



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Química Analítica

Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**“Desenvolvimento de um Sistema para
Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva”**

Candidato: Carlos Henrique de Vasconcelos Fidelis

Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto

Campinas
Novembro de 2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

F448d Fidelis, Carlos Henrique de Vasconcelos.
Desenvolvimento de um Sistema para Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva / Carlos Henrique de Vasconcelos Fidelis. -- Campinas, SP: [s.n], 2008.

Orientador: Fabio Augusto.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Cromatografia gasosa bidimensional. 2. Modulador. 3. Instrumentação analítica. 4. Combustíveis. I. Augusto, Fabio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Development of a Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography System

Palavras-chaves em inglês: Two-dimensional gas chromatography, Modulator, Analytical instrumentation, Fuels

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Fabio Augusto (orientador), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Vitor Hugo Polisél Paces (IQSC-USP), Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago (IQ-USP-SP), Prof. Dr. Jarbas José Rodrigues Rohwedder (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 25/11/2008

"Há duas coisas infinitas: o Universo e a tolice dos homens."

Albert Einstein

"Reparta o seu conhecimento. É uma forma de alcançar a imortalidade."

Dalai Lama

"Meu laboratório é aqui."

*Resposta dada por Einstein apontando para uma caneta que tirou do bolso.
Na ocasião, ele era pesquisador e professor em Princeton e um grupo
de estudantes perguntou-lhe onde se localizava seu laboratório*

Dedicatória

*A Deus, por ter iluminado o meu caminho
Aos meus pais, Severino e Alzenilda e aos meus irmãos,
André, Márcia e Meire, pelo amor e incentivo
Aos meus amigos*

Agradecimentos

- À Unicamp e ao Instituto de Química, pela estrutura e excelência de todo o seu quadro.
- Ao Prof. Fabio Augusto, pela oportunidade, orientação e dedicação.
- Ao Prof. Jarbas J. R. Rohwedder, do IQ-Unicamp, por sua participação fundamental para o início deste projeto.
- Aos amigos do LCG, acima de tudo pela amizade, dedicação e pela colaboração no projeto.
- Ao colaborador e amigo, Ernesto, cujo trabalho e participação constantes, tornaram-se parte integrante deste projeto.
- A todos os funcionários do IQ-Unicamp, em especial ao funcionário Lourival Pimpim, pela colaboração durante todo o projeto.
- Ao LNLS, na pessoa do Sr. Eli, o qual colaborou com o projeto em uma das fases do desenvolvimento instrumental.
- Ao amigo Prof. Gilberto, pelo incentivo constante.
- Ao amigo Dr. Daniel L. Rocco.
- Aos amigos da EsPCEx, pelo apoio e incentivo.
- À Comissão de Pós-Graduação do IQ-Unicamp.
- À CAPES pela bolsa concedida.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação.

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica

2003 – 2008: **Doutorado em Ciências**

Universidade Estadual de Campinas

Título: *Desenvolvimento de um Sistema para Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva – GC×GC.*

2001 – 2002: **Mestrado em Química Analítica**

Universidade Estadual de Campinas

Título: *Caracterização do Material Particulado Inalável (MP₁₀) na Atmosfera de Paulínia e Região*

1994 – 1999: **Bacharelado e Licenciatura em Química**

Universidade de São Paulo - Campus Ribeirão Preto

Estágio no Exterior

Instituto de Química Inorgânica da Universidade de Tübingen - Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Fakultät für Chemie und Pharmazie (Baden-Württemberg, Alemanha). Orientador: Prof. Dr. Joachim Strähle. Síntese e determinação da estrutura de compostos inorgânicos por meio de Raio-X e Infravermelho. 04/1999 a 03/2000.

Publicações

1. Marcio Pozzobon Pedroso, Luiz Antonio Fonseca de Godoy, Carlos Henrique de Vasconcellos Fidelis, Ernesto Correa Ferreira, Ronei Jesus Poppi e Fabio Augusto “Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC)”; aceito para publicação, *Química Nova*, em julho/2008.
2. de Godoy L. A. F.; Ferreira, E. C.; Pedroso, M. P; Fidelis, C. H. D. V.; Augusto, F.; Poppi, R. J.; “Quantification of kerosene in gasoline by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography and N-way multivariate analysis”, 2008, *Analytical Letters*, 41, 9, 1603-1614.
3. Carlos H. V. Fidelis; Paulo M. Donate e Adalgisa R.de Andrade. “Eletroxidação do Etanol em Eletrodos de TiO₂”, 2001, *Química Nova*, (24) 42-46.
4. Adalgisa R. de Andrade; Paulo M. Donate; Paula P. D. Alves, and Carlos H. V. Fidelis, “Ethanol Electro-oxidation in Ruthenium-Oxide-Coated Titanium Electrodes”, *J. Electrochem. Soc.*, 1998, 145, 3839-3843.

Premiações

Prêmio de melhor trabalho; apresentado no Simcro 2006 – 2^o Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins. 18 a 20 de outubro de 2006. São Pedro-SP.

Cursos / palestras ministrados

Curso ministrado: Fundamentos de Planejamento de Experimentos. Convênio Univ. Federal Alfenas-MG/Unicamp. 05 a 09 dezembro de 2005 com carga horária de 16 h.

Palestrante do Encontro Interno sobre Pesquisas Ambientais na Região Metropolitana de Campinas, realizado nos dias 07 e 08 de agosto de 2003 na UNICAMP.

Capítulos de livros publicados

OLIVEIRA, Ana Maria de; BIAJOLI, André Francisco Pivato; FIDELIS, Carlos Henrique de Vasconcelos; SILVA, Raquel Gomes da Costa; AUGUSTO, F. Extraction and Pre-Concentration Techniques for Chromatographic Analysis. In: Marco Aurélio Zezzi Arruda. (Org.). Trends in Sample Preparation. 1 ed. Nova Iorque, EUA: Nova Publishers, 2006, v. 0, p. 191-225

Resumos em Congressos

Donate, P.M.; Fidelis, Carlos Henrique de V.; Andrade, A. R. de; Boodts, J.F.C.; Alves, P.D. 20^a Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas-MG; 24 a 27 de maio de 1997.

Fidelis, C.H.V.; J.F.C. Boodts; P.M.Donate; A.R. de Andrade (orientadora); 5^o Simpósio de Iniciação Científica da USP. Exatas e Engenharia - São Paulo 3 a 5 de novembro de 1997.

Andrade de, A. R.; Fidelis, Carlos Henrique de V.; Boodts, J.F.C.; 21^a Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas-MG; 25 a 28 de maio de 1998.

Carlos Henrique de V. Fidelis (PG), Daniela Rosa (IC), Wilson F. Jardim (PQ), 25^a Reunião Anual da SBQ, Poços de Caldas-MG; 20 a 23 de maio de 2002.

Fidelis, C. H. V. (PG); Silva, R. C. (PG) e Fabio Augusto (PQ), 27^a Reunião Anual da SBQ, Salvador-BA; 30 de maio a 02 de junho de 2004.

FIDELIS, C. H. V. ; AUGUSTO, F. ; CASTILLO, A. L., 2004, 10^o Congresso Latino Americano de Cromatografia e Técnicas Afins (COLACRO X), Campos do Jordão, 2004

Carlos H. V. Fidelis, Jarbas J. R. Rohwedder, Fabio Augusto. 13^o Encontro Nacional de Química Analítica / 1^o Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, UFF, Niterói, RJ; 12-16 setembro, 2005.

Ernesto C. Ferreira, Carlos H. V. Fidelis, Pedro A M. Vasquez e Fabio Augusto; 13^o Encontro Nacional de Química Analítica / 1^o Congresso Ibero-Americano de Química Analítica, UFF, Niterói, RJ; 12-16 setembro, 2005.

Carlos H. V. Fidelis, Ernesto C. Ferreira e Fabio Augusto; 29^a Reunião Anual da SBQ, Águas de Lindóia-SP; 19 a 22 de maio de 2006.

Carlos H. V. Fidelis, Ernesto C. Ferreira e Fabio Augusto. Simcro 2006. Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins. São Pedro; 18 a 20 de outubro de 2006.

Outras Atividades Acadêmicas

Programa de Estágio Docente (PED) – Instituto de Química – Unicamp. Monitoria em disciplinas experimentais de 4 horas semanais. Períodos: 2^o Semestre de 2003, 2^o Semestre de 2005 e 1^o Semestre de 2006.

Resumo

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA PARA CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL COMPREENSIVA

O projeto objetivou estudar os fundamentos que governam um sistema GC×GC, por meio da construção do principal componente de tal sistema, o modulador, sua adaptação a um cromatógrafo a gás comercial e posterior aplicação. O ponto de partida do desenvolvimento instrumental foi a projeção e a construção de um modulador de duplo jato com dois *cabeçotes* de aço e dióxido de carbono líquido como agente crioscópico. Numa segunda etapa os dois cabeçotes foram substituídos por peça única, utilizando-se ainda o mesmo fluido para resfriamento. Posteriormente o modelo em peça única foi alimentado por nitrogênio líquido. Ambos os sistemas moduladores foram controlados por softwares escritos em laboratório. O primeiro, utilizado em testes iniciais, foi escrito em Visual Basic 3¹. Em um segundo momento, foi escrito simultaneamente ao desenvolvimento do modulador um software exclusivo para o controle da modulação e registro dos dados². Durante todo o trabalho, algumas aplicações foram feitas para testar o desempenho do sistema. Foram realizadas separações GC×GC principalmente de amostras de gasolina Tipo C. Os resultados obtidos foram extremamente promissores uma vez que ficou demonstrada a aplicabilidade de um sistema modulador para GC×GC utilizando-se um forno secundário, externo ao forno do cromatógrafo.

Abstract

DEVELOPMENT OF A SYSTEM FOR COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY

The aim of this project was to investigate the basic concepts concerning a GC×GC system by adjusting the main system component, the modulator, to a commercial gas chromatograph and its subsequent application. The instrumental development starting point was the projection and construction of a two piece dual jet modulator with carbon dioxide as coolant. In a second stage the two nozzles were replaced by a single piece and the same coolant was used. In sequence nitrogen gas cooled by liquid nitrogen was used as modulating agent with the single piece design. For system control and data acquisition two homemade software were used. The first was written in Visual Basic 3¹. The second was developed simultaneously to the modulator and is an exclusively applied version². During project development some applications were showed to evaluate system performance. GC×GC separations were performed mainly by using Brazilian gasoline C type. The results obtained are very promising once was demonstrated the applicability of a modulator system using a secondary oven external to the chromatograph oven.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xix
LISTA DE FIGURAS.....	xx
1. Introdução.....	1
2. Objetivo.....	10
3. Revisão Bibliográfica.....	11
3.1. Cromatografia Planar.....	11
3.2. GC 2D com <i>Heart cutting</i> (GC-GC).....	13
3.3. Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva (GC×GC).....	16
3.3.1. Desenvolvimento da GC×GC.....	16
3.3.2. Princípios e Vantagens de GC×GC.....	17
3.3.3. Estruturação em GC×GC.....	18
3.3.4. Termos e Definições em GC×GC.....	20
3.3.5. Separação “Compreensiva”.....	25
3.3.6. Ortogonalidade.....	27
3.3.7. Ortogonalidade e colunas.....	30
3.3.8. Programação de temperatura.....	40
3.3.9. Modulação e moduladores.....	49
3.3.10. Detecção.....	57
3.3.11. Repetibilidade em GC×GC.....	60
3.3.12. Aquisição e tratamento de dados em GC×GC.....	61
4. Experimental.....	64
4.1. Cromatógrafo.....	64
4.2. Colunas.....	64
4.3. Modulador - Primeira versão.....	65
4.3.1. Compartimento modulador.....	65
4.3.2. Sistema de resfriamento.....	68
4.4. Modulador – Segunda Versão.....	68
4.4.1. Compartimento modulador.....	68
4.4.2. Sistema de resfriamento.....	71

4.5. Controle do sistema e aquisição de dados <i>Hardware</i> , <i>Software</i> , Coleta e Tratamento de Dados Cromatográficos.....	72
4.6. Reagentes e Amostras.....	73
5. Resultados e Discussão.....	75
5.1 Modulador de duplo jato criogênico com resfriamento por CO ₂ (l) – Primeira Versão.....	75
5.1.1 Modulando com a primeira versão – estudos preliminares.....	75
5.1.2 Análise de Gasolina por GC×GC, empregando a primeira versão de modulador.....	78
5.1.3 Problemas identificados na Primeira Versão do Modulador.....	82
5.2 Modificações e aperfeiçoamentos do sistema de modulação desenvolvido – Segunda Versão.....	84
5.2.1 Separações GC×GC utilizando a segunda versão de modulador.....	85
5.2.2 Mundaça no sistema de resfriamento da segunda versão.....	90
5.2.3 Separações GC×GC empregando a segunda versão do modulador alimentada por N ₂ (g) resfriado por N ₂ (l).....	91
5.2.3.1 Medida da vazão ótima do gás de arraste.....	91
5.2.3.2 Avaliação do consumo do sistema de resfriamento.....	91
5.2.3.3 Estudos de repetibilidade.....	95
5.2.3.4 Variação do tempo de modulação.....	95
5.2.3.5 Temperatura do ar do soprador térmico.....	96
5.2.3.6 Comprimento da segunda coluna.....	98
5.2.3.7 Programação de temperatura do forno.....	99
5.2.3.8 Período de modulação.....	104
5.2.4 Aplicações do sistema GC×GC construído	105
5.2.4.1 Identificação de gasolina adulterada por querosene.....	105
5.2.4.2. Identificação de BTEX na gasolina.....	106
6. Conclusões.....	109
7. Referências Bibliográficas.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definições de “ortogonalidade” em vários campos da ciência.....	29
Tabela 2 - Exemplos de combinações de colunas usadas em GC×GC.....	33
Tabela 3 – Consumo de sistemas de resfriamento para GC×GC que empregam N ₂ (l).....	93

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama do Sistema de Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva de Liu e Phillips¹⁹ 4
- Figura 2.** Ciclo de funcionamento do modulador térmico de Liu e Phillips¹⁹ (para discussão, veja texto) 5
- Figura 3.** Construção de cromatogramas Sinal \times ${}^1t_R \times {}^2t_R$ em GC \times GC (modificado de Dallüge et al.²⁰). 7
- Figura 4.** Seções de cromatogramas de petróleo extraído de sedimento contaminado. 8
- Figura 5.** Número de publicações de artigos sobre GC \times GC em periódicos indexados em função do ano de publicação. 16
- Figura 6.** Separação GC \times GC de diesel em um conjunto de colunas BPX5-BP20 (modificado de Marriott e cols⁴⁴)..... 19
- Figura 7.** Esquema representando as fases de modulação, em comparação a uma curva gaussiana. Modificado de Marriott e cols⁴⁴. 25
- Figura 8.** Diagramas de contorno resultantes da análise por GC \times GC de amostra de semi-voláteis com diferentes comprimentos efetivos de coluna de segunda dimensão (modificado de Ong et al⁴³)..... 36
- Figura 9.** Mapa de retenção de propriedade química (modificado de Marriott e cols⁴⁴). Conjunto de colunas polar/apolar (primeira e segunda dimensões, respectivamente)..... 38
- Figura 10.** Diagramas de contorno simulados, obtidos por GC \times GC mostrando a influência da temperatura na retenção dos componentes da amostra (modificado de Venkatramani e Phillips⁵⁴). 42
- Figura 11.** Efeito da programação da temperatura na ordem de eluição de pesticidas organoclorados em cromatografia gasosa convencional usando colunas BPX5-BPX50. (modificado de Ong e cols.⁴³)..... 44
- Figura 12.** Diagrama de contorno, do soluto I ao soluto P, ilustrando as ordens de retenção relativas para os solutos L e M, O e P em ambas as dimensões, em função da variação de temperatura durante as análises por GC \times GC (extraído de Ong e cols.⁴³)..... 45
- Figura 13.** Uso da programação de temperatura para gerar um cromatograma bidimensional ortogonal (modificado de Phillips e Beens³⁹). Maiores detalhes no texto..... 47
- Figura 14.** Curvas de Van Deemter para N₂, He e H₂ (modificado de Grob⁴⁷) 48

Figura 15. Esquemas de 6 dos moduladores mais utilizados (modificado de Adahchour et al ⁷⁸)	51
Figura 16. Esquema do mecanismo de funcionamento de um modulador de duplo jato criogênico (modificado de Beens e cols ⁹⁹).....	52
Figura 17. Esquema de um modulador criogênico do tipo LMCS (modificado de Kinghorn e Marriott ⁸³).....	54
Figura 18. Conexão entre as duas colunas feita por meio de um conector universal para colunas capilares (Alltech Associates Inc., IL- USA).....	64
Figura 19. Primeira versão de modulador para GC× GC desenvolvido no projeto.	66
Figura 20. Entrada de ar quente frontal através de um soprador térmico, na primeira versão do modulador.	67
Figura 21. Esquema do sistema GC× GC completo (exceto aquisição de dados), com modulador de duplo jato de CO ₂ (l) com dois cabeçotes - primeira versão projetada	67
Figura 22. Sistema de resfriamento e sua ligação com compartimento modulador (acima) e detalhe do cabeçote do modulador (abaixo) utilizados na segunda versão.	69
Figura 23. Cabeçote desmontado do modulador da segunda versão.....	70
Figura 24. Sistema GC× GC (esquemático).	70
Figura 25. Sistema GC× GC completo, com modulador de duplo jato e N ₂ (l) como fluido criogênico e cabeçote em peça única (segunda versão projetada). O compartimento modulador é mostrado em mais detalhes na Figura 22.	71
Figura 26. (A) Cromatograma obtido após corrida cromatográfica com mistura BTEX como amostra, utilizando duas colunas, sem modulação (corrida convencional); T _{col} = 40 ⁰ C → 10 ⁰ C·min ⁻¹ → 150 ⁰ C; (B) - Cromatogramas obtidos pela separação da mesma amostra, empregando GC× GC (corrida com acionamento das válvulas); modulador de duplo jato criogênico; modulação: 3 s + 1 s; gás de arraste: N ₂ ; T _{col} = 40 ⁰ C → 10 ⁰ C·min ⁻¹ → 150 ⁰ C. (C) Ampliação dos picos fracionados, correspondentes ao etilbenzeno.....	77
Figura 27. Triplicata de diagramas de contorno de amostra de gasolina tipo C.....	79
Figura 28. Duplicata de diagramas de contorno resultantes de corridas empregando Gasolina Tipo C como amostra.....	86
Figura 29. Duplicata dos cromatogramas que deram origem aos diagramas de contorno da Figura 28.	87
Figura 30. Curva de Van Deemter para a primeira coluna, HP-1 (25 m × 0,32 mm × 0,25 μm) 1D. Gás de arraste: H ₂ . Composto usado: Metanol.	91

Figura 31. Variação do perfil do pico cromatográfico de C9 modulado pelo sistema GC× GC, em função da pressão de N ₂ (g)	92
Figura 32. Cromatogramas tridimensionais (diagramas de contorno) obtidos em triplicata na separação de amostra de gasolina Tipo C.	94
Figura 33. Variação do perfil do pico cromatográfico de C9, C10 e C11 em função do tempo de modulação.....	96
Figura 34. Variação do perfil do pico cromatográfico de C8 – C20 em função da temperatura aproximada do ar do soprador térmico	97
Figura 35. Diagramas de contorno resultantes do estudo de variação do comprimento da segunda coluna.....	102
Figura 36. Cromatogramas tridimensionais resultantes da separação de Gasolina Tipo C	103
Figura 37. Diagramas de contorno resultantes de separação GC× GC de gasolina tipo C	104
Figura 38. Diagramas de contorno obtidos na separação de amostra de gasolina Tipo C	106
Figura 39. Cromatogramas (diagramas de contorno) obtidos em estudo simulando adulteração de gasolina por querosene	107

1. Introdução

Novas tecnologias para Cromatografia Gasosa têm como objetivo geral viabilizar a separação, identificação e quantificação rápidas do maior número de constituintes em misturas complexas, usando equipamentos simples e robustos. Essas metas têm sido atingidas por meio de aperfeiçoamentos nos diversos módulos dos sistemas cromatográficos. Por exemplo, colunas cromatográficas capilares de diâmetros reduzidos - e, portanto, de alta eficiência - permitem um grande aumento na capacidade de resolução³. O uso dessas colunas combinadas com vazões elevadas de gás de arraste, rampas de aquecimento do forno da coluna de dezenas a centenas de graus por minuto e sistemas digitais de controle e aquisição de dados viabilizou a chamada Cromatografia Gasosa Rápida (*Fast Gas Chromatography, Fast GC*), onde tempos de corrida da ordem de dezenas de milissegundos já foram reportados⁴. Outra alternativa para o aumento da capacidade aparente de separação é o uso de detectores espectroscópicos, que podem proporcionar grande seletividade e sensibilidade, como o AED (*Atomic Emission Detector, Detector por Emissão Atômica*), MS/MS (*Tandem Mass Spectrometry, Espectrometria de Massas em Tandem*) ou FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectrometry, Espectrometria no Infravermelho com Transformada de Fourier*)⁵.

Entretanto, a maioria desses recursos aparentemente já atingiu seus limites máximos de desempenho e aperfeiçoamento. Colunas com diâmetros muito inferiores aos menores atualmente disponíveis (50 μm a 100 μm) seriam inviáveis para aplicações rotineiras⁶. Uma coluna capilar moderna apresenta cerca de 100000 pratos. No entanto, Giddings⁷ calculou que seriam necessários 500 milhões de pratos para uma probabilidade de separação de 0,99 de uma mistura de 100 componentes. Segundo Smits⁸, o número de picos que podem ser separados em uma coluna capilar é apenas 0,1 % de todos os compostos voláteis conhecidos. Assim, a princípio a existência de sistemas com eficiências e sensibilidades muito superiores às atuais demandaria necessariamente novos paradigmas nas pesquisas em Cromatografia Gasosa. Porém, uma das vertentes mais promissoras para esses desenvolvimentos se baseia em um conceito já há

muito conhecido: o de **separação multidimensional**, onde a amostra é submetida sequencialmente a vários processos diferentes de eluição. Separações bidimensionais são muito usadas em Cromatografia Planar⁹: a amostra é aplicada no canto de uma cromatoplaça quadrada e eluída; em seguida, a cromatoplaça é seca, girada em um ângulo de 90° e eluída novamente com uma segunda fase móvel diferente da usada na primeira eluição. Também são disponíveis diversos modos de separação bidimensional para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), sendo a segunda eluição feita em outra coluna de HPLC¹⁰ ou mesmo com outras técnicas, como Eletroforese Capilar¹¹ ou Cromatografia Gasosa¹². Em qualquer caso, espécies co-eluídas na primeira etapa podem ser separadas na segunda eluição, especialmente se os mecanismos de separação das etapas forem diferentes – *i.e.*, se eles forem **ortogonais**¹³. A *ortogonalidade* total raramente é obtida, uma vez que as fases cromatográficas geralmente possuem alguma similaridade em seus mecanismos de separação. No entanto, o ganho de resolução será ainda significativo. Se as capacidades de resolução (número máximo de picos separáveis) do primeiro e segundo estágios forem, respectivamente, n_1 e n_2 picos, a capacidade total de resolução de um sistema bidimensional será de $n_1 \times n_2$ picos; entretanto, esse incremento geométrico só será alcançado se a totalidade do eluato da primeira etapa for re-eluída na segunda etapa, conforme já havia previsto Giddings¹³.

A definição correta de cromatografia multidimensional inclui, de acordo com Giddings^{13,14}, dois critérios. Primeiro, é aquela na qual os componentes da mistura são submetidos a duas ou mais etapas de separação nas quais seus deslocamentos dependem de fatores diferentes. O segundo critério é que quando dois componentes forem significativamente separados em qualquer das etapas individuais, eles permaneçam separados até o final da operação de separação.

Para entender melhor as separações realizadas em mais de uma dimensão é importante compreender o conceito de dimensão de separação. Uma dimensão de separação pode ser entendida como uma técnica que depende de um único parâmetro para separar os compostos. Portanto, em uma mistura de dois compostos em que seus pontos de ebulição são quase iguais seria praticamente

impossível separá-los por destilação porque o parâmetro básico do qual a destilação depende é o ponto de ebulição. Por outro lado se um segundo parâmetro básico estiver envolvido na separação cromatográfica, como a razão de distribuição entre a fase estacionária e a fase gasosa, a separação desses compostos será trivial ¹⁵.

Em síntese, a *dimensionalidade* do sistema cromatográfico é o número de diferentes mecanismos de separação que são usados no sistema, p. ex. volatilidade, polaridade, exclusão por tamanho ou uma combinação de mecanismos. Já a dimensionalidade de uma amostra é o número de propriedades químicas independentes necessárias para especificar os compostos da amostra. Trata-se de uma propriedade intrínseca de amostras analíticas, independente do número de componentes presentes na amostra ¹⁶. O fator limitante da capacidade de separação de sistemas cromatográficos é a discordância entre as dimensionalidades do sistema e da amostra. Via de regra a dimensionalidade da amostra é sempre maior que a do sistema de separação utilizado. Visando contornar este problema é que se começou então a empregar mais de um mecanismo de separação em um mesmo sistema.

A operacionalização de separações bidimensionais em Cromatografia Gasosa é muito mais complexa que em cromatografia planar, já que a coleta de frações do eluato de uma coluna capilar e reinjeção em uma segunda coluna sem perdas, contaminação ou alargamento excessivo da banda cromatográfica não é trivial. A primeira tentativa de implementação foi o “cromatógrafo a gás de dois estágios” de Simmons e Snyder (1958)¹⁷: frações selecionadas do eluato de uma coluna, contendo analitos não separados, eram desviadas para uma segunda coluna instalada no mesmo forno através de um sistema complexo de válvulas. Em 1968, quando surgiu um dispositivo pneumático mais conveniente para a transferência de frações - o “Inversor de Deans” (*Deans Switching*) -¹⁸ a chamada Cromatografia Gasosa Bidimensional de Frações Parciais (*Heartcut Bidimensional Gas Chromatography*) começou a ser aplicada mais intensivamente, sendo ainda hoje eventualmente usada para amostras complexas¹⁹. O Inversor de Deans propriamente dito ainda é objeto de estudo²⁰. Em tal sistema, no entanto, a

capacidade total de separação do sistema não podia ser utilizada, uma vez que apenas algumas frações separadas na primeira coluna, eram selecionadas para serem recromatografadas numa segunda coluna.

Em 1991, Liu e Phillips²¹ descreveram um novo sistema bidimensional consistindo de duas colunas capilares conectadas em série: a primeira era uma coluna convencional de polietilenoglicol de 21 m com 0,25 mm de diâmetro interno e a segunda, uma coluna curta e fina (1 m × 0,1 mm) de metilsilicone. Um pedaço de 15 cm do início da segunda coluna, recoberto com um filme de ouro, era mantido fora do forno do cromatógrafo (Figura 1). O setor metalizado da segunda coluna – denominado **modulador** - era conectado a uma fonte de 40 V CC.

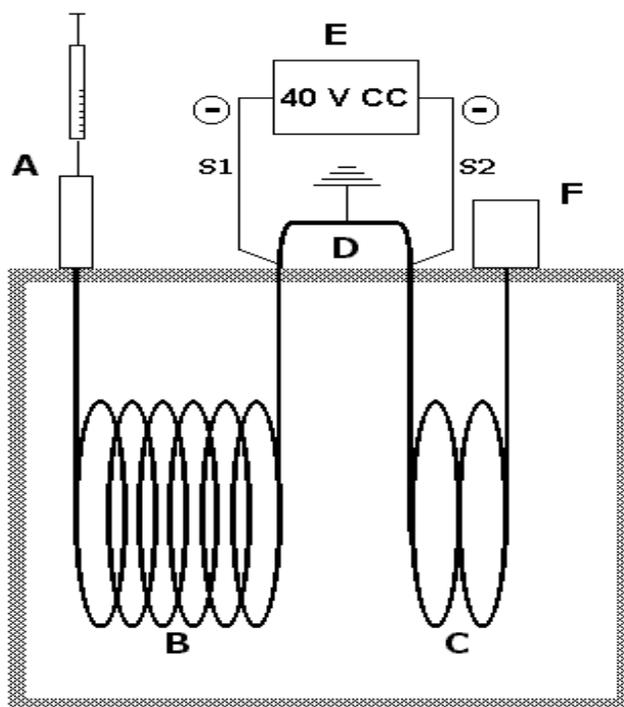


Figura 1 . Diagrama do Sistema de Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva de Liu e Phillips²¹: A – injetor; B – coluna da 1^a dimensão (21 m × 0,25 mm); C – coluna da 2^a dimensão (1 m × 0,1 mm); D – modulador; E – fonte de corrente contínua e F – detector por ionização em chama.

A conexão da fonte ao modulador era feita por três terminais, formando dois circuitos separados (S1 e S2 na figura) acionáveis individualmente por meio de chaves eletrônicas micro processadas.

A função do modulador era coletar continuamente frações do eluato da primeira coluna, reconcentrá-las (efeito também denominado focalização) e reinjetá-las na segunda coluna (Figura 2).

Inicialmente, com o circuito S1 não energizado e o circuito S2 energizado, a seção dianteira do modulador fica a temperatura ambiente e assim retém eluato vindo da primeira coluna (**A**). Durante certo intervalo de tempo, todo material eluído da primeira coluna é sorvido pelo filme de fase estacionária no setor dianteiro do modulador que se encontra a temperatura ambiente (**B**).

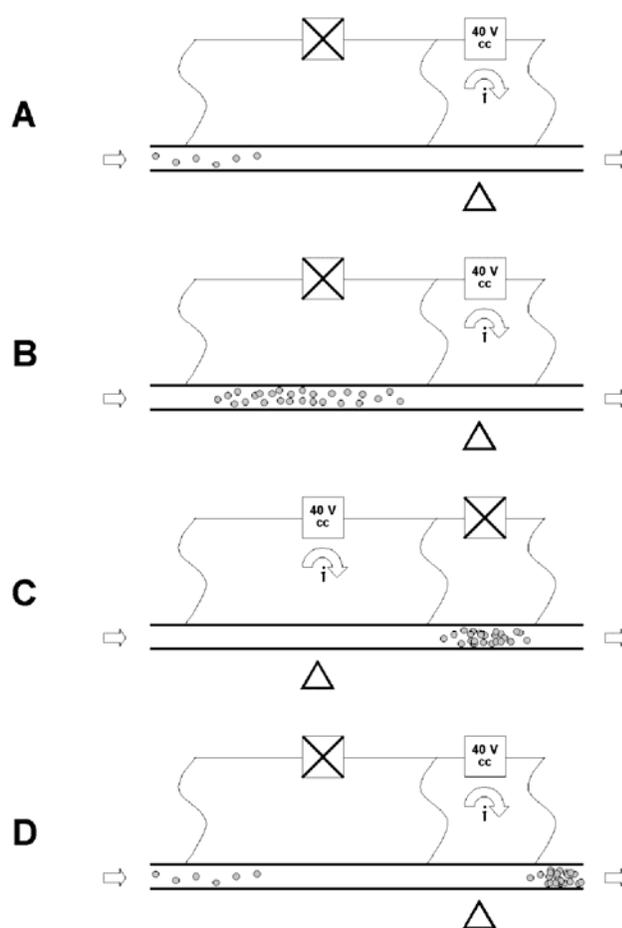


Figura 2 . Ciclo de funcionamento do modulador térmico de Liu e Phillips²¹ (para discussão, veja texto).

Em seguida, o circuito S1 é acionado e o circuito S2 desligado. A seção dianteira do modulador é aquecida rapidamente pela passagem de corrente elétrica pelo filme metálico, e os analitos retidos são desorvidos termicamente e eluem para o segundo setor do modulador (agora em temperatura ambiente), sendo recoletados formando uma banda estreita (**C**). Dada a baixa capacidade térmica das paredes da coluna cromatográfica, assim que desligada a corrente cada setor do modulador retorna rapidamente à temperatura ambiente. Após outro intervalo de tempo, o circuito S2 é ligado e o circuito S1 desligado (**D**), e o sistema retorna ao estado inicial (**A**). A fração reconcentrada no setor final elue para a segunda coluna, onde é separada, enquanto uma nova fração do eluato da primeira coluna começa a ser sorvida no setor inicial do modulador. O conjunto dessas operações de coleta, reconcentração e reinjeção de frações é denominado **modulação** (as etapas de coleta e reconcentração são também denominadas, respectivamente, aprisionamento e focagem); ela é repetida continuamente a partir da injeção da amostra, sendo o eluato da primeira coluna completamente fracionado e recromatografado na segunda coluna. Esta técnica foi chamada de **Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva, ou abrangente**³⁶ (**GC×GC** ou **GC²**). A inovação fundamental foi o uso de uma segunda coluna curta e eficiente: misturas simples (como as frações reinjetadas) podem ser separadas em alguns segundos, possibilitando ciclos de modulação rápidos (neste trabalho, 2 s) e fracionamento completo da amostra eluída sem aumento significativo do tempo total de análise em relação a uma separação cromatográfica unidimensional convencional.

O processo de modulação ocorre de maneira semelhante, segundo o mesmo mecanismo geral, em qualquer cromatógrafo a gás operando no modo GC×GC, independente do tipo de modulador utilizado.

Outro conceito deste trabalho que ainda aparece em sistemas modernos de GC×GC é a forma de representação gráfica dos cromatogramas. O registro do sinal do detector em função do tempo em um sistema GC×GC é uma sequência contínua e encadeada dos cromatogramas para cada fração eluída na segunda coluna. A partir desse registro digitalizado, e conhecido o **período de modulação**

(o intervalo de tempo para cada ciclo de modulação, que deve ser constante) pode-se construir cromatogramas tridimensionais Sinal do Detector \times Tempo de Retenção na 1ª Coluna (1t_R) \times Tempo de Retenção na 2ª Coluna (2t_R). Na Figura 3 uma banda cromatográfica larga, consistindo de três analitos não separados pela primeira coluna **(A)** é fracionada e eluída na segunda coluna gerando um cromatograma bruto **(B)**. Cada um dos cromatogramas individuais das frações pode ser destacado do cromatograma bruto **(C)** e a partir deles pode-se desenhar gráficos Sinal \times $^1t_R \times$ 2t_R como superfícies de resposta tridimensional (“3D Plot”, **D**), como uma série de curvas de nível monocromáticas (“Contour Plot”, **E**) ou usando escalas cromáticas de intensidade de sinal (“2D Colour Plot”, ou diagrama de contorno, **F**); atualmente esta última forma tem sido a preferida. Outro aspecto fundamental de GC \times GC pode ser destacado dessa figura. Cada uma das manchas no diagrama de contorno é um pico.

