UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MEIRE RIBEIRO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM SISTEMA
DE CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA PRESSÃO**

SÃO CARLOS

2012

MEIRE RIBEIRO DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO, AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO DE UM SISTEMA
DE CROMATOGRAFIA GASOSA DE ALTA PRESSÃO**

Dissertação apresentada ao Instituto
de Química de São Carlos da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração:
Química Analítica

Orientador:
Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2012

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao
Usuário do SBI/IQSC*

Silva, Meire Ribeiro da

Desenvolvimento, avaliação e aplicação de um sistema de cromatografia
gasosa de alta pressão. / Meire Ribeiro da Silva. -- São Carlos, 2012.
102 p.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos /
Universidade de São Paulo, 2012.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

1. Cromatografia gasosa. 2. Coluna capilar empacotada. 3.
Cromatografia gasosa de alta pressão. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

DEDICATÓRIA

À minha família. Ao meu pai pelo exemplo de superação e determinação; à minha mãe exemplo de dedicação e carinho e ao meu irmão pelo ombro amigo em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Ao Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pela orientação e pelo incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos diretores e funcionários do Instituto Internacional de Cromatografia (IIC) e NST pelo auxílio e por ceder prontamente os tubos capilares, fases estacionárias e colunas.

Ao Dr. Esmeraldo Aparecido Cappelaro pelo conhecimento transmitido e ajuda em algumas etapas deste trabalho.

Aos funcionários da oficina mecânica do IQSC pela ajuda, conhecimento transmitido e pelo trabalho de qualidade realizado.

Ao Alexandre Cruz pela disponibilidade para auxiliar na resolução dos problemas instrumentais.

Aos amigos Carlos, Maraíssa, Raquel e Paulo pelo apoio, discussões e ajuda mesmo com medo da pressão utilizada no sistema instrumental.

À Odete Milão pela ajuda e incentivo.

Aos amigos do CROMA pelos conhecimentos transmitidos, momentos de descontração e apoio durante a realização deste trabalho.

À Prof. Dr^a Ivani A. Carlos, aos meus amigos do QUB 04 e aos amigos da CBA que me incentivaram na escolha pela área acadêmica.

À CAPES, ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro concedido durante o mestrado.

RESUMO

A cromatografia é uma técnica de separação cuja classificação se dá por meio do estado físico da fase móvel (líquido, gasoso, supercrítico, entre outros). Dentre as técnicas cromatográficas mais utilizadas e cujo conhecimento é bastante conhecido está a cromatografia gasosa. Embora esta técnica tenha sido bastante estudada existem ainda algumas vertentes que não totalmente estudadas, sendo uma delas a cromatografia gasosa de alta pressão na entrada da coluna (HIPGC). A HIPGC destaca por oferecer vantagens analíticas como alta eficiência, maior velocidade no tempo de análise e também facilita a migração de compostos com alta massa molecular. As desvantagens e dificuldades estão concentradas na instrumentação. O uso de alta pressão requer conexões que suportem tal pressão, sistema de injeção adequado a fim de eliminar vazamentos entre outros. Neste trabalho, sucessivos sistemas instrumentais foram montados visando o desenvolvimento, aprimoramento e avaliação de um sistema instrumental simples e versátil para HIPGC. Na avaliação do sistema foi utilizada coluna capilar empacotada pelo método “slurry packed”. A escolha da coluna foi realizada a partir de curvas de eficiência de Van deemter. O sistema instrumental desenvolvido para HIPGC é apropriado para pressões de entrada de até 1800 psi. Além disso, este sistema apresentou boa reprodutibilidade nas análises e não apresentou vazamentos. Os resultados mostraram o potencial da técnica HIPGC na redução do tempo de análise.

ABSTRACT

Chromatography is a separation technique whose classification takes place by means of the physical state of the mobile phase (liquid, gas, supercritical, etc.). Among the most commonly used chromatographic techniques and whose knowledge is well known is gas chromatography. Although this technique has been widely exploited there are some topics which weren't fully investigated, one of them being high-pressure chromatography column input (HIPGC). HIPGC shows analytical advantages as high efficiency, faster analysis time and facilitates the migration of compounds with high molecular mass. The main difficulties in HIPGC are found in the instrumentation. The high pressure requires an appropriate connection that works in this range of pressure and one injection system suitable to transport the sample at different pressures. In this work, different instrumental systems were assembled to develop equipment to HIPGC that is simple and versatile. In the system evaluation was used capillary columns packed by methodology's "slurry packed" were used. The choice of the column was made from van Deemter efficiency curves. The system developed for instrumental HIPGC it is appropriate for inlet pressures up to 1800 psi. Furthermore, this system showed good reproducibility of analysis and didn't show leaks. The results showed the potential of HIPGC, such as shorter analysis time.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Levantamento das publicações em instrumentação analítica no período de 2000 a 2012.....	15
Figura 2 – Esquema de um sistema para cromatografia gasosa de alta pressão [19]....	21
Figura 3 – Desenho da válvula proposta por German e Heynen: A – disco de aço inox, B – plástico de vedação, C – corpo da válvula(aço inox), D – entrada da amostra, E – tomada de amostra, F – canal de amostra, G – canal do gás portador, H – câmara da amostra e J – eixo. Adaptado de [21].....	22
Figura 4 – Esquema do sistema proposto por Huber <i>et. al.</i> [22].....	23
Figura 5 – Esquema de sistema proposto por KWA: 1 e 12 – fornecimento de gás a alta pressão, 13 e 14 – injetor de alta pressão, 16 e 18 - coluna de GC no modo criostático-termostático, 1 – gás de arraste, 2 – válvula de controle, 3 – regulador de pressão, 4 – indicador de baixa pressão, 5 – compressor de gás, 6 - timer pulse, 7 – manômetro diferencial, 7A – Cavidade alta (29,5 cm ³), 7B – cavidade baixa (0.6 cm ³), 8 – válvula de controle, 9 – indicador de alta pressão, 10 – válvula de controle, 11- indicador de alta pressão, 12 – tampão gasoso volume 600 cm ³ , 13 – válvula de precisão miniaturizada (injetor), 14 – câmara de amostra, 15 - válvula de precisão miniaturizada (injetor), 16 – coluna de GC, 17 – gás propellor, 18 – controlador de temperatura, 19 - válvula de precisão miniaturizada - válvula de expansão para alta pressão (3000 – 1 atm), 20 – detector de ionização de chama e 21- registrador [24].....	24
Figura 6 – Esquema da válvula de injeção proposto por KWA [24].....	25
Figura 7 – Diagrama das aplicações de GC e LC de acordo com a polaridade e massa molecular dos compostos.....	26
Figura 8 – Esquema simplificado de um sistema de empacotamento com partículas em suspensão destinado ao preparo de colunas capilares. (a) cilindro de gás, (b) reservatório do solvente de empacotamento, (c) bomba amplificadora pneumática, (d) válvulas, (e) conexão em T, (f) reservatório de partículas em suspensão, (g) tubo capilar e (h) restritor (tubo de sílica fundida) [46].....	32

Figura 9 - Cromatograma ilustrando os vários parâmetros obtidos em uma análise típica [47]	34
Figura 10 – Fotografia do sistema instrumental 1	40
Figura 11 – Desenho esquemático do sistema de pressurização do gás de arraste.....	41
Figura 12 – Desenho esquemático do sistema de controle de fluxo	42
Figura 13 – Fotografia do sistema instrumental 2.....	43
Figura 14 – Desenho esquemático do sistema instrumental 2.....	44
Figura 15 – Fotografia do sistema instrumental 3.....	45
Figura 16 – Desenho esquemático do sistema instrumental 3.....	46
Figura 17 – Desenho esquemático do sistema instrumental 4.....	47
Figura 18 – Desenho esquemático do sistema instrumental 4.....	48
Figura 19 – Fotografia do sistema instrumental 5.....	49
Figura 20 – Desenho esquemático do sistema instrumental 5.....	50
Figura 21 – <i>Booster</i> . (a) Figura esquemática da configuração do <i>booster</i> . (b) Foto ilustrativa de um <i>booster</i> comercial	54
Figura 22 - Sistema de pressurização desenvolvido.....	55
Figura 23 – Desenho esquemático do controle de pressão do GC.....	56
Figura 24 – Desenho esquemático do funcionamento do controle de pressão do GC 17A.....	57
Figura 25 – Controle de pressão do sistema HIPGC. (a) Isolamento do sistema de controle de pressão do GC 17A e (b) Janela do software <i>work station</i> apresentando os valores de fluxo e pressão fixados no sistema de HIPG.....	59
Figura 26 – Válvula micrométrica. (a) Desenho esquemático da válvula micrométrica. (b) Foto ilustrativa da válvula micrométrica HOKE série 1600 utilizada no sistema...	60
Figura 27 - Desenho das modificações no sistema de introdução de amostra. (A) dispositivo de injeção modificado, (B) e (C) diferentes vistas da peça usinada.....	62
Figura 28 – Imagem das peças usinadas em diferentes vistas.....	63
Figura 29 - Diagrama de fluxo x pressão de entrada da coluna cromatográfica, utilizando N ₂ como gás de arraste. (a) Diagrama do GC-17 A, obtido utilizando coluna	

30 m x 0,32 mm x 0,5 μm . (b) Diagrama do sistema instrumental I, obtido utilizando coluna 25 m x 0,32 mm x 0,1 μm NST-5.....	64
A variação do fluxo da purga varia dependendo da pressão de entrada da coluna. No intervalo de pressão da entrada da coluna fixado de 0 – 2000 psi, a taxa de fluxo da purga variou de 0 – 5 L . min ⁻¹ (Figura 30)......	64
Figura 31 – Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexano (b), hexeno (c), n-octano (d) e decalina (e). Condições: coluna empacotada 100 cm x 250 μm d.i x 5 μm C18, Fase móvel N ₂ 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C.....	68
Figura 32 – Desenho esquemático das etapas da introdução da amostra em elevadas pressões.	69
Figura 33 – Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexeno (b), hexano (c), n-octano (d) e decalina (e) com a injeção utilizando seringa convencional(-) e com seringa <i>gastight</i> (-). Condições: coluna empacotada 100 cmx 250 μm d.i x 5 μm C18, Fase móvel N ₂ 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C.....	70
Figura 34 – Perfil cromatográfico do n-octano em diferentes tempos de acionamento da válvula (a) 2 s,(b) 6 s e (c) 10 s. Condições: coluna empacotada 100 cmx 250 μm d.i x 5 μm C18, Fase móvel N ₂ 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C.....	72
Figura 35 – Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexeno (b), hexano (c), n-octano (d) e decalina (e) com a injeção utilizando válvula de HPLC(-) e com seringa (-).Condições: coluna empacotada 100 cm x 250 μm d.i x 5 μm C18, Fase móvel N ₂ 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C.....	73
Figura 36 – Perfil cromatográfico com <i>liner</i> de SPME (-) e com <i>liner</i> de <i>splitless</i> (-).75	
Figura 37 - Válvula acoplada ao injetor.....	77
Figura 38 – Variação do w_{bb} em função da pressão do gás auxiliar (N ₂).....	78
Figura 39 – Anilhas de PTFE para agulha ser fixada na válvula de injeção. (a) Anilha de PTFE deformada devido à pressão e (b) Anilha de PTFE não deformada.....	78
Figura 40 – Modificação do êmbolo da seringa. (a) Plugue da seringa <i>gastight</i> comercial e (b) Plugue com as dimensões modificadas.....	80

Figura 41 – Dispositivo de fixação da seringa (a), (b), (c), (d) e (e) diferentes vistas do dispositivo	81
Figura 42 - Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexeno (b), hexano (c), n-octano (d) com a injeção utilizando seringa sem modificação (-) e com modificação (-). Condições: coluna empacotada 100 cm x 250µm d.i x 5µm C18, Fase móvel N ₂ 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C.....	82
Figura 43 - Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexeno (b), hexano (c), n-octano (d) com a injeção utilizando seringa com modificação em injeções sucessivas de 1µL. Condições: coluna empacotada 100 cm x 250µm d.i x 5µm C18, Fase móvel N ₂ 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C.....	83
Figura 44 – Curva de van Deemter em diferentes pressões para coluna capilar de 250 µm x 20 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3,0 µm.....	84
Figura 45 - Curva de van Deemter em diferentes pressões para coluna capilar de 250 µm x 12 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3,0 µm.....	85
Figura 46 - Cromatogramas típicos de uma mistura de hidrocarbonetos (C9 – C12) em pressões de entrada da coluna cromatográfica de (a)1500 psi e (b)2000 psi. Condições: coluna empacotada 20 cm x 250µm d.i x 3 µm C18, Fase móvel N ₂ , temperatura da coluna de 90°C.....	85
Figura 47 – Gráfico da relação entre pressão de entrada da coluna e tempo de retenção.....	86
Figura 48 - Perfil dos cromatogramas de gasolina (a) e diesel (b) no sistema instrumental de HIPGC desenvolvido	87
Figura 49 – Cromatograma de triacilglicerídeos do biodiesel.....	88
Figura 50 – Padrão biodiesel (B100) da ASTM [51].....	88
Figura 51 – Cromatograma de Ibuprofeno	89
Figura 52 – Controle de fluxo do GC 17A	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variação das dimensões do restritor de fluxo.....	66
Tabela 2 – Variação do comprimento do restritor de fluxo x Pressão de entrada da coluna.....	67
Tabela 3 – Variação do tempo de retenção em função da pressão de entrada da coluna	68
Tabela 4 – Otimização das dimensões do plugue do êmbolo.....	80
Tabela 5 – Avaliação da modificação da seringa	81

LISTA DE ABREVIACES

SFC	Cromatografia a Fluído Supercrítico
UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Pressão
UPSFC	Cromatografia com fluído supercrítico de alta pressão
GC	Cromatografia Gasosa
LC	Cromatografia Líquida
HRGC	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
SGC	Cromatografia a Gás Solvatante
HPGC	Cromatografia Gasosa de Alta pressão
HIPGC	Cromatografia Gasosa de alta pressão na entrada
HIPMC	Alta Pressão de Entrada em Micro Coluna
HT-GC	Alta Temperatura - Cromatografia Gasosa
MS	Deteccão por espectrometria de massa
(Py)-GC	Pirólise - Cromatografia Gasosa
THM-GC	<i>Thermochemolysis</i>
FID	Detector por ionização em chama
o.d	Diâmetro externo
d.i	Diâmetro interno
PTFE	Politetrafluoretileno
Cv	Coefficiente de vazão

LISTA DE SIMBOLOS

t_m	Tempo Morto
t_r	Tempo de Retenção
t_r'	Tempo de Retenção Ajustado
R	Resolução
w_{b1}	Largura da base do pico
w_{b2}	Largura da base do pico
k	Fator de Retenção
α	Fator de Separação
N	Número de Pratos
H	Altura Equivalente a um prato
L	Comprimento da coluna cromatográfica
h	Altura reduzida do prato
d_p	Diâmetro da partícula
u	Velocidade linear média da fase móvel
D_m	Coeficiente de difusão do analito na fase móvel

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	Contexto da instrumentação analítica na atualidade	15
1.2	A cromatografia e suas vertentes	16
1.3	Cromatografia gasosa a elevada pressão.....	18
1.4	Histórico da instrumentação em HIPGC.....	20
1.5	Estratégias utilizadas para ampliação da faixa de massa molecular	26
1.5.1	- Alta temperatura em GC (HT-GC)	27
1.5.2	- Derivatização	28
1.5.3	- Pirólise	28
1.5.4	- <i>Thermochemolysis</i>	29
1.6	O efeito de pressões elevadas em cromatografia	30
1.7	Fundamentos teóricos.....	31
1.7.1	Colunas	31
1.7.1.1	Empacotamento com partículas em suspensão	32
1.7.2	Parâmetros cromatográficos	33
1.8	Instrumentação.....	37
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Reagentes	40
3.2	Instrumentação.....	40
3.2.1	Sistema instrumental I	40
3.2.1.1	Sistema de pressurização do gás de arraste.....	41
3.2.1.2	Sistema de controle de fluxo	42
3.2.2	Sistema Instrumental II	43

