional gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3223 – 3232, 2007b.

VON MÜHLEN, C.; OLIVEIRA, E. C.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J. Characterization of Nitrogen-Containing Compounds in Heavy Gas Oil Petroleum Fractions Using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Coupled to Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Energy Fuels**, v. 24, p. 3572–3580, 2010.

WANG, Y.; CHEN, Q.; NORWOOD, D. L.; McCAFFREY, J. Recent development in the applications of Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatograph. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 33, p. 1082–1115, 2010.

WEI, S.; HUANG, B.; LIU, M.; BI, X.; REN, Z.; SHENG, G.; FU, J. Characterization of PM_{2.5}-bound nitrated and oxygenated PAHs in two industrial sites of South China. **Atmospheric Research**, v. 109–110, p. 76–83, 2012.

WELKE, J. E.; MANFROI, V.; ZANUS, M.; LAZAROTTO, M.; ZINI, C.A. Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1226, p. 124–139, 2012.

WELTHAGEN, W.; SCHNELLE-KREIS, J.; ZIMMERMANN, R. Search criteria and rules for comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry analysis of airborne particulate matter **Journal of Chromatography A**, v. 1019, p. 233–249, 2003.

WHO (World Health Organization). **Global health risks. Mortality and burden of disease attributable to selected major risks**, 2009.

WHO (World Health Organization). **Preventing disease through healthy environments. Exposure to air pollution: a major public health concern**, 2010.

WORTON, D. R.; KREISBERG, N. M.; ISAACMAN, G.; TENG, A. P.; McNEISH, C.; GÓRECKI, T.; HERING, S. V.; GOLDSTEIN, A. H. Thermal Desorption Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography: An Improved Instrument for In-Situ Speciated Measurements of Organic Aerosols. **Aerosol Science and Technology**, v. 46, p. 380–393, 2012.

XIE, L.; MARRIOTT, P. J.; ADAMS, M. Chemometric analysis of comprehensive two-dimensional gas chromatography data using cryogenic modulation. **Analytica Chimica Acta**, v. 500, p. 211–222, 2003.

YUSA, V.; QUINTAS, G.; PARDO, O.; PASTOR, A.; DE LA GUARDIA, M. Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection–gas chromatography–mass spectrometry. **Talanta**, v. 69, p. 807–815, 2006.

ZIELINSKA, B.; SAMY, S. Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 386, p. 883–890, 2006.

ZIMMERMANN, K.; ATKINSON, R.; AREY, J.; KOJIMA, Y.; INAZU, K. Isomer distributions of molecular weight 247 and 273 nitro-PAHs in ambient samples, NIST diesel SRM, and from radical-initiated chamber reactions. **Atmospheric Environment**, v. 55, p. 431–439, 2012.

ZINI, C. A. Cromatografia gasosa bidimensional. **Scientia Chromatographica**, v. 1, nº 1, p. 31–49, 2009.

APÊNDICE

Nome, número CAS, fórmula molecular, massa molar, ponto de ebulição e fórmula estrutural dos nitro-HPAs estudados neste trabalho.

nitro-HPA	Fórmula estrutural
1,3-dinitropireno N° CAS: 75321-20-9 Fórmula molecular: $C_{16}H_8N_2O_4$ MM ($g\ mol^{-1}$): 292 *Ponto de ebulição: 493.9 °C
1,6-dinitropireno N° CAS: 42397-64-8 Fórmula molecular: $C_{16}H_8N_2O_4$ MM ($g\ mol^{-1}$): 292 *Ponto de ebulição: 515.2 °C
9-nitroantraceno N° CAS: 602-60-8 Fórmula molecular: $C_{14}H_9NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 223 *Ponto de ebulição: 402.9 °C
7-nitrobenzo(a)antraceno N° CAS: 20268-51-3 Fórmula molecular: $C_{18}H_{11}NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 273 *Ponto de ebulição: 495.3 °C
6-nitrobenzo(a)pireno N° CAS: 63041-90-7 Fórmula molecular: $C_{20}H_{11}NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 297 *Ponto de ebulição: 524.1 °C
6-nitrocriseno N° CAS: 7496-02-8 Fórmula molecular: $C_{18}H_{11}NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 273 *Ponto de ebulição: 505 °C
9-nitrofenantreno N° CAS: 954-46-1 Fórmula molecular: $C_{14}H_9NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 223 *Ponto de ebulição: 413.3 °C
2-nitrofluoranteno N° CAS: 13177-29-2 Fórmula molecular: $C_{16}H_9NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 247 *Ponto de ebulição: 455.7 °C