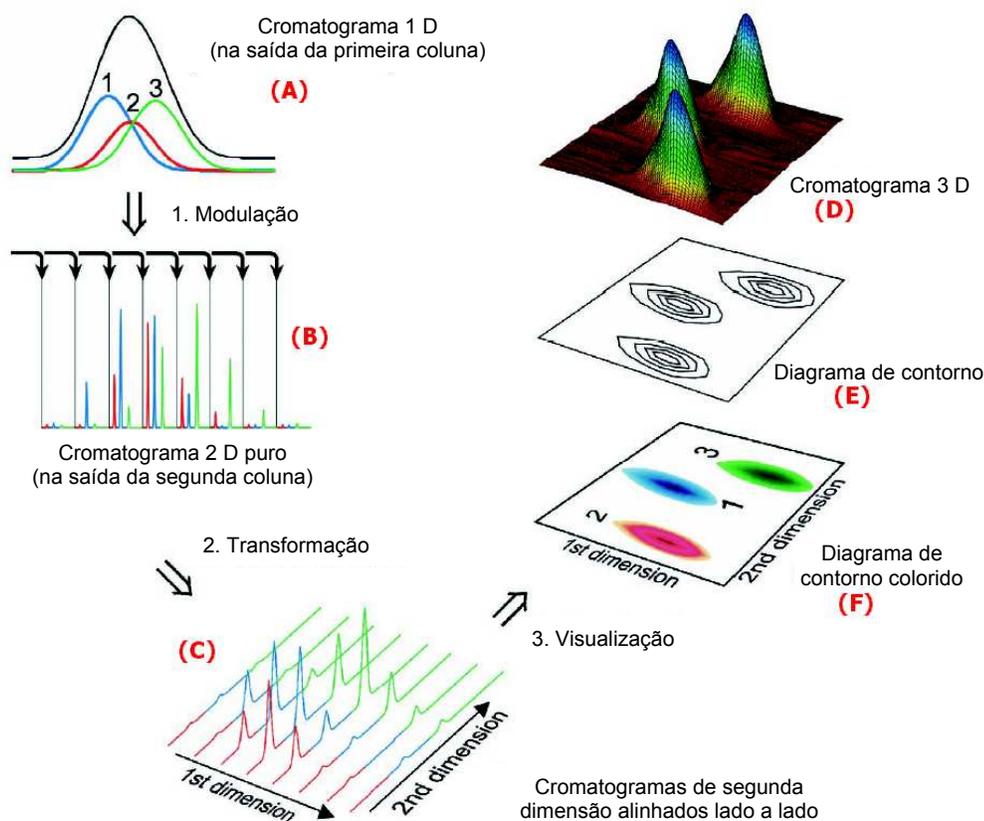


Figura 3. Construção de cromatogramas Sinal \times $^1t_R \times$ 2t_R em GC \times GC (modificado de Dallüge et al.²²).

O estreitamento das bandas cromatográficas decorrente da modulação também possibilita aumento significativo da detectabilidade: ao invés de eluir como um pico largo e baixo, cada analito elui como uma série de picos estreitos, mais intensos, com maiores relações sinal/ruído e, portanto, mais facilmente detectáveis.

A Figura 4 mostra a representação em escala cromática de sinal de um cromatograma típico obtido em um sistema GC×GC-FID – no caso, de óleo combustível extraído de sedimento marinho contaminado²³. Nessa figura, também é mostrado um cromatograma dessa amostra obtido com um sistema GC-FID convencional. Essa comparação é especialmente ilustrativa da potencialidade e poder de resolução de GC×GC. Em ambos cromatogramas, a maior parte das espécies elui com tempos entre 90 min e 270 min.

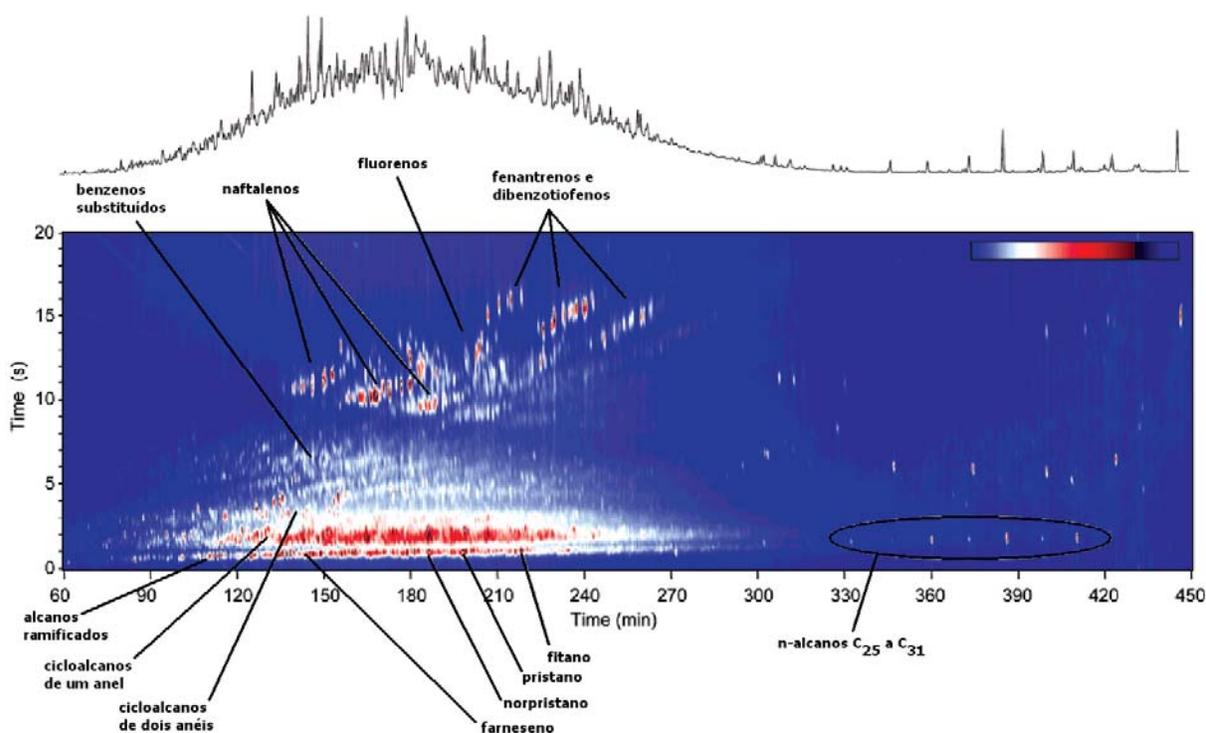


Figura 4. Seções de cromatogramas de petróleo extraído de sedimento contaminado: GC-FID (acima) e GC×GC-FID com modulador térmico de varredura (abaixo) (modificado de Reddy e cols.²³). Colunas: GC-FID: metilsilicone (60 m × 0,25 mm × 0,25 μm); GC×GC-FID: metilsilicone (10 m × 0,1 mm × 0,5 μm) + cianopropilfenilsilicone (0,75 m × 0,1 mm × 0,14 μm).

Entretanto, nessa região do cromatograma convencional – cujo perfil é típico dessas amostras de derivados de petróleo - não existe nenhum pico resolvido; apenas algumas espécies em maior concentração se sobrepõem e se distinguem da “montanha” de eluatos não separados.

Já no sistema GC×GC, na mesma faixa de tempo de corrida, diversos picos de analitos resolvidos ou grupos de eluatos correlacionados são visíveis: obtém-se um quadro muito mais claro da composição e diversidade da mistura sendo separada.

Os resultados das primeiras aplicações de GC×GC reportadas eram bastante impressionantes; p.ex., Liu et al²⁴, usando o sistema descrito acima separaram completamente 17 pesticidas, dois padrões internos e impurezas co-extraídas de soro humano por extração com fluido supercrítico com apenas 4,5 min de corrida. Porém, até o final da década de 90 o uso desta técnica foi restrito. Ainda que simples esse modulador apresenta diversos inconvenientes, como baixa durabilidade e dificuldade de confecção.²⁵ Só no final da década, quando moduladores mais confiáveis, assim como detectores rápidos e microcomputadores com maiores capacidades de memória e velocidades de processamento se tornaram disponíveis, é que a GC×GC começou realmente a se popularizar. Um levantamento na base de dados do ISI (*Web of Science*) mostrou que entre 1991 e 1999, apareceram menos de 10 artigos anuais sobre GC×GC; a partir de 1999 o número de publicações aumentou quase exponencialmente, chegando a cerca de 70 em 2007.

2. Objetivo

O objetivo do trabalho foi projetar e montar um dispositivo modulador de baixo custo para Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva, GC×GC e adaptá-lo a um cromatógrafo a gás comercial. Após a montagem do sistema GC×GC a meta foi estudar as variáveis e parâmetros relacionados às separações no mesmo, avaliar o seu desempenho e desenvolvê-lo por meio da análise de amostras de combustíveis.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Cromatografia Planar

A cromatografia planar está na origem principal da cromatografia bidirecional ou bidimensional. Primeiramente um solvente é eluído em uma direção para a eluição da amostra, colocada no canto da placa cromatográfica (ou papel); depois de seca a placa, outro solvente é utilizado para efetuar uma segunda corrida na qual a eluição ocorre em ângulo reto em relação à primeira, utilizando desta forma, as duas dimensões da placa. As posições finais das manchas dependem da interação dos componentes da amostra com as diferentes fases móveis. O resultado é o aproveitamento do plano 2D (bidimensional) para obter uma melhor separação que na forma 1D (unidimensional) convencional.

A idéia de submeter uma amostra a vários tipos de separação para aumentar a resolução e o poder de separação de um sistema cromatográfico foi extensamente discutida por Giddings ¹³ em 1984. No entanto, 40 anos antes desta discussão teórica, Consden e colaboradores²⁶ apresentaram um trabalho em que duas diferentes eluições cromatográficas foram realizadas ao longo de dois eixos de uma folha de papel (cromatografia em papel) para efetuar uma separação 2D de aminoácidos. Foram mostrados cromatogramas bidimensionais dos aminoácidos em tiras de papel de filtro e esta é considerada a primeira separação 2D compreensiva da história.

Kirchner et al. ²⁷ foram os pioneiros da cromatografia de camada delgada (TLC, do inglês Thin Layer Chromatography) bidimensional no início dos anos 50. Na segunda metade da mesma década Stahl ²⁸ discutiria mais extensamente a técnica. Entretanto, a separação planar mais importante foi demonstrada por O' Farrell ²⁹ em 1975. Mais de 1000 proteínas de uma cultura bacteriana foram separadas usando focagem isoelétrica em uma direção (na primeira eluição) e eletroforese em gel de sódio dodecilsulfonato-poliacrilamida na segunda. Eletroforese bidimensional em gel é ainda muito empregada atualmente na separação de DNA e proteína ³⁰.

Técnicas modernas de cromatografia planar oferecem alto poder de separação devido ao arranjo bidimensional. Cromatoplasmas com diferentes propriedades, uma grande variedade de combinações de solventes e técnicas de eluição garantem a essas separações maior capacidade de resolução frente a sistemas convencionais unidimensionais. Szabolcs Nyiredy ³¹, descreveu as aplicações dos sistemas modernos de cromatografia planar bidimensional. Esses sistemas compreendem: (1) Cromatografia planar compreensiva (PC×PC, onde PC é *Paper Chromatography*); técnica de Cromatografia Planar Multidimensional (MD-PC, do inglês *Multidimensional Planar Chromatography*) usando a mesma fase estacionária de monocamada e dois deslocamentos com diferentes fases móveis caracterizados por diferentes forças de solvente e diferentes valores de seletividade ou usando fase estacionária bicamada e dois deslocamentos com a mesma ou diferentes fases móveis. (2) Cromatografia planar seletiva (PC+PC); técnica de MD-PC na qual, após o primeiro deslocamento de fase estacionária um ponto (tirado de uma placa TLC/HPTLC ou retirado usando cromatografia em papel) é aplicado a uma segunda fase estacionária (igual ou diferente) para eluição subsequente dos compostos transferidos com a mesma fase móvel ou uma diferente. (3) Cromatografia planar modulada (ⁿPC); técnica de MD-PC que usa a mesma fase estacionária (em uma, duas ou três dimensões geométricas) utilizando sistemas de solvente/fase estacionária com força de solvente decrescente e diferentes valores de seletividade. (4) Cromatografia planar de camada acoplada (PC-PC); técnica de MD-PC que usa camadas acopladas com fases estacionárias ortogonais (nas quais mecanismos de retenção completamente independentes asseguram a separação) eluídas com sistema de solvente/fase estacionária de composição constante. (5) Métodos MD-PC combinados; uma combinação de pelo menos dois dos modos mencionados (1 a 4) ou o acoplamento de duas técnicas cromatográficas nas quais Cromatografia Planar é usada como segunda dimensão e outro método de separação (GC, HPLC, etc) como primeira.

Apesar da importância da cromatografia planar como ponto de partida para as técnicas multidimensionais de separação, em particular a cromatografia

gasosa, a maior parte dos desenvolvimentos em cromatografia multidimensional nas últimas duas décadas envolveu sistemas com colunas acopladas, mais adequados à automação e a medidas quantitativas. Estes serão os sistemas abordados deste ponto em diante.

3.2 GC 2D com *Heart cutting* (GC-GC)

Há uma variedade de maneiras pelas quais colunas podem ser acopladas em arranjos denominados bidimensionais. O que é comum, no entanto, a todos os processos é que segmentos ou bandas do eluato de uma primeira separação são direcionados para uma segunda coluna de diferente seletividade de fase estacionária.

Basicamente as aplicações de GC bidimensional apresentadas dos anos 60 até início dos anos 90 se referiam a acoplamento de colunas com a transferência de um número limitado de frações discretas de eluato de uma coluna, para uma segunda coluna cromatográfica. Este método é denominado na literatura “heart cut” ou “heart cutting” GC. Neste, são utilizadas colunas de capacidades de resolução equivalentes. Assim, o tempo de retenção dos analitos em cada uma delas é significativo em relação à outra. A injeção contínua de frações do eluato da primeira coluna na segunda, como ocorre em GC×GC, acarretaria a injeção de uma fração antes que a anterior tivesse eluído, causando risco de coeluição. Disto decorre a reinjeção de apenas algumas partes do efluente da primeira coluna para ser recromatografado em uma segunda o que, no entanto, não é um fator que comprometa drasticamente a aplicabilidade desta técnica.

Em 1958 Simmons e Snyder¹⁷ de forma pioneira publicaram um trabalho no qual foi descrito um sistema cromatográfico que utilizava duas colunas cromatográficas empacotadas, uma apolar e uma polar, na separação bidimensional de amostras petroquímicas. Por meio de um arranjo de válvulas era possível selecionar frações do eluato da primeira coluna e reinjetá-las na segunda coluna. Somente quando as frações que se desejava submeter a uma segunda separação emergiam, em tempos pré-determinados, da primeira coluna, é que estas eram direcionadas via acionamento das válvulas para a segunda coluna. O

restante da amostra era purgada do sistema. Desta maneira “cortes” da amostra que sofrera separação da primeira coluna eram injetados novamente em uma segunda coluna (por este motivo a técnica foi mais tarde denominada “heart-cutting” GC). O sistema foi empregado na análise de compostos C-5 a C-8, de uma fração da gasolina denominada “Platformer” e ficou demonstrado o ganho de resolução fornecido pelo equipamento, uma vez que isômeros C-5 a C-8 que emergiam da primeira coluna mal resolvidos, foram separados na segunda etapa. É importante notar que a diferença de mecanismos de separação das colunas é que forneceu um ganho de resolução dos picos, após a segunda eluição.

Diversos outros sistemas para cromatografia 2D *heart cutting* foram desenvolvidos após o trabalho de Simmons e Snyder¹⁷. O princípio de funcionamento de todos eles é semelhante, sendo que o avanço da tecnologia trouxe a vantagem da automação e mais tarde da informatização.

Dez anos depois do trabalho de Simmons e Snyder, Deans¹⁸ introduziu um princípio básico que foi posteriormente utilizado extensivamente para *heart cutting* em sistemas bidimensionais. A base do método era o desvio do fluxo do gás de arraste por ajuste da pressão em junções que compunham o sistema. As junções eram ligadas às duas colunas cromatográficas acopladas em série. O fluxo em cada junção era controlado por válvulas solenóides e manipulado de maneira que a intervalos pré-determinados fossem injetadas partes (“cortes”) do efluente da primeira coluna, na segunda para uma nova separação. A automação apresentada no sistema facilitou seu uso em relação a sistemas mecânicos como o de Simmons, porém o uso de controladores modernos de vazão e pressão integrados a computadores torna atualmente sistemas semelhantes ao de Deans mais fáceis de serem operados, bem como mais confiáveis. Alguns sistemas continuaram surgindo baseados no princípio do modelo de Deans e foram extensivamente revisados por Bertsch³². Gordon et al³³ estudaram vários sistemas para a análise de amostras complexas que eram, no entanto, de operação complexa e manual o que fez com que esses instrumentos nunca fizessem parte de análises de rotina. Havia problemas com a pressão de operação que determinava os “cortes” que

seriam reinjetados em uma segunda coluna, comprometendo a repetibilidade dos tempos de retenção.

O problema principal dos sistemas de cromatografia gasosa bidimensional por *heart-cut* seria mais tarde resolvido com o surgimento do controle eletrônico de pressão e vazão do gás de arraste. A utilização do aprisionamento criogênico de pequenas frações de eluato também representou um avanço no desenvolvimento da cromatografia bidimensional. As larguras de picos resultantes da separação na primeira coluna limitam o poder de resolução da segunda coluna; a focagem é o principal mecanismo de redução desse efeito de dispersão. Bertsch (1990) apud Mondello (2001)³⁹ destacou as vantagens da focagem, entre elas: (1) conhecer o ponto de partida exato da segunda dimensão, (2) adição de várias frações antes da injeção, (3) possibilidade de conectar colunas recheadas de alta vazão com colunas de pequeno diâmetro e baixa vazão de operação, (4) aumento de detectabilidade, (5) redução do alargamento de picos, (6) adição de injetores auxiliares para adição de padrões e (7) possibilidade de operação de duas colunas analíticas com diferentes gases de arraste.

Namara e colaboradores³⁴ empregaram um sistema com dois cromatógrafos para a realização de separações 2D e análise de pesticidas em óleo essencial de limão, empregando o princípio do “inversor de Deans” para a transferência de frações. Entre os dois cromatógrafos encontrava-se uma linha de transferência, ligando serialmente as duas colunas capilares empregadas. Nesta parte do sistema era realizado o aprisionamento dos analitos eluídos da primeira coluna para posterior reinjeção e separação em um segundo forno (segundo cromatógrafo), contendo a segunda coluna. O sistema de aprisionamento era criogênico e com controle pneumático. Foi utilizada uma coluna HP-5 MS no forno principal e uma DB-17 MS no segundo forno. Primeiramente foi realizada uma corrida convencional por GC-MS no cromatógrafo do forno principal e em seguida a corrida 2D. Dessa forma pôde-se pré-determinar os tempos desejados para realizar os “cortes”. A utilização de forno secundário para realizar a segunda separação aumenta o custo de operação, porém oferece a vantagem do controle independente da temperatura da segunda coluna.

Sistemas bidimensionais de cromatografia gasosa continuaram sendo desenvolvidos e aplicados.

3.3 Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva (GC×GC)

3.3.1 Desenvolvimento da GC×GC

Como descrito na introdução, em 1991, Liu e Phillips²¹ introduziram o primeiro sistema GC×GC. Desde então o número de trabalhos que empregaram esta técnica apresentados na literatura aumentou quase exponencialmente. A Figura 5 mostra a evolução do número de publicações em GC×GC de 1991 a junho de 2008. Nota-se o aumento consistente e a manutenção de uma tendência do interesse crescente pela pesquisa em Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva, sobretudo a partir do ano de 2002.

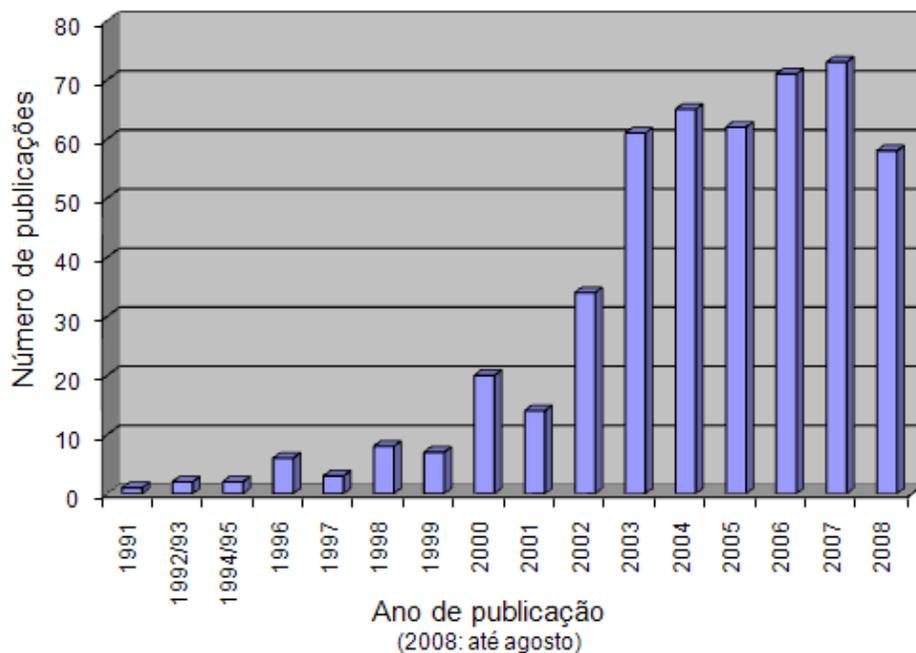


Figura 5. Número de publicações de artigos sobre GC×GC em periódicos indexados em função do ano de publicação. Palavras chave utilizadas na pesquisa na base de dados Web of Science: GC×GC, comprehensive two-dimensional gas chromatography.

A maior parte do que foi reportado envolvendo aspectos teóricos e instrumentação em GC×GC ocorreu até o ano de 2004. Entretanto, trata-se de uma técnica relativamente nova e investimentos neste âmbito continuam ocorrendo, apesar do aumento acentuado do interesse em aplicações da técnica e desenvolvimento de métodos.

3.3.2 Princípios e Vantagens de GC×GC

A vantagem de GC×GC sobre *heart-cut* GC fica aparente quando se trata de uma amostra de alta complexidade ou para a qual se quer analisar a composição de compostos desconhecidos e não somente os chamados “compostos-alvo” (target analytes) como ocorre em *heart-cut* GC.

O princípio de funcionamento de um sistema GC×GC é comum a todos os equipamentos do gênero, como o de Liu e Phillips²¹, descrito na introdução. A técnica é baseada na coleta contínua do efluente de uma coluna cromatográfica e reinjeção periódica de pequenas porções do efluente em uma segunda coluna de propriedades diferentes (tanto dimensões, quanto fase estacionária). O processo é repetido em uma velocidade alta o suficiente para que cada pico eluído da primeira coluna seja amostrado pelo menos três vezes. Desta maneira, a separação obtida na primeira coluna é mantida, sendo realizada uma separação adicional na segunda. O mecanismo fundamental do sistema é uma interface que conecta fisicamente primeira e segunda coluna e realiza a coleta e reinjeção periódicas, denominada *modulador*. Os dados obtidos de uma corrida GC×GC devem ser convertidos da forma linear para uma representação 2 D utilizando algoritmos e *softwares* dedicados para esta tarefa.

Entre as características de GC×GC que a diferenciam da cromatografia gasosa unidimensional convencional estão, em primeiro lugar, a capacidade de separação muito maior. Segundo, devido ao efeito de focagem ou reconcentração, há um aumento de detectabilidade. Em terceiro, se as condições de ortogonalidade adequadas foram criadas, compostos quimicamente relacionados se arranjam em grupos, o que facilita a caracterização da amostra estudada.

Se a capacidade de uma dimensão é estimada baseando-se no número de picos de uma certa largura de base x ($= 4\sigma$) s que podem ser ajustados ou distribuídos em um tempo total de eluição y s, então cerca de y/x picos podem ser separados. Em GC×GC, pode-se aproximar a capacidade calculando-se quantas “áreas de picos” se ajustam na área total disponível. Por exemplo, considere-se um pico de 15 s de largura de base na primeira dimensão e 200 ms na segunda dimensão, com tempo de modulação 4 s. Então para 60 minutos de análise teremos uma capacidade de $(3600/15) \times (4/0,2) = 4800$ picos. Esta capacidade não é normalmente utilizada em sua totalidade na análise. Porém a capacidade de separação aumenta enormemente em tais sistemas, demonstrando a vantagem das análises por cromatografia gasosa bidimensional³⁹.

Tanto os princípios quanto as vantagens de GC×GC serão mais bem discutidos nas seções seguintes, em que são apresentados os componentes do sistema e seus respectivos papéis no desempenho do mesmo.

3.3.3 Estruturação em GC×GC

Esta talvez seja a mais importante característica de GC×GC e que lhe confere possibilidades especiais de separação e caracterização de amostras. GC×GC possibilita o posicionamento de picos no espaço 2D de acordo com as propriedades químicas dos componentes da amostra e leva ao reconhecimento de grupos de compostos quimicamente semelhantes presentes na mesma. Marriott e colaboradores⁴⁶, exemplificaram essa propriedade com cromatogramas resultantes da análise de amostras petroquímicas e de PCB (Figura 6).

Freqüentemente é descrito como ‘polaridade’ a propriedade da segunda coluna responsável pelas diferenças de retenção nesta dimensão de separação. Esta idéia, no entanto, é generalista. Observa-se na Figura 6 que há uma variação sistemática nas propriedades químicas das moléculas que levam a pequenas mudanças nas interações com a fase estacionária e conseqüente aumento ou diminuição na retenção do analitos. O entendimento das características químicas estruturais que explicam essas variações não se encontra ainda estabelecido na literatura. O melhor entendimento da natureza das

separações GC×GC e as propriedades químicas decorrentes das geometrias moleculares podem ser investigados se relações retenção-estrutura forem quantificadas.

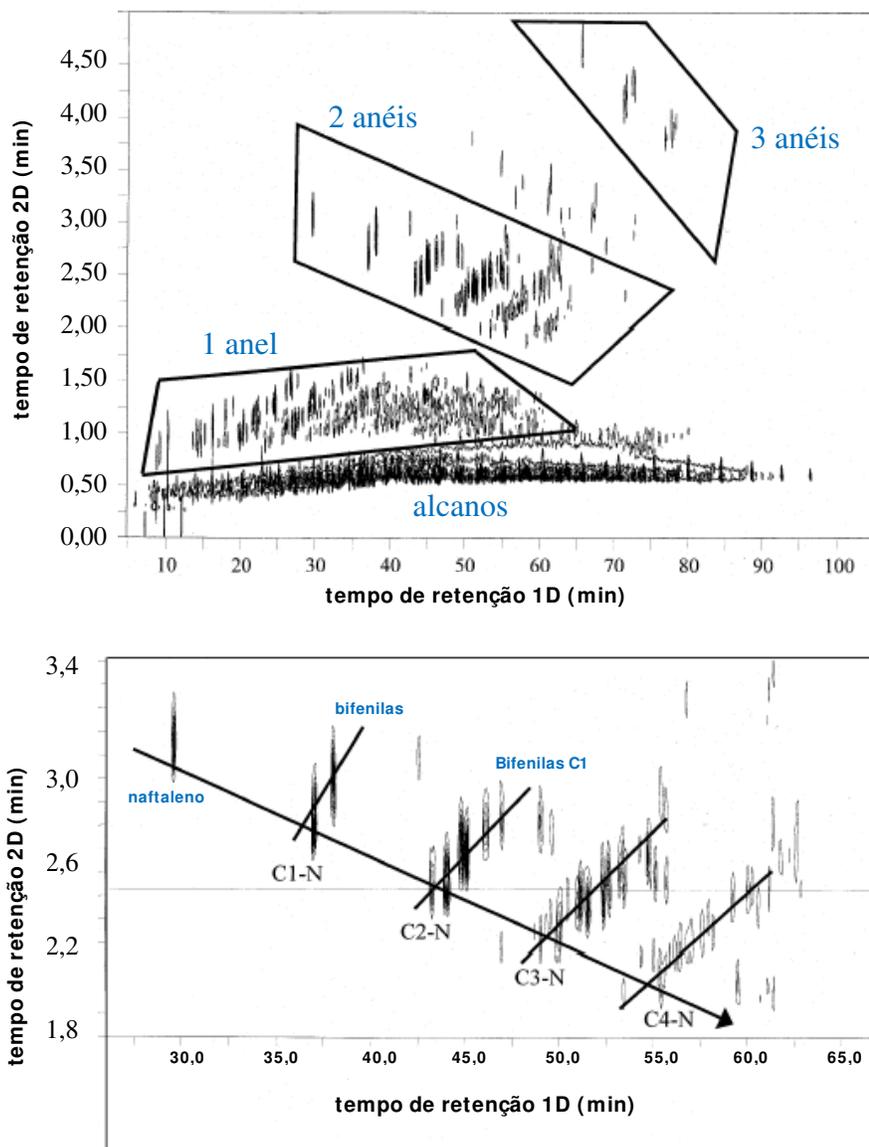


Figura 6. Separação GC×GC de diesel em um conjunto de colunas BPX5-BP20 (modificado de Marriott e cols⁴⁶). Na segunda coluna polar, alcanos são pouco retidos, enquanto aromáticos são crescentemente retidos com o número crescente de anéis. Na expansão da região de di-aromáticos (parte de baixo da Figura), tendências de retenção podem ser identificadas sugerindo que há propriedades químicas molecular-específicas que influenciam nas retenções dos componentes. Cx-N: naftaleno com x carbonos substituintes.

3.3.4 Termos e Definições em GC×GC

O uso de termos e símbolos claros, sem ambigüidades e bem definidos ajuda na comunicação entre os pesquisadores dos métodos de separação e entre estes e a comunidade científica.

Uma sessão no primeiro Simpósio Internacional em Cromatografia Gasosa Multidimensional (6 a 7 de março de 2003, Volendam - Holanda) foi organizada para discutir a terminologia e nomenclatura utilizados nesta técnica³⁵. Termos e conceitos como ortogonalidade, cromatografia compreensiva, modulação, entre outros, bem como os símbolos aplicados à nova tecnologia, foram definidos. Os Quadros 1 e 2 apresentam alguns dos termos sugeridos no Simpósio, além da tradução sugerida na literatura.

No Brasil ainda não existem normas para a uniformização da nomenclatura na área da cromatografia multidimensional abrangente³⁶. No entanto, a literatura apresenta uma proposta de nomenclatura para a língua portuguesa³⁶, dos termos utilizados em cromatografia gasosa bidimensional, também discutida no 1º Workshop em Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (15 a 18 de janeiro, 2007, Porto Alegre – RS).

A simbologia, bem como os termos relacionados à área, empregados no presente trabalho são os adotados internacionalmente e os discutidos na literatura nacional.

Os Quadros 2 e 3 apresentam, respectivamente, as abreviações e a lista de símbolos adotados no Primeiro Simpósio em Cromatografia Gasosa Multidimensional Abrangente³⁵.

Quadro 1: Nomenclatura sugerida no Primeiro Simpósio Internacional de Cromatografia Gasosa Multidimensional Compreensiva e respectiva sugestão de tradução (principais termos)^{35,36}.

Termo	Tradução sugerida	Definição
Modulator	Modulador	Interface entre as duas colunas em um sistema GC ² que acumula ou estreita as bandas de amostras do eluato da 1ª coluna para reinjeção rápida na segunda coluna.

Quadro 1: Nomenclatura sugerida no Primeiro Simpósio Internacional de Cromatografia Gasosa Multidimensional Compreensiva e respectiva sugestão de tradução (principais termos). *Continuação*

Modulation time or Modulation period (P_M)	Tempo ou período de modulação (P_M)	Duração de um ciclo completo de modulação em um sistema de separação compreensiva bidimensional, i.e., o tempo entre duas injeções sucessivas na segunda coluna.
Modulation frequency (f_M)	Frequência de modulação (f_M)	Número de modulações por unidade de tempo.
Modulation number (n_M)	Número de modulação (n_M)	O número de modulações para um dado pico de primeira dimensão.
Modulation cycle	Ciclo de modulação	Compreende um evento de modulação completo.
Single-stage modulation	Modulação de um estágio	Compressão e/ou acumulação e injeção da banda cromatográfica através de uma série de processos em apenas um local no modulador
Dual-stage modulation	Modulação de dois estágios	Compressão e/ou acumulação e injeção da banda cromatográfica através de uma série sucessiva de processos, em dois locais diferentes no modulador.
Modulated peaks	Picos Modulados	Picos gerados pela separação que ocorra na segunda coluna, após o evento de modulação que, agrupados, representam o pico primário
In-phase modulation	Modulação em fase	É a fase da modulação que produz uma seqüência simétrica de picos, apresentando um único pico mais intenso entre os picos modulados (Figura 7 a). Quando a modulação está em fase, o tempo de retenção do pico primário está mais próximo do tempo de retenção do pico modulado mais intenso.
Out-of-phase modulation	Modulação fora de fase	Qualquer fase que produz uma distribuição não simétrica dos picos modulados, em relação a um pico modulado central (Figura 7 b e c). Quando os picos modulados estão distribuídos de forma simétrica, mas sem um pico central mais intenso, a modulação é chamada 180° fora de fase, como ilustrado na Figura 7c.
Parent peak	Pico Primário	Pico obtido por cromatografia monodimensional, que corresponde ao pico de origem dos picos modulados, obtidos por cromatografia multidimensional abrangente.

Quadro 1: Nomenclatura sugerida no Primeiro Simpósio Internacional de Cromatografia Gasosa Multidimensional Compreensiva e respectiva sugestão de tradução (principais termos). *Continuação*

Termo	Tradução sugerida	Definição
Modulation phase F_M	Fase da Modulação	Definida pela relação entre os eventos de modulação e a distribuição do soluto entre os picos modulados. A fase de modulação é utilizada para ajustar a posição do máximo do pico relativamente aos eventos de modulação. A Figura 7 apresenta cromatogramas obtidos para os picos modulados de um composto, antes da conversão em diagrama de contorno ou outra representação gráfica. Para verificar a fase da modulação, os picos modulados são comparados a uma curva gaussiana.
Wrap-around	Pico fora do ciclo	Efeito observado quando um determinado composto apresenta um tempo de eluição na segunda coluna superior ao P_M . Exemplo: um composto tem ${}^2t_R = 7s$ e o $P_M = 4s$. Como o gráfico bidimensional apresenta o tempo de retenção na segunda dimensão igual ao período de modulação, o pico não poderá aparecer com tempo de retenção na segunda dimensão superior ao P_M . Se isto ocorrer o composto aparecerá no próximo ciclo de modulação, com tempo de retenção na coluna de segunda dimensão = ${}^2t_R - P_M$.
Focussing efect	Efeito de focalização (ou focagem)	Redução da largura da banda (em unidades de tempo, distância e/ou volume). Igual à razão entre a largura da banda sem modulação e a largura da banda com modulação.
Separation space	Espaço de separação	A região no gráfico bidimensional GC ² no qual os compostos se distribuem
Column set cross sectional area ratio	Razão das seções do conjunto de colunas	A mudança relativa em área seccional transversal da coluna ¹ D para ² D do conjunto de colunas.
Zone compression	Zona de Compressão	O efeito de reduzir a largura de um pico cromatográfico no espaço ou no tempo de forma a resultar em maior concentração do (s) componente(s) do mesmo dentro da coluna cromatográfico.

Quadro 1: Nomenclatura sugerida no Primeiro Simpósio Internacional de Cromatografia Gasosa Multidimensional Compreensiva e respectiva sugestão de tradução (principais termos). *Continuação*

Termo	Tradução sugerida	Definição
Chromatographic structure	Estrutura cromatográfica	A ordem observada de compostos quimicamente relacionados no plano de uma separação compreensiva bidimensional.
Roof-tile efect	Efeito Telhado	Perfil relativo ao agrupamento de picos de uma classe de compostos quimicamente relacionados em um espaço de separação, o qual se repete quando o número de carbono destes compostos aumenta ou diminui, de forma a causar uma impressão visual de “telhado” no gráfico bidimensional, sendo que cada conjunto alinhado de “telhas” corresponde a um grupo de compostos pertencentes a uma classe química que apresenta um determinado número de carbonos. Esta distribuição espacial de telhas em seqüência no diagrama de contorno auxilia na identificação dos compostos e pode ser observada especialmente em amostras petroquímicas.