3.2.2.1	Sistema de controle de fluxo	44
3.2.3	Sistema instrumental 3	45
3.2.3.1	Sistema de controle de fluxo	46
3.2.4	Sistema instrumental 4	47
3.2.4.1	Sistema de controle de fluxo	48
3.2.5	Sistema instrumental 5	49
3.2.5.1	Sistema de controle de fluxo	50
3.3	Preparo de colunas	51
3.3.1	Material Utilizado	51
3.3.2	Preparo das estruturas colunas capilares	51
3.3.3	Método de empacotamento	52
4	Resultados e discussões.....	53
4.1	sistema instrumental I	53
4.1.1	Pressurização do gás de arraste	53
4.1.2	Sistema de controle de pressão	56
4.1.3	Sistema de controle de fluxo	57
4.1.4	Sistema de introdução da amostra	61
4.1.5	Avaliação do sistema instrumental I	63
4.1.5.1	Fluxo total.....	63
4.1.5.2	Fluxo da purga	64
4.1.5.3	Estanqueidade do sistema.....	65
4.1.5.4	Restritor de fluxo	66
4.1.5.5	Aquisição de dados.....	67
4.1.5.6	Testes realizados em condições reais de uso	68
4.2	Sistema instrumental 2.....	71

4.2.1.1	Sistema de injeção.....	71
4.2.2	Avaliação do sistema 2	71
4.2.2.1	Tempo de acionamento da válvula de injeção.....	71
4.2.2.2	Testes realizados em condições reais de uso	72
4.3	SISTEMA INSTRUMENTAL 3.....	74
4.3.1	Avaliação do sistema instrumental	74
4.3.1.1	Otimização da substituição do liner	74
4.4	SISTEMA INSTRUMENTAL 4.....	76
4.4.1	Avaliação do sistema instrumental	76
4.4.1.1	Sistema de introdução da amostra	76
4.4.1.2	Otimização da pressão do gás auxiliar.....	77
4.5	Sistema instrumental 5.....	79
4.5.1	Avaliação do sistema instrumental	79
4.5.1.1	Modificações no êmbolo da seringa.....	79
4.5.1.2	Dispositivo de fixação da seringa.....	80
4.5.1.3	Otimização da seringa.....	81
4.5.1.4	Testes realizados em condições reais de uso	82
5	CONCLUSÃO	90
6	PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	91
7	Anexo.....	92
7.1	Controle de fluxo do GC-17A	92
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO DA INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA NA ATUALIDADE

Atualmente, o avanço científico, a inovação da tecnologia, da instrumentação e dos métodos analíticos tornam-se necessários para enfrentar os desafios que se impõem nas mais diversas áreas do conhecimento (como por exemplo, a ambiental, biológica, controle de qualidade de produtos, processos farmacêuticos, petroquímicos, entre outros) bem como o interesse ao desenvolvimento econômico e social.

Após os trabalhos pioneiros em instrumentação analítica, esta linha de pesquisa tem sido alvo de muitas publicações. A Figura 1, apresenta um gráfico estatístico com a evolução das publicações nos últimos anos, mostrando que o tema instrumentação analítica está em constante crescimento provavelmente, devido à necessidade em se obter sistemas com maior resolução e sensibilidade, que proporcionem simultaneamente, menor tempo de análise e redução de custos.

Figura 1 Levantamento das publicações em instrumentação analítica no período de 2000 a 2012.

Os sistemas cromatográficos que utilizam alta pressão têm-se destacado nos últimos anos por permitirem análises rápidas e com menor consumo de fase móvel,

além de possibilitarem o uso de colunas empacotadas com partículas pequenas (menores que 5 μm) e colunas de menor comprimento, sem perder em eficiência.

A utilização de pressão elevada foi investigada no período em que as técnicas cromatográficas estavam sendo consolidadas, surgindo algumas vertentes entre as décadas de 70 e 80, como por exemplo, a cromatografia gasosa a alta pressão e a cromatografia com fluido supercrítico (SFC), que foram pouco exploradas devido aos problemas instrumentais encontrados. Somente com os avanços tecnológicos nas últimas décadas foi possível desenvolver válvulas, conexões, bombas, sistemas de injeção de amostra destinados à alta pressão. Assim surgiram sistemas disponíveis comercialmente como o UHPLC (*Ultra High Pressure Liquid Chromatography*), SFC e UPSFC (*Ultra Pressure Supercritical Chromatography*).

Diante deste cenário de vantagens e de avanço tecnológico, o uso de elevada pressão em sistemas cromatográficos deve ser amplamente difundido, explorando a aplicação em diferentes matrizes a fim de se demonstrar as áreas em que estas técnicas mais se adequam. Além de tornar possível a investigação das vertentes da cromatografia que foram estagnadas, devido à indisponibilidade de dispositivos para alta pressão como no caso da cromatografia gasosa com alta pressão.

1.2 A CROMATOGRAFIA E SUAS VERTENTES

A teoria da cromatografia e sua prática foram desenvolvidas ao longo de décadas. Os primeiros trabalhos envolvendo cromatografia foram publicados em 1906 por Michael Tswett, um botânico russo, o qual separou algumas substâncias de extratos de plantas [1]. A partir desta data a técnica tomou proporções cada vez maiores quanto às variações da fase móvel como também na forma instrumental, surgindo primeiramente a cromatografia gasosa (GC) e posteriormente a cromatografia líquida (LC).

Ambas técnicas, GC e LC, são amplamente utilizadas nas mais diversas áreas de aplicação em laboratórios de todo o mundo. São técnicas que ao mesmo tempo são complementares e concorrentes, visto que há um número significativo de aplicações

que podem ser igualmente resolvidas por ambas, porém em outras aplicações uma das técnicas é preferível à outra, devido às limitações que cada uma apresenta.

A cromatografia gasosa é mais conhecida, difundida e consolidada, quando comparada à LC, sendo uma técnica de separação importante para análises quantitativa e qualitativa de uma vasta gama de compostos. Trata-se de uma técnica rápida e sensível, que permite a combinação de uma variedade de detectores seletivos incluindo a detecção por espectrometria de massas. No entanto, a área de aplicação de GC é limitada às moléculas termicamente estáveis e suficientemente voláteis. Sendo assim, há inúmeros compostos que não atendem a estes requisitos e, portanto não são passíveis de análise direta em GC [2].

A LC trata-se de uma técnica versátil, visto que é possível utilizar grande número de fases estacionárias, as quais possibilitam separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência [3].

O processo de seleção entre LC e GC depende de vários critérios, tais como velocidade da análise para a metodologia a ser aplicada, e a seletividade para o composto alvo.

Diante das limitações das técnicas e os critérios de seleção entre elas a situação ideal seria desenvolver um sistema cromatográfico no qual houvesse a transferência de características da LC para o domínio da GC e vice versa, ou seja, a unificação das técnicas.

Anteriormente ao período em que as técnicas cromatográficas foram estabelecidas quanto à sua eficiência, consolidando-se inicialmente a Cromatografia Gasosa de Alta Resolução (HRGC), e posteriormente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) [4] várias vertentes das mesmas surgiram, com o intuito não somente de explorar as limitações das técnicas GC e LC, mas também de unificação das mesmas, sendo algumas destas vertentes a cromatografia supercrítica (SFC); a cromatografia gasosa a alta pressão (HPGC), cujos primeiros trabalhos surgiram na década de 60, e mais tarde a cromatografia a gás solvatante (SGC), na década de 80.

Outros exemplos de tentativas para combinar as vantagens da LC e GC incluem pesquisas direcionadas à LC com detectores de GC [5], hifenizada LC-GC [6], abrangente bidimensional LC×GC [7], e cromatografia unificada [8,9].

A maioria destas tentativas não tem sido bem sucedida, pois alguns detalhes na instrumentação devem ser melhor analisados, e por isso os métodos ainda não ganharam ampla aceitação.

1.3 CROMATOGRAFIA GASOSA A ELEVADA PRESSÃO

A cromatografia de alta pressão (do gás de arraste) foi relatada, em diferentes direções. Kobayashi *et. al.* [10-12] aplicou pressões de até 2000 psi para a avaliação de constantes físicas. Myers e Giddings [13, 14] combinou partícula pequena (<1 µm) com pressão elevada uma abordagem diferente para cromatografia em fase gasosa utilizando pressões de até 2500 psi, e, em colaboração com Manwaring [15] realizou um estudo do efeito de fluxo turbulento do gás de arraste em cromatografia de alta velocidade utilizando equipamento de alta pressão de até 2500 psi. Myers e Giddings também desenvolveram um equipamento com pressões de entrada de até 2000 psi [16]. Sie, van Beersum e Rijnders [17], também trabalharam com CO₂ como gás transportador, em 30-40 °C e até 1175 psi, no qual concluíram que com o aumento da pressão há uma queda pronunciada no coeficiente de partição permitindo que as separações sejam realizadas em temperaturas mais baixas do que o habitual.

O uso de fluídos supercríticos em cromatografia e a cromatografia gasosa com alta pressão na entrada da coluna cromatográfica *high inlet pressure gas chromatography* (HIPGC) assim denominada por Myers e Giddings em 1965, mostraram uma alternativa para estender a GC convencional, porém o sucesso dessas técnicas ficou fadado ao esquecimento durante décadas, pois devido às limitações tecnológicas não haviam dispositivos adequados para manipulações em altas pressões e em cromatografia ou quando existiam apresentavam problemas especiais de manipulação.

Embora as limitações encontradas que levaram ao comprometimento do desempenho cromatográfico os trabalhos pioneiros foram suficientes para mostrar as potencialidades dos sistemas. No caso da HIPGC que é uma extensão da GC convencional, mostrou-se bastante promissora, pois o sucesso da técnica só foi possível a partir da interação entre o gás transportador a alta pressão e da fase estacionária que não está presente nos modos convencionais de cromatografia. E a partir dessa interação foi possível verificar vantagens analíticas como alta eficiência, maior velocidade no tempo de análise, facilidade na migração de compostos com alta massa molecular, uso de fase estacionária de menor diâmetro.

Em HIPGC como os gases são submetidos ao aumento de pressões da ordem de 1000 atm acima do convencional, a densidade dos gases adquirem propriedades muito semelhantes à dos líquidos. E, estes gases podem ser incorporados em um sistema cromatográfico que, ao contrário da GC, pode analisar macromoléculas e outras espécies de baixa volatilidade. Este sistema oferece uma nova alternativa além da LC para a cromatografia de moléculas complexas.

Basicamente este sistema apresenta três grandes vantagens. Primeiro, o poder de solvatação que é função da pressão e esta pode ser rapidamente e precisamente variada ao longo do sistema por simples meios mecânicos (válvulas). Tal controle é um elemento particularmente importante em separações de macromoléculas, pois a separação em LC é normalmente conseguida por alterações na composição da fase móvel (uso de gradiente). Em segundo lugar, a viscosidade relativamente baixa e a elevada difusividade de gases densos, acelera a separação por aproximadamente dez vezes, é um ponto bastante importante levando em conta a lentidão natural para separações macromoleculares em LC. Terceiro, a detecção que é sensível e a quantificação precisa como a da GC [18].

Assim como a importância de saber as vantagens do sistema instrumental as limitações também são importantes. A instrumentação de alta pressão é complexa, cara, e de difícil manuseio em comparação aos sistemas típicos de LC, pois vazamentos ocorrem com frequência e o risco de explosões também. Outros

problemas referem-se ao fluxo instável, injeção, e detecção. Estas dificuldades refletem os poucos trabalhos encontrados na literatura mostrando o estado da arte primitivo desta nova área.

A seguir será apresentado um breve histórico sobre a evolução da HIPGC enfatizando principalmente os sistemas instrumentais desenvolvidos e mostrando os resultados das experiências com estes sistemas.

1.4 HISTÓRICO DA INSTRUMENTAÇÃO EM HIPGC

Um dos primeiros trabalhos utilizando cromatografia gasosa de alta pressão (HIPGC) foi desenvolvido por Myers e Giddings em 1965. Construiu-se um equipamento composto por um detector de ionização de chama “home-made” conectado a um eletrômetro GC-4 Beckman, um sistema de injeção constituído por tubos capilares e válvulas de alta pressão com baixo volume interno, um regulador de pressão e um de *split* para controlar a quantidade de gás que passa para o detector, conforme o esquema apresentado na Figura 2.

As características básicas das colunas empacotadas utilizando pressões de entrada na coluna de até 2500 psi e comprimento de até 4m foram estudadas, obtendo mais de um milhão de pratos teóricos em alguns casos. Vários parâmetros da coluna foram examinados utilizando metano e butano sobre uma ampla faixa de pressão, incluindo a altura do prato teórico, a redução do número de pratos teóricos, a altura de pratos teóricos por segundo, entre outros [19].

Figura 2 – Esquema de um sistema para cromatografia gasosa de alta pressão [19].

Em 1968 Myers e Giddings utilizando o sistema instrumental anteriormente descrito (Figura 2) desenvolveram um trabalho que combinava a vantagem das altas pressões, partículas pequenas e colunas com diâmetro pequeno o qual denominaram de alta pressão de entrada em micro coluna (HIPMC). A partir do estudo utilizando 15 colunas empacotadas com vários materiais com pressões de entrada de 2500 psi e partículas de pequeno diâmetro, obtiveram altura de pratos teóricos reduzidos abaixo de 0,082 mm (com partículas de 13 μm) [20].

Tempo depois Myers *et. al.* em seu trabalho sobre cromatografia em alta pressão utilizando alta pressão de espécies não voláteis, apresentou as dificuldades instrumentais que até então não tinham sido descritas claramente. Além disso, a SFC estava despontando como uma nova alternativa e, portanto discutiu-se também a influência da pressão na densidade dos gases. Dentre estas características, destaca-se a dificuldade encontrada na instrumentação HIPGC, por ser complexa, cara e difícil de manusear [18]. As principais dificuldades foram:

- Vazamentos: são freqüentes em sistemas de alta pressão, explosões também são conseqüência, por isso deve-se tomar muito cuidado ao realizar trabalhos com este tipo de sistema [18].

- A alta pressão de injeção: é um problema único, porque basicamente a injeção é a transferência de uma pequena quantidade de material para a entrada da coluna, portanto é uma transferência contra a pressão. Este tipo de transferência é realizada utilizando seringas, isto para pressões de 14.7 psi ou mais, mas no caso de pressões muito elevadas, como mil vezes maior, preocupa-se com a forma em que a amostra será conduzida até a coluna devido à força proveniente da elevada pressão, que aumenta a tendência do fluido da fase móvel a sair do injetor [18].

Diante das dificuldades encontradas para injeção de amostras em HIPGC e também no interesse em desenvolver a cromatografia a fluído supercrítico que havia sido iniciado na década de 60, German e Heynen (1971) desenvolveram uma válvula de amostragem para o uso em cromatografia gasosa adaptada para altas pressões e altas temperaturas, conforme Figura 3. A válvula possuía a capacidade de funcionar em pressões de até 1067 psi ou temperaturas de até 300 °C [21].