3-nitrofluoranteno N° CAS: 892-21-7 Fórmula molecular: $C_{16}H_9NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 247 *Ponto de ebulição: 445.5 °C
2-nitrofluoreno N° CAS: 607-57-8 Fórmula molecular: $C_{13}H_9NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 211 *Ponto de ebulição: 374.7°C
1-nitronaftaleno N° CAS: 86-57-7 Fórmula molecular: $C_{10}H_7NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 173 *Ponto de ebulição: 304 °C
2-nitronaftaleno N° CAS: 581-89-5 Fórmula molecular: $C_{10}H_7NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 173 *Ponto de ebulição: 319.6 °C
1-nitropireno N° CAS: 5522-43-0 Fórmula molecular: $C_{16}H_9NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 247 *Ponto de ebulição: 445.5°C
2-nitropireno N° CAS: 789-07-1 Fórmula molecular: $C_{16}H_9NO_2$ MM ($g\ mol^{-1}$): 247 *Ponto de ebulição: 455.7 °C
*Pontos de ebulição a 760 mmHg: dados extraídos de < http://pt.sw3c.com > em 11/01/2013.	

Súmula Curricular

DADOS PESSOAIS

Nome: Silvana Odete Pisani

Local e data de nascimento: São Paulo, 25 de janeiro de 1953.

ESCOLARIDADE

Universidade de São Paulo, São Paulo, 1976.

Graduação: Bacharel em Química com Atribuições Tecnológicas

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Mestrado em Química, Área de Química Analítica.

OCUPAÇÃO

Funcionária da Nova Analítica Imp. Exp. Ltda., empresa da área de instrumentação para laboratórios.

Início em 2003 até o presente.

PUBLICAÇÕES

Pisani, S. O.; Rothschild L. Aplicação da cromatografia a gás bidimensional abrangente para a identificação de HPAs e derivados em material particulado atmosférico. In: V Encontro Nacional de Química Ambiental - São Pedro, SP, 2010.

Carvalho, Lilian R. F.; Vasconcellos, Pérola C.; Mantovani, Waldir; Pool, Cristina S.; Pisani, Silvana O. Measurements of biogenic hydrocarbons and carbonyl compounds emitted by trees from temperate warm Atlantic rainforest, Brazil. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 7, p. 493, 2005.

PISANI, S. O.; Vasconcellos, Pérola C.; Carvalho, Lilian R. F. Artifact evidence in carbonyl compound sampling using the enclosure technique with cuvette system. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 5, p. 795, 2003.

Carvalho, Lilian R. F.; Vasconcellos, Pérola C.; Pisani, Silvana O.; Pool, Cristina S. Measurements of volatile organic compounds emitted from plants in the metropolitan area of São Paulo City, Brazil. In: EGS-AGU - EUG Joint Assembly, Nice, 2003.

Carvalho, Lilian R. F.; Pool, Cristina S.; Pisani, Silvana O.; Vasconcellos, Pérola C.; Mantovani, Waldir. Estimativas das taxas de emissão de isopreno e monoterpenos por plantas típicas da Mata Atlântica. In: 26º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 2003.

Carvalho, Lilian R. F.; Bruns, E. R.; Pisani, Silvana O.; Vasconcellos, Pérola C. Artefatos na coleta de compostos carbonílicos emitidos por plantas usando a técnica de confinamento com sistema cuvette. In: 26º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, SP, 2003.

PISANI, S. O. Uma avaliação da emissão de compostos orgânicos voláteis por fontes naturais. In: 25 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, 2002.

PISANI, S. O. Otimização de método para medição seletiva de compostos carbonílicos emitidos por plantas. In: 11º Encontro nacional de química analítica, 2001, Campinas.