Quadro 2: Abreviações sugeridas no Primeiro Simpósio em Cromatografia Gasosa Multidimensional Abrangente e outras abreviações³⁵.

GC×GC	Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente
GC×GC - FID	Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente com Detector de Ionização em Chama
GC×GC / MS	Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente com Detector de Massas
LC×LC	Cromatografia Líquida Bidimensional Abrangente
LC×SEC	Cromatografia Líquida e por Exclusão Bidimensional Abrangente
LC×GC	Cromatografia Líquida e Gasosa Bidimensional Abrangente
SFC×GC	Cromatografia Supercrítica e Gasosa Bidimensional Abrangente
GC×GC×GC	Cromatografia Gasosa Tridimensional Abrangente
SFC×LC×CZE	Cromatografia por exclusão de tamanho, líquida e eletroforese capilar tridimensional abrangente
LC×GC×GC	Cromatografia Líquida Acoplada à Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente
GC×2GC	Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente com Duas Colunas Paralelas na Segunda Dimensão

Quadro 3: Lista de símbolos adotados em cromatografia bidimensional abrangente^{35,36}.

${}^1D, {}^2D$	Primeira dimensão e segunda dimensão, respectivamente.
${}^1d_C, {}^2d_C$	Diâmetros internos das colunas da primeira e da segunda dimensão, respectivamente.
${}^1d_f, {}^2d_f$	Espessuras dos filmes da primeira e da segunda coluna, respectivamente, para colunas tubulares abertas (GC)
${}^1d_p, {}^2d_p$	Diâmetro de partícula da primeira e da segunda coluna, respectivamente, para colunas recheadas (LC)
f_M	Frequência de modulação – número de modulações por unidade de tempo, normalmente expressa em modulações por min
${}^1I, {}^2I$	Índices de retenção de um pico eluído da primeira e da segunda coluna, respectivamente.
${}^1k, {}^2k$	Fatores de retenção de um pico eluído da primeira e da segunda dimensão, respectivamente.
${}^1N, {}^2N$	Números de pratos da primeira e da segunda dimensão, respectivamente.
${}^1n, {}^2n$	Capacidades de picos da primeira e da segunda coluna, respectivamente. Entende-se por capacidade de picos o número máximo de componentes que podem ser separados em um determinado intervalo de tempo, com uma resolução específica, em determinado sistema cromatográfico.
n_M	Número de modulação - número de modulações obtidas para um determinado pico primário
${}^1R_S, {}^2R_S$	Valores de resolução de um par de picos eluídos da primeira e da segunda dimensão, respectivamente.
${}^1T_e, {}^2T_e$	Temperaturas de eluição de um pico eluído da primeira e da segunda dimensão, respectivamente.
${}^1t_M, {}^2t_M$	Tempos de retenção de um composto não retido pela fase estacionária da primeira e da segunda dimensão, respectivamente.
${}^1t_R, {}^2t_R$	Tempos de retenção de um pico na primeira e na segunda dimensão, respectivamente.
${}^1\bar{u}, {}^2\bar{u}$	Velocidades lineares médias na primeira e na segunda dimensão, respectivamente.
${}^1W_b, {}^2W_b$	Largura do pico na linha de base dos picos eluídos na primeira e na segunda dimensão, respectivamente.
${}^1\sigma, {}^2\sigma$	Desvios padrões dos picos eluídos da primeira e da segunda dimensão, respectivamente.
τ_Z	Período de amostragem adimensional, definido como a razão entre o período de amostragem do modulador e o desvio padrão do pico primário (a)

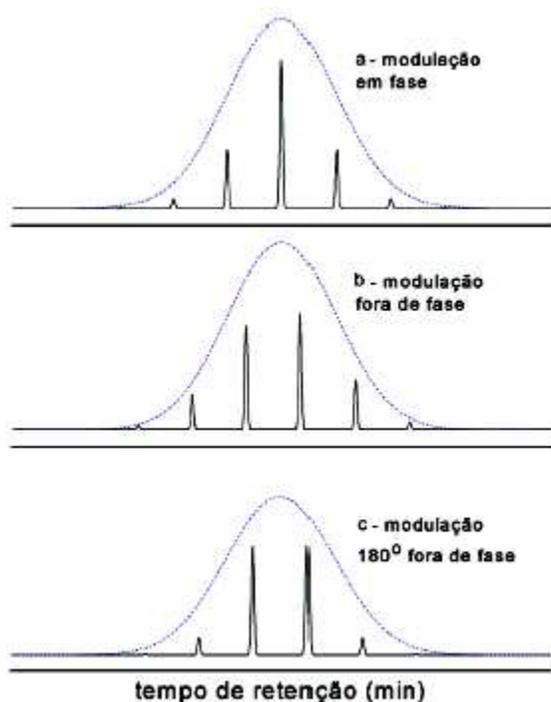


Figura 7. Esquema representando as fases de modulação, em comparação a uma curva gaussiana. Modificado de Marriott e cols⁴⁶.

3.3.5 Separação “Compreensiva”

Como definir quando um processo bidimensional de separação pode ser chamado compreensivo e o conceito de ortogonalidade, são dois dos temas mais importantes e extensivamente discutidos nos trabalhos publicados principalmente até o ano de 2000. No artigo de Schoenmakers, Marriott e Beens³⁵, que aborda a nomenclatura e as convenções adotadas no primeiro simpósio internacional em GC multidimensional compreensiva, os autores definem que uma separação bidimensional pode ser chamada compreensiva se:

- a) Cada parte da amostra é sujeita a duas separações diferentes
- b) Iguais percentagens (100% ou menos) de todos os componentes da amostra passam através de ambas as colunas e chegam ao detector.

- c) A separação (resolução) obtida na primeira dimensão é essencialmente mantida.

Os autores sugerem entender-se 'essencialmente mantida', como uma redução na resolução aparente da primeira dimensão, de no máximo 10%, uma vez que se considera impossível manter-se 100% da separação na primeira dimensão. O parâmetro que garante a preservação da resolução obtida na primeira dimensão de separação é o número mínimo de cromatogramas de segunda dimensão (número de "fracionamentos" do pico de primeira dimensão), estabelecido como três a quatro^{35,40}.

O uso do termo "comprehensive" foi extensamente discutido no simpósio. Foi estabelecido que o termo também pode ser empregado em uma separação quando a amostra a ser analisada se trata de uma parte extraída de uma "amostra de partida". Por exemplo, um extrato de uma planta pode ser tratado como a amostra a ser analisada, da mesma forma que o soro obtido de sangue, uma fração da destilação de petróleo, uma fração específica obtida de uma separação cromatográfica, etc. Em todos esses casos, bem como em outros semelhantes, a amostra obtida de outra pode ser tratada como amostra principal e ser analisada "compreensivamente" e não como uma fração a ser reinjetada configurando uma separação no modo *heart cut*³⁵.

Quanto à condição b), desde que a razão split seja igual para todos os componentes da amostra, o termo "comprehensive" não precisa ser reservado somente aos casos em que 100% dos analitos são transferidos à segunda dimensão. Se o cromatograma obtido é idêntico (levando-se em consideração à mudança nas intensidades de sinal devido à injeção de uma menor porção da amostra como consequência do uso do fator split) àquele obtido com 100 % de transferência, o termo "comprehensive" pode ser usado. Em outras palavras, uma "representação fiel" do cromatograma deve ser obtida na cromatografia bidimensional verdadeiramente compreensiva. Na prática não é fácil obter uma representação fiel do que seria o cromatograma resultante da injeção de 100 % dos analitos quando o fator de transferência não é 100%. A seleção de frações

para transferência para a segunda coluna é acompanhada de variação das frações individuais de picos. O uso do modo split de injeção pode causar discriminação dos analitos das amostras. Na dúvida deve-se falar em “separações aproximadamente bidimensionais compreensivas”.

3.3.6 Ortogonalidade

Em GC×GC ortogonalidade não diz respeito a duas dimensões que não têm nada em comum, como se poderia pensar, mesmo porque em ambas a mesma técnica, cromatografia gasosa, é utilizada. A ortogonalidade é, portanto, alcançada por meio de um processo de ajuste de mecanismos de separação que procura minimizar o que pode haver em comum entre as dimensões. Esse processo na prática se dá pela escolha das colunas que constituirão a primeira e segunda dimensões.

Ortogonalidade é importante por duas razões. Primeiro, uma separação ortogonal utiliza eficientemente o espaço de separação e também o tempo e tem assim maior capacidade de pico que separações não ortogonais. Segundo, a retenção nas duas dimensões de um cromatograma ortogonal é determinada por dois mecanismos diferentes e independentes fornecendo duas medidas diferentes de propriedades moleculares. Em separações multidimensionais é importante minimizar “informação cruzada”. Se há muita informação cruzada, haverá pouca ortogonalidade e, portanto, muito espaço de separação não ocupado⁵⁷.

Venkatramani et al⁵⁷ mostraram que há duas maneiras de se obter ortogonalidade. A primeira consiste em combinar técnicas que utilizem mecanismos diferentes para a separação, como os métodos cromatográficos-espectroscópicos hifenados. A segunda abordagem consiste em tornar ortogonal o sistema de separação variando ou ajustando as condições de operação da segunda dimensão em função do andamento da separação na primeira. A segunda abordagem envolve condições variáveis ou ajustáveis durante a corrida cromatográfica. Em cromatografia isso é possível, ajustando a retenção por meio da variação de temperatura, o que não ocorre nos métodos espectroscópicos.

Métodos multidimensionais de separação exploram diferentes propriedades de solutos ou respostas dos mesmos a diferentes processos físicos ou instrumentais, geralmente acoplados em série. Um alto grau de correlação pode reduzir uma separação multidimensional a uma separação essencialmente unidimensional. Se os mecanismos de separação das duas dimensões (dois diferentes processos ou etapas de separação, utilizados em um sistema bidimensional) são muito similares, o grau de correlação existente reduzirá a capacidade de separação da análise. Um sistema de separação e seu modo de detecção também podem ser ditos ortogonais como HPLC-DAD (HPLC com detecção por arranjo de diodos), onde não há correlação entre os tempos de retenção em HPLC e o espectro UV dos componentes da amostra. Análises bidimensionais ortogonais são obtidas pelo uso de dois diferentes instrumentos, como em HPLC-GC; HPLC-eletroforese capilar, nos quais os solutos respondem diferentemente ao processo de separação em cada dimensão³⁹. O instrumento analítico mais conhecido para análise bidimensional ortogonal de rotina é o GC-MS, sendo o espectrômetro de massas a segunda dimensão.

A inexistência de correlação entre os mecanismos de separação caracteriza a *ortogonalidade* entre os mesmos. No entanto, o termo *ortogonal* ou *ortogonalidade* é usado freqüentemente na literatura e sua interpretação muitas vezes é feita de maneira incorreta.

Enquanto o termo ortogonalidade é bem definido em matemática e estatística, na literatura das separações bidimensionais ele tem sido usado de maneira inconsistente, meramente para indicar diferentes separações ou mecanismos em vez de separações “perpendiculares” ou “independentes”.

A Tabela 1 destaca as definições de ortogonalidade nesses diferentes campos da ciência. A definição analítica implica que mecanismos de retenção completamente independentes são empregados nas duas dimensões³⁵. Cabe ressaltar, no entanto, que se um mecanismo de separação dito ortogonal levará ou não a uma boa separação depende sobretudo da amostra. Por exemplo, se a primeira dimensão separa de acordo com os pontos de ebulição e a segunda

dimensão é estéreo-seletiva, apenas estéreo isômeros na amostra irão apresentar uma separação bidimensional ortogonal.

Tabela 1 - Definições de “ortogonalidade” em vários campos da ciência

Campo	Definição de Ortogonalidade
Matemática*	De dois vetores ou funções: perpendicular; tendo um produto interno igual a zero.
Estatística*	De um conjunto de variáveis: estatisticamente independente. De um projeto experimental: tal que as variáveis sob investigação podem ser tratadas como estatisticamente independentes.
Química Analítica	De duas dimensões de separação: tal que os tempos de eluição nas duas dimensões podem ser tratados como estatisticamente independentes.

* do Oxford English Dictionary (edição on-line). Modificado de Schoenmakers et al³⁵.

É fácil imaginar que a utilização de duas colunas de mesma fase estacionária operadas nas mesmas condições de temperatura não irá resultar na separação de dois componentes de uma amostra coeluídos na primeira coluna. Em Cromatografia Gasosa multidimensional a ortogonalidade será conferida ao sistema pelo uso de duas colunas de propriedades diferentes. Sendo assim, faz-se uso de colunas de fases estacionárias diferentes para que o mecanismo de interação entre os componentes de uma mistura com cada coluna seja diferente.

Ortogonalidade em si não é uma vantagem, mas sim a possibilidade de utilização do plano 2D de separação gerando a estruturação característica dos cromatogramas GC×GC¹⁶. Esta estruturação dos cromatogramas GC×GC, agrupando compostos com propriedades químicas semelhantes, é que possibilita a identificação de grupos químicos em amostras que contêm compostos como séries homólogas, isômeros ou congêneres. Esta possibilidade de análise por grupos químicos é uma das principais características e uma das maiores vantagens de GC×GC.

A escolha das colunas é feita procurando-se a melhor separação possível da mistura de componentes. Diz-se que se quer “maximizar” a ortogonalidade das

colunas. Idealmente isso significa que se quer separar na segunda coluna, os compostos que não foram resolvidos na primeira, baseando-se em diferenças moleculares entre os solutos. Entretanto, se dois solutos são muito similares em suas propriedades, um conjunto de colunas ortogonal não será facilmente encontrado para esta separação (p. ex. no caso de hidrocarbonetos de cadeia linear e ramificada). Será então considerada a separação por classes químicas.

Uma combinação ortogonal de colunas, no entanto, não garante cromatogramas estruturados. Para que ocorra estruturação é necessário que a amostra contenha um grande número de compostos isômeros, homólogos ou congêneres e que a segunda coluna seja escolhida de acordo com as propriedades físico químicas dos analitos²². Haglund et al³⁷ e Korytár et al³⁸ realizaram estudos em que números limitados de bifenilas cloradas foram separadas de outros congêneres por GC×GC. A melhor combinação de colunas, nos dois casos, apesar de resultar na melhor separação, não forneceu a estruturação nos cromatogramas.

3.3.7 Ortogonalidade e colunas

A maioria dos estudos em GC×GC publicados até o momento utiliza desenvolvimento de métodos, otimização de condições e seleção de colunas de maneira empírica ou seja, tentativa e erro. Em muitos casos quando já existe um método 1D-GC para uma certa amostra, esta mesma coluna é escolhida como primeira coluna no sistema GC×GC²².

A otimização das dimensões das colunas, bem como da temperatura durante a separação e da vazão do gás de arraste, é de grande importância na obtenção de bons resultados em separações com o sistema GC×GC. No entanto, a maior parte das análises cromatográficas, pelo menos até 2003, utilizou métodos originalmente empregados em cromatografia convencional. Ou seja, as condições de pressão de gás de arraste e programação de temperatura dos métodos otimizados foram mantidas e utilizadas para a primeira coluna nas separações por GC×GC. A presença da segunda coluna (cujas dimensões são reduzidas) em cromatografia bidimensional, no entanto, acarreta valores relativamente altos de

pressão interna na primeira coluna, principalmente quando comparados aos valores operacionais de 1 D GC e, conseqüentemente, baixos coeficientes de difusão na fase móvel. A alternativa na maioria dos casos foi operar a primeira coluna em condições abaixo da vazão ótima e utilizar programação com aumento lento de temperatura. As medidas têm a intenção de permitir que ocorra o número mínimo de modulações (quatro) através dos picos cromatográficos de primeira dimensão.

Uma idéia que permaneceu durante muito tempo entre os pesquisadores da técnica é a de que quanto menor a segunda coluna, melhor. Esta espécie de “mito” criado provavelmente devido à necessidade de uma corrida rápida na segunda dimensão para preservar a separação ocorrida na primeira, foi gradativamente derrubado. Ong et al⁴⁵ estudaram sistematicamente o efeito da variação do comprimento da segunda coluna na separação de uma mistura de compostos semi-voláteis e demonstraram que o uso de colunas de segunda dimensão muito curtas geralmente propostos para GC×GC podem não ser a melhor escolha.

A separação na segunda coluna deve acontecer em poucos segundos para que a separação obtida na primeira coluna seja preservada. Uma vez que este tempo fica tipicamente em torno de 4 a 8 s, os picos de primeira dimensão devem ter uma largura de base em torno de 20 a 30 s. No entanto, usando condições padrão da coluna esses picos possuem largura de base da ordem de 10 a 15 s. O uso de programação lenta de temperatura e/ou baixa vazão de gás de arraste poderia resolver a questão⁴³. Isto implicaria em condições não ótimas de separação da primeira coluna e um tempo muito longo de análise. Se a segunda coluna tiver dimensões semelhantes à primeira, ou ocorrer um número baixo de reinjeções na segunda coluna, pode ocorrer a mistura de analitos separados na primeira dimensão. A fim de evitar isto, bem como o alargamento dos picos correspondentes às frações reinjetadas na segunda coluna utiliza-se colunas de diâmetro interno reduzido, tipicamente em torno de 0,1 mm.

Algumas aplicações de diferentes conjuntos de colunas encontram-se resumidas na Tabela 2.

O uso de colunas de diâmetros internos ainda mais reduzidos foi algumas vezes reportado, como no trabalho de Adahchour e colaboradores⁴³ que empregaram uma coluna de 50 μm de diâmetro interno na segunda dimensão. A principal vantagem apresentada foi a redução do tempo de análise (no estudo em questão, três vezes menor) sem perda na resolução, além da operação da primeira coluna em condições ótimas, mostrando que nem sempre 0,1 mm de diâmetro interno é a melhor escolha para a segunda coluna.

Os autores apontam algumas desvantagens na adoção de estratégias que não a redução do diâmetro interno da segunda coluna, para a redução do tempo de análise. O aumento da vazão do gás de arraste pode resultar em menos que quatro cortes por pico de primeira dimensão, se os outros parâmetros são mantidos constantes.

A elevação mais acelerada da temperatura, na programação de temperatura, influenciará negativamente a eficiência de separação da segunda coluna e conseqüentemente o poder de separação do sistema GC \times GC. Esta medida também tornará os picos de primeira dimensão mais estreitos, o que poderá causar um número reduzido de modulações destes picos, comprometendo o processo de modulação (menos de 4 fracionamentos por pico). A redução do comprimento da segunda coluna também pode não ser uma boa alternativa, uma vez que isso implicará em risco de redução de eficiência de separação.

Apesar dos bons resultados apresentados no trabalho acima descrito, Beens⁴⁰ e colaboradores afirmaram que um compromisso entre as condições ótimas da primeira e segunda colunas deve ser estabelecido, por meio da escolha de dimensões adequadas. O trabalho destaca que em um conjunto de colunas utilizado em separações por GC \times GC o ótimo das duas colunas (pela curva de Van Deemter) se localiza em regiões de pressão de entrada bem diferentes e que o ótimo da primeira coluna se encontra em velocidade linear relativamente baixa. Novamente é destacado o problema de se tentar cumprir o critério de mínimo de modulações por pico de primeira dimensão por meio ou do ajuste da programação de temperatura (baixas taxas de aumento de temperatura) ou da utilização de baixos valores de vazão de gás de arraste.

Tabela 2 - Exemplos de combinações de colunas usadas em GC×GC*

Aplicação	Combinação de colunas	Referências
Óleos essenciais	1D: BPX5 (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm) 2D: BP 20 (2 m × 0,1 mm D.I. × 0,1 µm)	55
Óleos essenciais de tabaco	1D: DB-petro (50 m × 0,2 mm D.I. × 0,5 µm) 2D: DB-17ht (2,5 m × 0,1 mm D.I. × 0,1 µm)	52
Drogas em controle de Doping	1D: BPX5 (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm) 2D: BPX50 (0,4 m × 0,1 mm D.I. × 0,2 µm)	47
Petróleo	1D: DB-1 (10 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm) 2D: OV 1701 (0,5 m × 0,1 mm D.I. × 0,14 µm)	56
Petróleo	1D: PONA ^a (10 m × 0,2 mm D.I. × 0,5 µm) 2D: BPX50 (0,8 m × 0,1 mm D.I. × 0,1 µm)	58
Pesticidas em alimentos	1D: DB-1 (15 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm) 2D: BPX50 (0,8 m × 0,1 mm D.I. × 0,1 µm)	90
CB	1D: HP-1 (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm) 2D: HT-8 (1 m × 0,1 mm D.I. × 0,1 µm)	38
PCB	1D: HT-8 (50 m × 0,22 mm D.I. × 0,25 µm) 2D: BPX50 (2,5 m × 0,10 mm D.I. × 0,10 µm)	131
Aminoácidos	1D: BPX 5 (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm) 2D: BPX 50 (2 m × 0,1 mm D.I. × 0,1 µm)	98
Pesticidas em Uvas	1D: RTX-5MS (10 m × 0,18 mm D.I. × 0,2 µm) 2D: TR-50MS (1 m × 0,1 mm D.I. × 0,1 µm)	48

* Modificado de Dallüge et al²²**HP1:** 100% dimetilpolisiloxano (Agilent Technologies).**DB1:** 100% dimetilpolisiloxano (J & W Scientific).**BPX5:** 5% Fenil Polisiloxano (SGE).**BP20:** Polietilenoglicol (SGE).**BPX50:** (50% fenil) polisilfenileno-siloxano (SGE).**HT-8:** (8%fenil)-policarborano-siloxano (SGE).**RTX-5MS:** 95% dimetil-5%difenil polisiloxano (Restek).**OV-1701:** 14% cianopropilfenil metilpolisiloxano (Ohio Valley).**DB-petro:** 100% dimetilpolisiloxano (J & W Scientific).**DB-17ht:** 50% fenilmetilpolisiloxano (J & W Scientific).**TR-50MS:** 50% fenil polisilfenileno-siloxano (Thermo Fisher Scientific).**CB:** clorobenzeno**PCB:** bifenilas policloradas^a Dimetilpolisiloxano

A eficiência da primeira coluna fica desta maneira prejudicada. A solução seria operar uma das colunas em condições ótimas e a outra em condições “sub-ótimas”. A sugestão dada foi combinar uma primeira coluna com diâmetro interno entre 0,25 e 0,32 mm e uma segunda coluna com esta dimensão entre 0,15 e 0,18 mm. Isto minimizaria o problema de capacidade de amostra do sistema.

Em algumas situações em GC×GC ocorrerá um tempo de análise mais longo que uma análise semelhante por 1D-GC e isto deve ser levado em consideração. O estudo de Beens também demonstrou que é mais vantajoso operar a primeira coluna em condições ótimas que a segunda, o que forneceria uma eficiência próxima da ótima para ambas as colunas. Os resultados foram baseados em experimentos e em simulações por meio de um programa de computador criado para prever as condições ótimas de pressão e temperatura do sistema tendo como dados de entrada as dimensões das colunas e o tipo de gás de arraste.

Para Harynuk et al⁴⁴ o uso da segunda coluna com diâmetro interno reduzido possibilita a utilização das condições ótimas da primeira coluna e tempo reduzido de análise. Por outro lado os autores também destacam a diminuição da capacidade de pico de tais configurações. Esta estratégia acarreta também a redução da capacidade de amostra da coluna e do sistema (redução da capacidade de pico), podendo ocasionar a necessidade de um “pré-tratamento” da amostra, caso os analitos alvo se encontrem em baixas concentrações³⁹. O trabalho estudou várias combinações de colunas com diferentes diâmetros internos, porém semelhantes razões de fase. A conclusão foi que colunas com diâmetro interno de 0,250 mm resultam em larguras de pico semelhantes às obtidas com colunas de 0,100 mm de diâmetro interno, porém com maior capacidade de amostra. A principal vantagem de colunas com maior diâmetro interno é a redução do efeito de alargamento dos picos, apesar da menor velocidade de separação. Em condições de não-saturação, colunas com menor diâmetro interno fornecem picos mais estreitos.

Em situações onde a velocidade de análise é a prioridade e não há picos largos eluindo próximos de analitos alvo, colunas com 0,1 mm de diâmetro interno

podem ser a melhor escolha. Por outro lado, para amostras nas quais as concentrações de analitos ou componentes da matriz são desconhecidas e podem ser altas, será melhor utilizar colunas de diâmetro interno maior na segunda dimensão, diminuindo as chances de saturação desta coluna. Um desafio aos fabricantes de coluna seria desenvolver colunas com duas regiões distintas compostas por duas diferentes fases estacionárias. O resultado seria um conjunto de colunas para GC×GC de mesmo diâmetro interno, porém sem junções entre as colunas, para aplicações onde fosse vantajoso o uso de mesmo diâmetro interno para ambas as colunas⁴⁴.

A tendência entre os pesquisadores em GC×GC, no entanto, não é de usar colunas com diâmetros internos semelhantes ou iguais. Há vários outros parâmetros a serem levados em conta, tais como velocidade linear do gás de arraste, temperatura de eluição, dentre outros. Vários conjuntos de colunas diferentes em um sistema GC×GC podem mostrar bons resultados. O importante, no entanto, é fazer a escolha certa em função da aplicação pretendida.

As separações em destaque na Figura 8 deixam claro que a escolha das dimensões da segunda coluna em GC×GC não deve ser feita baseada em condições pré-estabelecidas, mas sim em função principalmente da amostra de interesse.

Apesar de colunas mais longas resultarem em melhor separação, devido ao período de modulação e o tempo de retenção de picos vizinhos na segunda coluna, pode haver coeluição de componentes separados na primeira coluna. Este efeito, denominado *wrap-around* (ver Quadro 1), também surge como decorrência de programações de temperatura inadequadas (seção 3.3.5).

Interações entre os analitos e a fase estacionária são descritos em termos do potencial químico, $\Delta\mu^0$, o qual deriva da tendência do composto em ser transferido da fase móvel para a fase estacionária. Isto altera o tempo de retenção do composto. Para separar dois compostos com o mesmo potencial químico em uma coluna, deve-se, em um sistema multidimensional, alterar seus potenciais químicos. Isto poderia ser feito utilizando diferentes temperaturas nas duas dimensões, no entanto a alternativa mais prática é usar colunas de fases

estacionárias diferentes. A programação independente de temperatura das duas dimensões exige o uso de dois fornos, o que aumenta a complexidade do sistema, apesar de apresentar a vantagem do “ajuste fino” da separação.

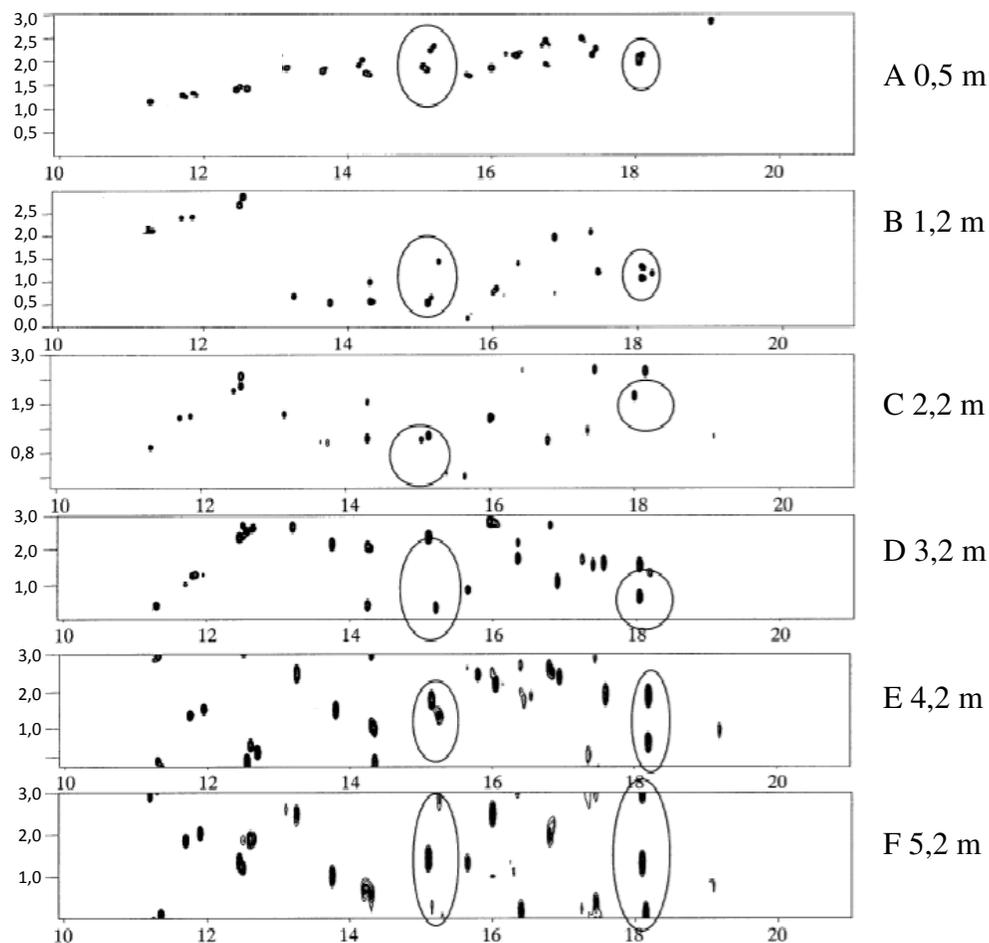


Figura 8. Diagramas de contorno resultantes da análise por GC×GC de amostra de semi-voláteis com diferentes comprimentos efetivos de coluna de segunda dimensão (modificado de Ong et al⁴⁵). Nota-se que 3,2 e 5,2 m resultaram em melhor separação que nos demais casos. Conjunto de colunas: BPX5-BPX50.

Em GC×GC pode-se escolher um conjunto de colunas tal que seja possível “ajustar” a separação, ou seja, pode-se alterar os potenciais químicos de compostos cujos valores desse parâmetro são muito semelhantes para uma única coluna. Deve-se então selecionar uma segunda coluna que seja capaz de separar classes de compostos não resolvidas na primeira dimensão.

Separações em Cromatografia Gasosa baseiam-se em dois parâmetros, volatilidade dos analitos e sua interação com a fase estacionária. Em uma coluna apolar a volatilidade será o parâmetro de interesse e, portanto ocorrerá uma separação por diferenças nos pontos de ebulição dos analitos. Já em uma coluna polar, tanto volatilidade quanto interação específica do analito com a fase estacionária são parâmetros importantes. Este fato poderia acarretar uma perda significativa do grau de ortogonalidade nas separações por GC×GC, considerando-se a existência de um importante mecanismo de separação em comum entre as duas dimensões. Entretanto, mesmo na presença de uma aparente correlação entre as dimensões de separação, o sistema será ortogonal. Deve-se considerar que uma vez que a separação na segunda coluna, tipicamente polar, acontece na ordem de alguns segundos (3 a 10 s), a separação na mesma ocorre em condições isotérmicas e analitos com volatilidades similares emergidos da primeira coluna sofrem uma separação na segunda sem contribuição do parâmetro ponto de ebulição e a separação é, portanto, ortogonal²².

O arranjo mais comumente utilizado é uma coluna apolar (ou de baixa polaridade) como 100% dimetilpolisiloxano ou 5% fenil-95% dimetilpolisiloxano na primeira dimensão e uma coluna polar (ou de alta polaridade) na segunda dimensão. Fases estacionárias típicas usadas neste caso são 35-50% fenil-50-65% dimetilpolisiloxano, polietilenoglicol (Carbowax), carborano (HT-8) e cianopropil-fenil-dimetilpolisiloxano. Em princípio o uso de um conjunto coluna polar × apolar ou polar × polar não obtém o mesmo resultado do arranjo apolar × polar. Em ambos os casos o resultado da primeira separação dependerá dos efeitos tanto da volatilidade quanto da polaridade. Cada fração eluída vai conter analitos que diferem em volatilidade e desta maneira este parâmetro terá um papel importante na separação que ocorrerá na segunda coluna. A consequência é que separações em sistemas como estes não serão ortogonais²².

A medida que as pesquisas em GC×GC avançam, a seleção de colunas para aplicações específicas complementa a teoria e vai sendo gerado um “guia” de combinação de colunas de acordo com a aplicação desejada. A combinação BPX5-BPX50 foi sugerida por Marriott e colaboradores como uma excelente

escolha para a análise de amostras petroquímicas e de compostos aromáticos semivoláteis^{39,42}. Solutos aromáticos (benzenos, naftalenos, etc), por exemplo, são mais polares e são retidos por mais tempo na segunda coluna que compostos saturados.

Compostos oxigenados são muito melhor diferenciados de não oxigenados por um conjunto de colunas BPX5 - BPX20 do que por BPX5 - BPX50, devido à menor polaridade da segunda coluna do primeiro conjunto.

A Figura 9 ilustra que o resultado de uma separação GC×GC pode ser interpretado como um mapa de resolução química, o qual é definido pelo mecanismo de retenção de cada coluna. Isto resulta em um espaço bidimensional de separação, com as magnitudes de separação definidas pelo tempo total de retenção na primeira coluna e o tempo de modulação na segunda coluna. Mudando-se a polaridade do conjunto de colunas os compostos serão movidos para diferentes locais no espaço 2D. A temperatura de eluição dos compostos na primeira coluna irá mudar assim como a retenção na segunda coluna irá variar.

tempo de retenção ² D	¹ D alta volatilidade ² D alta polaridade	¹ D baixa volatilidade ² D alta polaridade
	¹ D alta volatilidade ² D baixa polaridade	¹ D baixa volatilidade ² D baixa polaridade
	tempo de retenção ¹ D	

Figura 9. Mapa de retenção de propriedade química (modificado de Marriott e cols⁴⁶). Conjunto de colunas polar/apolar (primeira e segunda dimensões, respectivamente).

Se as fases das duas colunas são escolhidas de tal maneira que não há diferença de seletividade na segunda coluna, então irá ocorrer correlação de

mecanismos de retenção nas duas colunas (ou seja, não haverá diferenciação ou separação molecular na segunda dimensão). Esta é considerada geralmente uma má escolha de conjunto de colunas; entretanto, a escolha é também freqüentemente uma conseqüência do objetivo da análise.

É inteiramente inevitável que para obter-se a separação de certos componentes em um experimento GC×GC, empregando um certo conjunto de colunas, outros componentes possam ser correlacionados quando do uso dessas colunas. Em outras palavras, um conjunto de colunas pode ser ortogonal para um grupo de compostos de uma amostra e ao mesmo tempo não ortogonal para outro grupo. Como conseqüência, a análise de amostras complexas freqüentemente levará o pesquisador a optar por um compromisso na escolha do conjunto de colunas⁴⁶.

Combinações não-ortogonais de colunas em GC×GC também são algumas vezes empregadas (ver Tabela 2). Se a dimensionalidade da amostra¹⁶ e do sistema são compatíveis, estruturação também é obtida sob condições não ortogonais⁸². No entanto, o uso de combinações ortogonais mostra-se geralmente mais vantajoso. Marriott e colaboradores^{50,51} realizaram separações de pares enantioméricos de hidrocarbonetos monoterpênicos e monoterpênicos oxigenados com uma combinação não-ortogonal (ciclodextrina × BP20 e uma ortogonal (DB-5 × ciclodextrina). No segundo caso obteve-se cromatogramas mais estruturados, facilitando a caracterização dos pares enantioméricos.