Figura 3 – Desenho da válvula proposta por German e Heynen: A – disco de aço inox, B – plástico de vedação, C – corpo da válvula(aço inox), D – entrada da amostra, E – tomada de amostra, F – canal de amostra, G – canal do gás portador, H – câmara da amostra e J – eixo. Adaptado de [21]

No ano de 1975 Huber *et. al.* desenvolveram uma nova face instrumental para a HIPGC. Estudou-se a redução do prato teórico em cromatografia gasosa através do aumento da pressão e a diminuição do tamanho da partícula de empacotamento da coluna. O sistema instrumental utilizado era constituído por coluna facilmente substituída, unidade de amostragem de alta pressão, um detector de condutividade

térmica, um banho termostatzado para a coluna, dispositivo para amostragem e o detector, conforme Figura 4. A pressão era controlada por um controlador de pressão, após o controlador de pressão do gás de arraste, a corrente do gás era dividida em duas correntes, a primeira transportava o fluxo do gás de arraste para a célula de referência do detector e a segunda direciona o fluxo do gás de arraste para o sistema de injeção. O dispositivo de injeção era uma válvula de alta pressão (Valco CV-6- μ HPa) que suportava até 145 psi. Os resultados experimentais foram explicados com base na altura no prato teórico (curvas de van Deemter) e obtiveram número de prato teórico máxima por metro de coluna de 10.000 [22].

Figura 4 – Esquema do sistema proposto por Huber *et. al.* [22].

Huber *et. al.* utilizando o sistema instrumental para HIPGC anteriormente descrito (Figura 4) desenvolveu aplicação utilizando colunas de diâmetro interno 1.0 mm, colunas empacotados com partículas porosas (abaixo de 60 μ m) e fases estacionárias polares e apolares. Neste estudo obtiveram uma relação linear entre o número de pratos teóricos e o comprimento da coluna, 55.000 pratos teóricos utilizando a pressão de entrada na coluna de 638 psi e comprimento de coluna de 6m. Este trabalho destaca-se por apresentar um nomograma para as colunas obtidas, ou

seja, um diagrama no qual com base na pressão de entrada na coluna, escolhe-se o diâmetro da partícula de empacotamento e entre outros parâmetros [23].

KWA em 1983 desenvolveu um sistema instrumental para HIPGC para medidas isobáricas e isotérmicas. A Figura 5 mostra um sistema instrumental bastante complexo.

Figura 5 – Esquema de sistema proposto por KWA: 1 e 12 – fornecimento de gás a alta pressão, 13 e 14 – injetor de alta pressão, 16 e 18 - coluna de GC no modo criostático-termostático, 1 – gás de arraste, 2 – válvula de controle, 3 – regulador de pressão, 4 – indicador de baixa pressão, 5 – compressor de gás, 6 - timer pulse, 7 – manômetro diferencial, 7A – Cavidade alta (29,5 cm³), 7B – cavidade baixa (0,6 cm³), 8 – válvula de controle, 9 – indicador de alta pressão, 10 – válvula de controle, 11- indicador de alta pressão, 12 – tampão gasoso volume 600 cm³, 13 – válvula de precisão miniaturizada (injetor), 14 – câmara de amostra, 15 - válvula de precisão miniaturizada (injetor), 16 – coluna de GC, 17 – gás propellor, 18 – controlador de temperatura, 19 - válvula de precisão miniaturizada - válvula de expansão para alta pressão (3000 – 1 atm), 20 – detector de ionização de chama e 21- registrador [24].

Neste sistema o injetor de alta pressão (Figura 6) e o uso de válvulas de precisão miniaturizadas se destacam, pois comparando-se com os sistemas anteriores pode-se considerar um sistema mais robusto, porém de difícil utilização [24].

Figura 6 – Esquema da válvula de injeção proposto por KWA [24]

Neste sistema com o uso da válvula de injeção (Figura 6) a precisão da pressão da coluna foi melhorada em cerca de duas ordens de magnitude em comparação com investigações anteriores sem o uso de válvulas para injeção [24].

A partir deste levantamento bibliográfico, nota-se que a HIPGC é uma vertente da GC deixada no esquecimento, pois os trabalhos mais recentes datam da década de 80. Embora este fato, é possível verificar que houve evolução principalmente no que diz respeito à instrumentação, inicialmente na década de 60 utilizavam-se válvulas e reguladores de pressão simples e já na década de 80 utilizavam-se válvulas de precisão miniaturizadas. Apesar da evolução nas válvulas, o modo de injeção da amostra não foi bem definido, pois encontram-se trabalhos que se utilizam de válvulas de introdução de amostra [18 - 24] e outros utilizam-se seringas [25]. Esta falta de definição se deve provavelmente a vazamentos provocados pela elevada pressão ou falta de resistência dos dispositivos para esta faixa de pressão dos sistemas instrumentais desenvolvidos, entre outros fatores.

Diante deste cenário bastante instigante é possível desenvolver um sistema de instrumentação utilizando-se da combinação dos trabalhos em HIPGC já descritos com os avanços na área cromatográfica e a tecnologia disponível para a instrumentação analítica.

Atualmente, existem várias opções de válvulas, reguladores de pressão para instrumentação analítica o que reforça o objetivo de trabalhar com sistema de alta

pressão. Portanto, o desenvolvimento de um sistema para HIPGC com uma tecnologia mais robusta torna-se viável. Sendo assim, será possível sanar alguns dos problemas instrumentais utilizando como base as novas abordagens na área da cromatografia (UHPLC e UPSFC) e também será possível verificar e explicar algumas das observações que foram realizadas nos trabalhos pioneiros.

1.5 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS PARA AMPLIAÇÃO DA FAIXA DE MASSA MOLECULAR

A área de aplicação do GC e as possibilidades para trazer mais moléculas para o âmbito da GC disponíveis atualmente são representadas esquematicamente na Figura 7

Figura 7 – Diagrama das aplicações de GC e LC de acordo com a polaridade e massa molecular dos compostos

De acordo com o esquema é possível verificar na opção via GC, que a alta temperatura (HT-GC) é a única alternativa em que as moléculas da amostra não são alteradas, mas sim as condições cromatográficas, isto se faz necessário para permitir a eluição dos compostos que em baixas temperaturas ficam totalmente retidos.

As outras rotas são aquelas que alteram ligeiramente as propriedades das moléculas como na derivatização ou então alteram-as completamente, no caso da pirólise e da *thermochemolysis*.

As estratégias apresentadas para a ampliação da faixa de massa molecular analisada por GC são as conversões de (macro) moléculas em espécies menores, e também as abordagens para reduzir a polaridade das moléculas. A seguir os

princípios das quatro opções apresentadas na Figura 7 (HT-GC, derivatização, pirólise e a *thermochemistry*) serão descritos sucintamente [2].

1.5.1 – Alta temperatura em GC (HT-GC)

Inicialmente deve-se definir a faixa de temperatura que distingue a GC convencional e a GC de alta temperatura (HT-GC), sendo assim considera-se a temperatura máxima de GC convencional 340°C e valores superiores a este podem ser considerados HT-GC. Sabe-se que esta classificação quanto à faixa de temperatura esta em constante mudança, porque os valores de temperatura são dependentes dos avanços tecnológicos no desenvolvimento de fases estacionárias.

Em GC convencional há uma vasta gama de fases estacionárias, diferentes tipos de injeção e vários dispositivos de detecção. Em HT-GC o número de fases estacionárias é reduzido, pois as colunas de sílica fundida com revestimento de poliimida utilizadas em GC convencional não podem ser utilizadas comprometendo o desempenho da coluna, além da necessidade de técnicas de injeção especiais.

Com o avanço tecnológico as colunas para elevada temperatura atuais minimizaram o sangramento, porém a diversidade de fases estacionárias como as encontradas na GC convencional ainda é menor.

Os conectores das colunas para HT-GC também é problemático devido à resistência térmica dos materiais disponíveis e ainda assim devem ser inertes caso contrário podem prejudicar a detecção.

Outro fator importante é quanto à estabilidade dos compostos para elevadas temperaturas, pois em temperaturas muito elevadas (aproximadamente 480°C) a maioria dos compostos não são estáveis. Atualmente um dos detectores mais utilizados é o MS e no caso da hifenação com HT-GC alguns problemas são encontrados.

Embora a HT-GC seja uma alternativa para ampliar a faixa de compostos analisados por GC é possível notar muitas limitações e, portanto para utilizá-la como uma alternativa esta deve ser mais explorada [25 - 27].

1.5.2 - Derivatização

Muitos dos compostos que contêm grupos polares e reativos não são suficientemente voláteis e estáveis para a análise direta por GC, e, além disso, se estes grupos polares tiverem interação com a fase estacionária ocorrerá adsorção irreversível. A técnica de derivatização química foi desenvolvida para sanar estes problemas, uma vez que várias categorias de compostos que contêm tais grupos polares não são passíveis de GC.

A derivatização refere-se ao processo de bloquear os grupos polares das moléculas para melhorar as suas características em termos de adsorvidade, volatilidade, e estabilidade. Derivatização pode também ser aplicada para conferir propriedades mais favoráveis para a detecção, para reduzir a volatilidade de espécies altamente voláteis ou para formar diastereoisômeros para separações quirais [28].

Na última década, a importância de derivatização em cromatografia tem diminuído consideravelmente. Isto é especialmente devido ao desenvolvimento de novos dispositivos de detecção com de particular importância a LC-MS e com progressos recentes em LC-MS/MS muitos dos compostos que necessitam de derivatização para torná-los adequados para o GC pode agora ser convenientemente feito com pouca preparação de amostra ou nenhuma por LC-MS [29].

A derivatização é normalmente um procedimento analítico demorado e de trabalho intensivo, é tentador substituir aplicações de GC por métodos de LC que não requerem derivatização, mesmo se o equipamento necessário é muito mais caro [30].

1.5.3 - Pirólise

Para que GC seja aplicável, as moléculas de interesse precisam apresentar algum grau de volatilidade, no caso de polímeros esta exigência não é encontrada, mas ainda assim, GC pode ser usado para estudar material polimérico, quando há um

preparo de amostra adequado. No caso de compostos poliméricos a pirólise é uma alternativa bastante usada [31, 32].

A pirólise é um método de pré-tratamento térmico amplamente utilizado no estudo de (bio) macromoléculas com GC. A configuração convencional de GC para pirólise utiliza-se um dispositivo denominado pirolisador, este é acoplado ao injetor do GC [33].

Na pirólise o material não volátil é submetido a um rápido tratamento térmico destrutivo para produzir fragmentos menores, muito mais voláteis e desta forma alcançando os limites de aplicação de GC [34].

A principal vantagem da pirólise (Py)-GC em comparação a outras técnicas analíticas requer menor preparo da amostra. Como resultado disso, o tratamento de pirólise é rápido e também há a vantagem de que o dispositivo é relativamente barato.

O grande número de publicações e da ampla gama de áreas de aplicação já indicam que a pirólise é uma poderosa ferramenta analítica. Ainda assim, a aplicabilidade de GC em combinação com a pirólise pode ser aumentada ainda mais se houvesse a possibilidade de analisar uma grande série de amostras completamente automatizadas. Além disso, o desempenho quantitativo do tratamento por pirólise deve ser melhorado e o tratamento dos dados facilitados .

1.5.4 - *Thermochemolysis*

Pirólise de macromoléculas geralmente produz uma grande variedade de espécies químicas muito diferentes na polaridade e massa molar. Para que estes compostos sejam adequados para análise por GC eles devem apresentar baixo peso molecular e polaridade.

Um problema em potencial em Py-GC são os polímeros polares que geram compostos polares durante o processo de pirólise e para superar as limitações da pirólise convencional na análise de polímeros polares, Challinor introduziu uma técnica chamada *thermochemolysis* em 1989 [35].

A *thermochemolysis* (THM-GC) é uma técnica de degradação pirolítica com derivatização *in situ*. A THM-GC é bastante utilizada em diversas áreas de aplicação, especialmente para fins de investigar misturas complexas de origem biológica e ambiental é muito útil, pois gera uma grande quantidade de informações [35, 36].

A limitação da *thermochemolysis* está na avaliação quantitativa dos pirogramas, esta desvantagem é causada pelas reações incompletas e na ocorrência de uma multiplicidade de reações secundárias causadas por diferenças na matriz e causando problemas para otimização das condições experimentais.

1.6 O EFEITO DE PRESSÕES ELEVADAS EM CROMATOGRAFIA

O efeito da pressão em função da fase móvel entre as técnicas cromatográficas, demonstrado por Taylor, Figura 8. Nota-se que há um aumento contínuo do poder de solvatação da fase móvel associada ao aumento da viscosidade e a diminuição da difusividade da mesma [37].

Figura 8 – Diagrama do efeito da pressão em função da fase móvel entre as técnicas cromatográficas [37].

Dentre as vertentes da GC que utilizam alta pressão, a HIPGC difere de outras, como a SGC e a SFC. Na HIPGC são utilizados gases leves como H_2 , N_2 e He

utilizados como fase móvel a alta pressão atuam somente como transportadores do soluto e não como gás solvatante, já que o poder de solvatação de gases leves é muito baixo quando comparado ao CO₂, por exemplo, utilizado como fase móvel em SFC.

Diferentemente na SGC e na SFC em que o gás (ou fluido) utilizado como fase móvel a alta pressão e alta temperatura (pressão subcrítica e crítica, respectivamente) atua como transportador e solvatador, solubilizando os solutos presentes [38].

Embora o efeito de solvatação de gases leves não seja tão efetivo como em SGC e SFC. Ainda assim o efeito das altas pressões mostra-se uma maneira de ampliar a faixa de compostos analisados por GC, ou seja, quando a fase móvel é submetida a pressões elevadas modifica as propriedades físico-químicas da mesma, ocorrendo um aumento da densidade do gás permitindo uma melhor transferência de massa, e assim possibilitando a análise de compostos com elevada massa molecular e, portanto amplia a faixa de compostos analisados por GC.

Shariff *et. al.* mostraram que utilizando colunas capilares empacotadas em condições abaixo das condições críticas apresentou separações com elevada eficiência na análise de hidrocarbonetos de baixo ponto de ebulição em menos de 20 min, porém a técnica ficou limitada a pressão do He de 1760 psi, pois esta pressão mostrou ser insuficiente para separação de componentes de elevado peso molecular em temperaturas menores que 150°C [39].

Sendo assim pode-se notar que se houver o aumento da pressão e o uso de colunas mais longas, ou até, aumentar a pressão e diminuir o tamanho das partículas de empacotamento será possível não somente análises mais rápidas como também permitir a análise de compostos com elevada massa molecular.

1.7 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

1.7.1 Colunas

As colunas utilizadas em GC convencional são as tubulares abertas, porém neste trabalho não serão o foco principal sendo utilizadas as colunas empacotadas que

são também conhecidas como particuladas ou recheadas. Estas colunas podem ser preparadas de diversas formas como: o empacotamento com fluido supercrítico [40 - 43], empacotamento a seco [44] e o empacotamento com partículas em suspensão [45]. Dentre estas formas de empacotamento a mais simples de ser obtida é a última.

1.7.1.1 Empacotamento com partículas em suspensão

Nesta técnica de empacotamento as partículas de fase estacionária são imersas em um solvente, de modo a formar uma suspensão. Esta é introduzida em um reservatório, ligado em uma de suas extremidades ao tubo que dará origem a coluna. A outra extremidade do reservatório conecta-se a uma bomba de alta pressão contendo um solvente apropriado, que é então purgado para promover o preenchimento da coluna cromatográfica.

A Figura 8 mostra um esquema simplificado de um sistema de empacotamento com partículas em suspensão.

Figura 8 – Esquema simplificado de um sistema de empacotamento com partículas em suspensão destinado ao preparo de colunas capilares. (a) cilindro de gás, (b) reservatório do solvente de empacotamento, (c) bomba amplificadora pneumática, (d) válvulas, (e) conexão em T, (f) reservatório de partículas em suspensão, (g) tubo capilar e (h) restritor (tubo de sílica fundida) [46].