A variação da polaridade da fase estacionária da coluna de primeira dimensão altera a temperatura de eluição dos analitos e conseqüentemente o tempo de retenção dos mesmos na segunda coluna. A extensão da utilização do espaço bidimensional de separação é outro fator influenciado pela mudança da primeira coluna de um sistema GC×GC. Ryan et al⁵³ estudaram a ortogonalidade de separações bidimensionais compreensivas para uma faixa de diferentes polaridades de colunas de primeira dimensão com dois tipos de colunas de segunda dimensão. A proposta do estudo foi utilizar dados de fator de retenção /temperatura em experimentos com uma coluna para estimar as temperaturas de eluição na segunda dimensão. Com os dados gerados pôde-se prever o resultado

de separações bidimensionais e compará-los com dados experimentais. Concluiu-se também que o tempo de eluição t_R em um experimento GC×GC é controlado pela polaridade da fase estacionária da segunda coluna e pela temperatura na qual os analitos chegam a esta coluna.

O método proposto é interessante na medida em que fornece condições para uma boa escolha do conjunto de colunas a ser utilizado. No entanto, a predição dos resultados de todas as separações 2D é impossível e deve-se estar atento às limitações destas predições.

3.3.8 Programação de temperatura

O ajuste das melhores condições de operação em um sistema GC×GC é bem mais complexo que na Cromatografia Gasosa convencional. Temperatura e vazão do gás de arraste influenciam a separação de maneiras diferentes, porém não independentes.

Mudanças nas condições de operação de um sistema cromatográfico bidimensional compreensivo causam uma nova distribuição dos componentes de uma amostra no plano de retenção do diagrama de contorno. Dentre estas condições encontram-se especialmente a temperatura à qual se submete as colunas e a vazão do gás de arraste. O grau de ortogonalidade poderá variar em função desta temperatura.

A Figura 10 mostra simulações de diagramas de contorno resultantes de corridas GC×GC utilizadas por Venkatramani e Phillips para discutir o efeito da temperatura do forno do cromatógrafo e o seu papel no ajuste da ortogonalidade. Os experimentos A, B, C e D foram realizados sob diferentes temperaturas das colunas.

Em A, com ambas as dimensões isotérmicas, uma vez que a volatilidade é um fator determinante em cromatografia gasosa, as duas dimensões de retenção estão correlacionadas e os componentes da amostra se distribuem sobre uma diagonal. Esta situação é semelhante à cromatografia planar em condições tais, que os dois eixos não apresentam quase nenhuma diferença nas propriedades de retenção. O sistema possui potencial para uma alta capacidade de pico, porém

esta é baixa uma vez que o método, nestas condições, não é ortogonal. Tal condição de operação leva a um aumento no tempo total de análise sem um aumento de informação cromatográfica. O número de componentes da amostra próximos da diagonal depende da amplitude de características desses componentes, bem como do grau de proximidade entre as propriedades das duas colunas.

A gráfico B é semelhante ao gráfico A. No entanto, a temperatura da segunda coluna foi aumentada (o que seria possível somente no caso de se dispor de um forno secundário, ou seja, um forno dentro do qual estaria somente a segunda coluna). Um aumento progressivo na temperatura da segunda coluna compensaria uma diminuição progressiva na volatilidade dos componentes da amostra. A separação na segunda coluna em GC×GC, no entanto, é basicamente isotérmica devido à rapidez com que ocorre (tipicamente em torno de 6 s).

Porém um efeito semelhante ao aumento de temperatura da segunda coluna pode ser causado utilizando-se menores espessuras de fase estacionária ou aumentando-se a velocidade linear do gás de arraste. Mesmo levando-se em consideração que diferenças nas propriedades dos componentes da amostra, como polaridade e forma das moléculas também participam como fatores determinantes da retenção na segunda dimensão, a variação do poder de retenção da segunda dimensão como uma função do progresso da separação na primeira dimensão, poderia eliminar qualquer mecanismo em comum da segunda dimensão de separação. O resultado é o espaço inteiro de retenção disponível, permitindo maior rapidez na separação e maior capacidade de pico.

A mudança ocorrida no gráfico C da Figura 10 resultaria da programação de temperatura da primeira coluna, o que causaria o deslocamento da diagonal para baixo, pois os tempos de retenção vão diminuindo à medida que a temperatura aumenta.

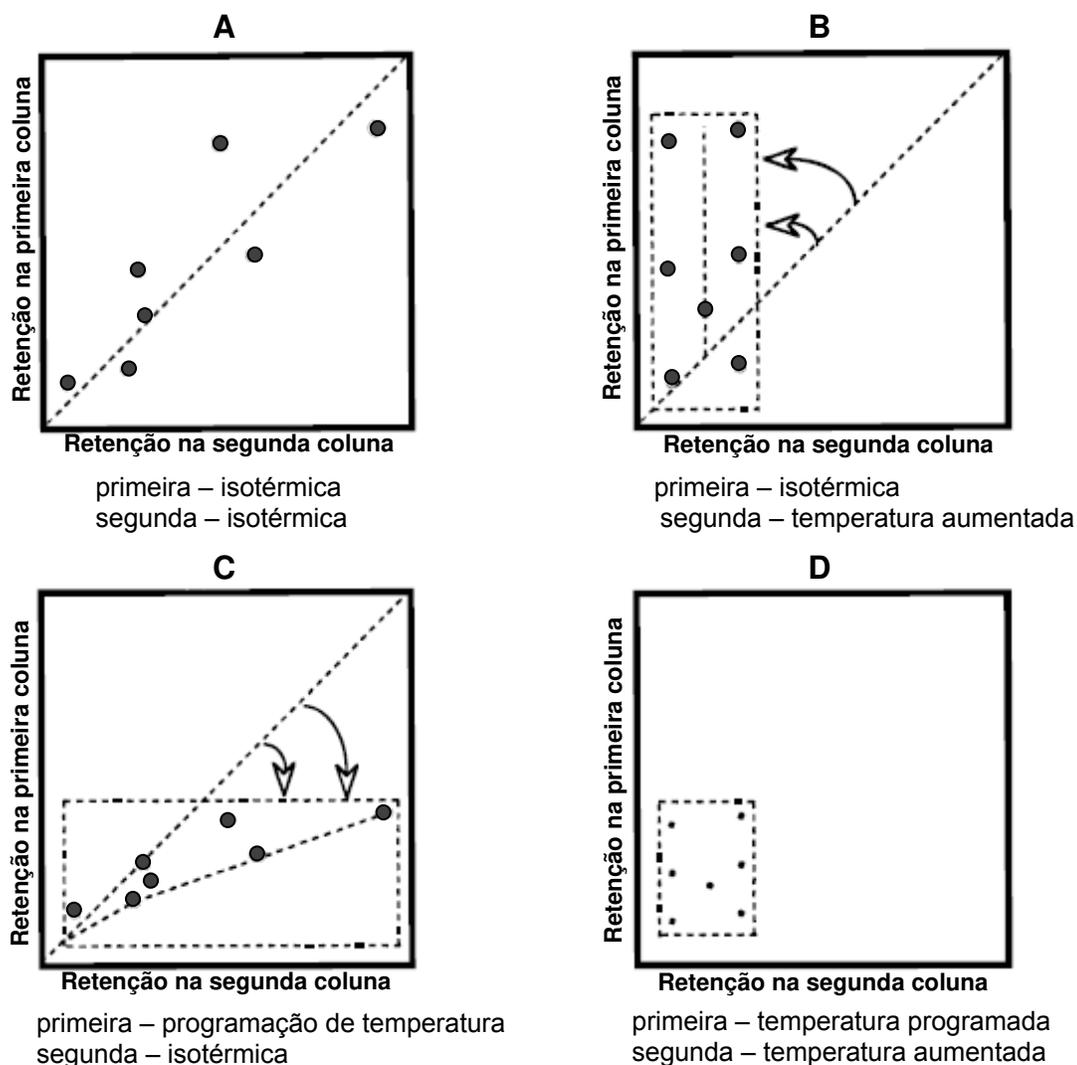


Figura 10. Diagramas de contorno simulados, obtidos por GC×GC mostrando a influência da temperatura na retenção dos componentes da amostra (modificado de Venkatramani e Phillips⁵⁷).

O gráfico D da Figura 10 é o resultado da combinação das condições das Figuras B e C. Os picos, apesar de confinados em uma área menor, encontram-se bem distribuídos e os tempos de retenção nas duas dimensões são independentes. O cromatograma bidimensional é, portanto, ortogonal.

A ordem de eluição é especialmente sensível a mudanças de temperatura e poderá variar quando dois ou mais compostos possuem tempos de retenção próximos, porém diferentes sensibilidades a mudanças nas condições cromatográficas. Ong et al⁴⁵, demonstraram o efeito da mudança de temperatura

na ordem de eluição de uma mistura de 17 compostos. A Figura 11 amostra a comparação entre as ordens de eluição de vários destes compostos com a mudança na programação da temperatura, em quatro diferentes corridas cromatográficas realizadas pelos autores. A mesma amostra foi também submetida a análise por GC×GC e o resultado é mostrado na Figura 12, que ilustra claramente os deslocamentos relativos das posições dos solutos no plano definido pelos tempos de retenção 1t_R e 2t_R .

Uma diminuição na taxa de aumento de temperatura faz com que os solutos eluam da primeira coluna em temperaturas menores. O aumento nas larguras dos picos devido à programação mais lenta de temperatura é observado principalmente nos diagramas de contorno (Figura 12). Os solutos eventualmente sofreriam sobreposição com picos vizinhos à medida que eluíssem mais tarde em menores temperaturas (pois apresentariam picos menos simétricos). No entanto, ocorreu, além de uma inversão na ordem de eluição de alguns picos (observada, sobretudo na primeira dimensão), uma melhor separação quando utilizadas programações com aumento mais lento da temperatura (Figura 11). Isto demonstra que a resolução é fortemente dependente do efeito da temperatura no mecanismo de retenção e na magnitude da interação de cada soluto na segunda coluna.

Na maior parte dos sistemas GC×GC desenvolvidos até o momento, a programação de temperatura à qual as colunas são submetidas é simplesmente aquela do forno do cromatógrafo dentro do qual se encontram as colunas. Isto é devido ao fato de a maioria destes sistemas não apresentar um forno secundário e conseqüentemente alojar ambas as colunas no forno convencional do cromatógrafo utilizado. Alguns sistemas, no entanto, dispõem de um segundo forno, onde é colocada a segunda coluna, possibilitando que a mesma seja submetida a temperaturas diferentes daquelas em que se encontram a primeira.

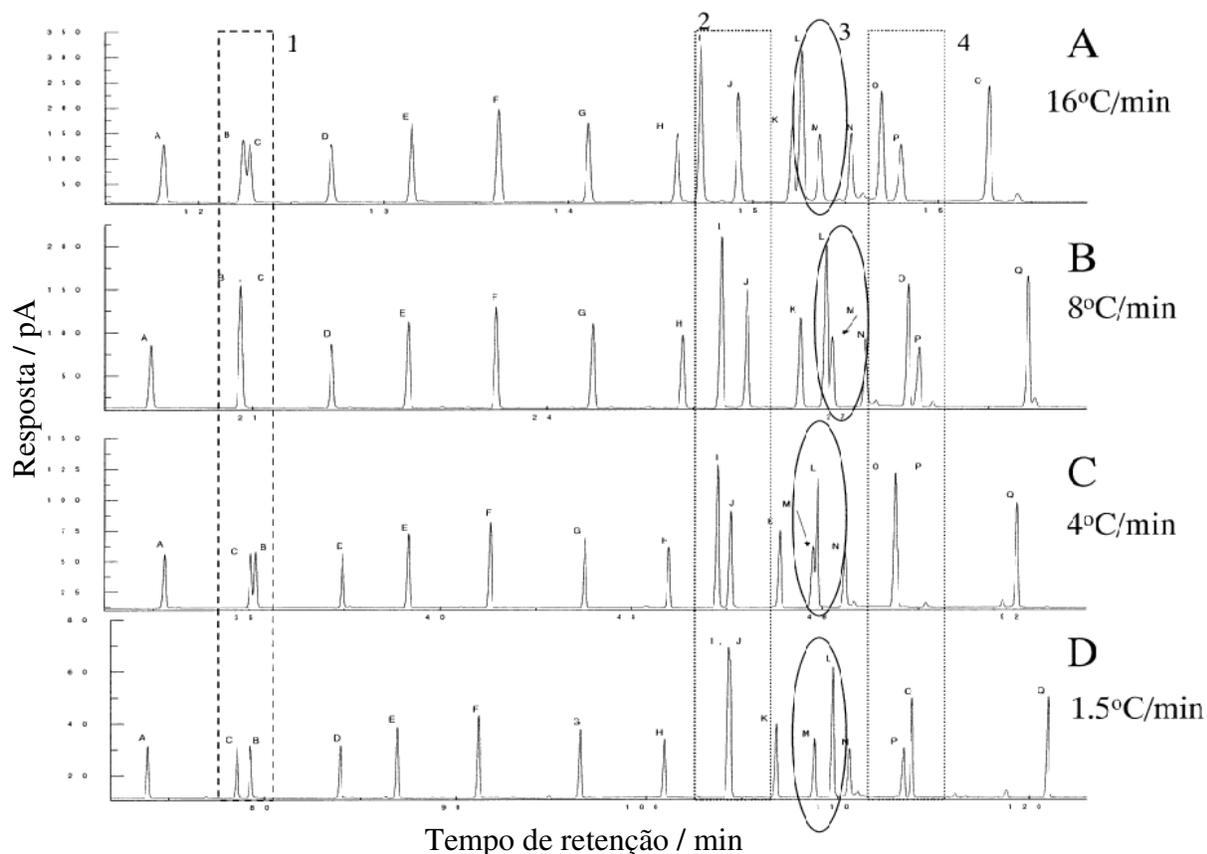


Figura 11. Efeito da programação da temperatura na ordem de eluição de pesticidas organoclorados em cromatografia gasosa convencional usando colunas BPX5-BPX50. Os pares de soluto B e C, I e J, L e M, O e P mostraram inversão ordem de eluição (modificado de Ong e cols.⁴⁵).

Como a separação na segunda coluna ocorre na ordem de alguns segundos, o processo é essencialmente isotérmico. Em consequência, picos que eluem por último da segunda coluna, poderam ser mais largos. Para minimizar possíveis alargamentos, o que se faz (quando possível, por meio de um forno secundário) é manter a temperatura da segunda coluna maior que a temperatura do forno principal, realizando um “ajuste fino” da separação. Esta medida também é uma ferramenta para resolver problemas de *wrap-around*.

O ajuste independente da temperatura da coluna de segunda dimensão torna possível eluir mais rapidamente ou mais lentamente os analitos de interesse.

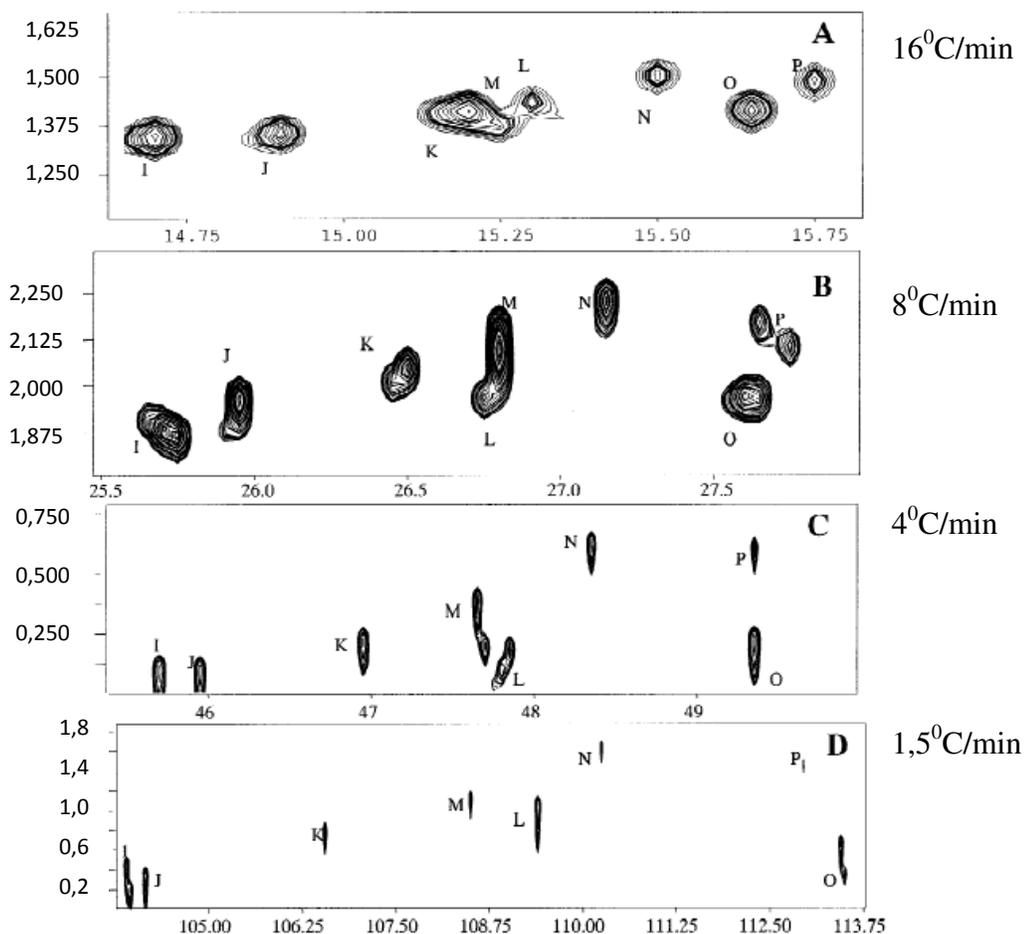


Figura 12. Diagrama de contorno, do soluto I ao soluto P, ilustrando as ordens de retenção relativas para os solutos L e M, O e P em ambas as dimensões, em função da variação de temperatura durante as análises por GC×GC (extraído de Ong e cols.⁴⁵).

Dessa forma pode-se controlar o tempo de retenção da segunda coluna e assim o processo de modulação. A vantagem é evitar que não ocorra a injeção de uma fração antes da chegada da fração anterior ao detector (*wrap-around*).

Com o intuito de realizar pelo menos quatro modulações por pico de primeira dimensão, a programação de temperatura em GC×GC geralmente possui taxas de aumento menores que as utilizadas em GC convencional. Em sistemas com controle de temperatura independente para ambas as colunas, a temperatura da segunda coluna é geralmente ajustada para 20 a 30°C maior que a da primeira coluna.

Apesar das inúmeras possibilidades de combinações de colunas, considera-se que a maneira mais fácil de ajustar a ortogonalidade de um sistema é por meio da programação de temperatura⁴¹. A Figura 13 ilustra o uso da temperatura para obter uma separação bidimensional.

Na Figura 13 A ambas as colunas encontram-se em condições isotérmicas. O exemplo considera como amostra uma série homóloga. Como esperado para uma amostra como esta, uma separação isotérmica gera picos cujo espaçamento é exponencial com o tempo. A retenção se correlaciona nas dimensões uma vez que o tempo de retenção aumenta de um membro para o outro na série em função apenas da volatilidade. A Figura é apenas um cromatograma unidimensional convencional representado em duas dimensões. A segunda coluna não contribui para a separação.

Na Figura 13 B, a temperatura da segunda coluna foi aumentada em função do andamento do cromatograma gerado pela primeira coluna. Com uma programação de temperatura não linear, a retenção na segunda coluna é uma constante para todos os membros da série de compostos.

A Figura 13 C mostra que se a temperatura da primeira coluna também for programada, os membros da série eluem com espaçamento constante. Uma programação de temperatura adequadamente escolhida aplicada à segunda coluna novamente traz os membros de uma série homóloga à mesma retenção constante nesta coluna.

Neste caso a programação de temperatura da segunda coluna é aproximadamente linear e tem aproximadamente a mesma taxa de aumento que a primeira coluna. Usar a mesma programação de temperatura para ambas as colunas (o que simplifica o sistema, pois ambas podem ficar dentro do mesmo forno) irá produzir um cromatograma bidimensional com retenção na segunda coluna constante para todos os compostos da série.

O uso da mesma programação de temperatura para o conjunto de colunas produz cromatogramas com tempos de retenção da segunda coluna aproximadamente constantes para os membros de uma série homóloga.

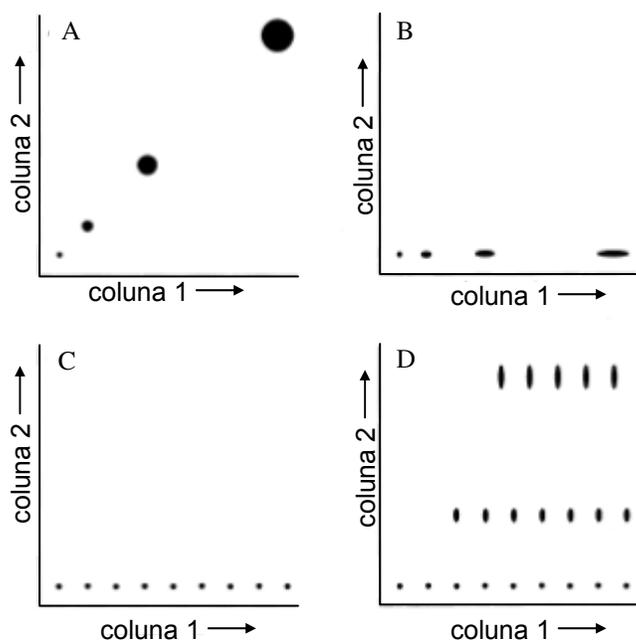


Figura 13. Uso da programação de temperatura para gerar um cromatograma bidimensional ortogonal (modificado de Phillips e Beens⁴¹). Maiores detalhes no texto.

Na prática, pequenos desvios da retenção para membros de uma série homóloga ou de quaisquer outros compostos ocorrem em GC×GC, devido à viscosidade do gás de arraste, que muda com a temperatura e conseqüentemente também sua vazão. Temperaturas iniciais muito elevadas também podem causar desvios nos tempos de retenção dos compostos que eluem primeiro.

Na Figura 13 D outras séries homólogas são adicionadas à amostra. Assume-se uma fase apolar para a primeira coluna e polar para a segunda coluna. Dentro de uma série homóloga a segunda coluna retém substâncias também em função de sua volatilidade. Para qualquer substância, o mecanismo de retenção na segunda dimensão é, portanto, misto. O objetivo do controle de temperatura é justamente minimizar a participação da volatilidade da separação na segunda coluna, aumentando desta maneira o grau de ortogonalidade do sistema.

Em GC×GC duas colunas são conectadas em série e por esta razão as vazões de gás de arraste de ambas não podem ser controladas de forma independente. Conseqüentemente, em geral é escolhido um valor tal que

separações aceitáveis são obtidas em cada uma das colunas. Em outras palavras, ajusta-se um valor que é um compromisso entre as vazões ótimas das duas colunas.

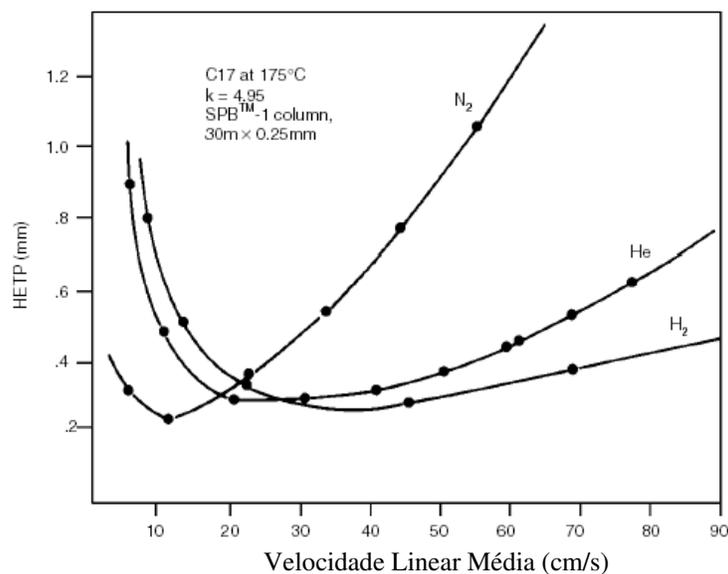


Figura 14. Curvas de Van Deemter para N₂, He e H₂ (modificado de Grob⁴⁹). Nota-se que o formato mais suave da curva do H₂ permite a utilização de uma ampla faixa de valores de velocidade linear (ou vazão) sem grande perda de eficiência da coluna.

3.3.9 Vazão do gás de arraste

A velocidade linear do gás de arraste ou vazão escolhida para a primeira coluna geralmente é baixa, mas ainda em uma faixa ótima para esta coluna⁴⁰. Como se sabe, valores muito baixos de vazão de gás de arraste ocasionam uma grande perda de eficiência de separação⁵⁹. Por consequência dos diâmetros internos reduzidos das segundas colunas utilizadas e pelo fato das colunas encontrarem-se ligadas em série, as velocidades lineares na segunda dimensão são geralmente muito superiores aos valores ótimos. Há, no entanto certa tolerância devido ao formato suave da curva de Van Deemter para estas colunas de dimensões reduzidas, especialmente no caso em que se utiliza o hidrogênio como gás de arraste, como se observa na Figura 14.

3.3.10 Modulação e moduladores

Desde o surgimento da Cromatografia Gasosa Bidimensional Compreensiva, os esforços estiveram voltados principalmente para modificações instrumentais que resultassem no desenvolvimento e aperfeiçoamento de moduladores. Este fato se justifica pelo papel do modulador no sistema, componente mais importante, do qual depende a eficiência da separação. Independentemente da tecnologia, modelo, design ou versão utilizados suas funções são as mesmas, bem como seu princípio de funcionamento, ilustrado na Figura 16 (também discutido na introdução). O modulador tem basicamente três funções:

- a) fazer, continuamente, a amostragem ou acúmulo de frações adjacentes do efluente da primeira coluna;
- b) realizar a focagem destas frações;
- c) injetar as frações focadas na segunda coluna, na forma de pulsos estreitos.

O conjunto destes três processos constitui a modulação.

O poder de resolução da segunda coluna é limitado pela largura dos picos da primeira dimensão e a focagem é o mecanismo capaz de reduzir efeitos de dispersão que prejudicam a separação na segunda dimensão. A eficiência deste processo é função da eficiência do modulador utilizado.

Devido à conservação da massa, há um incremento na altura dos picos de segunda dimensão, em relação aos de primeira dimensão (20 a 150 vezes). No entanto, as altas frequências de aquisição resultam num aumento do ruído gerado e conseqüentemente em um ganho não tão pronunciado no que se refere a limites de detecção (5 a 10 vezes)¹⁰⁰.

Desde o surgimento dos primeiros moduladores, do tipo modulador térmico de dois estágios, que usavam aquecimento elétrico^{21,153,154}, vários foram os conceitos desenvolvidos para este dispositivo primordial em um sistema GC×GC. Sobretudo na primeira década após a divulgação do primeiro sistema modulador, houve um intenso investimento na construção de sistemas de modulação

robustos, de fácil instalação, manutenção, operação, bem como de ampla aplicação.

Em seguida surgiu um modulador com um sistema de aquecimento móvel, chamado *sweeper*^{25,41,156}, o primeiro comercialmente disponível (Zoex Corporation, Lincoln, NE, USA) e que continuou sendo o único por alguns anos, até que novas tecnologias foram desenvolvidas. O modulador utiliza um tubo capilar de filme espesso para reter e acumular os analitos no final da primeira coluna, os quais são posteriormente remobilizados pela temperatura elevada do aquecedor (Figura 15 A). O *sweeper* tinha que se mover muito próximo do capilar modulador, tornando sua instalação complicada e causando uma fragilidade ao sistema. A principal desvantagem, no entanto, estava na necessidade de operação do *sweeper* com uma diferença de cerca de 100^oC acima da temperatura do forno, para a rápida dessorção das frações de analito retidas. Isto limitava a temperatura máxima de operação da primeira coluna a cerca de 230^oC. O modulador possuía um complicado processo de otimização. Apesar das limitações, até 2003 cerca de 30% dos trabalhos publicados em GC×GC utilizaram o *Sweeper*²².

Uma discussão a respeito da faixa de aplicação do modulador *Sweeper*, foi publicada em uma edição do J. Chromatogr. A de 2004. Gaines e Frysinger⁷⁵ discordaram de outros trabalhos, como o de Dallüge e Beens⁷⁶, no que se refere à temperatura máxima de eluição em que opera o modulador *Sweeper*.

Os primeiros afirmaram que a “crença” gerada de que este modulador possui uma temperatura máxima de eluição de 230^oC é falsa, baseado em seus resultados anteriores^{77,79}. Segundo Dallüge e Beens⁷⁶, apenas sob condições especiais (modificações no modulador) é que a faixa de aplicação do *Sweeper* pode ser estendida em relação à faixa padrão de aplicação do modulador e que, portanto, o modelo *Sweeper* possui aplicação mais limitada que moduladores criogênicos. Esta foi a “resposta”, publicada na mesma edição da revista. De qualquer maneira, no ano de 2006 após não ser comercializado durante alguns anos, o *sweeper* já era considerado obsoleto⁸¹.

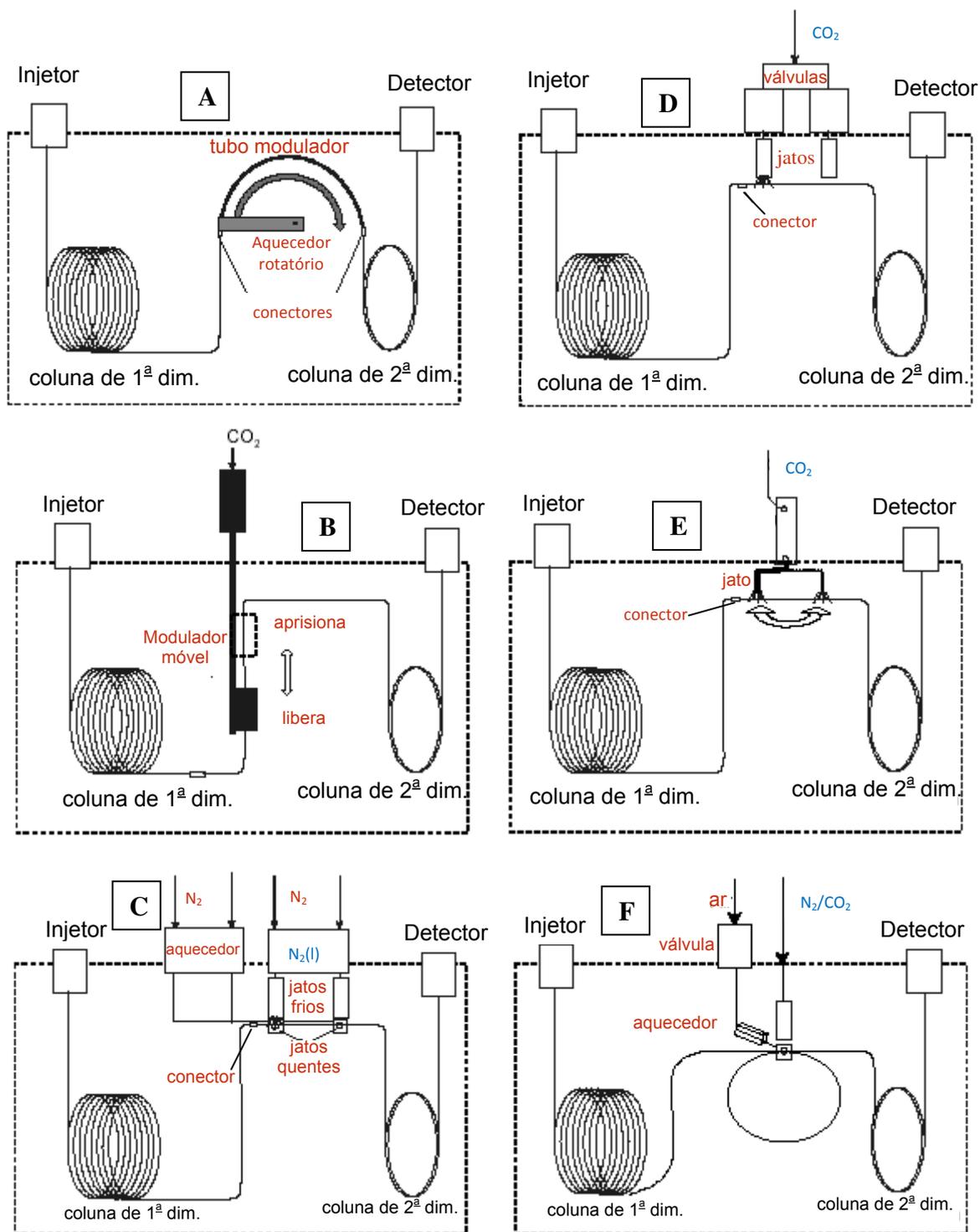


Figura 15. Esquemas de 6 dos moduladores mais utilizados (modificado de Adahchour et al ⁸¹): (A) sweeper; (B) LMCS (Longitudinally Modulating Cryogenic System); (C) KT 2001; (D) modulador de jato duplo de CO₂; (E) modulador criogenico semirotatório⁷⁸ e (F) KT 2003, duplo jato de N₂/CO₂⁸⁰.

A principal modificação do sistema, mostrada pelos próprios Gaines e Frynsinger, em outras publicações, é a incorporação ao modulador, de um capilar de pequena espessura de fase, 0,5 μm , contra 3 a 5 μm no modulador não modificado. A Figura 15 A mostra o esquema de um modulador Sweeper.

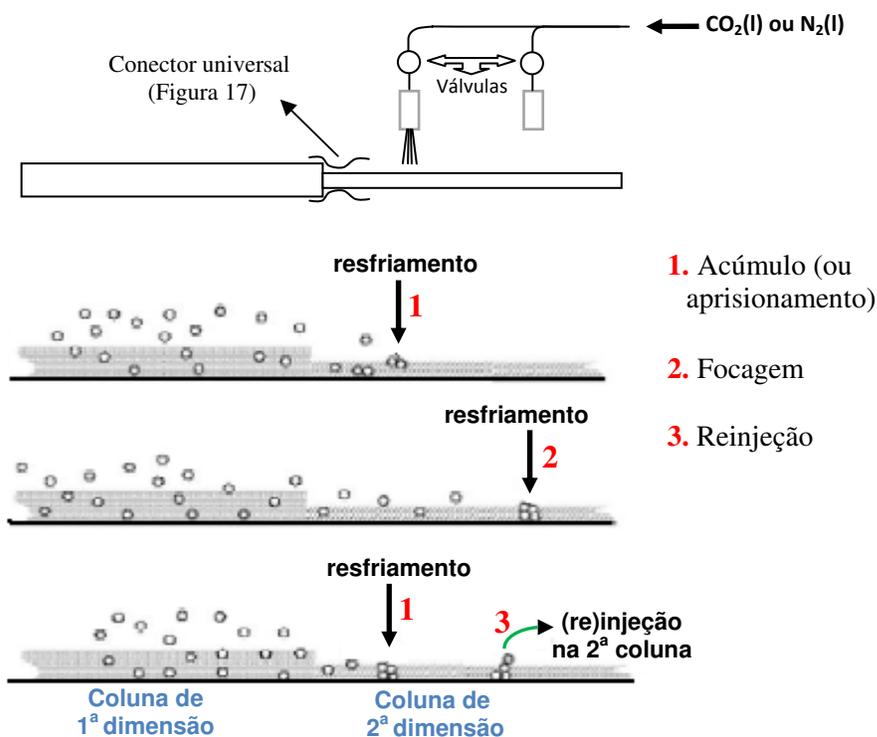


Figura 16. Esquema do mecanismo de funcionamento de um modulador de duplo jato criogênico (modificado de Beens e cols¹⁰¹). As etapas numeradas, que ocorrem na modulação ilustrada, são as mesmas em qualquer modulador. Inicialmente (acima) o modulador aprisiona uma fração do eluato da 1ª coluna por meio de um jato de $\text{CO}_2(\text{l})$ ou $\text{N}_2(\text{l})$. O jato é desligado (meio), e um segundo ponto é resfriado focando uma banda estreita de analitos. No instante seguinte a focagem cessa (abaixo), liberando a banda estreita para a 2ª coluna e o jato mais próximo à 1ª coluna é acionado novamente, evitando uma eventual coeluição desta fração com a subsequente. O próximo ciclo de modulação se inicia.

Já no final da década de 90, Marriott desenvolve um modulador denominado LMCS, (Longitudinally Modulating Cryogenic System) que continuou sendo utilizado com sucesso em diversas aplicações^{83-98,99}. Apesar de várias

modificações do projeto original feitas desde então, o princípio básico permanece o mesmo. Um pequeno braço móvel se desloca ao longo de um trecho de alguns centímetros do início da segunda coluna. Quando posicionado em alguma das extremidades de seu percurso, o braço móvel faz incidir $\text{CO}_2(\text{l})$ ou $\text{N}_2(\text{l})$ sobre o pequeno segmento de coluna sobre o qual se encontra. Este conceito de modulador (Figura 15 B e Figura 17) encontra-se comercialmente disponível. O protótipo deu início à geração dos *Moduladores criogênicos*, com partes móveis simplificadas, que mais tarde ganharam versões sem partes móveis, mais robustos e de mais fácil montagem.

Dallüge et al²² resumiram em uma tabela as propriedades dos principais moduladores para GC×GC. Nesta breve revisão, fica clara a maior robustez dos sistemas de modulação criogênicos que utilizam um a quatro jatos de $\text{CO}_2(\text{l})$ ou $\text{N}_2(\text{l})$ em relação a outros como o Dual-stage heated Sweeper e o LMCS (Longitudinally Modulated Cryogenic System). Outras vantagens desses sistemas são as pequenas larguras dos pulsos de picos injetados na segunda coluna (até 10 ms, contra até 60 ms do modulador tipo Sweeper) e a faixa de aplicação de ponto de ebulição (30 a 550⁰C, contra 300⁰C de temperatura máxima de aplicação do modulador de válvula).

Entre os moduladores mais utilizados encontra-se o sistema de duplo jato criogênico (sem peça móvel), cujo modelo base é o de Beens et al¹⁰¹ empregado mais tarde em sua versão comercial¹⁰². Alguns moduladores inspirados no modelo de Beens foram desenvolvidos em laboratório e utilizados com sucesso em diferentes aplicações¹⁰⁴⁻¹⁰⁷. A Figura 15 D mostra um esquema deste modulador, com sua disposição no cromatógrafo e a Figura 16 mostra o mecanismo funcionamento do modulador de duplo jato criogênico, comum a todos os modulares.

Uma das principais vantagens apontadas neste tipo de modulador é a ausência de partes móveis, que o torna mais robusto.

Alternativamente ao uso do próprio ar aquecido do forno, para reaquecimento do ponto de coluna resfriado, alguns modelos empregam um ou mais jatos quentes para esta função, como o KT 2001 mostrado na Figura 15

(Zoex Corp, Lincoln, NE), e o Pegasus 4D (Leco Corp., St Joseph, MI), que também possui um forno secundário. Jatos quentes favorecem a rápida remobilização dos analitos durante a modulação.

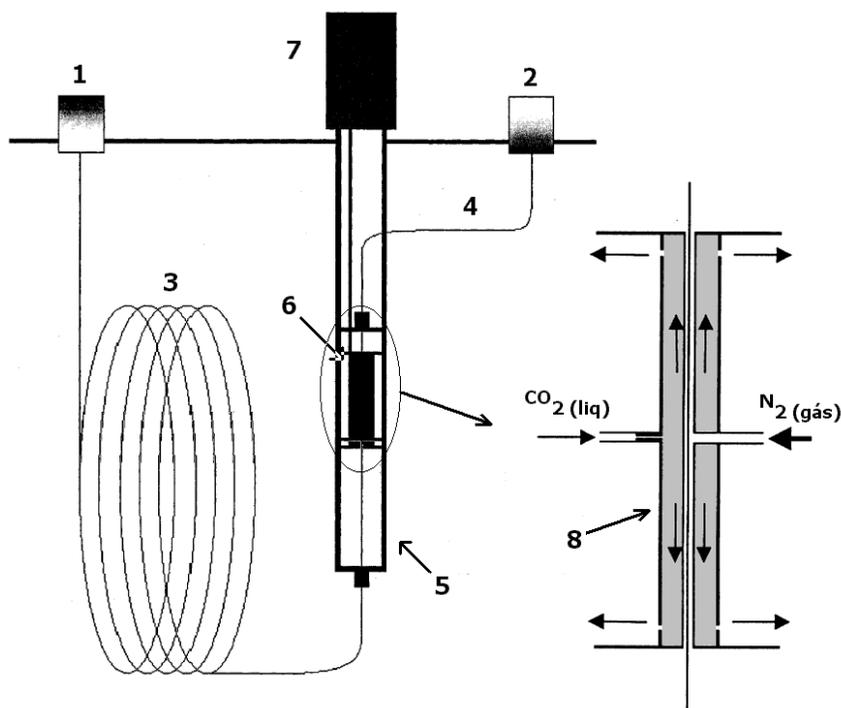


Figura 17. Esquema de um modulador criogênico do tipo LMCS (modificado de Kinghorn e Marriott⁸⁶). 1 – injetor; 2 – detector; 3 – primeira coluna; 4 – segunda coluna; 5 – trilho; 6 – camisa de refrigeração móvel; 7 – motor e 8 – corte ampliado da camisa de refrigeração móvel.

O forno somente para a segunda coluna permite que ela seja operada em temperatura diferente da primeira, possibilitando uma separação mais seletiva. O segundo forno pode ser o de um segundo cromatógrafo, ou um forno somente para a segunda dimensão, também comercialmente disponível (Zoex Corp, Lincoln, NE). No primeiro caso o custo do sistema é aumentado, mas bons resultados estão disponíveis na literatura¹⁰³. Um forno secundário, no entanto, fornece resultados ainda melhores⁸².

Entre os moduladores de jato criogênico, há modelos que utilizam no lugar de dois jatos de CO₂ ou N₂ líquido, apenas um. Neste arranjo, um *loop* de coluna faz com que sejam reinjetadas na segunda coluna, frações do eluato da primeira após a ação deste único jato sobre um ponto do início da segunda coluna, como

mostrado na Figura 15. Brinkman e colaboradores desenvolveram um modulador deste tipo¹¹¹. O sistema foi considerado pelos autores tão eficiente quanto à versão anterior desenvolvida também por Beens et al¹⁰¹, pois as larguras de pico de segunda dimensão obtidas foram similares em ambos os casos (cerca de 70 ms). Considerado mais simples para instalação além de mais robusto, este modulador não apresentou, no entanto grande evolução no seu emprego apesar de a versão comercial do mesmo já ter sido utilizada com algum sucesso^{109,110}. Diferente do sistema de Beens, os sistemas comerciais empregam jatos quentes para reaquecer o ponto criogenicamente resfriado.

Os moduladores criogênicos possibilitaram uma aplicabilidade mais ampla aos sistemas GC×GC. No entanto, a alimentação por CO₂(l) não permite a retenção dos analitos mais voláteis. Introduziu-se então o resfriamento por N₂(l). Moduladores de jato que utilizam nitrogênio líquido no lugar de gás carbônico líquido atingem menores temperaturas nos pontos de aprisionamento e focagem dos analitos. Em consequência, tais sistemas possuem aplicação mais ampla, adequando-se à separação de amostras contendo frações de pontos de ebulição mais baixos.

A modulação criogênica dos analitos em GC×GC é também realizada por meio de N₂(g) resfriado por N₂(l)¹¹²⁻¹¹⁵. Este tipo de modulador emprega um tanque de N₂(l) dentro do qual passam dutos ou tubulações para o transporte de N₂(g). O contato da tubulação com o N₂(l) resfria o N₂(g). Ao chegar à saída da tubulação, o gás encontra-se resfriado o suficiente para realizar a modulação do eluato da primeira coluna.

Dentre as tecnologias de modulação citadas, a menos empregada é a de válvula, extensamente estudada por Synovec e colaboradores⁶⁰⁻⁷². Os dois tipos principais de válvulas empregadas são as de diafragma e as de fluxo diferencial. Um dos aspectos positivos da modulação com válvulas é o fato desse modo não envolver concentração do efluente da primeira coluna dispensando, portanto, o controle de grandes diferenças de temperaturas. Neste aspecto tais moduladores podem ser mais simples, de menor custo e mais robustos que moduladores térmicos. Outras vantagens são a ausência de breakthrough e a possibilidade do

uso em separações muito rápidas de segunda dimensão, da ordem de 1 s ou menos.

Apesar de o uso de válvulas na modulação ser capaz de produzir picos muito estreitos para a segunda dimensão (da ordem de 10 ms), algumas desvantagens podem ser apontadas. O aspecto dos cromatogramas se assemelha aos demais, gerados pelo emprego de outro modulador, entretanto o método não aumenta a detectabilidade³⁹. Além disso, o caráter “compreensivo” dos sistemas que empregam válvulas é questionável, uma vez que parte da amostra é purgada para fora do sistema.

A maior parte dos moduladores de válvula de diafragma transfere apenas cerca de 2% do eluato da primeira coluna para a segunda (e não são por este motivo indicados para a análise de traços) e as de fluxo diferencial cerca de 80%⁶¹. Neste último caso, apesar de evitar-se a perda de detectabilidade, é necessário o uso de altos valores de vazão de gás de arraste na segunda coluna. Outro aspecto negativo desses moduladores é a temperatura máxima de aplicação dos mesmos, que fica em torno dos 175⁰C. Entretanto nos últimos moduladores baseados em válvula desenvolvidos, este problema foi contornado^{62,63,68,69}, até com transferência total da amostra da primeira para a segunda dimensão⁷⁰.

Apesar de historicamente os moduladores baseados em válvulas apresentarem limitações e serem pouco utilizados, muitos esforços vêm sendo realizados no sentido de ampliar sua faixa de aplicações, como visto nos trabalhos de Seeley et al⁶²⁻⁶⁷ e Sinha et al⁷³, além de estudos recentes, como o de Wang⁷¹. Harynuk e Górecki⁷⁴ introduziram uma complexa interface de modulação baseada em GC×GC “stop-flow”, utilizando uma válvula de seis portas e um *trap* criogênico.

Outros conceitos de modulação foram ainda reportados. Um deles é a modulação parcial¹¹⁶. Neste caso a modulação é dita parcial, porque apenas uma fração do sinal original é modulado e convertido em sinal secundário, gerando um cromatograma compreensivo e outro unidimensional em uma única corrida. As vantagens apontadas para este método são a facilidade de implementação, picos de segunda dimensão mais estreitos e preservação do sinal original, preservando

a resolução e precisão da primeira dimensão. No entanto, a presença de sinal da primeira separação na segunda dimensão pode influenciar no tempo de retenção desta. Uma menor detectabilidade também é observada. Estes fatores tornam o método inadequado para a aplicação em separações de amostras complexas. A modulação parcial é indicada nos casos em que se possa usar o sinal correspondente à separação na primeira dimensão para fins quantitativos. A separação na segunda dimensão será empregada na identificação de classes estruturais e quantificação dos picos que não foram completamente separados na primeira dimensão.

É interessante notar que em um período de apenas 12 meses, entre os anos de 2003 e 2004, pelo menos 10 novos moduladores foram reportados na literatura.

3.3.11 Detecção

A detecção em GC×GC é feita da mesma maneira que em GC convencional, ou seja, utilizando-se os mesmos detectores. Há, no entanto, um pré-requisito para que certo detector possa ser empregado em um sistema GC×GC: que ele possua uma frequência de trabalho igual ou superior a 50 Hz. Isto é devido à grande velocidade com a qual os dados são gerados em uma separação deste tipo e à largura dos picos obtidos. Os tempos de residência dos analitos na segunda coluna são da ordem de 3 a 10 s e os picos de segunda dimensão nestes sistemas possuem larguras que variam de 20 a 600 ms. Para que eles possam ser devidamente detectados e “reconstruídos”, o detector deve possuir altas frequências de leitura. Por exemplo, para um pico de 100 ms será necessária a coleta de 50 a 100 pontos por segundo para se dispor de 5 a 10 pontos no gráfico que definirá este pico, considerado o intervalo mínimo para uma definição satisfatória do pico.

O primeiro detector utilizado em GC×GC foi o FID²¹ (Flame Ionization Detector), único que, sobretudo nos primeiros anos da técnica, primeira metade da década de 90, atendia os requisitos de detecção em GC×GC e que continua sendo largamente utilizado devido à sua relação custo/benefício. O custo é

relativamente baixo para um detector “universal” que apresenta robustez, velocidade de coleta de dados adequada ao uso em GC×GC, ampla faixa linear e baixos limites de detecção. Alguns modelos possuem volume interno desprezível e freqüências de aquisição de dados de até 300 Hz^{118,119,120}.

Uma das aplicações mais conhecidas do FID é a que envolve a caracterização de amostras petroquímicas por meio do chamado “efeito telhado”^{36,121}. A identificação de compostos é feita com base na relação direta que há entre estrutura química e a disposição no espaço bidimensional (diagramas de contorno), dos pontos correspondentes aos compostos separados. Compostos pertencentes a uma mesma classe e com o mesmo número de carbonos ficam agrupados em uma mesma diagonal. O emprego do FID, portanto, vai além da quantificação, em que é utilizado juntamente com técnicas espectrométricas^{96,122}. O aumento do poder de separação de GC×GC-FID em relação a GC-FID traz vantagens como a separação de alcoóis, de hidrocarbonetos nos produtos do processo Fischer-Tropsch, a detecção de compostos aromáticos nos produtos da deshidrogenação de n-parafinas, bem como a determinação de aromáticos em níveis de traços na matriz olefínica de processos de oligomerização, a qual não é possível por nenhum outro método de separação¹²³.

Mais versátil que outros detectores, usados na identificação de alguns picos e principalmente na quantificação dos analitos detectados, o detector espectrométrico fornece também informação estrutural. Dentre os analisadores de massa mais utilizados em cromatografia gasosa convencional, os espectrômetros de massas do tipo quadrupolo (qMS) e tempo de voo ToF-MS⁸¹, são adequados ao uso em GC×GC^{96,135}. A grande limitação da aplicação de qMS está em sua velocidade de varredura, tipicamente 2,43 Hz, nos modelos convencionais. Na primeira utilização deste analisador em GC×GC foi necessário reduzir drasticamente a velocidade da separação para obter picos de segunda dimensão da ordem de 1s¹²⁴. A quantificação é comprometida com o uso do qMS tendo em vista que em média apenas 3 a 5 pontos são obtidos por pico de segunda dimensão e ainda em uma faixa limitada de massas⁸¹. O modo SIM (Single Ion

Monitoring), no entanto, pode criar condições mais adequadas ao emprego de qMS em GC×GC, com frequência de aquisição da ordem de 30 Hz¹²⁵.

GC×GC-qMS foi utilizada com sucesso por Shimmo e colaboradores¹²⁹ na análise de partículas na atmosfera para confirmar a identificação de analitos realizada por GC×GC-FID. Entretanto, mesmo com a evolução da tecnologia em qMS sua aplicação ainda encontra-se significativamente limitada em GC×GC. Espectrômetros de massas com quadrupolo de varredura rápida^{126,127} introduzidos na primeira metade da atual década, com velocidade máxima de varredura de 10 kDa/s (contra 4 kDa/s nos modelos mais antigos) fornece apenas 20 Hz de varredura e 3 a 4 pontos por pico de segunda dimensão. Para fins de quantificação, uma faixa de massas limitada deve ser selecionada, o que possibilita alcançar taxas de aquisição acima de 33 Hz¹²⁸.

Dentre os espectrômetros de massa apenas Time-of-Flight Mass Spectrometer (ToF-MS) é o único capaz adquirir 50 ou mais espectros por segundo, podendo desta maneira definir inteiramente picos de segunda dimensão em GC×GC. Encontra-se na literatura inúmeras aplicações de GC×GC-ToF-MS^{92,104,105,129-134}. No entanto, seu custo consideravelmente mais alto que outros espectrômetros de massas torna a popularização desse sistema de detecção mais lenta. A diferença torna-se ainda mais alta quando a comparação é feita com outros sistemas empregados na detecção em GC×GC, principalmente FID. Outro ponto relevante do ToF-MS é a geração de arquivos grandes de dados, em razão da elevada frequência de aquisição. O tratamento de dados requer por isso o uso de computadores de alto custo e *softwares* sofisticados. Estas características limitam a difusão desses instrumentos.

Entre outros detectores menos utilizados em GC×GC pode-se citar o detector por captura de elétrons, ECD^{96,107,108} e o detector por emissão atômica, AED¹³⁶. Mesmo o micro ECD (μ ECD) com volume interno de 150 μ l, pode causar alargamento de picos.

3.3.12 Repetibilidade em GC×GC

Da mesma maneira que o tempo de retenção em cromatografia gasosa unidimensional é usado como parâmetro de identificação dos picos, a posição do pico no espaço bidimensional deve representar a natureza química de um composto em GC×GC. Isto favorece significativamente a análise qualitativa e a caracterização de compostos. Parâmetros analíticos extremamente relevantes como repetibilidade e reprodutibilidade são, no entanto, pouco discutidos na literatura de GC×GC.

Para repetir e/ou reproduzir as posições dos picos em GC×GC é necessário, além de um bom controle dos parâmetros cromatográficos, um processo bem controlado e reprodutível de tempo de início de cada modulação durante toda a análise. Tempos de retenção corretos no espaço 2 D requerem uma relação precisa entre tempo de início do ciclo de modulação e a conversão de dados para o formato de matriz¹¹⁷. Para tal, é necessário dispor de um sistema de aquisição de dados que realize a tarefa de aquisição em tempo real. Isto envolve não somente *hardware* e *software* de computadores, mas também do próprio cromatógrafo. Alguns cromatógrafos antigos podem ser empregados na realização de separações GC×GC, porém com limitações relativas a erros temporais de transmissão de dados.

A saturação das colunas é um fator que prejudica a repetição de resultados e deve ser minimizada por meio do ajuste cuidadoso dos parâmetros cromatográficos, como controle do volume injetado de amostra e diâmetro interno das colunas utilizadas. Separações cromatográficas por um sistema GC×GC operado em condições não lineares foram estudadas por Shellie et al¹¹⁷ e Ong et al¹³⁷. Estes autores são da mesma opinião de que apesar de não desejadas, tais condições geralmente não comprometem a identificação de componentes da amostra. Foi encontrado que a posição de picos de componentes em menor concentração e em níveis intermediários de concentração foram bastante reprodutíveis. Somente aqueles presentes em altas concentrações apresentaram grandes deslocamentos de posição no plano 2D.

O máximo do pico se desloca para maiores tempos de retenção em cada dimensão que se encontra saturada pelo excesso de amostra. Este efeito ocorre principalmente quando empregados moduladores cujo mecanismo de modulação inclui a concentração dos segmentos de soluto durante a eluição do pico da primeira para a segunda coluna (focagem, nos moduladores criogênicos). Os picos de segunda dimensão serão geralmente estreitos e simétricos nas extremidades e mais saturados quanto mais próximo do máximo do pico. Já a saturação na primeira coluna pode ser mais facilmente controlada pelo volume injetado de amostra. Maiores temperaturas de análise também diminuem a saturação.

3.3.13 Aquisição e tratamento de dados em GC×GC

A integração em GC×GC é obtida utilizando-se o cromatograma sem tratamento prévio (cromatograma original) e somando-se as áreas de cada pico individual modulado originado do mesmo composto¹³⁸. No entanto, esta operação geralmente é realizada por um programa de computador à parte, em uma etapa posterior à aquisição dos dados.

Para propósitos de análise quantitativa, o ideal seria dispor de *softwares* que apresentassem, em tempo real, os dados em formato bi e/ou tridimensional, fornecendo também uma lista de todos os picos encontrados no espaço 2D, juntamente com suas alturas e áreas. Complementarmente o *software* forneceria simetria de pico, resolução de picos vizinhos, entre outras informações.

A importância dos estudos quantitativos é bem conhecida. A concentração de óleos essenciais, por exemplo, é determinante na qualidade e conseqüentemente no preço dos perfumes. No entanto, a maioria dos trabalhos que empregam GC×GC encontrados na literatura são estudos qualitativos.

Os primeiros resultados quantitativos obtidos por GC×GC foram apresentados por Beens et al, em 1997¹³⁹. No estudo, os autores realizaram a caracterização de frações pesadas da gasolina e para isso utilizaram um programa escrito em laboratório na integração dos picos. O programa, no entanto,

não apresentou bons resultados na integração de picos que não eram bem separados na linha de base.

Um dos principais motivos que concorrem para um número relativamente pequeno de estudos quantitativos em GC×GC é a escassez de *softwares* especialmente dedicados. O tratamento de dados gerados por estes sistemas é um fator crítico na interpretação das informações cromatográficas obtidas. A maior parte dos grupos de pesquisa em GC×GC utiliza-se de programas feitos em laboratório. Frequentemente esses programas realizam a transformação e visualização, convertendo os dados originais em arranjos bidimensionais e o tratamento dos dados é complementado por *softwares* comercialmente disponíveis que geram diagramas de contorno^{123,136,140}. A Figura 3, mostra como são obtidos estes diagramas. Entretanto, recentemente surgiram *softwares* comerciais mais completos (ChromaTOF® - Leco Corp. St Joseph, MI; *GC Image Software* - Zoex Corp, Lincoln, NE).

Muitas vezes o problema torna-se escolher entre métodos precisos de integração que são, no entanto, lentos (os manuais) e métodos mais rápidos que são por outro lado menos precisos (os automáticos). No método manual, utilizado em grande parte dos trabalhos, primeiramente os picos de segunda dimensão pertencentes a um mesmo analito são integrados utilizando-se algoritmos de integração convencionais e posteriormente os resultados são somados¹⁴³. Reichenbach et al¹⁴⁴ descreveram uma técnica para remoção de ruído em imagens GC×GC. Como enfatizado pelos autores, a remoção de sinais de fundo é um primeiro passo importante para resolver problemas de quantificação.

Em se tratando da análise de um número grande de dados, como os gerados em GC×GC, os métodos multivariados de análise tornam-se ferramentas muito úteis¹⁴¹. O interesse por estes métodos vem crescendo e eles têm sido cada vez mais aplicados no tratamento e interpretação de dados gerados em sistemas GC×GC¹⁴². Um levantamento feito por Adahchour et al⁸¹ revelou que cerca de 30 artigos foram publicados nesta área até o ano de 2006. Uma atualização feita da base de dados Web of Science até junho de 2008 apontou pelo menos mais cinco publicações. Quando GC×GC encontra-se combinada com métodos não

espectrométricos de detecção, como FID, métodos de calibração tais como *rank annihilation method* (GRAM), são capazes de realizar a deconvolução de picos. No caso de dados obtidos com detecção espectrométrica, trilinear decomposition (TLD) e parallel factor analysis (PARAFAC) são mais indicados, uma vez que serão analisados dados trilineares.

Bruckner et al⁶⁰ e Fraga et al¹⁴⁵ empregaram GRAM para auxiliar na separação de picos sobrepostos gerados em separações GC×GC de amostras de combustíveis. O trabalho de Fraga et al obteve a separação de três isômeros aromáticos em 2,8 minutos, um tempo cinco vezes menor que o método de referência por cromatografia gasosa convencional.

Trilinear partial least squares (tri-PLS) é outro método trilinear empregado na análise quali e quantitativa em separações GC×GC. O estudo apresentado por Prazen et al¹⁴⁶ analisou compostos aromáticos e naftênicos em amostra de nafta.

A análise multivariada de dados já demonstrou sua importância na interpretação dos dados cromatográficos obtidos por GC×GC, bem como na diminuição de limites de detecção¹⁴⁷. Apesar de seu potencial em GC×GC, a aplicação da quimiometria é limitada pela confiabilidade dos ajustes nos parâmetros cromatográficos, os quais devem proporcionar boa reprodutibilidade dos tempos de retenção em ambas as colunas, bem como da largura de pico¹⁴⁸. Um bom ajuste destes parâmetros somente será alcançado com o uso de um sistema modulador robusto.

4 Experimental

4.1 Cromatógrafo

Foi utilizado inicialmente como plataforma um cromatógrafo HP 5890 equipado com detector de ionização em chama (FID-Flame Ionization Detector) e injetor split-splitless. Numa segunda etapa, os experimentos passaram a ser realizados em um cromatógrafo HP 5890 Series II. Ambos modelos possuem originalmente aquisição analógica de dados e o registro dos cromatogramas usualmente é feito em um integrador. O modulador foi então interfaceado a um computador, por meio de uma interface paralela PCL 711S (advantech) provida de um conversor A/D de 12 bits. Este interfaceamento, bem como a aquisição de dados são descritos mais adiante.

Utilizou-se injeção direta com microseringa e H₂ como gás de arraste.

4.2 Colunas

O conjunto de colunas utilizado foi: uma coluna HP-1, dimetilpolisiloxano, Agilent Technologies (25 m × 0,32 mm × 0,25 μm) conectada a uma coluna DB-Wax, polietilenoglicol, J&W Scientific – Agilent Technologies (1 m × 0,10 mm × 0,10 μm), por meio de um conector universal para colunas capilares (Alltech Associates Inc., IL- USA).

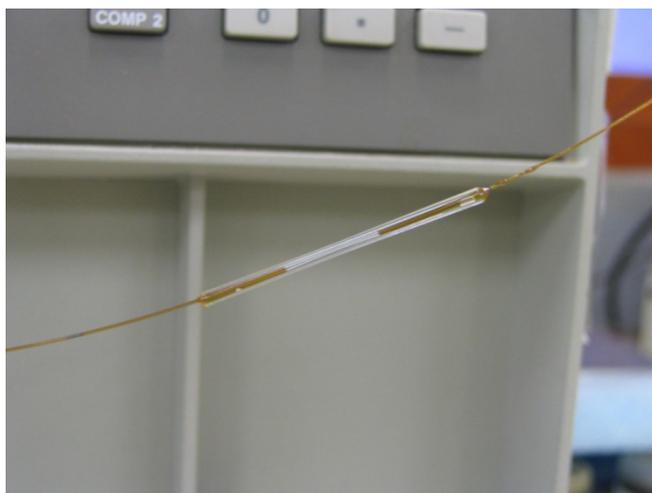


Figura 18. Conexão entre as duas colunas feita por meio de um conector universal para colunas capilares (Alltech Associates Inc., IL- USA).

A Figura 18 mostra a conexão entre as duas colunas capilares, feita em vidro. A fixação das colunas ao conector foi feita com resina de poliimida (Restek Corp, Bellafonte, PA, USA), segundo as orientações do fabricante.

4.3 Modulador - Primeira versão

4.3.1 Compartimento modulador

O primeiro compartimento modulador (dentro do qual ocorria a modulação), projetado e montado no Laboratório de Cromatografia Gasosa do Instituto de Química da Unicamp e utilizado neste trabalho, era constituído externamente por uma “caixa” de alumínio revestida com manta de fibra cerâmica.

No interior do compartimento encontravam-se dois cabeçotes feitos em aço, pelos quais era expelido, alternadamente, dois jatos dióxido de carbono líquido. O compartimento, bem como os cabeçotes, foram construídos por um especialista em mecânica fina contratado. Os cabeçotes possuíam duas metades longitudinais fixadas por quatro parafusos cada, formando uma fenda através da qual era expelido o dióxido de carbono líquido, proveniente de um cilindro com “tubo pescador” ou sifão. Duas outras peças em cada um dos cabeçotes, fixadas por um parafuso cada, prendiam a coluna capilar. As fendas para saída do gás criogênico tiveram inicialmente a espessura controlada em 40 μm . Posteriormente, esta espessura foi diminuída para 3 μm .

O controle da espessura da fenda foi feito por meio de chapas metálicas colocadas entre as metades longitudinais dos cabeçotes. A Figura 19 mostra o protótipo.

A passagem da coluna pela parede do cromatógrafo foi feita através de tubos de cobre de 1/4” de diâmetro e aproximadamente 10 cm de comprimento, mostrados no esquema da Figura 21 e na fotografia da Figura 22 (os tubos também foram usados na segunda versão).

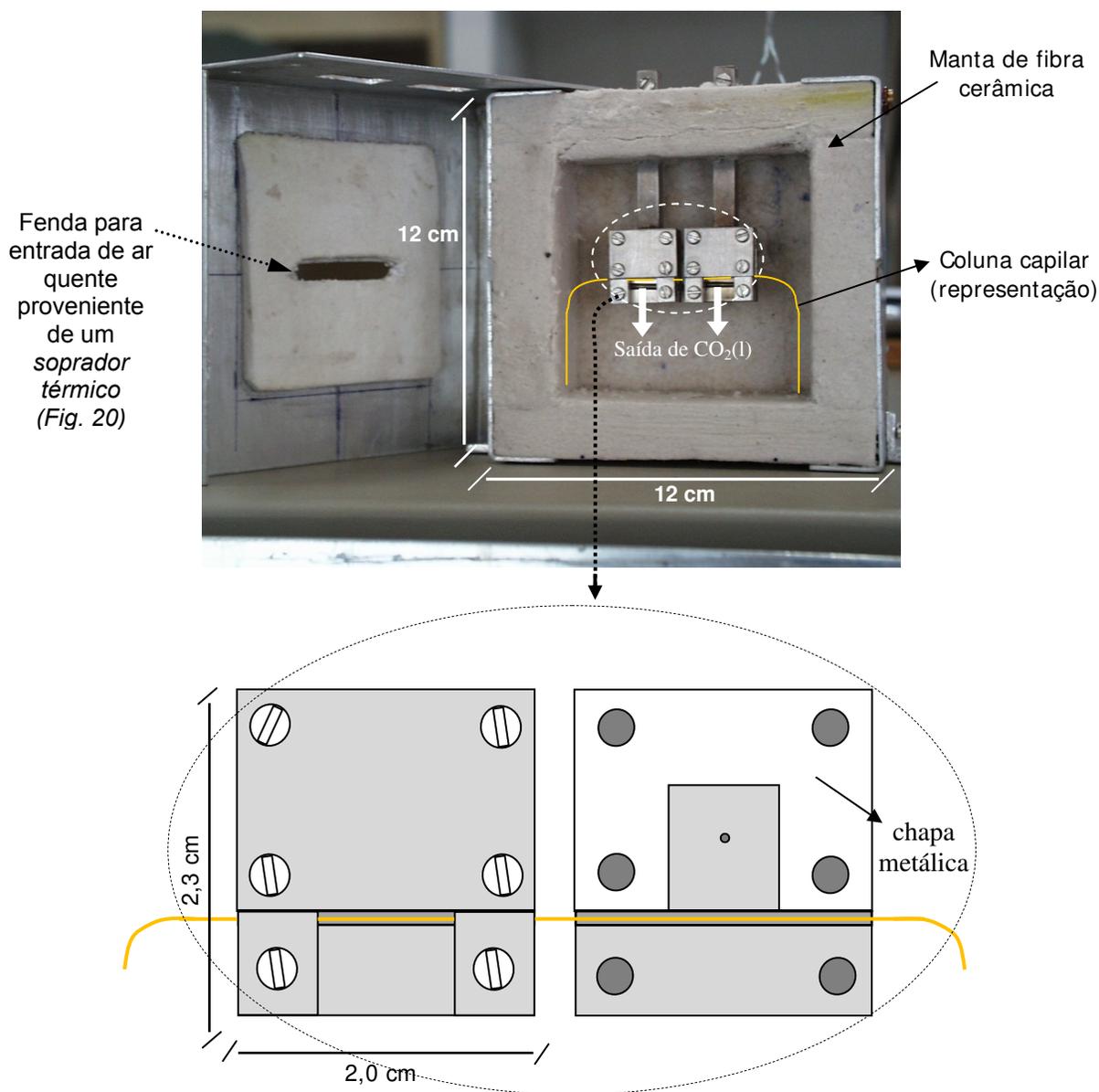


Figura 19. Primeira versão de modulador para GC×GC desenvolvido no projeto. Tubos de 1/16" de diâmetro foram fixados, por meio de solda prata, perpendicularmente ao centro dos cabeçotes e não aparecem na foto. Aproximadamente 0,5 cm da coluna em cada uma das saídas de CO₂(l) eram resfriados. O modulador é mostrado compondo o sistema GC×GC na Figura 21. O desenho na parte de baixo da Figura mostra um dos cabeçotes desmontado, no qual nota-se a chapa metálica em forma de U (invertida) de 40 μm de espessura e ao centro a saída de CO₂(l). Com o cabeçote montado e a linha de gás pressurizada, era formado um jato sobre a coluna capilar.

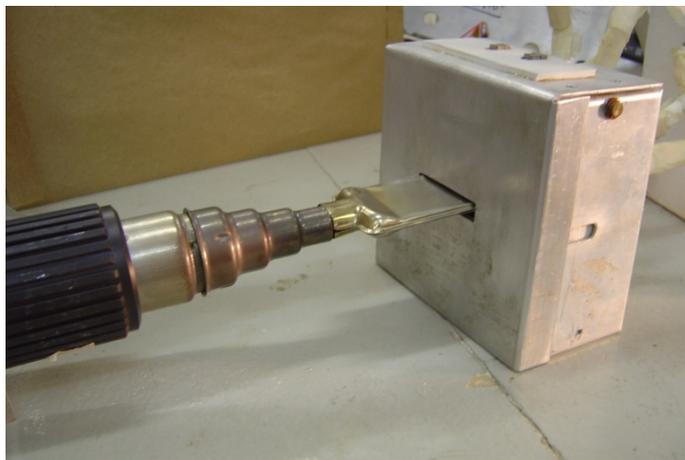


Figura 20. Entrada de ar quente frontal através de um soprador térmico, na primeira versão do modulador.

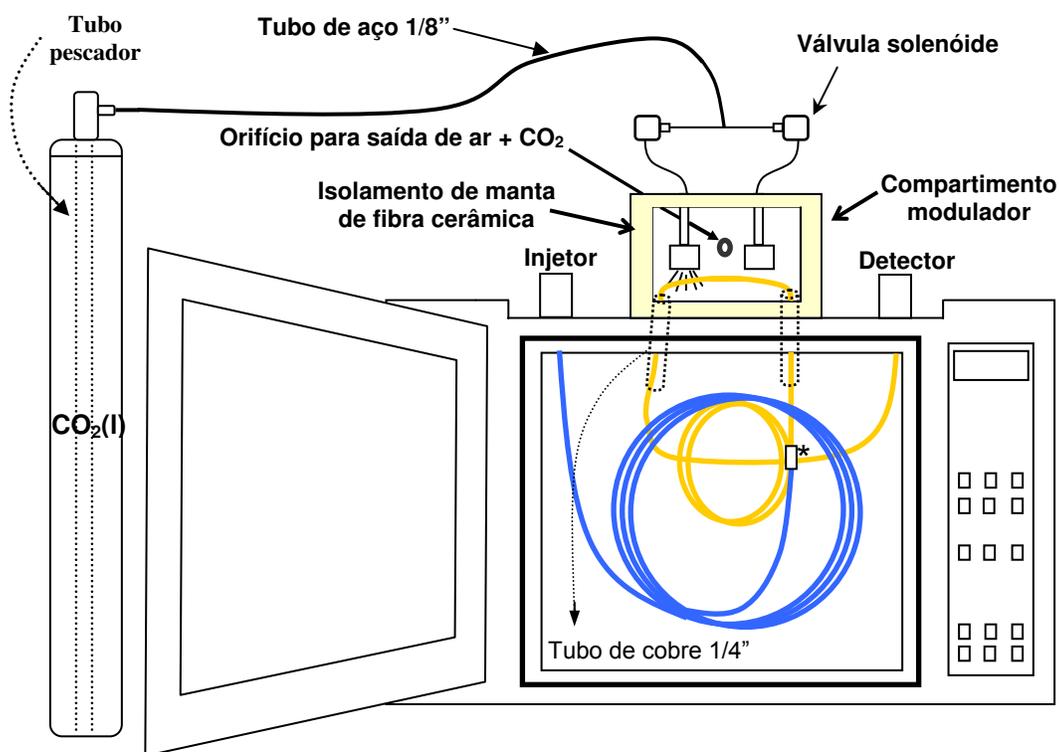


Figura 21. Esquema do sistema GCxGC completo (exceto aquisição de dados), com modulador de duplo jato de $\text{CO}_2(\text{l})$ com dois cabeçotes - primeira versão projetada. O compartimento modulador aparece em mais detalhes na Figura 20. Em azul: primeira coluna ou coluna de primeira dimensão (^1D). Em amarelo: segunda coluna ou coluna de segunda dimensão (^2D). * conector para colunas capilares (ver Figura 18).