Alguns parâmetros para realização do empacotamento devem ser otimizados tais como o solvente e a pressão de empacotamento. O solvente deve ter densidade aproximadamente igual à densidade das partículas da fase estacionária, para que estas permaneçam em suspensão durante todo o processo de empacotamento.

Vale ressaltar, que comumente utiliza-se mistura de solventes para atingir a densidade desejada, e , além disso o uso de solventes viscosos para suspensão das partículas requer a utilização de pressão mais alta durante o processo de empacotamento da coluna.

Geralmente a pressão de empacotamento é superior à pressão em que a coluna será utilizada a fim de permitir a compactação das partículas de forma mais homogênea possível, evitando a presença de espaços livres dentro da coluna ou até mesmo movimentação do recheio [46].

1.7.2 Parâmetros cromatográficos

A fim de projetar um novo equipamento em cromatografia ou até mesmo fazer modificações ou adaptações em um instrumento de cromatografia convencional para obter melhores condições cromatográficas, alguns parâmetros são necessários.

Existem parâmetros de medida que determinam se há ou não espaço para melhorias em relação à condição ótima teórica de um instrumento em particular ou de uma separação, eles também podem ser utilizados para comparar configurações instrumentais diferentes ou semelhantes.

Neste trabalho serão discutidos somente os parâmetros que influenciam diretamente na qualidade de um cromatograma obtido utilizando um instrumento modificado.

Num sistema cromatográfico, os compostos são eluídos da coluna analítica e registrados na forma de uma gaussiana. Este registro completo de todos os analitos presentes em uma amostra é denominado cromatograma, através deste são obtidas a maioria das equações para análise da separação cromatográfica, conforme Figura 9.

Figura 9 - Cromatograma ilustrando os vários parâmetros obtidos em uma análise típica [47]

Tempo de retenção

O analito leva um determinado tempo para percorrer a tubulação do sistema, desde a injeção até sua chegada ao detector, ainda não retido pela coluna, este tempo é denominado tempo morto (t_m).

O tempo de retenção (t_r) é definido como o tempo desde a injeção da amostra até a obtenção da altura máxima de um pico. Já o tempo de retenção ajustado (t_r') de um composto retido pela coluna pode ser calculado através da Equação 1.

$$t_r' = t_r - t_m \quad \text{Equação 1}$$

Resolução

A resolução (R) é a capacidade de separação de dois picos consecutivos em uma coluna.

$$R = \frac{2\Delta t_{r(1,2)}}{w_{b1} + w_{b2}} \quad \text{Equação 2}$$

onde w_{b1} e w_{b2} são as larguras das bases dos picos

Fator de retenção

O fator de retenção (k) é a relação entre o tempo em que um composto passa na fase estacionária e na fase móvel, conforme Equação 3.

$$k = \frac{t_r'}{t_m} \quad \text{Equação 3}$$

Fator de separação

O fator de separação (α) mostra a relação entre a retenção de dois picos consecutivos, sendo descrito através da Equação 4.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{r2}'}{t_{r1}'} \quad \text{Equação 4}$$

Número de pratos

O número de pratos (N) é utilizado para expressar a eficiência de uma coluna cromatográfica. O número de pratos relaciona-se com o tempo de retenção de uma analito (t_r) e a largura da base do pico (w_b) conforme a Equação 5.

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2 \quad \text{Equação 5}$$

Altura equivalente a um prato

A altura equivalente a um prato (H) permite a comparação entre a eficiência de colunas com diferentes comprimentos, já que o número de pratos depende do comprimento da coluna cromatográfica. O valor de H é obtido utilizando a Equação 6.

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Equação 6}$$

sendo L o comprimento da coluna cromatográfica.

Altura reduzida do prato

Dentre os parâmetros já mostrados a altura reduzida do prato (h) é bastante utilizada, pois permite fácil comparação quando as colunas se distinguem quanto ao

comprimento, tamanho de partícula, diâmetro, entre outros. A h pode ser obtida utilizando a Equação 7.

$$h = \frac{H}{d_p} \quad \text{Equação 7}$$

onde H é a altura equivalente a um prato e d_p o diâmetro da partícula.

Equação de van Deemter

A Equação de Van Deemter expressa a relação da eficiência de uma coluna cromatográfica que pode ser expressa numericamente através da determinação do número de pratos (N) ou da altura do prato (H) com a velocidade linear média (u) da fase móvel, conforme descrita na Equação 8.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u \quad \text{Equação 8}$$

O termo A é relacionado ao efeito dos múltiplos caminhos que o analito pode percorrer através do leito cromatográfico. Conforme mostrado na Equação 9, este termo é diretamente proporcional à qualidade do empacotamento (λ) e ao tamanho das partículas (d_p).

$$A = 2\lambda d_p \quad \text{Equação 9}$$

O termo B está relacionado à difusão longitudinal do analito, conforme a Equação 10 sendo γ uma constante relacionada ao empacotamento da coluna e D_m o coeficiente de difusão do analito na fase móvel.

$$B = 2\gamma D_m \quad \text{Equação 10}$$

Os termos C_s e C_m são relacionados ao transporte de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, podendo ser expressos pelas equações 11 e 12.

$$C_s = \frac{f_s(k)d_f^2}{D_s} \quad \text{Equação 11}$$

$$C_m = \frac{f_m(k)d_p^2}{D_m} \quad \text{Equação 12}$$

Sendo $f_s(k)$ e $f_m(k)$ funções complexas do fator de retenção k , d_f a espessura da fase estacionária, d_p o diâmetro da partícula, D_s e D_m o coeficiente de difusão do analito na fase estacionária e na fase móvel, respectivamente [46, 47].

1.8 INSTRUMENTAÇÃO

Na atualidade, com o surgimento de equipamentos que utilizam alta pressão (UHPLC e UPSFC) a instrumentação requerida para manipulação em elevadas pressões pode ser encontrada facilmente, embora o custo ainda esteja elevado. A configuração de um sistema para HIPGC pode ser considerada relativamente simples, sendo composta basicamente por um sistema de pressurização do gás de arraste, injetor para elevada pressão, forno, coluna analítica, detector e um sistema de aquisição de dados. Algumas considerações sobre as diferentes partes de um sistema para HIPGC serão brevemente expostas.

Sistema de pressurização da fase móvel: o sistema de pressurização do gás de arraste deve ser capaz de operar com estabilidade na faixa de fluxo de apenas poucos mL por minuto. Atualmente, as possibilidades para bombeamento de gases são os *booster* e os amplificadores de pressão que são extremamente caros e para manter o fluxo estável deve-se aliar a estes válvulas e reguladores de pressão.

Tubulações e conexões: o uso de tubulações deve ser dimensionado adequadamente, pois a variação do diâmetro interno da tubulação pode provocar o alargamento da banda cromatográfica. As conexões devem ser evitadas ao máximo,

pois podem ser pontos de vazamentos e, além disso, quando utilizadas requerem o emprego de peças apropriadas para alta pressão.

Injetores: em HIPGC a pressão de entrada é elevada quando comparada à GC convencional, neste caso o uso do dispositivo convencional de injeção em GC não é viável. Sendo assim, é necessário realizar modificações no injetor a fim de suportar altas pressões, ou até mesmo, fazer o uso de válvulas de injeção de LC, porém essas possibilidades devem apresentar uma boa repetibilidade não somente para análises quantitativas como qualitativas também.

Coluna analítica: as colunas empacotadas são pouco utilizadas em GC devido à baixa eficiência quando comparadas às colunas tubulares abertas, porém para sistemas com elevada pressão o uso de colunas empacotadas se faz necessário, pois com o uso de elevada pressão pode-se utilizar colunas empacotadas com partículas pequenas ($>1\ \mu\text{m}$) e mais curtas obtendo elevada eficiência e menor tempo de análise apresenta uma grande vantagem.

Detectores: dentre os comercialmente disponíveis, os detectores de massas e o FID podem ser considerados os mais adequados para a HIPGC. Os detectores de massas têm-se destacado por apresentarem boa sensibilidade e permitirem fácil acoplamento com sistemas cromatográficos, porém o custo ainda é relativamente alto. O uso de FID é uma alternativa para a utilização de detectores mais simples e de baixo custo, além de apresentam como principal vantagem a alta sensibilidade e também por ser um detector universal.

Sistema de aquisição de dados: os sistemas desenvolvidos para adquirir dados em GC podem ser empregados em HIPGC. Contudo os sistemas convencionais de aquisição de dados não podem ser considerados apropriados a HIPGC, pois um sistema adequado para aquisição de dados deve ser capaz de aumentar a frequência de aquisição do sinal analítico.

2 OBJETIVOS

Considerando as vantagens da cromatografia gasosa de alta pressão utilizando coluna capilar empacotada, busca-se melhorar algumas características instrumentais como o modo de introdução de amostra, e sanar os vazamentos desenvolvendo as modificações mecânicas necessárias.

Dentre as etapas de desenvolvimento do sistema instrumental está a modificação do injetor, a qual tem a finalidade de:

- permitir a injeção de amostras em altas pressões sem vazamentos;
- evitar a utilização de dispositivos extremamente complexos e caros;
- facilitar a substituição do dispositivo original pelo modificado possibilitando analisar amostras no sistema convencional de GC como também em altas pressões.

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento e aprimoramento de um sistema instrumental simples e versátil para cromatografia gasosa de alta pressão tornando possível analisar as potencialidades do sistema a fim de analisar compostos com elevada massa molecular, normalmente analisado por HPLC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

- O padrão analítico de ibuprofeno foi adquirido da Sigma (Steinheim, Alemanha).
- O biodiesel de óleo de soja (Cargill, Mairinque, Brasil)
- O padrão analítico de C9-C12 foi adquirido da Sigma (Steinheim, Alemanha).
- Solvente pentano e hexano (MALLINCKRODT)

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Foram realizados diferentes arranjos visando um sistema de HIPGC. Os diferentes arranjos (sistemas 1, 2, 3 e 4) serão descritos a partir de desenhos esquemáticos seguidos de numerações correspondentes à composição do sistema.

3.2.1 Sistema instrumental I

A Figura 10 ilustra o primeiro sistema desenvolvido. O sistema foi montado em duas partes, a primeira responsável pela pressurização do gás de arraste e a segunda pelo controle de fluxo de todo o sistema. A descrição dos componentes utilizados no sistema está descrita nos desenhos esquemáticos Figura 11 e 12.

Figura 10 – Fotografia do sistema instrumental 1

3.2.1.1 Sistema de pressurização do gás de arraste

Figura 11 – Desenho esquemático do sistema de pressurização do gás de arraste

Componentes

1. Cilindro de gás (N_2) acoplado ao seu respectivo regulador de pressão
2. Cilindro de gás (N_2) acoplado ao seu respectivo regulador de pressão
3. Tubo de aço inoxidável 1 / 4" o.d.
4. Válvula de retorno
5. Conexão T
6. Cilindro de gás vazio
7. Válvula de retenção
8. Regulador de pressão

3.2.1.2 Sistema de controle de fluxo

Figura 12 – Desenho esquemático do sistema de controle de fluxo

Componentes

1. Manômetro
2. Válvula micrométrica
3. Conexão T
4. Válvula de três vias
5. Filtro para gás (fase móvel)
6. Trap (fluxo da purga)
7. Trap (fluxo do *Split*)
8. Buffer
9. Dispositivo do injetor modificado
10. Porta de injeção – *liner* utilizado: *liner split*
11. União em aço inox (Valco)
12. Tubo capilar (restritor)
13. Coluna capilar empacotada
14. Detector FID

15. Cromatógrafo a gás , Shimadzu modelo 17 A

Toda a tubulação utilizada no sistema de controle de fluxo foi de aço inoxidável com 1 / 16" od.

A aquisição de dados foi obtida utilizando um microcomputador.

3.2.2 Sistema Instrumental II

A Figura 13 ilustra o esquema do segundo sistema desenvolvido. O sistema de pressurização foi o mesmo utilizado no sistema instrumental 1; o desenho esquemático (Figura 14) descreve os componentes utilizados no controle de fluxo do sistema instrumental II.

Figura 13 – Fotografia do sistema instrumental 2

3.2.2.1 Sistema de controle de fluxo

Figura 14 – Desenho esquemático do sistema instrumental 2

Componentes

1. Manômetro
2. Válvula micrométrica
3. Conexão T
4. Válvula de três vias
5. Filtro para gás (fase móvel)
6. Válvula de injeção Valco CI4W.06, Vici (Houston, TX, USA), com loop interno de 60 nL de amostra
7. Trap (fluxo da purga)
8. Buffer
9. Trap (fluxo do *Split*)
10. Dispositivo do injetor modificado
11. Porta de injeção – *liner* utilizado: *liner split*
12. União em aço inox (Valco)
13. Tubo capilar (restritor)

14. Coluna capilar empacotada

15. Detector FID

16. Cromatógrafo a gás , Shimadzu modelo 17 A

Toda a tubulação utilizada no sistema de controle de fluxo foi de aço inoxidável com 1 / 16" od.

A aquisição de dados foi obtida utilizando um microcomputador

3.2.3 Sistema instrumental 3

O terceiro sistema foi desenvolvido conforme Figura 15. A descrição dos componentes utilizados no sistema de controle de fluxo está descrita de acordo com a numeração do desenho esquemático (Figura 16).

Figura 15 – Fotografia do sistema instrumental 3

3.2.3.1 Sistema de controle de fluxo

Figura 16 – Desenho esquemático do sistema instrumental 3

Componentes

1. Manômetro
2. Válvula micrométrica
3. Conexão T
4. Válvula de três vias
5. Filtro para gás (fase móvel)
6. Válvula de injeção Valco CI4W.06, Vici (Houston, TX, USA), com loop interno de 60 nL de amostra
7. Trap (fluxo da purga)
8. Buffer
9. Trap (fluxo do *Split*)
10. Dispositivo do injetor modificado
11. Porta de injeção – *liner* utilizado: *liner split*
12. União em aço inox (Valco)
13. Tubo capilar (restritor)

14. Coluna capilar empacotada

15. Detector FID

16. Cromatógrafo a gás , Shimadzu modelo 17 A

Toda a tubulação utilizada no sistema de controle de fluxo foi de aço inoxidável com 1 / 16" od.

A aquisição de dados foi obtida utilizando um microcomputador.

3.2.4 Sistema instrumental 4

A Figura 17 mostra o esquema do quarto sistema desenvolvido. A descrição dos componentes utilizados no sistema está descrita de acordo com a numeração da figura 18.

Figura 17 – Desenho esquemático do sistema instrumental 4

3.2.4.1 Sistema de controle de fluxo

Figura 18 – Desenho esquemático do sistema instrumental 4

Componentes

1. Manômetro
2. Válvula micrométrica
3. Conexão T
4. Válvula de três vias
5. Filtro para gás (fase móvel)
6. Trap (fluxo da purga)
7. Trap (fluxo do *Split*)
8. Buffer
9. Válvula de injeção Valco CI4W.06, Vici (Houston, TX, USA), com loop interno de 60 nL . Acoplada à saída da amostra uma agulha (50 mm) utilizando uma anilha de PTFE.
10. Dispositivo do injetor modificado
11. Porta de injeção – *liner* utilizado: *liner split*

12. União em aço inox (Valco)
13. Tubo capilar (restritor)
14. Coluna capilar empacotada
15. Detector FID
16. Cromatógrafo a gás , Shimadzu modelo 17 A

Toda a tubulação utilizada no sistema de controle de fluxo foi de aço inoxidável com 1 / 16" o.d.