4.3.2 Sistema de resfriamento

O sistema de resfriamento nesta versão foi alimentado por CO₂(l). Foi utilizado inicialmente um cilindro de CO₂(l) de 4,5 kg de capacidade, posteriormente substituído por outro de 23 kg.

Dois válvulas solenóides de duas vias, 120 V / 60 Hz; 11,8 W (Asco®) realizaram as etapas de aprisionamento e focagem durante a modulação. O controle da abertura das válvulas foi feito por dois relês de estado sólido (dispositivo elétrico de comutação) - RS Components Ltda, comandados por computador, por meio de uma interface paralela. Tubos de cobre de 1/8" de diâmetro ligaram as válvulas solenóides (Figura 21) aos cabeçotes.

Para manter elevada a temperatura do compartimento modulador e arrastar o CO₂ expelido durante a modulação para fora do compartimento e do laboratório, utilizou-se um soprador térmico (HL 1800-E, Steinel - Figura 20).

A Figura 21 mostra o sistema completo. A tampa do compartimento modulador com a fenda para entrada de ar quente e o soprador encontram-se na Figura 20.

Um tubo flexível de aço (tubo corrugado) de 3/4" de diâmetro foi conectado a um orifício no fundo da caixa, se estendendo até o exterior do laboratório, para saída de ar juntamente com CO₂(g) e não aparece no esquema, bem como o sistema de controle do *software*.

O sistema de aquisição de dados utilizado, apresentado mais adiante, foi basicamente o mesmo em ambas versões de modulador, com exceção das modificações e aperfeiçoamentos realizados durante o desenvolvimento do *software*.

4.4 Modulador – Segunda Versão

4.4.1 Compartimento modulador

A segunda versão de compartimento modulador, era composta externamente por uma caixa de aço, sem revestimento, construída na oficina mecânica do Instituto de Química da Unicamp.

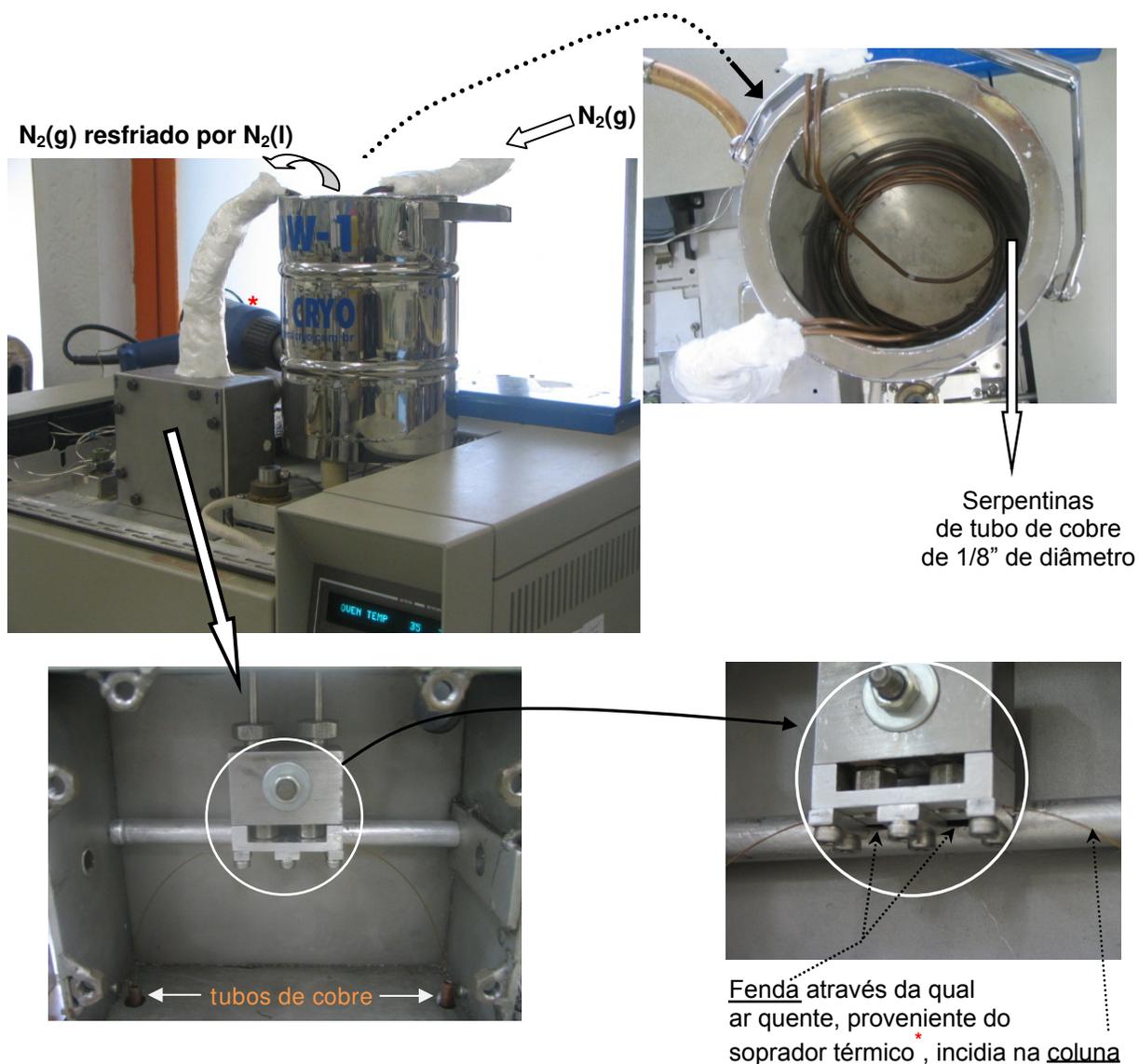


Figura 22. Sistema de resfriamento e sua ligação com compartimento modulador (acima) e detalhe do cabeçote do modulador (abaixo) utilizados na segunda versão. O sistema é o mesmo que aparece no esquema da Figura 24 em 2, 3 e 4. O cabeçote é mostrado desmontado na Figura 23. O tubo entre o frasco Dewar e o compartimento modulador (continuação da serpentina) foi isolado com manta de fibra cerâmica para diminuir a troca de calor com o ar ambiente.

Dentro da caixa encontrava-se o cabeçote em peça única feito em aço inox, fixado à caixa por meio de um parafuso no centro (Figura 22). O cabeçote foi construído na oficina de mecânica fina do Instituto de Química. O modulador era do tipo duplo jato criogênico.



Figura 23. Cabeçote desmontado do modulador da segunda versão.

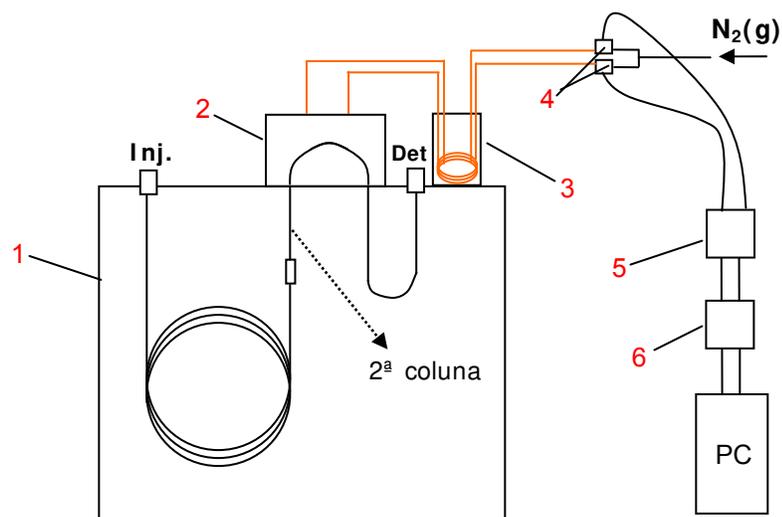


Figura 24. Sistema GCx GC (esquemático).

- | | |
|------------------|----------------------------|
| 1 - Cromatógrafo | 4 - Válvulas solenóides |
| 2 - Modulador | 5 - Relês do estado sólido |
| 3 - Frasco Dewar | 6 - placa A/D |
| | PC- Microcomputador |

À exemplo da primeira versão, a passagem da coluna do compartimento modulador ao forno do cromatógrafo foi feita através de tubos de cobre de 1/8" de diâmetro e aproximadamente 10 cm de comprimento.

A incidência de ar quente na coluna ocorreu de maneira semelhante àquela mostrada na Figura 20, da primeira versão, utilizando-se um soprador térmico (HL 1800-E, Steinel). No entanto, na segunda versão do modulador a entrada de ar encontrava-se na parte de trás do compartimento que continha o cabeçote, como se observa nas Figura 22 e Figura 25 (Sistema GC×GC completo).

4.4.2 Sistema de resfriamento

Pelo cabeçote do modulador era expelido $N_2(g)$ resfriado por $N_2(l)$. O $N_2(g)$ foi fornecido por uma linha de gás disponível no Instituto de Química da Unicamp e conduzido até o sistema de resfriamento através de tubos de aço de 1/8" de diâmetro.

Utilizou-se as mesmas válvulas e os relés descritos para a primeira versão (4.3.2).



Figura 25. Sistema GC×GC completo, com modulador de duplo jato e $N_2(l)$ como fluido criogênico e cabeçote em peça única (segunda versão projetada). O compartimento modulador é mostrado em mais detalhes na Figura 22.

O sistema de resfriamento consistiu de um frasco Dewar de 1,5 L (Metal Cryo Criogenia Ltda), no interior do qual havia duas serpentinas de tubos de cobre de 1/8" de diâmetro e 1 m de comprimento cada. As serpentinas, através das quais passava $N_2(g)$ a uma pressão controlada por manômetro, eram mantidas no fundo do frasco Dewar e permaneciam imersas em $N_2(l)$ durante as corridas cromatográficas (Figura 22).

Para reabastecer o frasco Dewar constantemente durante os experimentos, mantendo-se as serpentinas sempre imersas em $N_2(l)$, dispunha-se de um frasco estoque de 30 L. O reabastecimento foi realizado manualmente.

As saídas para o gás no cabeçote eram circulares, com diâmetro variável (de 400 μm a 1 mm) pelo uso de pequenos discos com orifícios no centro feitos de chapas de aço de 0,3 mm de espessura, como pode ser visto na Figura 23. Os discos foram feitos a Laser, no LNLS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron).

4.5 Controle do sistema e aquisição de dados: *Hardware, Software, Coleta e Tratamento de Dados Cromatográficos*

O controle do acionamento das válvulas solenóides foi feito via *software* e relês de estado sólido. O programa de computador utilizado inicialmente para controle da modulação e aquisição dos dados foi escrito em Visual Basic 3. Foi usado um PC AMD K6-2 500 MHz, 128 MB RAM, plataforma Microsoft Windows 95.

Posteriormente utilizou-se um programa confeccionado nas Linguagens C, PHP (v.4) e em HTML (ambiente gráfico)¹, um PC AMD K7 Athlon 900 MHz e 256 MB RAM e plataforma Debian Linux 3.1 r1. Por meio deste programa foi possível ajustar o tempo e a frequência de aquisição, o período de modulação, além do ganho fornecido pela placa A/D.

Para aquisição de dados analógicos e controle das válvulas solenóides do modulador foi instalada no microcomputador uma placa conversora A/D D/A de 12 bits (Advantech PCL-711B, 100 KHz de frequência, driver Linux). O sinal de saída do cromatógrafo foi amplificado cerca de dez vezes por meio de um circuito eletrônico.

Os dados foram adquiridos a 100 Hz. O período de modulação utilizado nos experimentos variou de 4 a 7 s, sendo sempre 3 a 5 s para a primeira válvula (onde ocorreu o aprisionamento) e 1 ou 2 s para a segunda válvula (onde ocorreu a focagem).

Após a aquisição dos dados cromatográficos pelo programa escrito em laboratório, a construção dos diagramas de contorno foi feita no programa MatLab 6.5, fazendo-se, por meio de comandos específicos, as transformações que aparecem na Figura 3. O procedimento consistiu em reorganizar o vetor de dados em uma matriz de tempo de retenção da primeira coluna por tempo de retenção da segunda coluna, construindo-se em seguida o diagrama de contorno correspondente. Pôde-se então trabalhar com escala de intensidade e mapa de cores conforme a necessidade.

Considerando-se uma corrida cromatográfica GC×GC de 30 minutos, ao término desta a frequência de aquisição empregada, 100 Hz, gera um total de 180000 pontos no vetor de dados. Utilizando-se o tempo de modulação de 5 s (que a 100 Hz originam 500 pontos), o vetor original gera outros 360 vetores contituídos por 500 pontos cada. O diagrama de contorno é então constituído pela matriz 500×360. Cada um dos passos é realizado por meio de comandos específicos no *software*.

4.6 Reagentes e Amostras

Para testes preliminares de funcionamento do sistema, bem como na identificação de compostos presentes na gasolina, foram utilizados:

- Mistura BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno), preparada em laboratório. Os componentes utilizados na mistura foram:

Benzeno para U.V Quimibrás, Rio de Janeiro-RJ.

Tolueno P. A. ACS - Synth, Diadema -SP.

Etilbenzeno 99,80% - Acros Organics, New Jersey, USA.

o- Xileno P.A. - Acros Organics, New Jersey, USA.

- Amostras de gasolina tipo C (gasolina adicionada de 23% v/v de álcool etílico) fornecidas pela Central Analítica do IQ-Unicamp.

- Querosene filtrado, comercialmente disponível (Vimak[®]).
- Padrão de Hidrocarbonetos C8 – C20, Fluka.

5 Resultados e Discussão

5.1 Modulador de duplo jato criogênico com resfriamento por CO₂(l) – Primeira versão

O primeiro modelo de modulador desenvolvido e testado neste projeto foi o duplo jato criogênico, mostrado na Figura 19, que utilizou CO₂(l) no processo de modulação durante as corridas cromatográficas.

Após a montagem do sistema GC×GC, com a adaptação do modulador ao cromatógrafo e ao sistema de aquecimento/resfriamento, iniciou-se a otimização das condições de operação e de aquisição de dados. Dentre essas condições, a prioridade foi o funcionamento correto da modulação. Para isto, é de extrema importância balancear resfriamento e aquecimento nos segmentos de coluna atingidos pelos jatos criogênicos, de forma a manter a temperatura dos mesmos suficientemente baixa para realizar o aprisionamento dos analitos e ao mesmo tempo alta o bastante para que possa ocorrer a remobilização dos analitos aprisionados. Com o intuito de obter este compromisso entre resfriamento e aquecimento, a potência do soprador térmico (Figura 20) e a vazão de CO₂(l) foram variadas até que fosse observado o fracionamento dos picos correspondentes aos compostos eluídos da primeira coluna. O resultado deste ajuste é apresentado a seguir.

5.1.1 Modulando com a primeira versão – estudos preliminares

Para avaliação do desempenho do sistema modulador desenvolvido, bem como o estudo dos mecanismos de funcionamento de separações GC×GC, foram feitas corridas cromatográficas tomando-se como amostra a mistura BTEX.

A Figura 26 A é o cromatograma obtido após injeção de 0,3 µL de BTEX, com razão de split 1:50, sem modulação (corrida cromatográfica convencional). Nas Figura 26 B e C são apresentados os resultados de uma separação utilizando as mesmas condições que na Figura 26 A, porém acionando a modulação ao início da corrida cromatográfica.

Observando-se a Figura 26 B nota-se que cada um dos quatro picos, correspondentes aos quatro compostos da amostra, foi modulado e que cada um deles foi fracionado em vários outros picos claramente de intensidades muito maiores que as observadas na Figura 26 A. Esta característica é uma das grandes vantagens de GC×GC: o aumento da detectabilidade. O estreitamento dos picos causa um aumento de intensidade dos mesmos, devido à conservação da área.

O requisito de eficiência da modulação, de pelo menos quatro modulações para cada pico foi alcançado, como se vê na Figura 26 B, exceto no caso do benzeno. Isto se deve à maior velocidade linear desse composto ao sofrer modulação, consequência da maior volatilidade do mesmo. Com a passagem rápida do benzeno pelo modulador, não houve tempo suficiente para que o mesmo sofresse pelo menos quatro modulações.

A Figura 26 C é uma ampliação do penúltimo composto modulado (etilbenzeno), mostrado na Figura 26 B. Nota-se que praticamente a cada período de modulação (4 s, sendo 3 s da primeira válvula - v1 – etapa de aprisionamento, mais 1 s da segunda válvula - v2 – etapa de focagem), foi obtido um pico. O pico entre 444 e 448 s, no entanto, apresentou uma parte fora do período de modulação. Isto indica que o composto teve um tempo de retenção na segunda coluna ligeiramente maior que o período de modulação, neste caso de 4 segundos. Por este motivo o tempo de modulação escolhido deve ser maior que o tempo de retenção do composto mais fortemente retido na segunda coluna, evitando assim o *wrap-around*.

O modelo, inspirado em um trabalho descrito por Beens e colaboradores¹⁰¹, não obteve excelentes resultados quanto a larguras de pico de segunda dimensão, robustez, reprodutibilidade, repetibilidade. As larguras de pico na segunda dimensão ficaram acima dos 600 ms. No entanto, apesar de se tratar de uma amostra facilmente separada em um cromatógrafo a gás convencional, os dados obtidos mostraram que o sistema já era capaz de realizar a modulação do eluato da primeira coluna e que o desenvolvimento de um sistema GC×GC em nosso laboratório era totalmente viável.

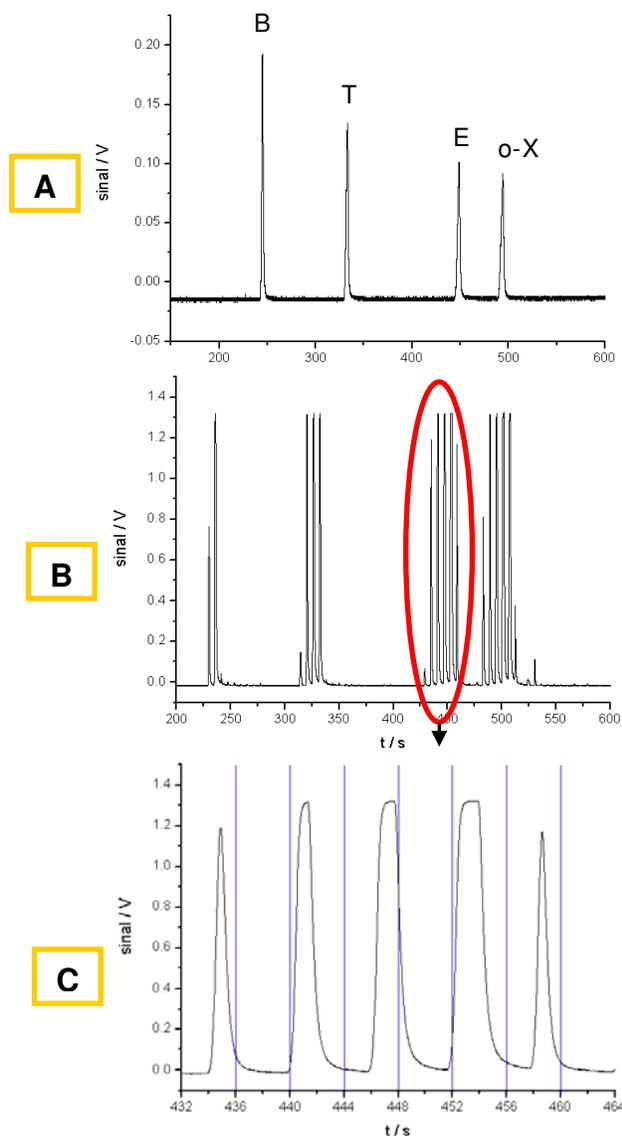


Figura 26. (A) Cromatograma obtido após corrida cromatográfica com mistura BTEX como amostra, utilizando duas colunas, sem modulação (corrida convencional); $T_{col} = 40^{\circ}\text{C} \rightarrow 10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1} \rightarrow 150^{\circ}\text{C}$; (B) - Cromatogramas obtidos pela separação da mesma amostra, empregando GC \times GC (corrida com acionamento das válvulas); modulador de duplo jato criogênico; modulação: 3 s + 1 s; gás de arraste: N_2 ; $T_{col} = 40^{\circ}\text{C} \rightarrow 10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1} \rightarrow 150^{\circ}\text{C}$. (C) Ampliação dos picos fracionados, correspondentes ao etilbenzeno. Cromatógrafo HP 5890 A; Coluna HP-5 (30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm) + Ciola-wax (0,94 m \times 0,10 mm \times 0,2 μm). o-X: orto-xileno.

5.1.2 Análise de Gasolina por GC×GC, empregando a primeira versão de modulador

A amostra escolhida para avaliar o desempenho e desenvolver o protótipo projetado foi a gasolina. O gás de arraste utilizado nos primeiros experimentos, N₂, foi trocado por H₂. A escolha foi feita devido ao H₂ ser o gás que apresenta a maior vazão ótima, e a menor inclinação na curva de Van Deemter, quando comparado aos outros gases comumente utilizados como gás de arraste, o He e N₂ (Figura 14). Isto permite uma faixa mais ampla de ajuste para sua velocidade linear sem grande perda de eficiência da coluna.

Em experimentos utilizando-se gasolina Tipo C como amostra, obteve-se resultados promissores. Nestes, pôde-se observar algumas mudanças nos perfis cromatográficos.

A Figura 27 mostra a triplicata de diagramas de contorno resultante de separações GC×GC em que, tendo por objetivo otimizar a separação, a temperatura do ar do soprador térmico foi variada, enquanto as demais condições foram mantidas. Levando-se em consideração a ampla faixa de compostos que compõem a gasolina, a temperatura do ar aquecido dentro do compartimento de modulação foi variada para que compostos mais pesados não ficassem retidos na parte da coluna que atravessava o compartimento. Procurou-se desta maneira também evitar que tais compostos tivessem tempos de modulação muito superiores aos demais, minimizando-se assim as ocorrências de *wrap-around*.

Uma estimativa feita do consumo de dióxido de carbono, mostrou-se bem próxima da relatada na literatura: 3,3 kg·h⁻¹ contra 3,17 kg·h⁻¹ para o modelo de jato duplo de J. Beens¹⁰¹. O cálculo foi feito dividindo-se a capacidade do cilindro de CO₂(l), 23 kg, pelo número de horas de funcionamento do modulador, aproximadamente 7 h. Entretanto, nota-se que não houve uma boa repetibilidade dos resultados, uma vez que vários dos picos não se repetem em todos os diagramas de contorno, aparecem em outro tempo de retenção, ou com formato diferente do correspondente em outra replicata.

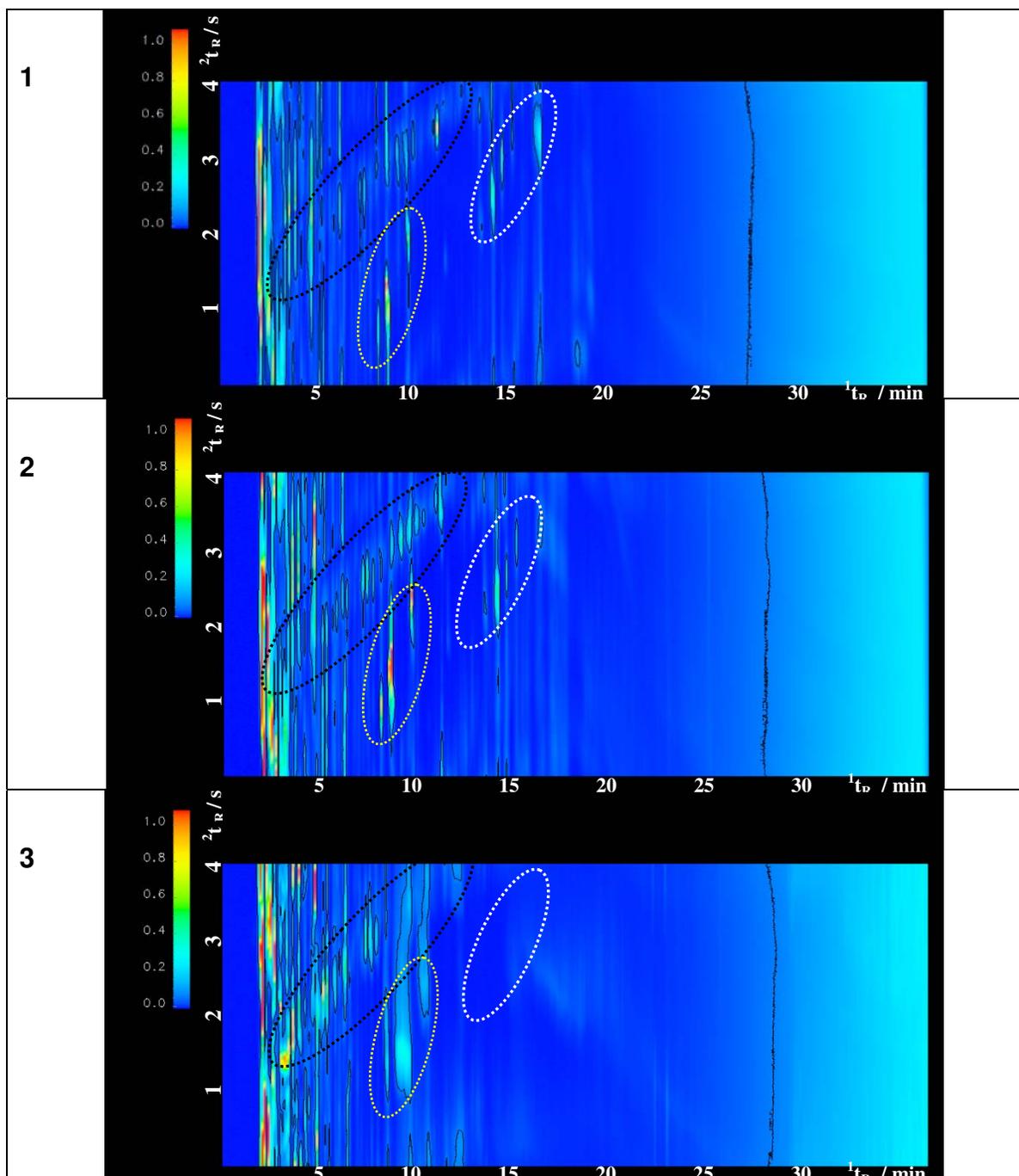


Figura 27. Triplicata de diagramas de contorno de amostra de gasolina tipo C. Condições: Injetor - 270°C; Detector - 280°C; Programação de temperatura do forno do cromatógrafo: 35°C (4 min); 2°C·min⁻¹ → 65°C; 8°C·min⁻¹ → 193°C; Programação de temperatura do soprador térmico: 150°C (10 min); 200°C (5 min); 250°C. Tempo de modulação: 4 s; Volume de amostra injetado: 0,1 µL. Split: 1:100. Gás de arraste: H₂; Vazão: 0,39 mL·min⁻¹. Conjunto de colunas: HP-1 (25 m × 0,32 mm × 0,25 µm) - DB-Wax (1 m × 0,10 mm × 0,10 µm).

As duas primeiras replicatas (identificadas como 1 e 2) são as mais semelhantes e o principal grupo de compostos, que forma uma diagonal, além de alguns outros compostos, encontram-se em posições muito próximas em ambos os diagramas, como destacado na Figura.

A inclinação das diagonais poderia significar um alto grau de correlação entre as dimensões de separação. No entanto, constatou-se posteriormente que esta inclinação devia-se em grande parte a um erro temporal de acionamento das válvulas solenóides, bem como de aquisição dos dados. Os tempos de acionamento das duas válvulas responsáveis pelos eventos de aprisionamento e focagem não eram reprodutíveis, possuindo variações de décimos de segundo. Desvios dessa ordem de magnitude são capazes de gerar variações significativas nos tempos de retenção da segunda dimensão, que causam mudanças de inclinação das sequências de picos nos diagramas de contorno. Isto dificulta dissociar-se a contribuição deste fator e a do grau de ortogonalidade, na inclinação das diagonais.

Além disso, constatou-se que o eletrômetro do cromatógrafo utilizado não possui velocidade de detecção compatível com a frequência necessária, 100 Hz neste caso, que foi a frequência escolhida de aquisição, via *software*. O eletrômetro possuía, no entanto, um atraso de cerca de 40 ms na detecção dos dados e em torno de 25 Hz de frequência de leitura. Por este motivo a definição das manchas nos diagramas de contorno, assim como as larguras de pico de segunda dimensão, em torno dos 400 ms nas menores, não são as ideais. Estes erros se devem à falta de “memória cache” da placa A/D de 12 bits utilizada no sistema.

A repetibilidade nos tempos de retenção da primeira coluna (1t_R) não foi significativamente afetada, uma vez que, independente da replicata, trata-se da mesma amostra analisada sob as mesmas condições. Além disso, certa diferença em 1t_R de um pico entre duas replicatas representa proporcionalmente muito menos comparando-se a uma variação semelhante na segunda dimensão, devido ao tempo de análise em cada uma das colunas. Isto pode ser notado pela observação das posições das manchas em relação ao eixo correspondente ao 1t_R .

No entanto, houve um deslocamento das manchas em relação ao tempo de retenção de segunda dimensão, 2t_R .

A reprodução do tempo de início dos ciclos de modulação é fundamental para obter-se boa repetibilidade¹¹⁷. Se a dificuldade em se repetir os resultados estivesse somente neste fator, haveria deslocamento de 1t_R e/ou 2t_R apenas. Nos resultados apresentados, no entanto, há diferenças nas formas das manchas, indicando que o problema ocorreu devido a deficiências ou erros não sistemáticos no processo de modulação em si, causando a baixa repetibilidade entre as corridas. A temperatura das seções de coluna resfriadas durante a modulação ou seja, o equilíbrio entre resfriamento e aquecimento nestes pontos, foi provavelmente um dos fatores responsáveis pelas diferenças entre replicatas. Esta temperatura é função não somente de tempos reprodutíveis de acionamento das válvulas solenóides, mas também da capacidade térmica do modulador.

As diferenças observadas entre os cromatogramas 2 e 3, podem ter ocorrido em parte devido à queda do nível de $\text{CO}_2(\text{l})$ no cilindro durante a corrida 2, o que fez a pressão de saída do $\text{CO}_2(\text{l})$ chegar a um valor insuficiente para repetir a modulação realizada na replicata anterior. No terceiro diagrama de contorno há uma dificuldade na identificação de picos individuais, uma vez que as manchas encontram-se em menor número que no cromatograma 2 e também “agrupadas”, indicando o possível congelamento excessivo que causou o acúmulo dos picos. Cabe ressaltar que a replicata em questão foi obtida após a troca do cilindro de dióxido de carbono líquido. A pressão de saída do fluido em seu valor máximo leva a pensar que o perfil observado na última replicata pode ser resultado de um resfriamento excessivo nas etapas de aprisionamento e focagem durante a modulação. A relação aquecimento/resfriamento, portanto, foi desfavorável à correta modulação dos picos cromatográficos.

Analisando o acima exposto, conclui-se que a repetibilidade deficiente observada entre os diagramas de contorno, decorreu sobretudo de falhas no processo de modulação. As falhas podem ser apontadas como resultado dos fatores listados a seguir (5.1.3), bem como da falta de automatização na regulação de temperatura do ar do soprador térmico. Por outro lado, o sistema

realizou a separação de compostos coeluídos na primeira coluna numa amostra tão complexa quanto a gasolina, como pode-se observar nos picos em uma mesma linha vertical, na Figura 27.

5.1.3 Problemas identificados na Primeira Versão do Modulador

Apesar dos resultados iniciais promissores, alguns problemas levaram à necessidade da construção de um novo modelo de modulador. Dentre as principais limitações da primeira versão, pode-se citar:

- vazamento de $\text{CO}_2(\text{l})$ nos cabeçotes do modulador. O desenho dos cabeçotes (Figura 19) favorecia o vazamento de $\text{CO}_2(\text{l})$ pelas laterais dos mesmos, desperdiçando o fluido e dificultando a repetição dos resultados, pois a quantidade e intensidade de $\text{CO}_2(\text{l})$ que realizavam a modulação não eram sempre as mesmas.
- dificuldade no controle do equilíbrio entre resfriamento e aquecimento, ocorrendo algumas vezes formação de gelo dentro do compartimento modulador.
- má vedação do compartimento modulador, resultando em vazamento do dióxido de carbono para o ambiente do laboratório.
- baixa robustez do sistema refletida na falta de repetibilidade e na quebra freqüente da coluna capilar dentro do compartimento modulador. A quebra devia-se à largura reduzida do compartimento, que causava tensão excessiva ao segmento de coluna em curva (Figura 19), resultando em sua ruptura. A existência de dois cabeçotes e da possibilidade de movimento “pendular” dos mesmos, ainda que limitado, também favorecia a quebra da coluna (ver Figura 19).
- A falta de um controlador de pressão para o cilindro de $\text{CO}_2(\text{l})$ foi outro fator que dificultou a repetição dos resultados, uma vez que não se podia saber com precisão a pressão de saída do dióxido de carbono, para associá-la idealmente a uma certa temperatura do ar expelido pelo soprador térmico e a uma determinada amostra.

- O modulador mostrou-se limitado quanto à modulação de compostos de massa molar reduzida devido ao uso de CO₂(l) como fluido criogênico.

As fendas para saída do gás criogênico tinham inicialmente a espessura de 40 µm, determinada por uma chapa metálica (Figura 19). No entanto, a espessura utilizada resultou em um jato muito intenso de CO₂(l) que causou muitas vezes o congelamento excessivo dos segmentos de coluna sobre os quais os jatos eram direcionados. Por vezes, todo o compartimento modulador era tomado por gelo e para evitar este inconveniente era necessário elevar ao máximo a temperatura do ar no compartimento. No entanto, a temperatura máxima atingida pelo ar fornecido pelo soprador (em torno de 600^oC) poderia danificar a coluna capilar. Na tentativa de contornar o problema, economizando CO₂(l) e evitando o congelamento excessivo, a espessura das fendas foi diminuída para 3 µm, utilizando-se papel alumínio comum. Este valor foi mantido durante a utilização desta versão de modulador, pois o problema foi amenizado.

Os experimentos mostraram que após 7 h de uso do cilindro de 23 kg de CO₂(l) a pressão no mesmo tornava-se insuficiente para realizar a modulação. Por meio de um manômetro verificou-se no entanto, que a pressão no cilindro com 7 h de uso era de 250 psi, o que corresponderia a quantidade significativa do fluido no cilindro, que possui pressão inicial (cilindro cheio) em torno de 700 psi. Portanto, a pressão no cilindro de CO₂(l) era suficiente para sustentar o bom desempenho do sistema desenvolvido, mantendo a correta modulação dos picos, somente enquanto se mantinha em torno de 50 a 100% da pressão inicial. A falta de dispositivos comerciais de controle da pressão de saída para cilindros de CO₂(l) foi uma limitação importante e constituiu-se numa grande desvantagem da utilização do CO₂(l) como fluido criogênico. O conhecimento da pressão exata de saída era desejável, uma vez que a escolha de um valor otimizado possibilitaria melhor repetibilidade dos resultados, bem como economia do fluido.

5.2 Modificações e aperfeiçoamentos do sistema de modulação desenvolvido – Segunda Versão

Uma nova versão de sistema de modulação para GC×GC foi projetada, construída e adaptada a um cromatógrafo HP 5890 Series II. Os fundamentos e o mecanismo de funcionamento da segunda versão eram basicamente os mesmos da versão anterior, no entanto o modelo foi acrescido de importantes modificações que visaram o aumento da sua eficiência, bem como a simplificação da sua construção e instalação. O objetivo desta etapa foi, portanto, aperfeiçoar o design da primeira versão de modulador, contornando os problemas identificados, e continuar a otimizar as condições de separação. A segunda versão seguiu sendo utilizada até o final do projeto.

Dentre as modificações feitas, destacam-se:

- substituição do compartimento modulador por um modelo feito em aço sem isolamento térmico e de dimensões ampliadas (na versão anterior, em alumínio e revestido por manta de fibra cerâmica). Este novo design eliminou vazamentos de CO₂ pelo compartimento e simplificou a construção e o manuseio do modulador. A vantagem apresentada pelo aumento das dimensões do compartimento modulador foi a diminuição da tensão imposta à coluna capilar, como consequência do aumento do ângulo do segmento de coluna dentro do compartimento (devido a maior largura do mesmo). Após a modificação não ocorreu mais a quebra da coluna capilar.
- Os dois cabeçotes para saída de CO₂ líquido da versão anterior foram substituídos por uma única peça, simplificando e tornando mais compacto o novo modelo. A peça foi confeccionada por um profissional em mecânica fina contratado. O novo modelo permitiu o controle da vazão dos dois jatos, o de aprisionamento e o de focagem, de forma independente, por meio de discos com orifícios de diâmetro variável. Posteriormente modificações foram realizadas na oficina de mecânica fina do Instituto de Química, como a substituição das porcas de latão que prendiam os discos na saída dos jatos, por peças em aço. O

cabeçote em peça única também favoreceu a eliminação do problema de quebra da coluna capilar.

- As válvulas solenóides, controladoras da saída de CO₂(l), foram instaladas em cima do modulador, tornando o modelo mais compacto e reduzindo o comprimento da tubulação através da qual era transportado o dióxido de carbono. Quanto mais curto o caminho percorrido pelo dióxido de carbono, menor será a troca de calor com o ar ambiente, minimizando seu consumo e mantendo o mais baixa possível sua temperatura na saída do modulador. Anteriormente as válvulas eram suspensas por meio de um suporte, mantendo-as a aproximadamente 70 cm do modulador.

5.2.1 Separações GC×GC utilizando a segunda versão de modulador

Após as modificações anteriormente descritas, a segunda versão do sistema modulador foi adaptada ao cromatógrafo e utilizada na análise de amostras de gasolina tipo C. Os dados foram adquiridos empregando-se um programa escrito em laboratório. Foi utilizado como fluido criogênico novamente CO₂(l).

Da mesma maneira que a primeira versão, a prioridade foi o funcionamento correto da modulação. Foram variadas a potência do soprador térmico e a vazão de CO₂(l) até que fosse observado o fracionamento adequado da maioria dos picos eluídos da primeira coluna (mínimo de 3 a 4 modulações, para cada pico).

A Figura 28 ilustra o efeito da variação em uma das condições de modulação, a vazão de fluido criogênico. O diagrama de contorno b) foi obtido após diminuição da vazão de CO₂(l) por meio do ajuste de uma válvula de restrição, uma válvula abre e fecha comum, utilizada na tentativa de minimizar problemas de congelamento excessivo durante a modulação.

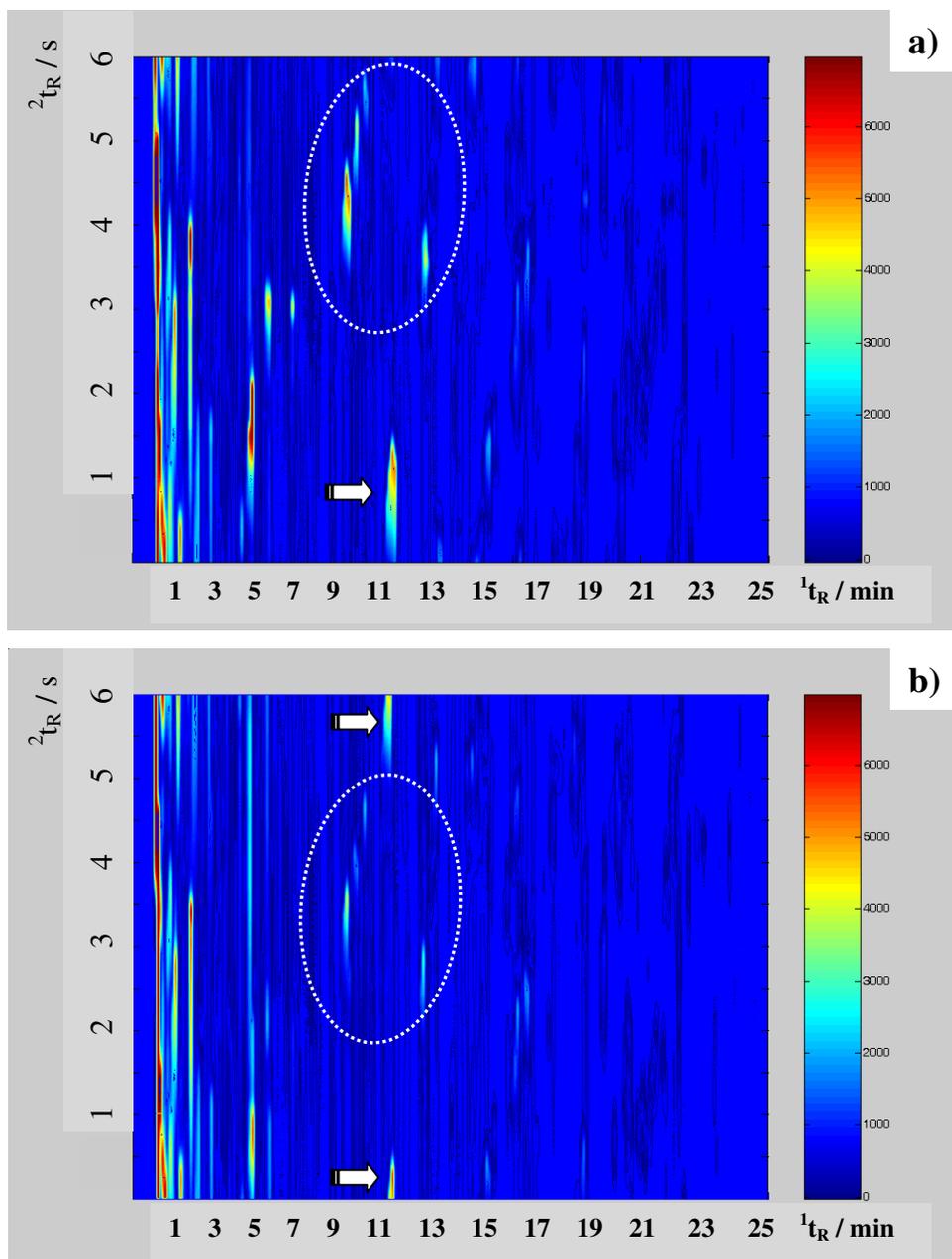


Figura 28. Duplicata de diagramas de contorno resultantes de corridas empregando Gasolina Tipo C como amostra. No diagrama b) a vazão do fluido criogênico foi diminuída, com as demais condições mantidas constante. Na barra de cores, o vermelho intenso corresponde à maior intensidade de sinal, 1 V.

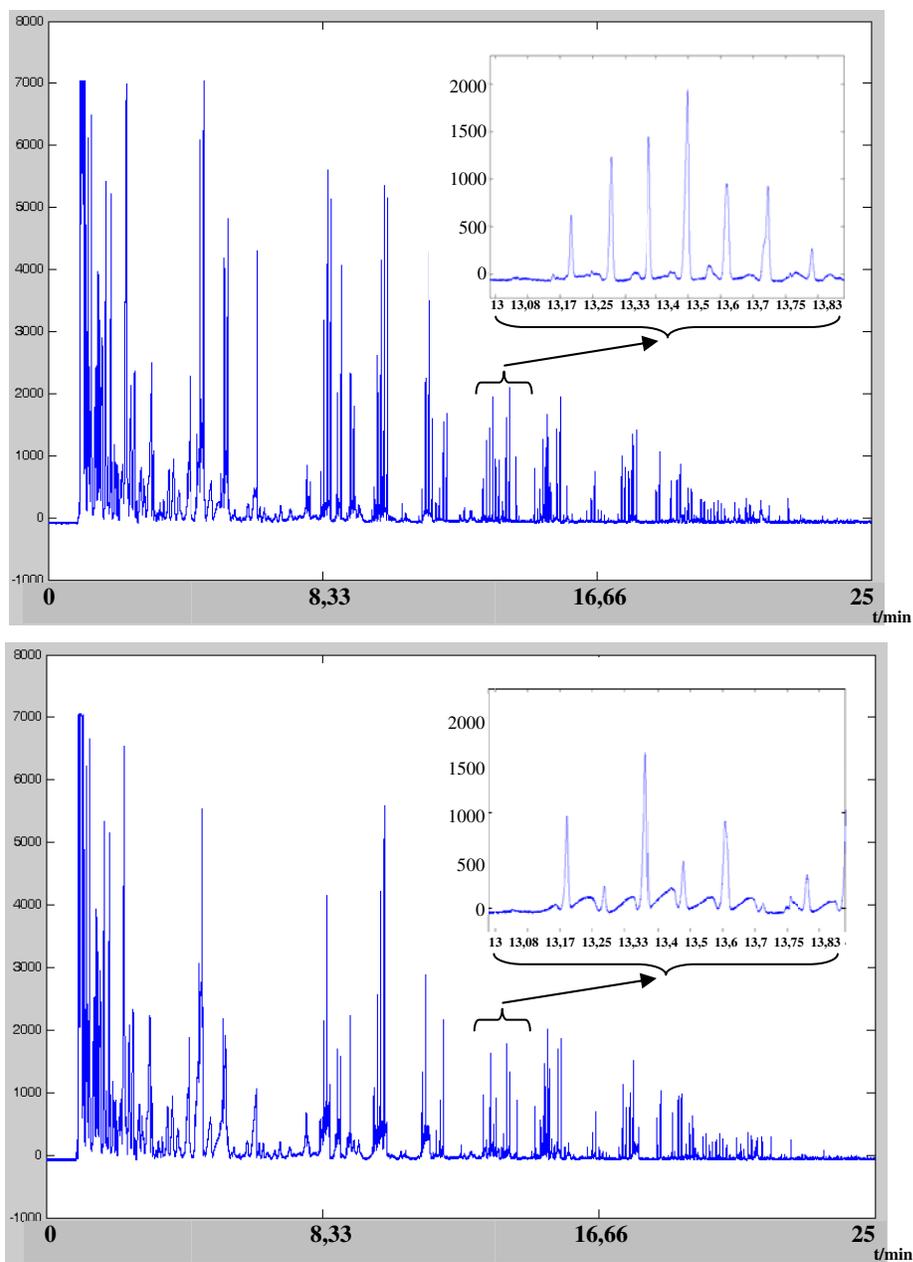


Figura 29. Duplicata dos cromatogramas que deram origem aos diagramas de contorno da Figura 28. Acima, o correspondente ao cromatograma a) e abaixo, o correspondente ao cromatograma b) da Figura 28. A região de ampliação, no entanto, não corresponde àquelas em destaque na Figura 29.

No diagrama b) da Figura 28, nota-se que todos os compostos destacados apresentaram tempos de retenção de segunda dimensão diferentes dos compostos correspondentes no diagrama a). O composto indicado por uma seta sofreu *wrap-around* pois seu 2t_R foi superior ao tempo de modulação. No diagrama

a) este composto eluiu na segunda coluna, no mesmo ciclo de modulação que os demais compostos indicados. A retenção maior do composto em destaque no diagrama b) em relação ao correspondente no diagrama a) pode ser devida à falta de sincronia entre o início da aquisição dos dados, o tempo em que a amostra foi injetada e acionamento do cromatógrafo.

Além disso, nota-se, pela observação da barra de cores, que houve mudança nas intensidades dos picos. No início do cromatograma, a faixa vertical que se estende por todo o eixo de t_R é resultado da presença de uma grande concentração de etanol na gasolina do tipo C, sendo esta em torno de 23 % v/v. O etanol, com ponto de ebulição baixo (alta de pressão de vapor) em relação aos demais componentes da amostra, elui primeiro e, devido às condições de modulação (a temperatura dos jatos criogênicos deveria ser mais baixa), não foi devidamente modulado.

Analisando-se em mais detalhe os resultados apresentados, pode-se comparar as diferenças na modulação dos picos em cada uma das replicatas, bem como as larguras na segunda dimensão dos picos em destaque. A Figura 29 mostra os cromatogramas modulados puros (forma convencional de picos) e uma ampliação para efeito de comparação.

Comparando-se os cromatogramas da Figura 29, observa-se que a replicata a) apresenta maiores intensidades de sinal, bem como maior número de picos modulados na mesma região do cromatograma. Além disso, o formato do pico modulado (ampliação) se assemelha a uma curva gaussiana, indicando a simetria do pico original, não modulado. Os picos de maior intensidade na ampliação do cromatograma b) se repetem (exceto em intensidade) nos mesmos tempos de retenção dos picos destacados no cromatograma a). Isto indica que apenas os tempos de retenção da segunda coluna sofreram alteração, devido à baixa repetibilidade do processo de modulação. Os picos de menor intensidade aparecem como “ombros”, correspondendo na verdade a uma parte daqueles mais intensos, que passou pelo modulador sem sofrer aprisionamento. Isto ocorre quando a temperatura do jato criogênico na etapa de aprisionamento não é suficientemente baixa para reter a fração eluída da primeira coluna. Desta

maneira, essa parte do pico eluiu normalmente, aparecendo como um pico largo e de baixa intensidade, apesar de a etapa de focagem da modulação ter ocorrido normalmente (notado pela presença dos picos estreitos e intensos). O composto estava entre os mais pesados da amostra, uma vez que eluiu na segunda metade da corrida cromatográfica. Compostos mais leves requerem temperaturas mais baixas para serem aprisionados ou focados durante a modulação. Mesmo assim, a forma e o número de picos no cromatograma b) induz à concluir-se que, no caso do pico em questão a temperatura do jato na etapa de aprisionamento e/ou focagem não estava suficientemente baixa. Perfis como este ocorreram com frequência devido a falhas no processo de modulação.

Nos experimentos que utilizaram o modulador em peça única e $\text{CO}_2(\text{l})$ como fluido criogênico, os jatos muitas vezes eram visivelmente “intermitentes” ou “pulsados”. O efeito foi mais nítido quando utilizados, com o objetivo de estreitar a banda de focagem, orifícios de saída com diâmetros reduzidos. Os diâmetros foram aumentados, sem, no entanto, surtir o efeito esperado. A inconstância dos jatos proporcionava uma condição não reprodutível de temperatura nos pontos da coluna atingidos pelos mesmos e conseqüentemente replicatas diferentes de cromatogramas obtidos sob as mesmas condições cromatográficas.

Além da baixa repetibilidade, que persistiu mesmo após a mudança no desenho do modulador, outra limitação apresentada pelo sistema desenvolvido foi a modulação adequada apenas de compostos com massas molares relativamente altos. Analitos como álcool etílico, butano e pentano, não foram modulados, uma vez que para aprisionar tais compostos é necessária uma temperatura mais baixa que a atingida no processo de modulação usando $\text{CO}_2(\text{l})$ como fluido criogênico.

Apesar de novamente não se ter obtido o sucesso esperado quanto à repetibilidade dos resultados e às separações em si, o sistema pôde ser utilizado para dar continuidade ao estudo da influência de mudanças nas condições de modulação na separação.

5.2.2 Mudança no sistema de resfriamento da segunda versão

Com o objetivo de modular um maior número de compostos, incluindo ao conjunto de substâncias moduladas compostos com baixos pontos de ebulição, como hidrocarbonetos com 2 a 5 átomos de carbono, passou-se a utilizar um gás resfriado por $N_2(l)$ para realizar a modulação. Além da maior abrangência de compostos, a mudança no sistema de resfriamento do modulador teve por objetivo contornar o problema de pulsação dos jatos, observado na utilização do $CO_2(l)$.

Para avaliar a melhor relação custo/benefício do gás a ser utilizado no sistema de resfriamento, foram realizados ensaios com os gases He e N_2 na alimentação do sistema modulador, para os quais foi montado o sistema mostrado na Figura 22 e Figura 24. Empregando a mesma pressão, o gás He mostrou-se mais promissor uma vez que interrompido o fluxo do gás (por meio do desligamento da válvula solenóide), devido a sua menor compressibilidade, o fluxo na saída do modulador foi imediatamente interrompido. Quando ligadas as válvulas, a saída de He foi praticamente imediata. No caso do gás N_2 , a sua alta viscosidade causou um *delay* (atraso na resposta), ou seja, mesmo após a interrupção da passagem do gás, este continuou a se desprender da saída da tubulação, enquanto o início de sua saída foi lenta após a abertura das válvulas. Entretanto, após otimização da vazão de gás, os resultados com N_2 se mostraram satisfatórios e este foi o gás escolhido para uso no sistema, principalmente em função do menor custo quando comparado ao He. A literatura reporta a utilização com sucesso de $N_2(g)$ em moduladores para GC×GC¹¹⁵.

As condições de operação e de aquisição de dados continuaram basicamente as mesmas que as anteriores, exceto quanto à potência do soprador térmico e à vazão do fluido crioscópico. Como anteriormente, ambos os valores foram ajustados até que fosse observado o fracionamento adequado da maior parte dos picos eluídos da primeira coluna.

5.2.3 Separações GC×GC empregando a segunda versão do modulador alimentada por N₂(g) resfriado por N₂(l)

5.2.3.1 Medida da vazão ótima do gás de arraste

Um estudo de Beens⁴⁰ e colaboradores apontou que é melhor operar a primeira dimensão em condições ótimas do que a segunda. Neste caso ambas colunas estariam próximas do seu ótimo. A otimização da vazão do gás de arraste foi feita por meio da construção de uma curva de Van Deemter para a primeira coluna, mostrada na Figura 30.

A vazão ótima encontrada foi de 0,23 mL·min⁻¹, determinada pelo mínimo da curva. Colunas de segunda dimensão de d.i. 0,05 e 0,10 mm (como a utilizada até agora no presente trabalho) resultam em valores de vazão e velocidades lineares ótimas baixos para a primeira coluna, como o encontrado.

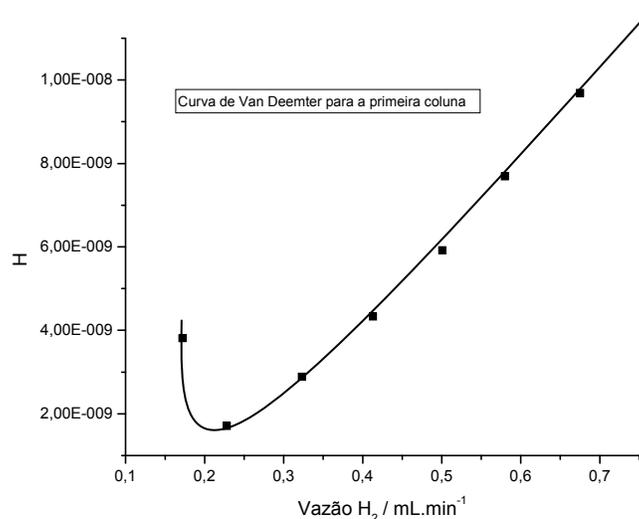


Figura 30. Curva de Van Deemter para a primeira coluna, HP-1 (25 m × 0,32 mm × 0,25 μm) 1D. Gás de arraste: H₂. Composto usado: Metanol.

5.2.3.2 Avaliação do consumo do sistema de resfriamento

A otimização da vazão dos fluidos empregados nos processos de aprisionamento e focagem é muito importante para que se possa obter o máximo de eficiência com o mínimo de consumo durante a modulação, reduzindo assim o custo de operação do sistema. Com o objetivo de conhecer-se o valor da vazão de N₂(g) que permitisse tal efeito, foram realizados experimentos nos quais a vazão

de nitrogênio foi variada. Neste estudo utilizou-se o nonano, um dos constituintes da gasolina, amostra utilizada na maior parte das separações GC×GC deste trabalho.

Nos resultados mostrados na Figura 31, nota-se que o pico modulado com a pressão de $N_2(g)$ ajustada em 45 psi, foi o que apresentou o perfil mais semelhante ao que se deseja em uma separação GC×GC, ou seja, o pico original fracionado em pelo menos outros quatro de intensidade bem superior. Em todos os demais valores de pressão testados, ocorreu uma modulação parcial, na qual é possível observar nos picos, o perfil do pico original (não modulado). No entanto, devido à grande variedade de compostos presentes na gasolina e, portanto, uma grande variedade de massas molares, assim como ocorre em boa parte das amostras submetidas a separações GC×GC não é possível ajustar um valor de pressão de fluido criogênico ótimo que possa realizar a modulação “ideal” abrangendo toda a gama de compostos da amostra.

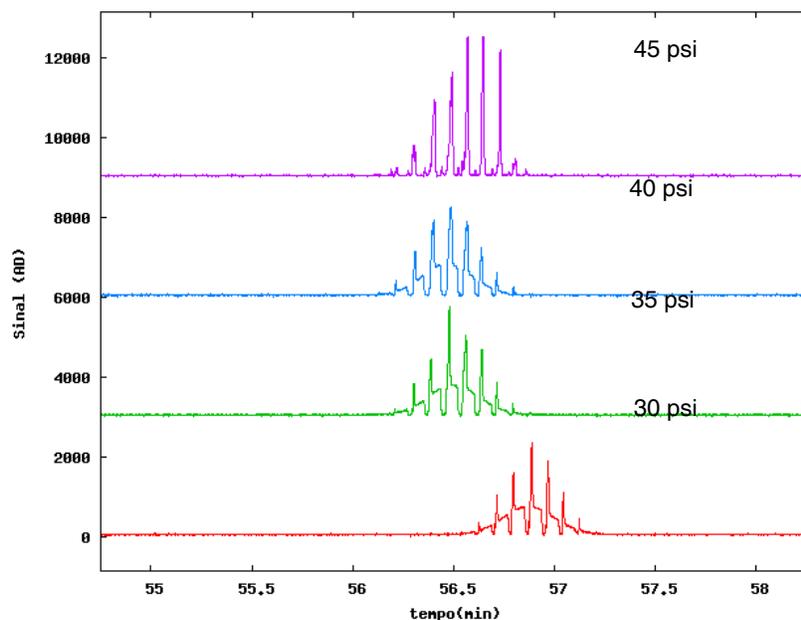


Figura 31. Variação do perfil do pico cromatográfico de C9 modulado pelo sistema GC×GC, em função da pressão de $N_2(g)$.

Por este motivo um valor médio deve ser escolhido de maneira que se possa modular o maior número possível de compostos, ou alternativamente, uma

pressão ideal para compostos alvo presentes na amostra a ser analisada. Utilizou-se a pressão de 40 psi para as separações realizadas após este estudo.

Tabela 3 – Consumo de sistemas de resfriamento para GC×GC que empregam $N_2(l)$.

	Consumo / $L N_2(l) \cdot h^{-1}$
Sistema aqui apresentado	1,2
Harynuk [115]	2
Pursh [114]	5*
Zoex Corp.(KT 2001)	16**

* considerando-se 6 a 8 horas de trabalho por dia.

** consumo para 6 horas de trabalho por dia (os dados disponíveis para os sistemas de Pursh e da Zoex são fornecidos nas respectivas referências em litros por dia de trabalho; foi feita uma estimativa do consumo por hora).

O emprego do modulador com resfriamento de $N_2(g)$ por $N_2(l)$ resultou em grande economia de operação além de conferir ao sistema um melhor desempenho quanto à repetibilidade.

O consumo de $N_2(l)$ foi estimado em torno de $1,2 L \cdot h^{-1}$, quando utilizada a pressão de 40 psi de $N_2(g)$, o que equivale a uma vazão de aproximadamente $1 L \cdot min^{-1}$ do gás. Um cilindro de gás de $9 m^3$ teria portanto, autonomia de 37,5 h.

Este resultado é excelente, quando feita uma comparação direta com sistemas descritos na literatura que empregaram um mecanismo semelhante de resfriamento, utilizando $N_2(l)$. A Tabela 3 mostra a comparação do consumo de $N_2(l)$ do sistema desenvolvido neste projeto, com outros disponíveis na literatura. No estudo descrito por Harynuk (Tabela 3) foi utilizado um sistema de resfriamento que opera a 50 psi de $N_2(g)$ e consome $2 L \cdot h^{-1}$ de $N_2(l)$.

O modelo construído por Pursh tem um consumo de 30 a 40 L de $N_2(l)$ por dia de trabalho, enquanto o comercializado pela Zoex Corporation (KT 2001) consome cerca de 100 L por dia de experimentos. O custo de operação do sistema apresentado mostra-se, portanto, significativamente mais baixo que outros semelhantes.

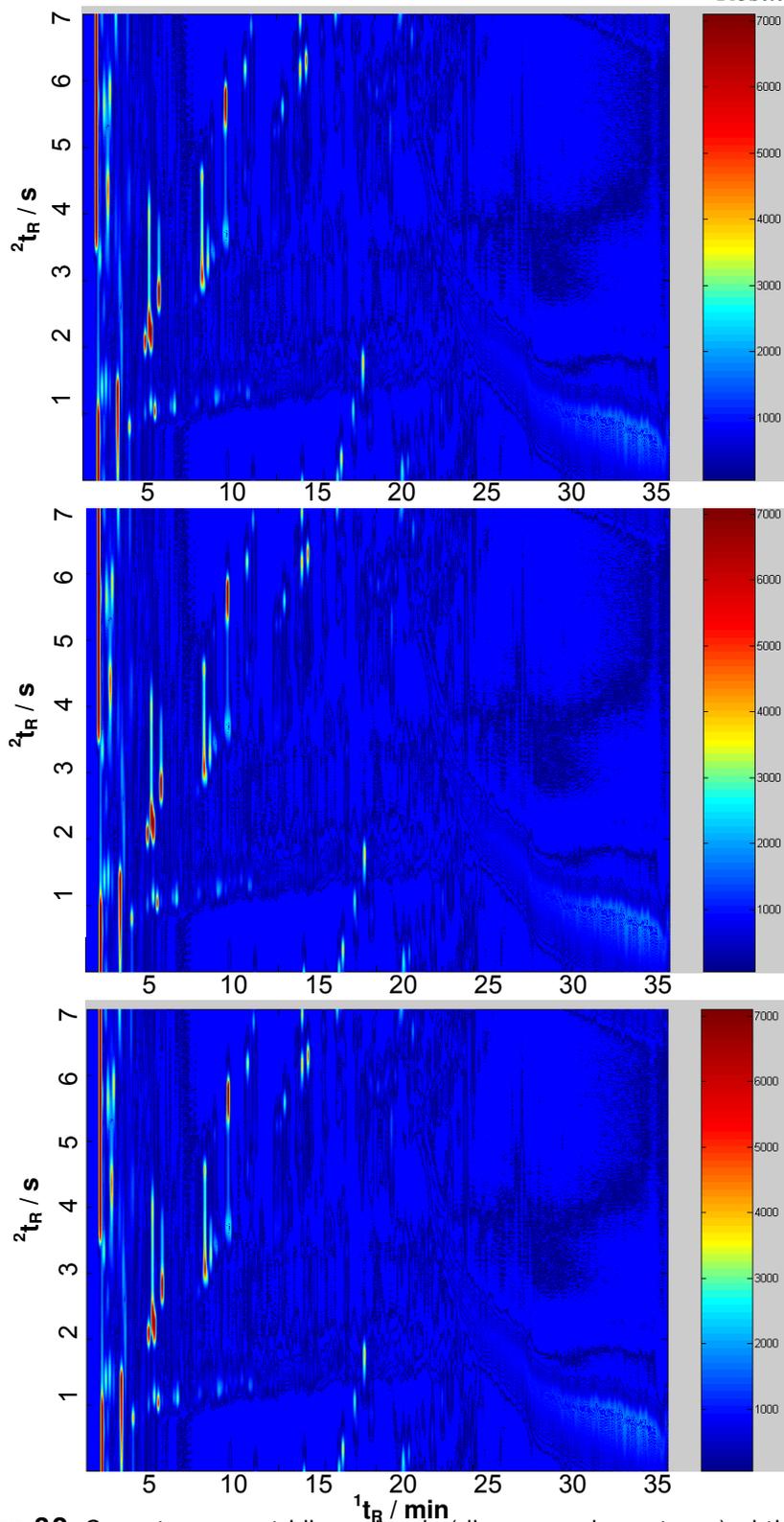


Figura 32. Cromatogramas tridimensionais (diagramas de contorno) obtidos em triplicata na separação de amostra de gasolina Tipo C. A programação de temperatura utilizada foi: 35°C (2 min); $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1} \rightarrow 65^{\circ}\text{C}$. $6^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1} \rightarrow 173^{\circ}\text{C}$. A injeção foi feita com microsseringa de vidro. Volume injetado: $0,1 \mu\text{L}$. Split 1:200. Vazão H_2 (arraste): $0,86 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. $V_1 = 5 \text{ s}$; $V_2 = 2 \text{ s}$.

5.2.3.3 Estudos de repetibilidade

Para avaliar-se o efeito da mudança do fluido criogênico no desempenho do sistema modulador, foi realizada uma série de corridas cromatográficas em replicata. A Figura 32 mostra as triplicatas de diagramas de contorno obtidas após separações de uma amostra de gasolina tipo C, por GC×GC-FID empregando a segunda versão de modulador e sistema de resfriamento modificado.

Neste estudo obteve-se um resultado muito importante e evidente pela observação dos cromatogramas apresentados na Figura 32: o aumento da robustez do sistema, refletido na boa repetibilidade demonstrada pelos cromatogramas obtidos. O pico indicado na Figura apresentou um coeficiente de variação igual a 5,4%, relativo aos volumes dos picos.

Apesar de não se ter conseguido sempre a repetição de replicatas com a mesma precisão obtida nos resultados mostrados na Figura 32, a mudança do fluido criogênico mostrou-se favorável ao aumento da confiabilidade no sistema quanto à repetição de resultados.

5.2.3.4 Variação do tempo de modulação

A Figura 33 mostra que, para diferentes tempos de modulação escolhidos, obtêm-se diferentes números de fracionamentos do pico cromatográfico original. Menores tempos de modulação resultam em maior número de fracionamentos e tempos maiores, em um número pequeno de fracionamentos do pico cromatográfico de primeira dimensão. Este resultado, se previsível neste aspecto, mostrou também que para tempos de modulação superiores a cinco segundos, não é mais observado em todos os compostos o número mínimo de quatro fracionamentos por pico, em hidrocarbonetos com mais de 10 átomos de C.

Isto pode ser observado para o caso do C11. Por este motivo, foram utilizados tempos de modulação de no máximo 5 s nas separações de amostras contendo hidrocarbonetos de alta massa molar, realizadas com esta versão de modulador e sistema de resfriamento.

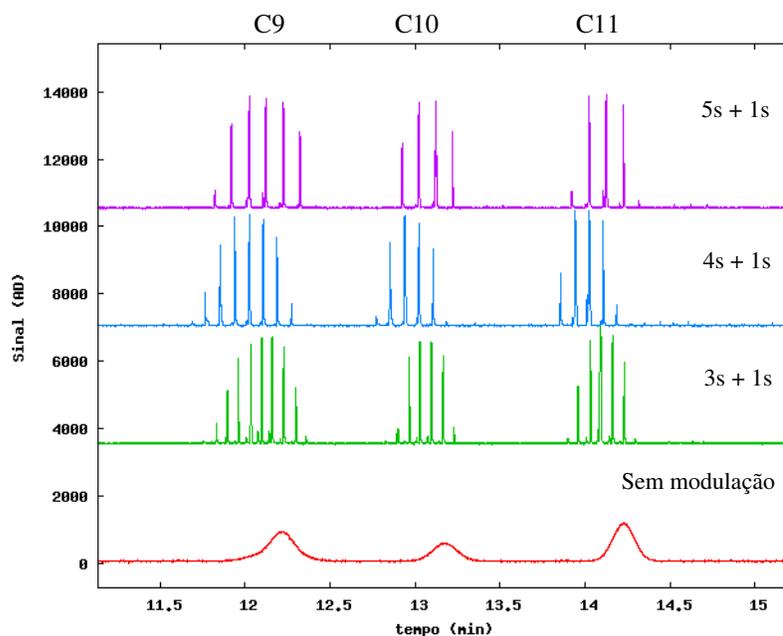


Figura 33. Variação do perfil do pico cromatográfico de C9, C10 e C11 em função do tempo de modulação. Os tempos de modulação são a soma dos tempos de aprisionamento (3 a 5 s) e focagem (1 s).

5.2.3.5 Temperatura do ar do soprador térmico

A temperatura do ar fornecido pelo soprador térmico era um parâmetro importante nesse sistema, pois interferia na eluição da amostra na parte da segunda coluna localizada dentro do compartimento modulador.

Para avaliar a influência da temperatura do ar expelido pelo soprador térmico no perfil cromatográfico dos alcanos, foram realizadas separações GC×GC variando-se a temperatura do soprador durante os experimentos.

A Figura 34 apresenta os diagramas de contorno obtidos da separação cromatográfica da série C8-C20, variando-se a temperatura do ar do soprador.

É visível a correlação entre o aumento da temperatura do ar no compartimento de modulação e a diminuição no tempo de retenção da segunda coluna. Esta diminuição é observada no diagrama de contorno 2, no intervalo de tempo correspondente àquele em que a temperatura permaneceu fixa em 210°C no diagrama 1.