A aquisição de dados foi obtida utilizando um microcomputador.

3.2.5 Sistema instrumental 5

A Figura 19 mostra conformação do sistema instrumental 5. A descrição dos componentes utilizados no sistema de controle de fluxo está descrita no desenho esquemático (Figura 20).

Figura 19 – Fotografia do sistema instrumental 5

3.2.5.1 Sistema de controle de fluxo

Figura 20 – Desenho esquemático do sistema instrumental 5

Componentes

1. Manômetro
2. Válvula micrométrica
3. Conexão T
4. Válvula de três vias
5. Filtro para gás (fase móvel)
6. Trap (fluxo da purga)
7. Trap (fluxo do *Split*)
8. Buffer
9. Suporte para seringa
10. Dispositivo do injetor modificado
11. Porta de injeção – *liner* utilizado: *liner split*
12. União em aço inox (Valco)
13. Tubo capilar (restritor)
14. Coluna capilar empacotada

15. Detector FID

16. Cromatógrafo a gás , Shimadzu modelo 17 A

Toda a tubulação utilizada no sistema de controle de fluxo foi de aço inoxidável com 1 / 16" o.d.

A aquisição de dados foi obtida utilizando um microcomputador.

3.3 PREPARO DE COLUNAS

3.3.1 Material Utilizado

- Partículas de fase estacionária (C18 - Kromasil) de 3,5 e 5 μm de diâmetro (Eka Chemicals)
- Tubos capilares de sílica fundida com 520, 250 e 50 μm d.i. (Polymicro Technologies Inc. e MicroQuartz)
- Filtros de fibra de vidro (Whatman)
- Tetrahidrofurano (THF 99%, Sigma-Aldrich)
- Álcool isopropílico (IPA)

3.3.2 Preparo das estruturas colunas capilares

Na preparação das colunas foram cortados tubos capilares de sílica fundida com 0.25 mm de d.i. nos comprimentos de 30 cm, 50 cm, 100 cm e 150 cm. Em uma das extremidades destes tubos foi introduzido filtro de fibra de vidro servindo como *frit*.

Um tubo de 0.50 mm de d.i. e 10 cm de comprimento foi impregnado por uma resina epóxi de secagem rápida com a finalidade de fixar o *frit*, sendo que introduziu-se 5 cm deste tubo impregnado com a resina e os outros 5 cm restantes fixou-se outro tubo de 0.25 mm de d.i com comprimento de 30 cm.

A fim de garantir resistência às colunas na região da junção, um tubo de 0.52 mm de d.i. foi utilizado para recobrir a região de junção e para fixação deste último tubo uma resina epóxi de secagem prolongada foi utilizada.

Ao final desta estrutura montada e preenchida pela fase estacionária, o mesmo procedimento se faz necessário para a outra extremidade após o empacotamento. Este procedimento evita a perda do material de empacotamento e também minimiza a movimentação do empacotamento.

3.3.3 Método de empacotamento

A configuração do sistema de empacotamento com partículas em suspensão empregado. Nesta configuração utilizou-se uma bomba reciprocante modelo LC-20AD (Shimadzu), e acoplou-se um tubo de aço inoxidável na saída da bomba e na extremidade deste tubo fixou-se a entrada de um reservatório de aço inox contendo a suspensão da fase estacionária (C18). Na saída deste reservatório conectou-se um dos tubos capilares previamente preparados. Para realização do empacotamento o sistema foi purgado, utilizando como solvente metanol de tal forma que o mesmo empurrou a suspensão de partículas para dentro da coluna.

Após o preenchimento do tubo capilar, o sistema deve ser desligado e a coluna será retirada somente após a despressurização total do sistema.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 SISTEMA INSTRUMENTAL I

O primeiro sistema instrumental desenvolvido visando a HIPGC foi projetado baseando-se nos trabalhos encontrados na literatura [18-24] e em projetos de instrumentação desenvolvidos no grupo de cromatografia do IQSC-USP, tomando-se como referência trabalhos na área de fluido supercrítico [48].

A seguir está uma descrição dos critérios, modificações e avaliações necessárias de todas as partes constituintes do sistema I.

4.1.1 Pressurização do gás de arraste

A HIPGC requer pressões elevadas quando comparadas às utilizadas a GC convencional, portanto para desenvolver um sistema instrumental para HIPGC necessita-se de um sistema de pressurização para o gás de arraste.

Os sistemas de pressurização popularmente conhecidos são as bombas que pressurizam líquidos, as mesmas não podem ser utilizadas para gases uma vez que os selos de vedação destas não possuem a resistência mecânica que os gases demandam.

Os selos de vedação das bombas para pressurização de líquidos inicialmente poderiam suportar a faixa de pressão, porém em um curto intervalo de tempo os selos se romperiam levando não só a substituição dos mesmos, mas também ocorreria a contaminação do fluido a ser pressurizado com o fluido auxiliar responsável pela pressurização.

Os sistemas de pressurização de gases disponíveis comercialmente conhecidos como amplificadores de pressão são distinguidos em dois tipos: os amplificadores de ar e os *boosters*.

Booster

O funcionamento dos amplificadores de pressão é bastante simples, pois o acionamento do pistão ocorre por ar comprimido e, então através da movimentação do mesmo multiplica-se a pressão do gás de suprimento (Figura 21(a)).

Os *boosters* (Figura 21 (b)) são utilizados para uma ampla faixa de gases. Possuem diversas funções como a de transferência de gás de alta pressão, carregamento de cilindros e além de pressurizar gases. Os *boosters* diferem dos amplificadores de ar por possuírem câmaras diferentes para o gás a ser pressurizado e o fluido pressurizador, isto evita a contaminação do gás a ser pressurizado.

Figura 21 – *Booster*. (a) Figura esquemática da configuração do *booster*. (b) Foto ilustrativa de um *booster* comercial

Dentre as possibilidades disponíveis comercialmente o *booster* seria a melhor alternativa para a utilização em cromatografia, pois não há a risco de contaminação do gás de arraste, porém um *booster* simples que atenderia o sistema em questão custa em torno de R\$ 75.000,00 reais.

Desta forma foi necessário desenvolver um sistema simples e barato para aumentar a pressão do gás de arraste, minimizando o custo do equipamento.

O sistema desenvolvido é composto por dois cilindros (I e II) contendo o gás de arraste conectado a um cilindro (III) vazio e de menor volume através de um T (Figura 22).

Figura 22 - Sistema de pressurização desenvolvido

Nesta configuração houve um aumento de aproximadamente 200 psi em comparação à pressão de saída do cilindro I, porém este aumento diminuía à medida que o gás contido nos cilindros era consumido; isto ocorreu porque a pressão entre os cilindros se igualava.

Sendo assim, foram utilizados duas válvulas de retorno evitando que o gás contido no cilindro de menor volume retornasse ao cilindro de partida (I e II). As molas das válvulas de retorno foram substituídas por molas mais resistentes para suportar a faixa de pressão, sanando a possibilidade de retorno do gás ao cilindro de origem (I e II).

O objetivo desta configuração foi aumentar a pressão do gás de arraste de uma maneira simples garantindo pressões elevadas por um maior intervalo de tempo e diminuindo o gasto de gás de arraste. Verificou-se que houve um aumento na pressão de aproximadamente 500 psi.

O ganho na pressão não foi extremamente alto, porém devido ao baixo fluxo do gás de arraste utilizado em cromatografia este aumento se tornou significativo para a economia do mesmo.

4.1.2 Sistema de controle de pressão

Neste sistema optou-se pela adaptação de um cromatógrafo a gás composto por detector por ionização em chama (FID), sistemas de válvulas microprocessadas e aquisição de dados via “*work station*”, possibilitando comparações diretas entre análises de GC convencional e o sistema instrumental visando a HIPGC.

O controle de pressão em equipamentos de GC é realizado eletronicamente utilizando válvulas e dispositivos eletrônicos (sensores), sendo todos estes para baixa pressão (até 58 psi). O sistema de controle de pressão está diretamente relacionado aos gases utilizados no detector FID (Figura 23).

Figura 23 – Desenho esquemático do controle de pressão do GC

A Figura 24 mostra um desenho esquemático do funcionamento do controle de pressão nos GC comerciais. A partir do monitoramento da pressão, por meio de um sensor (sensor de pressão), o sistema de controle realiza o fechamento ou abertura da válvula de acordo com a variação de pressão, tornando a pressão dos gases constantes.

Figura 24 – Desenho esquemático do funcionamento do controle de pressão do GC 17A

No sistema instrumental I, o controle de pressão foi o mesmo do cromatógrafo comercial, pois somente desta forma seria possível utilizar o detector FID do cromatógrafo e possibilitar a aquisição de dados.

4.1.3 Sistema de controle de fluxo

Todo o controle de fluxo num cromatógrafo está relacionado ao fluxo da purga, ao fluxo da fase móvel (gás de arraste) e da divisão do fluxo da amostra (*Split/Splitless*).

Nos equipamentos de GC convencionais todo o controle do fluxo é realizado por um sistema eletrônico, em que o ajuste do fluxo é realizado por válvulas do tipo solenoide e agulha. No controle do fluxo da purga normalmente é utilizado válvula agulha, sendo estas destinadas para baixa pressão e baixo fluxo, ou seja, possuem baixo coeficiente de vazão (C_v), pois permitem um ajuste fino do fluxo.

O fluxo do gás de arraste no sistema de injeção (*Split/splitless*) é controlado pelo método *back pressure*, em que se emprega geralmente válvula solenoide de 3 vias. No caso de injeção no modo *splitless* a válvula solenoide é fechada.

Na injeção no modo *Split* a válvula solenoide é aberta. Na linha do fluxo da injeção no modo *Split* além da válvula solenoide existe um sensor, o qual regula o fluxo de *Split*.

Válvula solenoide

As válvulas do tipo solenoide são utilizadas para controlar o fluxo de líquidos ou gases; geralmente são operadas eletronicamente.

O funcionamento de uma válvula solenoide consiste no movimento da agulha que está mecanicamente ligada ao fundo do êmbolo. A abertura se dá pelo movimento do êmbolo operado pela ação magnética de uma bobina elétrica energizada e o fechamento ocorre por ação da pressão da gravidade ou por ação de uma mola.

Válvula agulha

A válvula agulha é um tipo de válvula globo, usada para um controle fino do fluxo. As válvulas agulhas se diferem devido à cunha de fechamento, ou seja, não são utilizados discos, mas sim um plugue ou agulha.

O funcionamento é dado no movimento da agulha. O fechamento consiste no encaixe da agulha num anel usinado no corpo da válvula. A abertura da válvula se dá no desencaixe da agulha abrindo a passagem para o fluído. A regulagem da válvula depende do ângulo da agulha; além disso, o seu comprimento afeta a regulagem, pois quanto maior o seu comprimento melhor terá um controle fino do fluxo.

Diferentemente dos equipamentos de GC comerciais em que todo o controle do fluxo é realizado por um sistema eletrônico, no sistema instrumental I montado neste projeto controle de fluxo foi dimensionado para ser realizado manualmente.

Devido à faixa de pressão utilizada em HIPGC não é possível a utilização do controle de fluxo do cromatógrafo. Sendo assim, inicialmente isolou-se o sistema de controle de fluxo do próprio equipamento utilizando uma cruzeta (Figura 25 (a)).

As tubulações referentes à entrada do gás de arraste, ao fluxo da purga e ao fluxo do *split*, foram conectadas à cruzeta possibilitando que as condições mínimas de fluxo fossem alcançadas para que o software adquirisse os dados. Desta forma, os parâmetros tais como fluxo e pressão foram fixados, conforme descrito na Figura 25 (b).

Figura 25 – Controle de pressão do sistema HIPGC. (a) Isolamento do sistema de controle de pressão do GC 17A e (b) Janela do software *work station* apresentando os valores de fluxo e pressão fixados no sistema de HIPG.

Após o isolamento do sistema de fluxo, estudou-se o controle de todo o fluxo para ser realizado manualmente. O fluxo da fase móvel no sistema instrumental 1 deve ser baixo, pois caso seja muito elevado o empacotamento não suportará tal fluxo, podendo ocorrer a movimentação das partículas da coluna de modo que todo o recheio seja expulso do tubo capilar, mesmo utilizando *frit* na entrada e saída da coluna empacotada.

As válvulas solenoides e agulhas disponíveis comercialmente para elevadas pressões possuem C_v elevado e para o sistema instrumental em questão o C_v deve ser da ordem de 10^{-6} ou menores, pois esta faixa possibilita um controle fino do fluxo. Sendo assim, houve a necessidade de selecionar um tipo e válvula que suportasse pressões de entrada de até 3000 psi e que apresentasse C_v na faixa desejada, portanto a opção foi utilizar válvulas micrométricas.

Válvulas micrométricas

As válvulas micrométricas são válvulas de regulação utilizadas para controle manual de pressão e fluxo e, em alguns casos, pode funcionar como uma válvula moduladora pneumática. As válvulas micrométricas permitem a abertura gradual e sua configuração é simples, pois apresenta poucas peças, sendo estas móveis, o que apresenta praticidade caso haja a necessidade de modificações na mesma (Figura 26).

No sistema instrumental I foi utilizada uma válvula micrométrica com fluxo médio, apresentando C_v de 8×10^{-6} , possuindo boa resolução, pois o ajuste do fluxo pode ser feito com 16 voltas na manopla da válvula.

Figura 26 – Válvula micrométrica. (a) Desenho esquemático da válvula micrométrica. (b) Foto ilustrativa da válvula micrométrica HOKE série 1600 utilizada no sistema.

O funcionamento do controle de fluxo do sistema instrumental I é bastante simples, sendo composto por válvulas micrométricas, válvula de três vias, regulador de pressão e manômetro.

O controle de fluxo do gás de arraste é realizado através de um sistema em série composto por regulador de pressão, válvula micrométrica e manômetro.

O regulador de pressão tem a finalidade de regular a pressão de entrada na válvula micrométrica que suporta pressões de até 3000 psi. A válvula micrométrica é utilizada para um ajuste fino do fluxo do gás de arraste.

O controle de fluxo da purga é realizado somente pela válvula micrométrica, conforme o desenho esquemático da Figura 12.

O sistema instrumental 1 foi dimensionado para injeção no modo *split/splitless*; para tal controle foi utilizada uma válvula de três vias e uma válvula micrométrica. No modo *splitless* a válvula de três vias é fechada. No modo *Split*, a

válvula de três vias é aberta e a válvula micrométrica acoplada logo após é responsável pelo controle do fluxo do *Split*.

Comparando-se o controle de fluxo do cromatógrafo convencional como do sistema instrumental I, nota-se que a disposição das válvulas é bastante semelhante. Já a diferença no controle de fluxo está na substituição de válvulas solenoide e agulha por válvulas micrométricas (Anexo 1).

4.1.4 Sistema de introdução da amostra

Como já discutido anteriormente em HIPGC a pressão de entrada é elevada quando comparada à GC, portanto o uso do dispositivo convencional de injeção em GC não é viável, pois os equipamentos de GC comercializados são projetados para suportar pressões de até aproximadamente 58 psi.

Inicialmente foram investigadas as características do septo do injetor, o qual possui baixa resistência mecânica para pressões elevadas levando a ocorrer deformação do mesmo ou até seu rompimento ocasionando vazamentos. Uma alternativa seria a utilização do septo tipo Merlin, pois este fornece dois mecanismos distintos de vedação.

O primeiro mecanismo de vedação é constituído por um anel que garante a integridade de vazamento de gás durante o tempo de injeção. O segundo mecanismo mantém um selo de alta pressão no interior do porto de injeção. Avaliando estas características nota-se que estas se adequam aos requisitos da HIPGC, porém a faixa de operação é de 2-100 psi tornando-se impróprias para o uso.

Diante da ausência de dispositivos comerciais que suportem a faixa de pressão de HIPGC foram desenvolvidas modificações nas peças do injetor. As modificações foram realizadas com base no trabalho de Kendal *et. al.*, o qual desenvolveu um dispositivo que diminuiu o efeito da pressão sobre o septo, aumentou a vida útil do mesmo e também possibilitou o uso de seringa em sistemas de injeção para altas

pressões, pois a configuração do dispositivo permitiu maior fixação da agulha da seringa no injetor evitando o movimento da seringa [12].

Com base nas características descritas estudou-se uma maneira de modificar o dispositivo de injeção com a finalidade de suportar altas pressões, evitar possíveis vazamentos, deformação do septo e possibilitar utilização de seringa na injeção.

As Figuras 27 e 28 mostram as modificações nas conexões do injetor. As modificações mecânicas desenvolvidas nas conexões do injetor visaram minimizar o efeito da pressão contrária sob a seringa. As principais alterações realizadas foram:

- Peça ajustada para o aprisionamento do septo - evitando a movimentação do mesmo e a sua deformação (item 1 – Figura 27).
- Guia do injetor modificado – o guia da seringa não é encaixado na peça como normalmente encontra-se em GC, neste caso o guia da seringa foi usinado na própria peça, contribuindo com aprisionamento do septo, além de evitar vazamentos uma vez que não existe encaixe (item 2 – Figura 27).
- Dispositivo de aço – todo o dispositivo foi usinado em aço inox, por possui maior resistência mecânica quando comparado ao alumínio, comumente utilizado nos dispositivos de injeção de GC.

Figura 27 - Desenho das modificações no sistema de introdução de amostra. (A) dispositivo de injeção modificado, (B) e (C) diferentes vistas da peça usinada.

Figura 28 – Imagem das peças usinadas em diferentes vistas

4.1.5 Avaliação do sistema instrumental I

Conforme apresentado anteriormente, todas as partes constituintes do sistema foram estudadas de forma isolada antes da aquisição dos dispositivos, assim como da montagem completa do sistema.

Após a montagem completa do sistema instrumental I, alguns parâmetros foram avaliados tais como fluxo, estanqueidade do sistema e das tubulações, restritor no final da coluna cromatográfica e o sistema de aquisição de dados.

4.1.5.1 Fluxo total

Avaliou-se a taxa de fluxo total em função da pressão de entrada da coluna cromatográfica. Nos testes realizados utilizou-se uma coluna capilar de 25 m x 0,32 mm x 0,1 μ m NST-5, gás de arraste utilizado N_2 e para a realização das medidas a válvula micrométrica que controla o fluxo da purga foi fechada e com auxílio de um bolhometro realizou-se as medidas.

A Figura (a) e (b) mostra a faixa de controle de fluxo em função da pressão de entrada da coluna. No cromatógrafo comercial a faixa de pressão de entrada na coluna cromatográfica é de 0 – 141 psi e a taxa de fluxo total neste intervalo de pressão é de 0 a 1,2 L (Figura 29 (a)).

No sistema instrumental I a faixa de pressão de entrada na coluna cromatográfica é de 0 – 2000 psi e a taxa de fluxo total neste intervalo de pressão é de 0 a 8,3 L, Figura 29 (b).

No entanto, a faixa de ajuste do fluxo é limitada pela pressão primária como mostrado na Figura 29 (a) e (b). Além disso, vale ressaltar que a faixa de ajuste da pressão é limitada também pelo tipo de coluna e a taxa de fluxo de purga.

Figura 29 - Diagrama de fluxo x pressão de entrada da coluna cromatográfica, utilizando N_2 como gás de arraste. (a) Diagrama do GC-17 A, obtido utilizando coluna 30 m x 0,32 mm x 0,5 μ m. (b) Diagrama do sistema instrumental I, obtido utilizando coluna 25 m x 0,32 mm x 0,1 μ m NST-5

4.1.5.2 Fluxo da purga

Determinou-se a taxa de fluxo da purga em função da pressão de entrada da coluna cromatográfica. Nos testes realizados utilizou-se uma coluna capilar de 25 m x 0,32 mm x 0,1 μ m, gás de arraste utilizado N_2 . As medidas foram obtidas com a abertura da válvula micrométrica fixa em 12 voltas, e com auxílio de um bolhômetro e cronômetro realizou-se as medidas.

A variação do fluxo da purga varia dependendo da pressão de entrada da coluna. No intervalo de pressão da entrada da coluna fixado de 0 – 2000 psi, a taxa de fluxo da purga variou de 0 – 5 L . min⁻¹ (Figura 30).

Figura 30 – Variação do fluxo da purga x pressão de entrada na coluna.

4.1.5.3 Estanqueidade do sistema

Os ensaios de estanqueidade em sistemas onde ocorre a passagem de fluídos geralmente são compostos por três etapas: teste da parte seca (sistema sem a passagem do fluído), teste da parte molhada (sistema com a passagem do fluído) e o teste das tubulações e conexões. Todos estes testes são realizados utilizando pressão positiva ou negativa e os vazamentos são verificados utilizando instrumentos como manômetros, vacuômetros e sensores.

No sistema I, como o fluído é um gás, o ensaio de estanqueidade foi realizado em duas etapas: o teste da parte seca e o teste das tubulações e conexões. Os testes foram realizados utilizando pressão positiva de 1000 psi e as medições realizadas com manômetro.

Os testes da parte seca foram realizados submetendo isoladamente cada conexão, válvula, e tubulação soldada à pressões de 2000 psi e não houve a constatação de nenhum vazamento. Já o teste das tubulações e conexões foi realizado durante a evolução da montagem do sistema I; alguns pontos de vazamentos foram encontrados principalmente nas tubulações com algumas fissuras nos pontos de solda e as mesmas foram soldadas novamente sanando os problemas de vazamento.

4.1.5.4 Restritor de fluxo

Os restritores têm a função de diminuir o fluxo da fase móvel no final da coluna cromatográfica; são também usados para que se mantenha a pressão homogênea dentro da coluna cromatográfica. Embora exista uma variedade de tipos de restritores como os de sílica fundida, de sílica fundida não tratada, de aço inox, de vidro Pyrex entre outros, no sistema instrumental optou-se pela utilização de restritor de sílica fundida por ser o mais utilizado.

A fim de manter uma vazão uniforme em diferentes pressões alguns parâmetros foram otimizados como o comprimento do restritor e o diâmetro do capilar. Sendo assim, utilizou-se uma coluna capilar de 250 μm x 100 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 5,0 μm com fluxo de N_2 de 2,5 ml.min^{-1} para estudar a relação entre comprimento da coluna em função da pressão de entrada de 1500 psi.

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que tubos capilares de maior diâmetro interno necessitam de maior comprimento do mesmo. Desta maneira, optou-se pela utilização de tubos capilares de 0,05 mm de diâmetro interno (di), pois se utiliza menor comprimento de capilar, e facilita a troca de colunas devido a configuração utilizada.

Tabela 1 – Variação das dimensões do restritor de fluxo

Diâmetro interno capilar (mm)	Comprimento (m)
0.50	12
0.25	7,5
0.05	1,5

Após a escolha do diâmetro interno do restritor, avaliou-se o comprimento de restritor que seria necessário de acordo com a pressão de entrada da coluna, utilizando-se uma coluna 250 μm x 100 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 5,0 μm com fluxo de N_2 de 2,5 ml.min^{-1} , conforme Tabela 2.

Os dados da Tabela 2 mostram que com o aumento da pressão de entrada da coluna há também o aumento do comprimento do restritor, vale ressaltar que estes valores são variáveis, pois dependem das dimensões da coluna a ser usada.

Tabela 2 – Variação do comprimento do restritor de fluxo x Pressão de entrada da coluna

Pressão de entrada da coluna (psi)	Comprimento do restritor (m)
500	0,5
1000	1,0
1500	1,5
2000	2,0

4.1.5.5 Aquisição de dados

Embora o fluxo no final da coluna analítica seja controlado através de um restritor, devido ao pequeno comprimento das colunas capilares empacotadas quando comparadas às colunas de GC convencional isto resulta em um tempo de análise menor quando comparado à GC.

A fim de avaliar a aquisição de dados do GC convencional. I, ou seja, verificar se o sinal eletrônico proveniente de uma separação utilizando HIPGC seria convertido adequadamente num formato digital no software destinado para GC convencional, foram realizados experimentos em triplicata injetando uma solução de 10 ppm de octano em hexano em diferentes pressões de entrada (500, 1000 e 1500 psi), utilizando uma coluna capilar de 250 μm x 100 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 5 μm com fluxo de 2,5 mL.min⁻¹.

Como demonstrado na Tabela 3 nota-se que com o aumento da pressão de entrada da coluna o tempo de retenção do octano diminui. Além disso, pode-se verificar que na faixa de pressão de entrada da coluna 500 – 1500 psi o software GC solution é adequado.

Tabela 3 – Variação do tempo de retenção em função da pressão de entrada da coluna

Pressão de entrada da coluna (psi)	t_r do Octano (min)
500	5.8
1000	3.9
1500	2.6

4.1.5.6 Testes realizados em condições reais de uso

Após a avaliação da aquisição de dados ser concluída foram realizados testes em condições reais de uso do sistema instrumental 1. Nestes testes foi utilizada uma coluna capilar de 250 μm x 100 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3,0 μm , fluxo de 2,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$, pressão de entrada de 1500 psi e a injeção de um mix de 10 ppm dos hidrocarbonetos: pentano, hexeno, hexano, n-octano e decalina. A Figura 51 mostra um cromatograma típico do mix injetado.

Figura 31 – Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexano (b), hexeno (c), n-octano (d) e decalina (e). Condições: coluna empacotada 100 cm x 250 μm d.i x 5 μm C18, Fase móvel N, 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C

Verificou-se que com o aumento das pressões de entrada o sinal analítico diminuí. A fim de solucionar o problema investigou-se o dispositivo de injeção, não havendo nenhuma espécie de vazamento entre a conexão da peça ao cromatógrafo. Então foi verificado que em análises sucessivas utilizando as mesmas condições experimentais havia grande variação na intensidade do sinal.

A ausência de reprodutibilidade e repetibilidade nas injeções ocorreram devido ao erro no volume de amostra injetado, pois durante o transporte da amostra o conjunto seringa e êmbolo da seringa sofrem a ação de uma força contrária ao movimento do êmbolo, devido à interação entre a pressão interna do cromatógrafo e a pressão atmosférica (pressão externa) ocasionando vazamentos, ou seja, parte da amostra a ser injetada era ejetada para fora da seringa.

A força contrária ao movimento do êmbolo provocou a formação de uma espécie de “filme” líquido (parte da amostra a ser injetada) entre a parede da seringa e o êmbolo por todo o corpo da seringa ocasionando vazamentos na parte superior da mesma, conforme Figura 32. Desta forma o volume de injeção não foi constante e assim não houve reprodutibilidade.

Figura 32 – Desenho esquemático das etapas da introdução da amostra em elevadas pressões.

Diante desse contexto foi necessário escolher uma seringa que possuisse revestimento na extremidade do êmbolo capaz de obter a selagem completa do líquido evitando vazamentos. Sendo assim optou-se pelo uso de seringa do tipo *gastight* (10µl). As seringas do tipo *gastight* se destacam por serem revestidas por

PTFE permitindo a selagem completa da amostra e suportando pressões próximas de 1000 psi.

Realizou-se testes utilizando a seringa *gastight* nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Os resultados obtidos utilizando a seringa *gastight* apresentaram ganho de sinal analítico de 100 vezes quando comparado à injeção da amostra com a seringa convencional. Além disso, os resultados foram reprodutíveis para análises cuja pressão de entrada foi de até 1500 psi (Figura 33).

Nos testes realizados foi possível verificar que os picos possuem perfil simétrico, embora com w_b elevado quando comparado a injeções em GC convencional, fato este relacionado à eficiência das colunas. As colunas empacotadas possuem menor eficiência quando comparada às colunas tubulares abertas.

Figura 33 – Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexeno (b), hexano (c), n-octano (d) e decalina (e) com a injeção utilizando seringa convencional(-) e com seringa *gastight* (-). Condições: coluna empacotada 100 cm x 250 µm d.i x 5 µm C18, Fase móvel N₂, 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C.

Nas análises em que a pressão de entrada era superior à 1500 psi, verificou-se novamente que parte da amostra percorria o corpo da seringa na forma de um filme

no sentido contrário ao movimento do êmbolo havendo vazamento na seringa, sendo em proporções bem menores quando comparadas à seringa com êmbolo sem PTFE.

Sendo assim para investigar se a baixa intensidade do sinal em pressões superiores à 1500 psi uma nova configuração instrumental foi montada (sistema instrumental 2).

4.2 SISTEMA INSTRUMENTAL 2

O segundo sistema instrumental desenvolvido visando a HIPGC foi projetado com o objetivo de modificar o sistema de injeção de amostra a fim de obter maior intensidade do sinal analítico em análises utilizando pressões de até 1500 psi.

A modificação no sistema de injeção de amostra foi estabelecida a partir de trabalhos relacionados à cromatografia unificada encontrados na literatura [4] que utilizam válvulas de HPLC para a injeção da amostra.

A seguir descreve-se critérios e modificações necessárias para o novo modo de injeção da amostra.

4.2.1.1 Sistema de injeção

O sistema de injeção nas técnicas de separação que utilizam pressões superiores à cromatografia gasosa utilizam válvulas para introdução da amostra.

Neste sistema foi utilizada uma válvula de HPLC com loop interno de 60 nL, sendo esta acoplada após o manômetro, esta modificação foi bastante simples, conforme Figura 14.

4.2.2 Avaliação do sistema 2

4.2.2.1 Tempo de acionamento da válvula de injeção

Com este sistema montado foi necessário otimizar o tempo de acionamento da válvula de injeção, no qual utilizou-se uma mistura de pentano e octano na

concentração de 10 ppm, com pressão de entrada de 500 psi, fluxo de $2,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e uma coluna capilar de $250 \mu\text{m} \times 50 \text{ cm}$ de comprimento empacotada com partículas C18 de $5,0 \mu\text{m}$. Os tempos de acionamento da válvula testados foram em 2, 6, 10 segundos (Figura 34 (a), (b) e (c), respectivamente) para determinar o tempo ótimo de acionamento da válvula.

O tempo de acionamento foi fixado em 10 s (Figura (c)), como tempo de acionamento ótimo, uma vez que o sinal em 10 s foi mais intenso e o valor de w_b em 6 e 10 segundos foi o mesmo (0,14 min).

Notou-se que houve variação da largura do pico assim como na intensidade do sinal. O uso da válvula de injeção provocou maior valor de w_b quando comparados à injeção por seringa, provavelmente devido à dispersão da amostra.

Figura 34 – Perfil cromatográfico do n-octano em diferentes tempos de acionamento da válvula (a) 2 s,(b) 6 s e (c) 10 s. Condições: coluna empacotada $100 \text{ cm} \times 250 \mu\text{m} \text{ i.d.} \times 5 \mu\text{m}$ C18, Fase móvel N, 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C .

4.2.2.2 Testes realizados em condições reais de uso

Depois de concluída a etapa de otimização do tempo de acionamento da válvula, foram realizados testes em condições reais de uso do sistema instrumental 2. Nestes testes foi utilizada uma coluna capilar de $250 \mu\text{m} \times 100 \text{ cm}$ de comprimento

empacotada com partículas C18 de 5,0 μm e a injeção de um mix de 10 ppm dos hidrocarbonetos n-pentano, hexano, hexeno, n-octano e decalina, conforme Figura 35.

Houve aumento de sinal ao se utilizar a injeção por válvula quando comparado aos cromatogramas obtidos com a injeção por seringa. O uso da válvula ampliou a faixa de pressão possibilitando o uso de pressões de entrada de até 1800 psi, pois o aumento do sinal analítico foi de aproximadamente 2 vezes quando ao comparado ao sinal obtido no sistema I.

Na utilização de pressões superiores à 1800 psi não ocorria reprodutibilidade e repetibilidade nas análises. Sendo assim, avaliou-se outra possível fonte de perda do sinal analítico que seria o tipo de *liner*. A fim de avaliar a influência no *liner* na intensidade do sinal analítico, o sistema instrumental 3 foi montado.

Figura 35 – Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexeno (b), hexano (c), n-octano (d) e decalina (e) com a injeção utilizando válvula de HPLC(-) e com seringa (-). Condições: coluna empacotada 100 cm x 250 μm d.i x 5 μm C18, Fase móvel N $^{\circ}$ 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C.

4.3 SISTEMA INSTRUMENTAL 3

A configuração do sistema instrumental 3 é idêntica ao sistema instrumental 2. O terceiro sistema instrumental visou obter maior intensidade do sinal analítico em análises com pressões acima de 1500 psi, variando os tipos de *liners* e os modos *Split/Splitless*.

Dentre as diversas possibilidades substituiu-se o *liner* de *Split* que estava sendo utilizado nos testes anteriores pelos *liners* de *Splitless* e de SPME.

4.3.1 Avaliação do sistema instrumental

4.3.1.1 Otimização da substituição do liner

Na escolha do *liner* mais adequado para o sistema de HIPGC montado utilizou-se uma mistura de pentano e octano na concentração de 10 ppm, com pressão de entrada de 500 psi, fluxo de 2,5 mL.min⁻¹ e uma coluna capilar de 250 µm x 50 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 5,0 µm.

O uso do *liner* de SPME resultou em pico com menor w_b quando comparado ao *liner* de *splitless*. Além disso, o uso do *liner* de SPME apresentou um ganho de 64% na intensidade do sinal analítico quando comparado ao *liner* de *splitless*. Uma escolha apropriada do *liner* e dos parâmetros de injeção pode aumentar a área dos picos e também reduzir o limite de detecção até 300% [49].

Uma das funções do *liner* é promover a homogeneização do gás de arraste com a amostra. No caso da injeção do uso do *liner* de *splitless* não houve aumento do sinal analítico, quando comparado aos resultados obtidos pelo uso do *liner* de *Split*. Estes dois possuem dimensões bastante próximas e, provavelmente devido às dimensões dos *liners*, a homogeneização do gás de arraste com amostra foi menos eficiente quando comparado ao *liner* de SPME.

Os testes mostraram que o uso do *liner* de SPME é o mais apropriado para a configuração do sistema de HIPGC, conforme Figura 36. O *liner* para SPME possui diâmetro interno menor quando comparado aos *liners* para os modos *Split* e *Splitless*, e isto pode ter possibilitado o ganho no sinal analítico. Além disso, o *liner* de SPME se mostrou adequado para o sistema de HIPGC, uma vez que o volume de amostra é menor que o volume total do *liner* respeitando as condições de não saturação do *liner*.

Figura 36 – Perfil cromatográfico com *liner* de SPME (-) e com *liner* de *splitless*(-)

Embora a escolha do *liner* mais apropriado para a configuração do sistema de HIPGC tenha sido otimizada, não foi possível explorar pressões maiores que 1800 psi, uma vez que a configuração do sistema instrumental 3 foi a mesma do sistema instrumental 2.

Deste modo, estudou-se uma nova modificação no sistema instrumental com a finalidade de ampliar a faixa de pressão e evitar o alargamento do pico cromatográfico montando-se o sistema instrumental 4.

4.4 SISTEMA INSTRUMENTAL 4

O sistema instrumental 4 é uma modificação da configuração do sistema instrumental 2. A modificação refere-se à mudança de posição da válvula de injeção de amostra e também a utilização de gás auxiliar para transportar a amostra da válvula para dentro do cromatógrafo, ou seja, utilizou-se a injeção pressurizada.

Esta forma instrumental tem o propósito de fazer o uso de pressões maiores que 1800 psi, com reprodutibilidade dos picos cromatográficos e com sinal analítico significativo.

A seguir está uma descrição das modificações realizadas no sistema e os resultados obtidos nas condições reais de uso.

4.4.1 Avaliação do sistema instrumental

4.4.1.1 Sistema de introdução da amostra

No sistema 2 a válvula de injeção foi acoplada logo após o manômetro, e assim o gás de arraste foi utilizado como transportador da amostra até a câmara de aquecimento do injetor. Diferentemente no sistema instrumental 4, em que a válvula foi acoplada diretamente no injetor e foi utilizado um fluxo de gás auxiliar (N_2) para o transporte da amostra, conforme Figura 37.

A configuração do sistema é similar à utilizada por Long, J. *et. al.*; esta destaca-se porque a agulha está diretamente conectada na válvula e também fixa no injetor (Figura 37) não havendo a necessidade de utilizar nenhuma tubulação para transferência da amostra, eliminando uma possível fonte que causaria o alargamento de w_b . [50].

Figura 37 - Válvula acoplada ao injetor

Após a montagem do sistema 4, otimizou-se a pressão do gás auxiliar, responsável pelo transporte da amostra para dentro do injetor.

4.4.1.2 Otimização da pressão do gás auxiliar

A determinação da pressão ótima para o gás auxiliar se fez necessário, pois pode influenciar diretamente no w_b [50].

Na otimização da pressão ótima para o gás auxiliar foi utilizada uma coluna capilar de $250\ \mu\text{m} \times 100\ \text{cm}$ de comprimento empacotada com partículas C18 de $5,0\ \mu\text{m}$ e a injeção de um mix de 10 ppm de octano em pentano pressão de entrada de 500 psi, fluxo do gás de arraste de $2,5\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

A Figura 38 mostra a relação entre w_b em função da pressão do gás auxiliar de 500 à 600 psi. Nota-se que para pressões menores que 530 psi há variação no w_b , diferentemente em pressões superiores a 560 psi nota-se um comportamento estável do w_b .

Desta forma, a pressão mínima necessária do gás auxiliar para o transporte da amostra para dentro do cromatógrafo é de 560 psi, isto quando a pressão de entrada do gás de arraste foi de 500 psi.

Figura 38 – Variação do w_b em função da pressão do gás auxiliar (N)

Após a investigação em 500 psi foi verificado se o comportamento era o mesmo para pressões de entrada superiores à 500 psi. À medida que houve o aumento na pressão de entrada de 500 psi para 1000 psi foram encontrados vazamentos na conexão da agulha e a válvula, pois a anilha de PTFE não foi adequada para estanqueidade do sistema (Figura 39).

Figura 39 – Anilhas de PTFE para agulha ser fixada na válvula de injeção. (a) Anilha de PTFE deformada devido à pressão e (b) Anilha de PTFE não deformada.

A conformação instrumental 4 não se mostrou adequada para o transporte de amostras líquidas em pressões superiores à 500 psi. O uso deste tipo de arranjo

instrumental é apropriado para sistemas com baixa pressão de entrada do gás de arraste, pois em pressões de entrada de 20.74 psig mostrou-se adequado para a injeção de líquidos pressurizados [50].

Após todos os diferentes arranjos instrumentais, decidiu-se investigar se haveria a possibilidade de realizar modificações na seringa *gastight* a fim de evitar os vazamentos modificando as dimensões do plugue que existe na ponta do êmbolo da seringa, uma vez que a faixa de pressão de trabalho dos sistemas instrumentais de 2 a 4 variou de 1500-1800 psi, pois não difere do sistema instrumental 1 que foi de 1500 psi. Sendo assim, desenvolveu-se o sistema instrumental 5.

4.5 SISTEMA INSTRUMENTAL 5

Dentre todos os diferentes arranjos instrumentais estudados, no sistema instrumental 5 explorou-se a limitação do sistema instrumental 1.

A limitação do sistema 1 está no emprego da seringa para o transporte da amostra. O sistema instrumental 5 tem a finalidade de utilizar a seringa *gastight* com modificações no êmbolo para permitir seu uso em pressões superiores a 1800 psi, e além disso aliar o uso do *liner* de SPME para obter maior ganho de sinal analítico.

Outro fator estudado foi a movimentação do êmbolo, pois durante a perfuração do septo para injetar a amostra houveram casos em que o êmbolo foi expulso do corpo da seringa. A fim de manter o êmbolo da seringa preso ao corpo da mesma projetou-se um dispositivo de fixação da seringa durante a injeção da amostra.

4.5.1 Avaliação do sistema instrumental

4.5.1.1 Modificações no êmbolo da seringa

A fim de aumentar a estanqueidade da seringa e evitando os vazamentos já descritos anteriormente (sistema instrumental 1), modificou-se as dimensões do plugue de PTFE que existe na ponta do êmbolo da seringa, aumentando o diâmetro do plugue e a altura também (Figura 40).

O aumento do diâmetro externo no plugue de PTFE foi otimizado, pois deveria ser maior que o convencional, porém possibilitar o movimento do êmbolo, sendo assim as dimensões foram otimizadas conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Otimização das dimensões do plugue do êmbolo

	Êmbolo não modificado	Êmbolo modificado
Comprimento (mm)	1.31	1.61
Diâmetro (mm)	0.43	0.47

Figura 40 – Modificação do êmbolo da seringa. (a) Plugue da seringa *gastight* comercial e (b) Plugue com as dimensões modificadas

4.5.1.2 Dispositivo de fixação da seringa

O dispositivo de fixação da seringa foi projetado para apresentar mobilidade, ou seja, permitir facilidade em fixar no injetor e também retirá-lo. Além disso, permitir a fixação do êmbolo sem movimentação do mesmo (Figura 41).

No dispositivo piloto a manopla que movimenta o êmbolo foi usinada para que o controle fosse realizado pelo número de voltas da manopla. Este dispositivo piloto, mostrou que suportava as pressões de entrada sem a movimentação do êmbolo da seringa.

Figura 41 – Dispositivo de fixação da seringa (a), (b), (c), (d) e (e) diferentes vistas do dispositivo

Após esta observação, modificou-se a manopla (Figura 41 (b)) a fim de permitir injeção mais rápida e não utilizar a movimentação por rosca, porém não se mostrou adequado porque as injeções não foram reprodutíveis utilizando o dispositivo. Sendo assim, o dispositivo não foi utilizado.

4.5.1.3 Otimização da seringa

Devido às mudanças realizadas na seringa, houve a necessidade de verificar se a modificação no plugue do êmbolo da seringa não ocasionaria erro no volume de amostra. Sendo assim, comparou-se injeções com a seringa *gastight* sem modificação e a *gastight* com a modificação.

Nas comparações utilizou-se uma mistura dos hidrocarbonetos n-pentano, hexano, hexeno, n-octano e decalina na concentração de 10 ppm, com pressão de entrada de 500 psi, fluxo de $2,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e uma coluna capilar de $250 \mu\text{m} \times 100 \text{ cm}$ de comprimento empacotada com partículas C18 de $5,0 \mu\text{m}$, conforme Figura 35.

Com base na Tabela 5, verifica-se que o desvio padrão nas análises utilizando a seringa modificada foi menor. Embora a área do pico do octano tenha sido maior na utilização da seringa com a modificação, esta pequena variação pode ser atribuída ao erro do analista e não somente à modificação.

Tabela 5 – Avaliação da modificação da seringa

Volume de injeção (μL)	Seringa sem modificação	Seringa com modificação
	Área de pico e DP	Área de pico e DP
0,500	5.854 ± 0,004	5.852 ± 0,003
1,000	11.700 ± 0,006	11.710 ± 0,004

4.5.1.4 Testes realizados em condições reais de uso

Depois de concluída a etapa de otimização, foram realizados testes em condições reais de uso do sistema instrumental 5. Nestes testes foi utilizada uma coluna capilar de 250 μm x 100 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 5,0 μm e a injeção de um mix de 10 ppm dos hidrocarbonetos n-pentano, hexano, hexeno, n-octano, conforme a Figura 35.

O uso da seringa com o êmbolo modificado mostrou-se adequado, uma vez que o sinal analítico triplicou quando comparado às injeções utilizando seringa *gastight* convencional, conforme Figura 42.

Figura 42 - Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexeno (b), hexano (c), n-octano (d) com a injeção utilizando seringa sem modificação (-) e com modificação (-). Condições: coluna empacotada 100 cm x 250 μm d.i x 5 μm C18, Fase móvel N, 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C

Esta modificação possibilitou o uso de pressões de entrada da coluna de até 2000 psi com análises reprodutíveis, conforme Figura 43.

Figura 43 - Perfil cromatográfico da mistura pentano (a), hexeno (b), hexano (c), n-octano (d) com a injeção utilizando seringa com modificação em injeções sucessivas de 1µL. Condições: coluna empacotada 100 cm x 250µm d.i x 5µm C18, Fase móvel N, 1500 psi, temperatura da coluna de 90°C.

A fim de testar a aplicabilidade do sistema de HIPGC, inicialmente foi selecionada uma coluna capilar empacotada, e construídas curvas de van Deemter.

As Figuras 44 e 45 mostram a curva de van Deemter, ou seja, a relação entre a altura do prato reduzido em função da velocidade linear da fase móvel. No estudo utilizou-se uma mistura de n-octano em hexano na concentração de 10 ppm, fluxo de 2,5 mL.min⁻¹, pressão de entrada da coluna de 1500 psi e colunas capilares de 250 µm x 12 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3,0 µm (Figura 44) e 250 µm x 20 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3,0 µm (Figura 45).

O comportamento das curvas de van Deemter para ambas as colunas se mostraram semelhantes, pois com o aumento da pressão houve redução da altura do prato teórico assim como a velocidade linear ótima.

Em altas pressões o número de pratos teóricos aumenta proporcionalmente com o comprimento da coluna. A eficiência da coluna de 20 cm é maior quando

comparada à coluna de 12 cm, pois a eficiência é proporcional ao comprimento da coluna.

Figura 44 – Curva de van Deemter em diferentes pressões para coluna capilar de 250 μm x 20 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3,0 μm

Figura 45 - Curva de van Deemter em diferentes pressões para coluna capilar de 250 μm x 12 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3,0 μm

A Figura 46 apresenta cromatogramas típicos de uma mistura de hidrocarbonetos em pressões de entrada da coluna cromatográfica de 1500 e 2000 psi. Nota-se que o tempo de retenção dos hidrocarbonetos varia de acordo com a pressão de entrada da coluna.

Figura 46 - Cromatogramas típicos de uma mistura de hidrocarbonetos (C9 – C12) em pressões de entrada da coluna cromatográfica de (a)1500 psi e (b)2000 psi. Condições: coluna empacotada 20 cm x 250 μm d.i x 3 μm C18, Fase móvel N_2 , temperatura da coluna de 90°C

A relação tempo de retenção versus pressão de entrada da coluna para o octano em uma coluna capilar de 250 μm x 20 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3,0 μm , mostra que com o aumento da pressão ocorre redução no tempo de análise, conforme Figura 47.

Figura 47 – Gráfico da relação entre pressão de entrada da coluna e tempo de retenção

O uso de elevadas pressões e colunas capilares empacotadas com fase estacionárias destinadas à HPLC de pequeno diâmetro mostra-se uma abordagem promissora para vertentes em GC, uma vez que a separação de frações leves do petróleo como a gasolina e diesel, podem ser separadas em baixas temperaturas e sem o uso de programação de temperatura (Figura 48).

A Figura 48 mostra o perfil dos cromatogramas de gasolina e diesel; nota-se uma série homóloga de hidrocarbonetos. Além disso, verifica-se que é necessário o uso de colunas de maior comprimento para obtenção de maior número de pratos e consequentemente melhor separação.

Figura 48 - Perfil dos cromatogramas de gasolina (a) e diesel (b) no sistema instrumental de HIPGC desenvolvido

A aplicação do sistema de HIPGC neste trabalho possui caráter investigativo, uma vez que foram testados diferentes moléculas de elevada massa molecular, para determinar a faixa de massa molecular que o sistema de HIPG abrange. Inicialmente testou-se a análise de triacilglicerídeos do biodiesel, por serem um dos compostos mais pesados analisados por GC convencional.

Na análise de biodiesel (B100) seguindo a ASTM 6584 utiliza-se programação de temperatura na faixa de 50 – 380°C, o t_r dos triacilglicerídeos se encontra entre 22-25 min (Figura 50). Diferentemente no sistema de HIPGC desenvolvido obteve-se a separação dos triacilglicerídeos em análise isotérmica (150°C) entre 6 - 6,5 min (Figura 49). Isto confirma que com o uso da pressão não há necessidade de elevadas temperaturas e também diminui o tempo de análise [51].

Figura 49 – Cromatograma de triacilglicerídeos do biodiesel

Figura 50 – Padrão biodiesel (B100) da ASTM [51]

Embora, o sistema de HIPGC tenha apresentado bons resultados para série de hidrocarbonetos, mostrando as potencialidades do sistema quanto ao menor tempo de

análise avaliou-se a análise de moléculas de maior massa molecular como, por exemplo, ibuprofeno.

A análise direta de ibuprofeno em GC não é passível, pois não é um composto volátil e por isso o fármaco é derivatizado e analisado por GC-MS.

Desta forma utilizou-se análise direta de ibuprofeno em HIPGC, conforme Figura 51. Verificou-se um ombro referente ao fármaco. Além disso, realizou-se análises em temperaturas da coluna de 70 – 150 °C e o perfil cromatográfico foi idêntico ao apresentado na Figura 51.

Deste resultado pode-se concluir que para análise direta deste fármaco e de compostos com elevada massa molecular é necessário ampliar a faixa de pressão utilizada no sistema de HIPGC desenvolvido e também aumentar o comprimento da coluna pra aumentar o número de pratos. Trabalhos anteriores mostraram que a faixa de pressão de entrada da coluna de até 1764 psi utilizando He como gás de arraste não foi adequada para separação de compostos com elevada massa molecular [39].

Os resultados de aplicação indicam que o sistema de HIPGC desenvolvido é limitado pela faixa de pressão de 500 – 2000 psi e também pelo comprimento da coluna capilar empacotada.

Figura 51 – Cromatograma de Ibuprofeno

5 CONCLUSÃO

Os sistemas instrumentais de 1 a 4 mostraram-se inadequados para a HIPGC, pois apresentaram limitações instrumentais principalmente quanto à injeção da amostra. Embora as limitações, estes sistemas montados sem sucesso foram importantes para explorar o desenvolvimento dos demais sistemas instrumental para HIPGC.

Dentre todos os sistemas instrumentais montados, destacou-se os sistemas 2 e 5. O sistema instrumental 2 no qual utilizou-se a válvula para introdução da amostra se mostrou adequado para sistemas com pressões de até 1500 psi, pois apresentou reprodutibilidade nas injeções.

O sistema 5 se mostrou o mais adequado uma vez que permitiu análises com pressões de entrada mais elevadas de até 2000 psi e também análises reprodutíveis, utilizando uma simples modificação na seringa *gastight*.

O uso de colunas capilares empacotadas pelo método *slurry packing* mostrou elevada eficiência para análise de hidrocarbonetos leves. Dentre as colunas empacotadas a coluna capilar de 250 μm x 20 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3,0 μm apresentou menor *h*.

Os resultados mostraram que a elevada pressão de entrada da coluna aliada à colunas capilares empacotadas reduz o tempo de análise. Além disso, a faixa de pressão de 500 – 2000 psi não é suficiente para análise de compostos com elevada massa molecular em temperaturas menores que 150 °C, isto mostra que o sistema de HIPGC desenvolvido é limitado pela faixa de pressão de 500 – 2000 psi.

6 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

- Desenvolver conexões utilizando tubos de aço inox com dimensões semelhantes às utilizadas em sistemas para alta pressão (UHPLC);
- Desenvolver um sistema de introdução de amostra automatizado, a fim de evitar problemas na injeção da amostra como perda de volume, por exemplo;
- temperatura evitando estruturas coladas, pois estas se rompem com o aumento da temperatura;
- Empacotar colunas com maior comprimento e com fases estacionárias diferentes utilizando outras metodologias de empacotamento;
- Estudar a eficiência das colunas com diferentes fases móveis;
- Explorar aplicação no sistema desenvolvido com diversas amostras, desenvolvendo metodologias analíticas.

7 ANEXO

7.1 CONTROLE DE FLUXO DO GC-17A

Figura 52 – Controle de fluxo do GC 17A

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] CHESTER, T.L.; PINKSTONE, J.D. Supercritical fluid and unified chromatography. **Anal. Chem.**, v. 74, p. 2801-2812, 2002.
- [2] KAAL, E; JASSEN, H. Extending the molecular application range of gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 1184, p. 43-60, 2008.
- [3] MEYER, R. V. **Practical high-performance liquid chromatography**. 4^a ed. New York: John Wiley, 2004. 300 p.
- [4] MUHLEN, C.V.; LANÇAS, F.M. Cromatografia unificada. **Quim. Nova**, v. 27, p. 747-753, 2004.
- [5] KIENTZ, C.E.;BRINKMAN, U.A.TH. Gas chromatographic detectors for use in column liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 550, p. 461-494, 1991.
- [6] GROB, K. LC for sample preparation in coupled LC-GC: a review. **Chimia**, v. 45, p. 109-113, 1991.
- [7] JANSSEN, H.G.; W. BOERS, H.; STEENBERGEN, R. H.; FLOTTER, E. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography × gas chromatography: evaluation of the applicability for the analysis of edible oils and fats. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, p. 385-400, 2003.
- [8] TONG, D.X.; BARTLE, K.D.; CLIFFORD, A.A.; ROBINSON, R.E. Unified chromatography for gas chromatography, supercritical fluid chromatography and micro-liquid chromatography. **Analyst**, v. 120, p. 2461-2467, 1995.

- [9] ISHII, D.; NIWA, T.; OHTA, K.; TAKEUCHI, I. Unified capillary chromatography. **J. High Resolut. Chromatogr.**, v. 11, p. 800-801, 1988.
- [10] STALKUP, F. I.; KOBAYASHI, R. High-pressure phase-equilibrium studies by gas-liquid partition chromatography. **A.I.Ch.E. J.**, v. 9, p. 121-128, 1963.
- [11] GILMER, H. B.; KOBAYASHI, R. Laminar flow of a heat-generating fluid in a parallel-plate channe. **A.I.Ch.E. J.**, v. 10, p. 797-804, 1964.
- [12] KOONCE, K. T; DEANS, H. A.; KOBAYASHI, R. Generalization of gas-liquid partition chromatography to study high pressure vapor-liquid equilibria of multicomponent systems. **A.I.Ch.E. J.**, v. 11, p. 259-268, 1965.
- [13] MYERS, M. N.; GIDDINGS, J. C. High column efficiency in gas liquid chromatography at inlet pressures to 2500 p.s.i. **Anal. Chem.**, v. 37, p. 1453-1457, 1965.
- [14] MYERS, M. N.; GIDDINGS, J. C. High inlet pressure micro column system for use in gas chromatography. **Anal. Chem.**, v. 38, p. 294-297, 1966.
- [15] GIDDINGS, J. C.; MANWARING, W. A.; MYERS, M. N. Turbulent-gas chromatography. **Science**, v. 154, p. 146-148, 1966.
- [16] MYERS, M. N.; GIDDINGS, J. C. Ultra-high pressure gas chromatography in micro columns to 2000 atmophers. **J. Sep. Sci.**, v. 1, p. 761-766, 1966.
- [17] SIE, S. T.; BEERSUM, W.; RIJNDERS, G. W. A. High-pressure gas chromatography and chromatography with supercritical fluids. The effect of pressure on partition coefficients in gas-liquid chromatography with carbon dioxide as a carrier gas. **J. Sep. Sci.**, v. 1, p. 459-490, 1966.

[18] GIDDINGS, J.C.; MYERS, M.N.; McLAREN, L.; KELLER, R.A. High pressure gas chromatography of nonvolatile species. **J. Sep. Sci.**, v. 162, p. 67-72, 1968.

[19] MYERS, M.N.; GIDDINGS, J.C. High column efficiency in gas liquid chromatography at inlet pressures to 2500 psi. **Anal. Chem.**, v. 162, p. 67-72, 1965.

[20] MYERS M.N.; GIDDINGS J.C. High inlet pressure micro column system for use in gas chromatography. **Anal. Chem.**, v. 38, p. 294-297, 1966.

[21] GERMAN A.L.; HEYNEN, H.W.G. A sampling valve for use in gas chromatography adaptable for high pressure or high temperature. **J. Phys. E: Sci. Instrum.**, v. 5, p. 413-414, 1971.

[22] HUBBER, J.F.K.; LAUER, H.H.; POPPE, H. Reduction of theoretical plate height in gas chromatography by increase of pressure and decrease of particle size. **J. Chromatog.**, v. 112, p. 337-388, 1975.

[23] LAUER, H.H.; POPPE, H.; HUBER, J.F.K. Application of high-pressure gas chromatography with columns packed with small particles. **J. Chromatogr.**, v. 132, p. 1-16, 1977.

[24] KWA T. L. A precision high-pressure gas chromatograph for isobaric-isothermal measurements. **J. Chromatogr.**, v. 270, p. 105-115, 1983.

[25] GROB, K., GROB, K. Capillary columns with immobilized stationary phases – 5. Determination of column bleeding, re-silylation. **J. High Resolut. Chromatogr. Commun.**, v. 5, p. 349-354, 1982.

- [26] WU, Q.; HETEM, M.; CRAMERS, C.A.; RIJKS, J.A. Preparation of thermally stable phenylpolysiloxane fused silica capillary columns. Optimization and evaluation of the deactivation by capillary GC and solid state ²⁹Si NMR. **J. High Resolut. Chromatogr.**, v. 13, p. 811-816, 1990.
- [27] CHOI, M.H.; KIM, K.R.; CHUNG, B.C. Simultaneous determination of urinary androgen glucuronides by high temperature gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. **Steroids**, v. 65, p. 54-59, 2000.
- [28] POOLE, C.F.; ZLATKIS Z. Cyclic derivatives for the selective chromatographic analysis of bifunctional compounds. **J. Chromatogr.**, v. 184, p. 99-183, 1980.
- [29] HALKET, J.M.; WATERMAN, D.; Przyborowska, A.M.; Patel, R.K.P.; Fraser, P.D.; Bramley, P. Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **J. Exp. Bot.**, v. 56, p. 219-243, 2005.
- [30] WELLS, R.J. Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas Chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 843, p. 1-18, 1999.
- [31] WANG, F.C.-Y.; GERHART, B.B.; SMITH, P.B. Structure determination of polymeric materials by pyrolysis gas chromatography. **Anal. Chem.**, v. 67, p. 3536-3540, 1995.
- [32] WANG, F.C.Y.; SMITH, P.B. Quantitative analysis and structure determination of styrene/methyl methacrylate copolymers by pyrolysis gas chromatography. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 3033-3037, 1996.

- [33] WAMPLER, T.P. Introduction to pyrolysis–capillary gas chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 842, p. 207-220, 1999.
- [34] MARSMAN, J.H.; WILDSCHUT, J.; MAHFUD, F.; HEERES, H.J. Identification of components in fast pyrolysis oil and upgraded products by comprehensive two-dimensional gas chromatography and flame ionisation detection. **J. Chromatogr. A**, v. 1150, p. 21-27, 2007.
- [35] CHALLINOR, J.M. A pyrolysis-derivatisation-gas chromatography technique for the structural elucidation of some synthetic polymers. **J. Anal. Appl. Pyrol.**, v. 16, p. 323-333, 1989.
- [36] JOLL, C.A.; HUYNH, T.; HEITZ, A. Off-line tetramethylammonium hydroxyde *thermochemolysis* of model compound aliphatic and aromatic carboxylic acids: decarboxylation of some *ortho*- and/or *para*-substituted aromatic carboxylic acids. **J. Anal. Appl. Pyrol.**, v. 70, p. 151-167, 2003.
- [37] TAYLOR, L.T. Supercritical fluid chromatography for the 21 st century. **J. Supercrit. Fluids**, v. 47, p. 566-573, 2009.
- [38] SILVA, José Carlos Rodrigues. **Projeto, construção e avaliação de um sistema para cromatografia a gás solvatante**. 2002. 258 f. Tese (Doutorado em Físico-química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- [39] SHARIFF, S. M.; ROBSON, M.M; BARTLE, K. D.; MYERS, P.; CLIFFORD A.A. Use of liquid chromatography packings in high pressure gas chromatography. **J. High Resol. Chromatogr.** v. 19, p. 527-529, 1996

- [40] MALIK, A.; LI, W.; LEE, M. L. J. Preparation of long packed capillary columns using carbon dioxide slurries. **J. Microcol. Separ.**, v. 5, p. 361-369, 1993.
- [41] TONG, D.; BARTLE, K. D.; CLIFFORD, A. A. Preparation and evaluation of supercritical carbon dioxide-packed capillary columns for HPLC and SFC. **J. Microcol. Separ.**, v. 6, p. 249-255, 1994.
- [42] KOIVISTO, P.; DANIELSSON, R.; MARKIDES, K. E. Factors affecting the preparation of packed capillary columns in supercritical carbon dioxide media. **J. Microcol. Separ.**, v. 9, p. 97-103, 1997.
- [43] PLANETA, J.; KARASEK, P.; VEJROSTA, J. Development of packed capillary columns using carbon dioxide slurries. **J. Sep. Sci.**, v. 26, p. 525-530, 2003.
- [44] CRESCENTINI, G.; BRUNER, F.; MANGANI, F.; YAFENG, G. Preparation and evaluation of dry-packed capillary columns for high-performance liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 60, p. 1659-1662, 1988.
- [45] MONTEIRO, Alessandra M. **Cromatografia líquida capilar: desenvolvimento de colunas empacotadas e monolíticas, celas de detecção UV e aplicação da programação de temperatura Estudo do empacotamento e avaliação de colunas para cromatografia líquida capilar**. 2010. 188 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- [46] REZEMINI, Andrea Lucia. **Estudo do empacotamento e avaliação de colunas para cromatografia líquida capilar**. 1997. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

- [47] LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: Rima, 2004. 62 p.
- [48] KENDE, A.; VRABECZ, A.; ANGYAL, V.; RIKKER, T.; EKE, ZS.; TORKOS, K. *Liner as the Key of Injection Optimization in Pesticide Analysis*. **Chromatogr.**, v. 63, p. 181-187, 2006.
- [49] LUONG, J.; GRAS, R.; FIROR, R.; SIEBEN, L.; WINNIFORD, B.; CORTES, H. Dual-purpose gas chromatographic injection device for pressurized liquid and gas injection. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 2740-2748, 2009.
- [50] TAVARES, Maria Cecília Henrique. **Projeto, construção e aplicações de um sistema para cromatografia com fluido supercrítico (SFC)**. 1999. 160 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.
- [51] AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). Disponível em: < <http://www.anp.gov.br> >. Acesso em: 20 maio 2012.