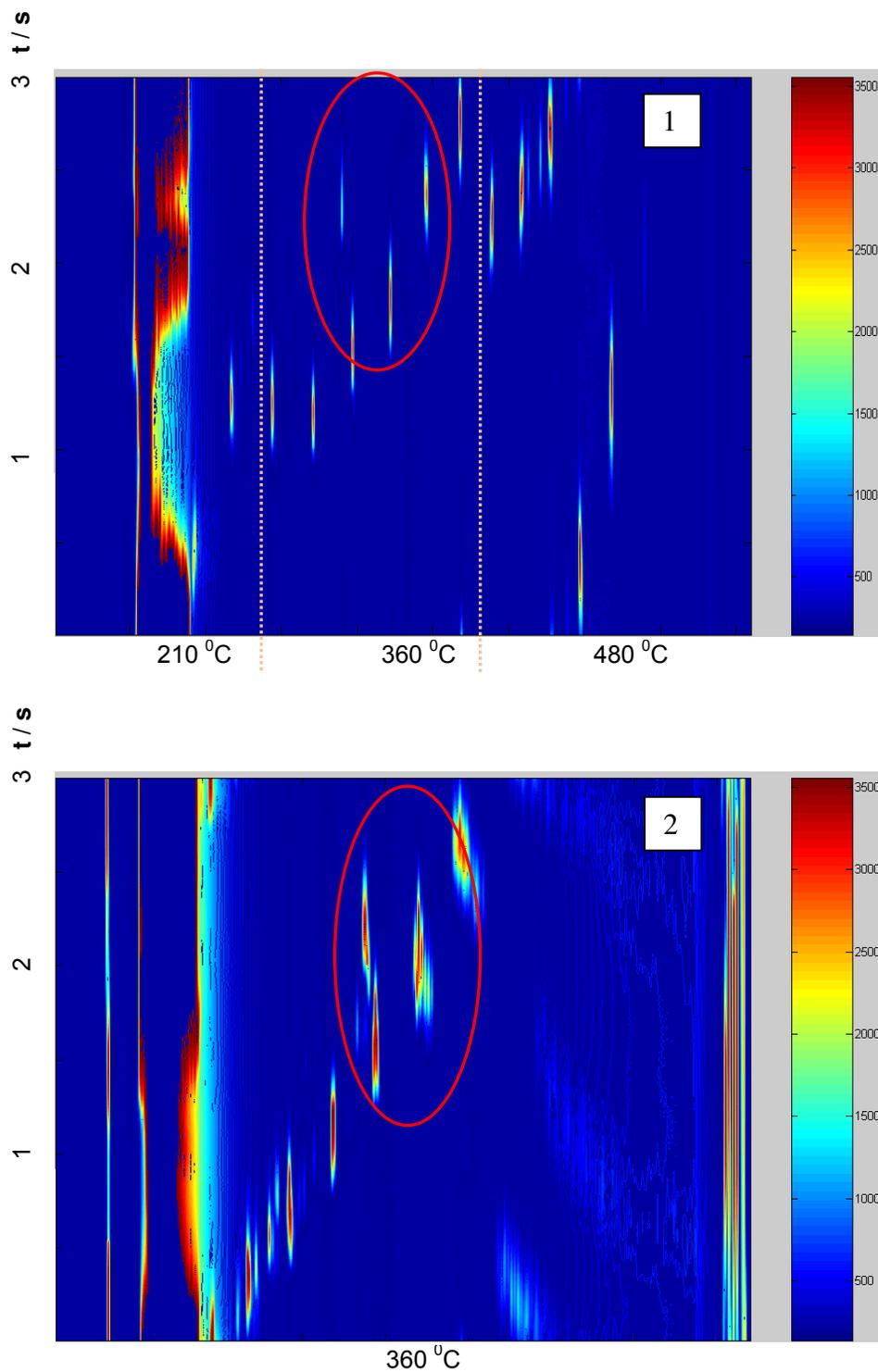


Figura 34. Variação do perfil do pico cromatográfico de C8 – C20 em função da temperatura aproximada do ar do soprador térmico. No diagrama de contorno 1, a temperatura foi variada de 210°C a 480°C (os tempos em que as mudanças ocorrerem encontram-se marcados pelas linhas verticais pontilhadas), enquanto no diagrama 2 a temperatura foi mantida constante em 360°C.

No cromatograma 2 a temperatura foi mantida em 360⁰C durante toda a corrida. No cromatograma 1, na área correspondente ao intervalo de tempo em que se manteve a temperatura neste valor, destacada na Figura, nota-se que o tempo de retenção dos compostos na segunda dimensão é semelhante. Fora desta faixa, onde a temperatura ficou fixa em 210⁰C ou 480⁰C, os tempos de retenção na segunda dimensão são bem diferentes, mostrando que o controle de temperatura dentro do compartimento modulador neste sistema era um fator muito importante a ser controlado para obter-se bons resultados.

Não foi possível determinar com precisão se a temperatura dentro do compartimento e, portanto, do segmento de coluna onde ocorria a modulação, era a mesma do próprio ar quente expelido pelo soprador térmico e qual a magnitude da troca de calor entre o compartimento de modulação e o ar ambiente.

Outra limitação apresentada por este sistema de aquecimento foi a imprecisão do controle de temperatura do equipamento utilizado, mais indicado para aplicação em eletroeletrônica, embalagens, plásticos, pintura automotiva, entre outras.

5.2.3.6 Comprimento da segunda coluna

Uma das maneiras de diminuir o tempo de retenção dos componentes de uma amostra na segunda coluna é reduzindo-se o comprimento desta. Iniciando com 1,58 m de comprimento na segunda dimensão, separações GC×GC da série de alcanos C6 – C20, cujos diagramas de contorno resultantes encontram-se na Figura 35, foram feitas diminuindo-se em 15 cm este comprimento entre a primeira e a segunda corridas e em 20 cm entre as demais, até 80 cm. Examinando-se os tempos de retenção na segunda dimensão para o alcano C12, destacado em todos os diagramas de contorno, nota-se a diminuição nos t_R^2 à medida que o comprimento da coluna diminui. Relativamente aos demais compostos, t_R^2 para C12 diminui da Figura 36a até 36d. Na Figura 35e. C12 aparece com t_R^2 aparentemente maior que os demais compostos. Uma vez que a segunda coluna é polar, os hidrocarbonetos deveriam ter o mesmo tempo de retenção nesta coluna (na qual a separação é isotérmica, pois acontece em apenas 3 s e a

contribuição do fator ponto de ebulição praticamente não existe). A inclinação da diagonal na qual se encontram os compostos, no entanto, faz com que alguns deles apresentem t_R bem diferente dos demais. Devido à grande inclinação da diagonal, nem todos os compostos puderam ser acomodados no cromatograma sem que houvesse uma descontinuidade. Na Figura 36e. quando foi usado o comprimento de 0,80m na segunda dimensão, isto é refletido com o t_R para o C12 aparentemente bem maior que o t_R dos demais hidrocarbonetos.

Observando-se os diagramas de contorno da Figura 35 claramente percebe-se que o tempo de retenção na segunda dimensão diminui com a diminuição do comprimento da segunda coluna. Nota-se também, que os compostos mais pesados, C14 – C20, só aparecem no diagrama de contorno c. em diante, quando a temperatura do soprador foi aumentada para 480°C. Nas Figura 35 a. e b., a temperatura utilizada não foi suficiente para que os hidrocarbonetos mais pesados eluíssem do compartimento modulador até o detector do cromatógrafo. Havia, portanto, uma diferença de temperatura entre o forno do cromatógrafo e o compartimento modulador que causava a limitação da aplicação do sistema modulador em separações de analitos com massas molares equivalentes ou maiores que as de C14, para comprimentos de segunda coluna acima de 1,23 m.

5.2.3.7 Programação de temperatura do forno

A Figura 36 apresenta o resultado de duas corridas cromatográficas GC×GC nas quais duas condições diferentes foram utilizadas. No cromatograma B a elevação de temperatura foi mais rápida, como mostra a programação utilizada. O resultado foi a eluição de uma das manchas em B no período modulação anterior ao que o mesmo composto eluiu no cromatograma A. O que ocorreu com este pico, denominado *wrap-around*, pode interferir na identificação de grupos químicos.

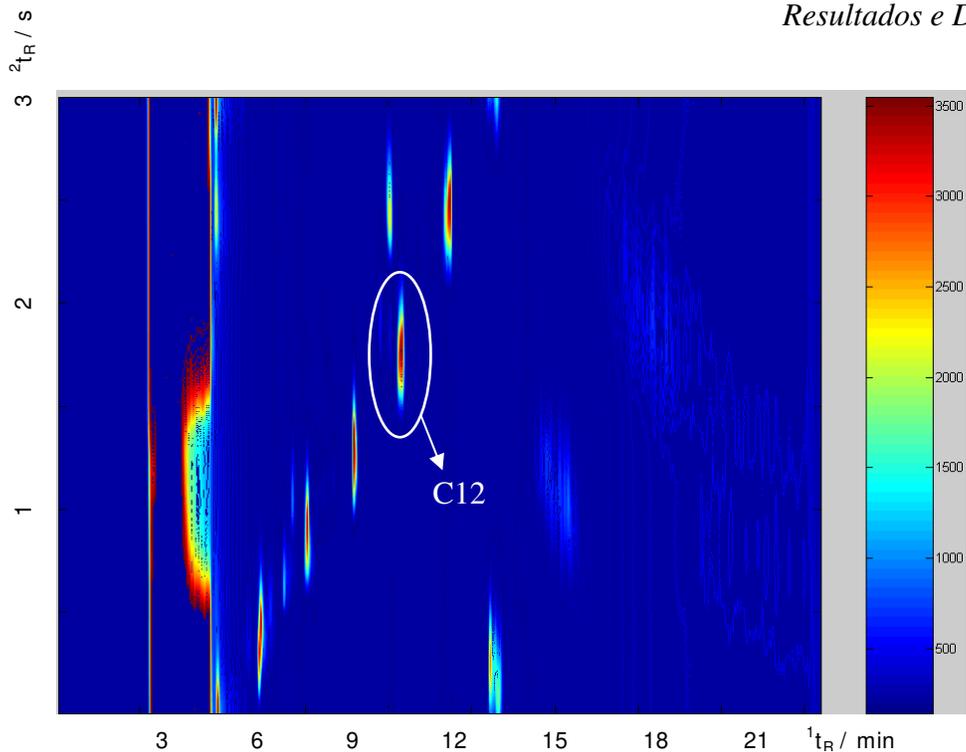


Figura 35 a. Segunda coluna com 1,58 m; temperatura do ar do soprador ajustada em 360°C durante todo o tempo de corrida e os compostos mais pesados não apareceram no diagrama. t_R de C12: 1,75 s.

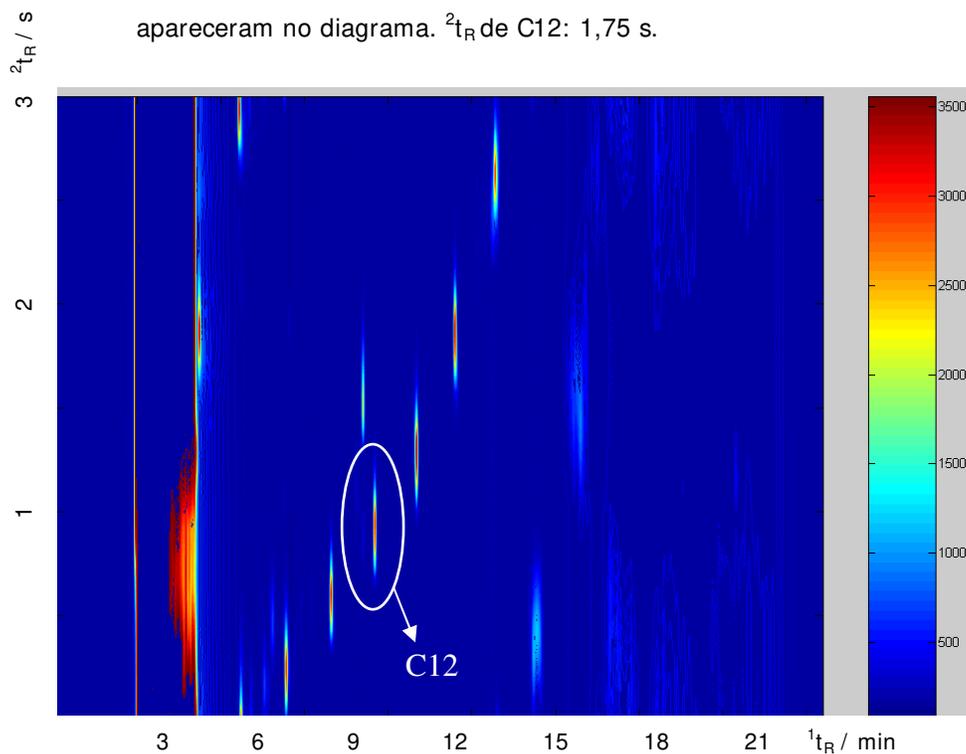


Figura 35 b. Segunda coluna com 1,43 m; temperatura do ar do soprador ajustada em 360°C durante todo o tempo de corrida. t_R de C12: 0,90 s.

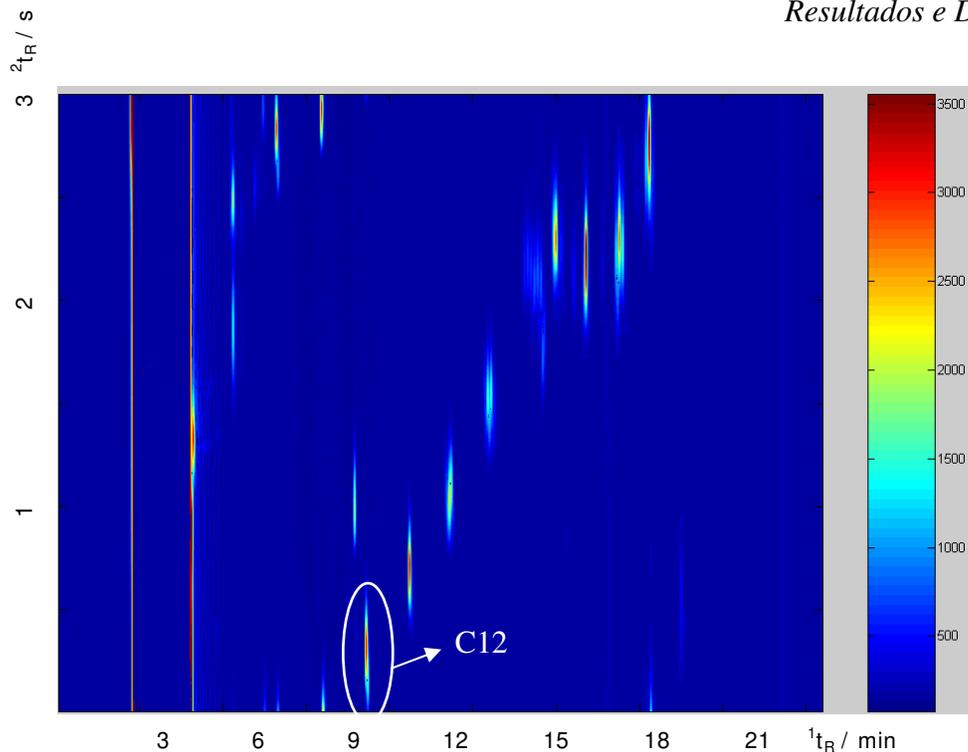


Figura 35 c. Segunda coluna com 1,23 m; temperatura do ar do soprador ajustada em 360°C até os 15 min; após: 480°C até o final da corrida. 2t_R de C12: 0,30 s.

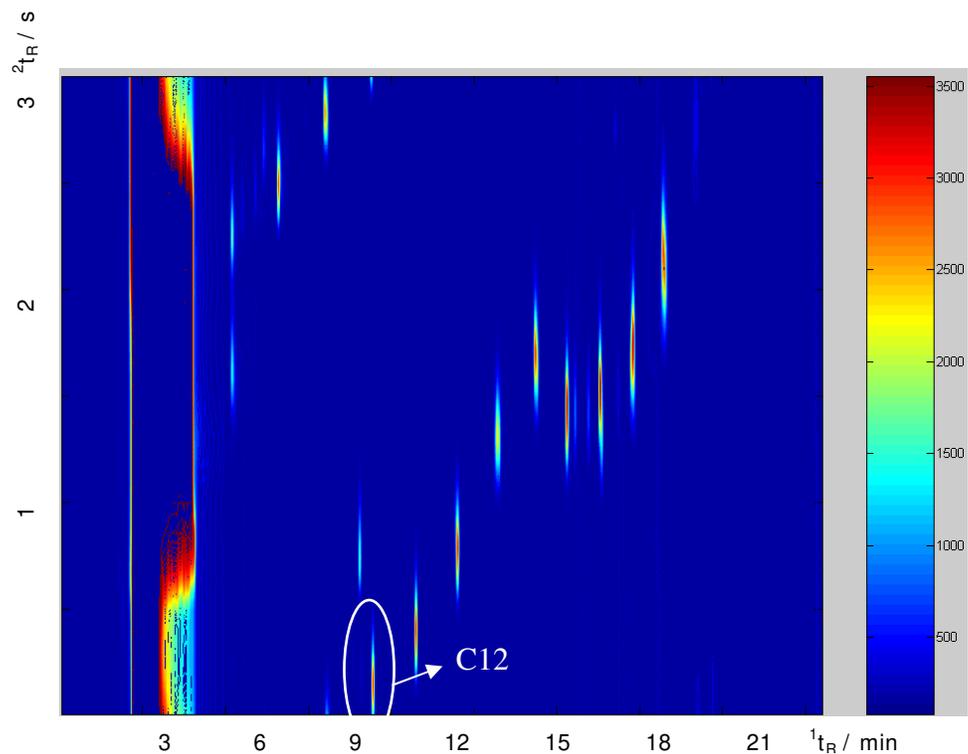


Figura 35 d. Segunda coluna com 1,00 m; temperatura do ar do soprador ajustada em 360°C até os 15 min; após: 480°C até o final da corrida. 2t_R de C12: 0,15 s.

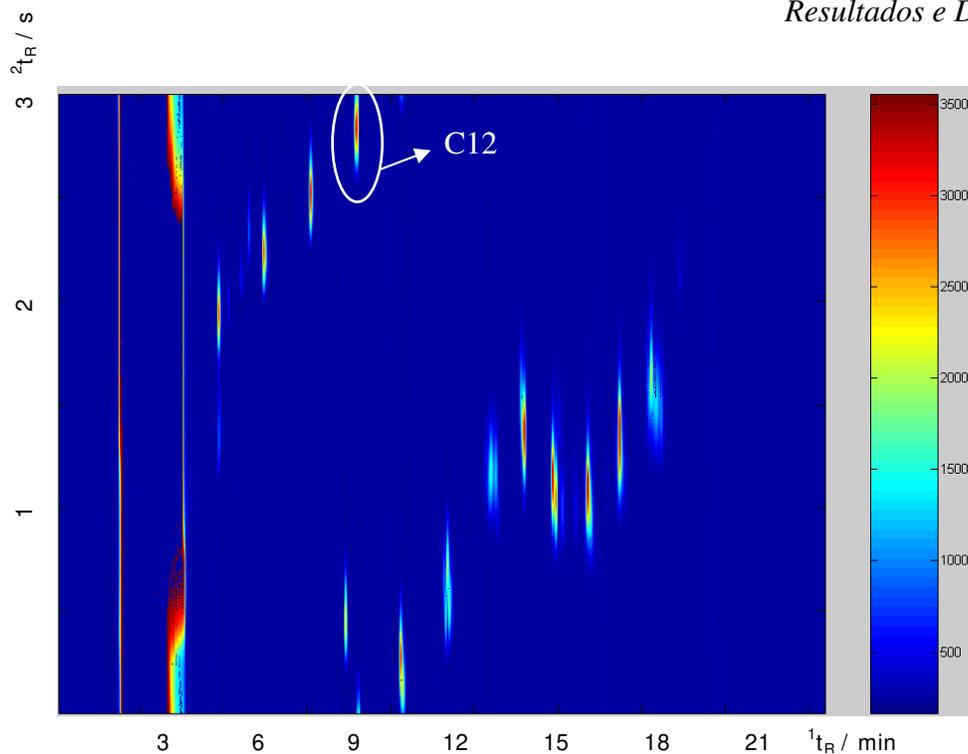


Figura 35 e. Segunda coluna com 0,80 m; temperatura do ar do soprador ajustada em 360°C até os 15 min; após: 480°C até o final da corrida. 2t_R de C12: 2,80 s.

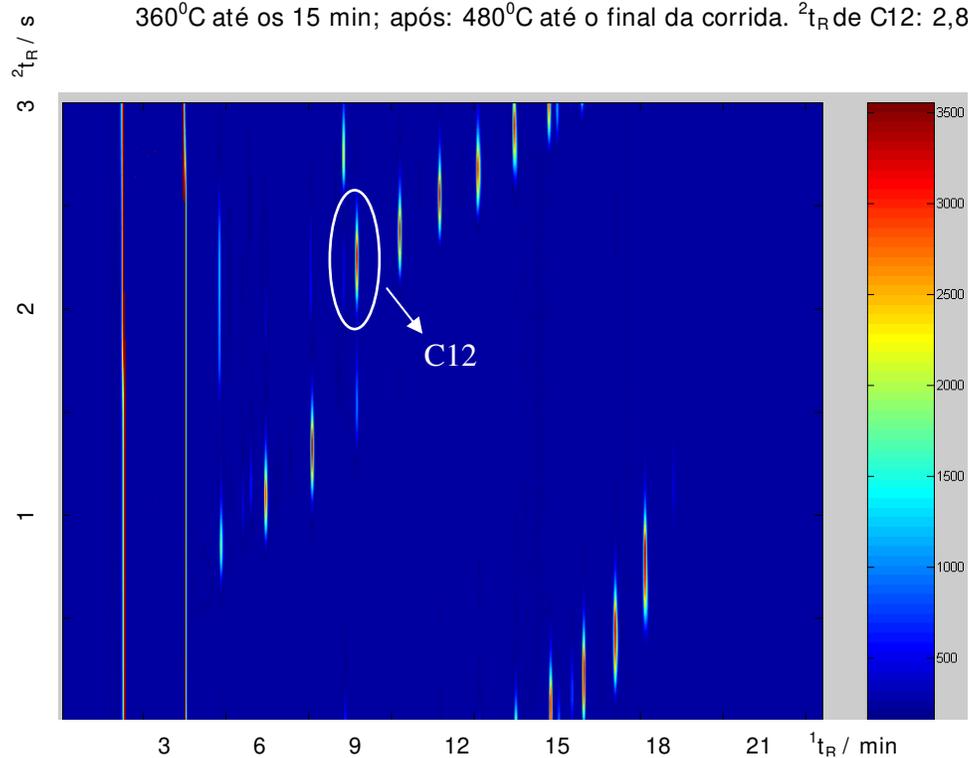


Figura 35 f. Segunda coluna com 0,80 m, mas com temperatura do ar do soprador ajustada em 480°C durante toda a corrida. 2t_R de C12: 2,20 s.

Figura 35. Diagramas de contorno resultantes do estudo de variação do comprimento da segunda coluna. HP-5 (30m × 0,25mm × 0,25 μ m) + CWax (1m × 0,1m × 0,1m). Tempo de Modulação: 3 s; split 1:100; Programação de Temperatura: 40 - 250 °C @12°C/min. Volume injetado: 0,5 μ L. Vazão: 0,6 mL·min⁻¹.

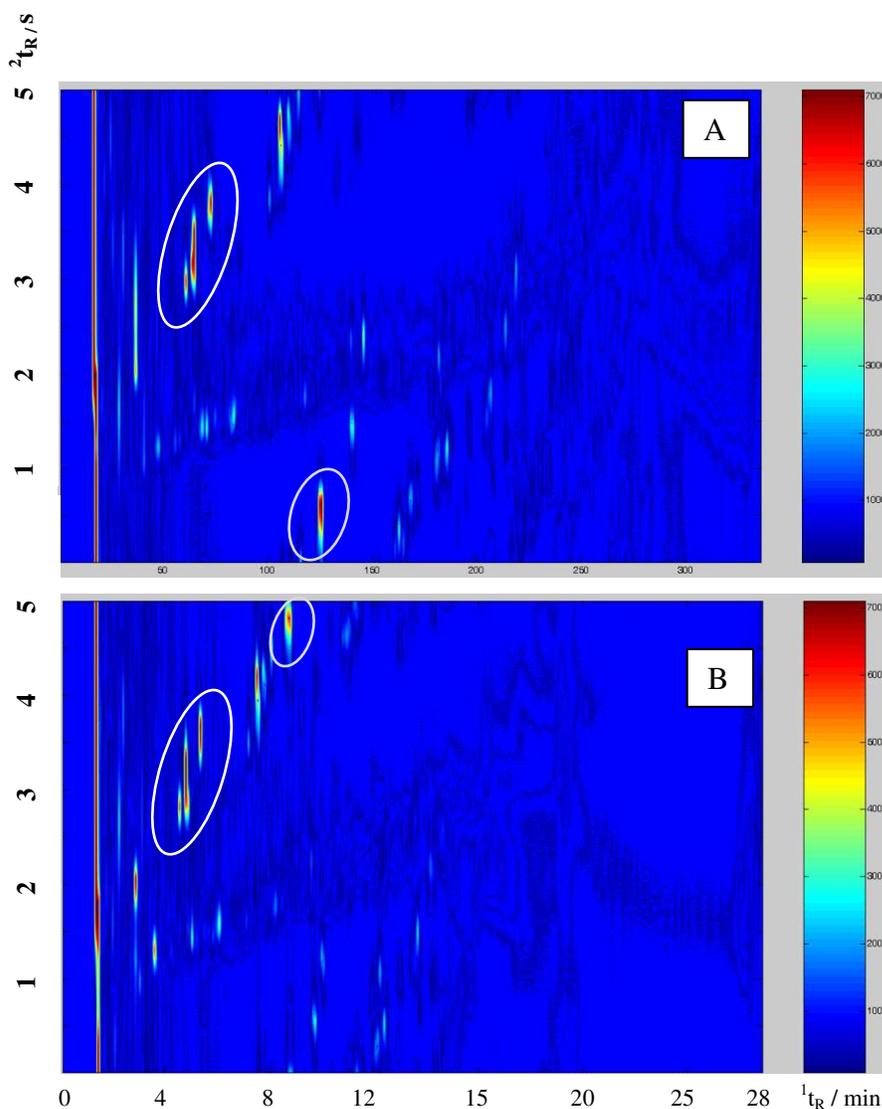


Figura 36. Cromatogramas tridimensionais resultantes da separação de Gasolina Tipo C. Programação de temperatura utilizada (A): 35°C (2 min); 2°C·min⁻¹ → 65°C; 6°C·min⁻¹ → 130°C; (B): 35°C; 3°C·min⁻¹ → 70°C; 5°C·min⁻¹ → 150°C; Tempo de modulação: 5 s (4 s + 1 s).

Se o *wrap-around* resultar numa mancha localizada em região próxima a outro grupo de compostos no diagrama de contorno, o composto pode ser associado a este outro grupo. Por isso é de grande importância a otimização de condições, como escolha da fase estacionária, comprimento da segunda coluna, vazão do gás de arraste, programação de temperatura e período de modulação.

O deslocamento da mancha em questão para outra região do diagrama de contorno ocorreu devido à mudança na programação de temperatura. Durante a

corrida cromatográfica que resultou no diagrama de contorno da Figura 36 B, o aumento mais rápido da temperatura do forno resultou na mudança do tempo de retenção na segunda coluna de todos os compostos da amostra, como aqueles destacados na Figura. A diminuição dos tempos de retenção com o aumento da temperatura causou a eluição do composto destacado na parte inferior do diagrama de contorno A, em um período de modulação anterior. Desta maneira este composto eluiu em B juntamente com a diagonal que contém os demais compostos presentes em grande concentração, pertencendo todos estes muito provavelmente à mesma classe de compostos.

5.2.3.8 Período de modulação

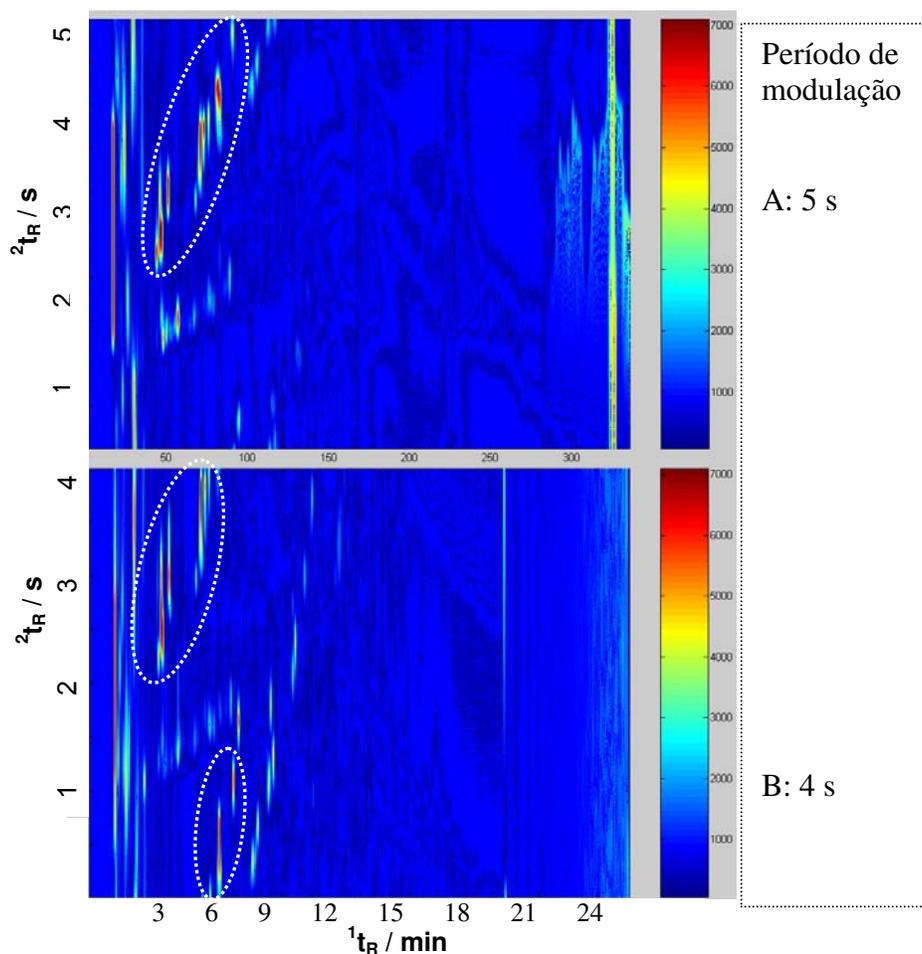


Figura 37. Diagramas de contorno resultantes de separação GC×GC de gasolina tipo C. A programação de temperatura utilizada foi: 50°C (2 min); 4°C·min⁻¹ → 130°C. 10°C·min⁻¹ → 180°C. Volume injetado: 0,1 µL. Split 1:200. Vazão H₂ (arraste): 0,6 mL·min⁻¹.

Para avaliar a influência do tempo de modulação numa separação GC×GC foram realizadas corridas cromatográficas com dois diferentes períodos de modulação, utilizando como amostra gasolina tipo C. A Figura 37 mostra o resultado.

Nota-se que uma parte da diagonal destacada no cromatograma A da Figura 37, aparece na parte inferior no cromatograma B. O período de modulação menor, 4 s, explica a eluição destes compostos no período seguinte, dividindo assim a diagonal anteriormente formada em duas. A classe de compostos constituída por esta diagonal fica então separada no diagrama de contorno, podendo dar margem a interpretação errada, de que se trata de duas classes distintas de compostos. No entanto, os compostos em destaque no cromatograma A, provavelmente são hidrocarbonetos aromáticos presentes na gasolina, uma vez que seus tempos de retenção na segunda coluna, polar, são superiores àqueles dos compostos pertencentes à diagonal inferior, da qual provavelmente fazem parte hidrocarbonetos alifáticos.

Dessa maneira observa-se que o período de modulação, assim como a programação de temperatura, é um parâmetro a ser ajustado para evitar a ocorrência de *wrap-around*.

5.2.4 Aplicações do sistema GC×GC construído

5.2.4.1 Identificação de gasolina adulterada por querosene

Para testar o potencial do sistema GC×GC desenvolvido, na identificação de adulteração de gasolina por solventes, foi realizado um experimento no qual uma amostra de gasolina tipo C foi dopada com querosene. A Figura 38 apresenta os cromatogramas obtidos. A adulteração foi simulada dopando-se uma amostra de gasolina tipo C com 30 % v/v de querosene, um dos solventes mais utilizados na adulteração da gasolina.

Pela observação dos cromatogramas é possível concluir rapidamente sobre qual é a amostra que contém querosene.

5.2.4.2 Identificação de BTEX na gasolina

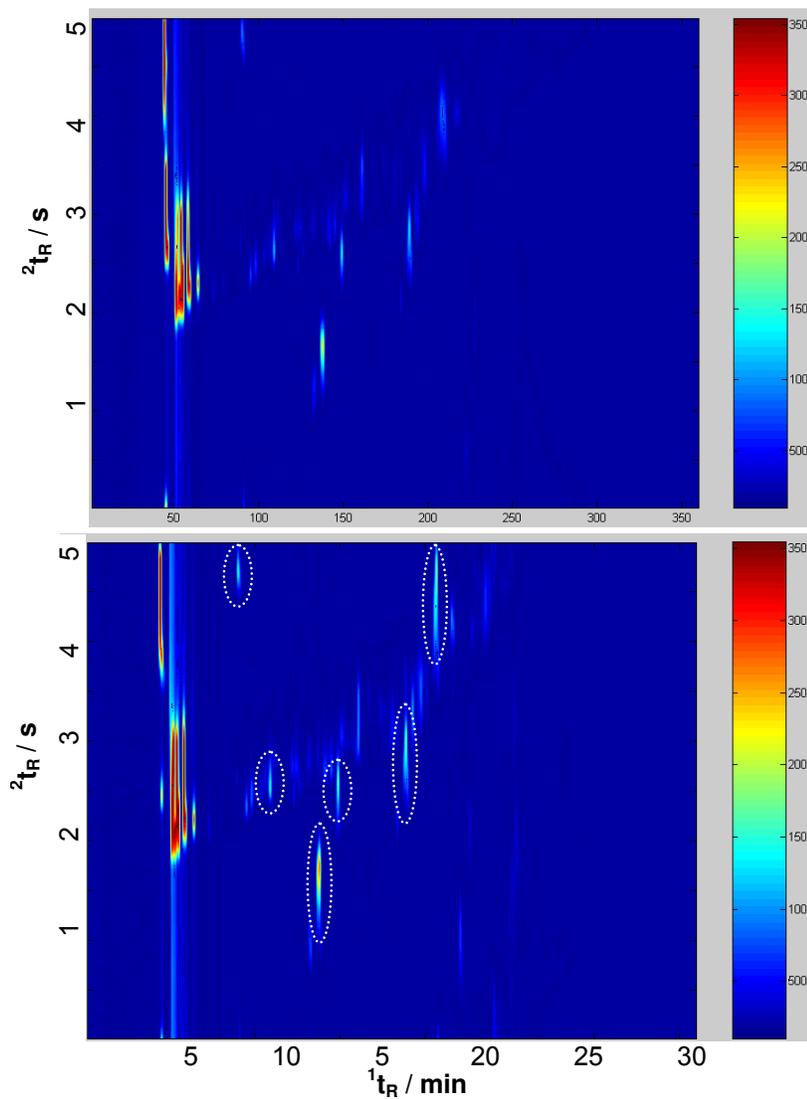


Figura 38. Diagramas de contorno obtidos na separação de amostra de gasolina Tipo C (parte superior) e a mesma amostra dopada com 30 % de querosene puro (não diluído; parte inferior). A integração os picos não foi realizada pois o *software* utilizado não encontrava-se ainda suficientemente desenvolvido. No entanto, a comparação visual das áreas dos picos, bem como das intensidades destes, pela barra de cores, auxiliam na identificação dos compostos que se apresentam em maior concentração. A programação de temperatura utilizada foi: 35^oC (2 min); 2^oC·min⁻¹ → 70^oC; 5^oC·min⁻¹ → 152^oC. Volume injetado: 0,1 μL. Split 1:180. Vazão H₂ (arraste): 0,23 mL·min⁻¹. V1= 4 s; V2 = 1 s. As elipses destacam os compostos que tiveram suas concentrações aumentadas.

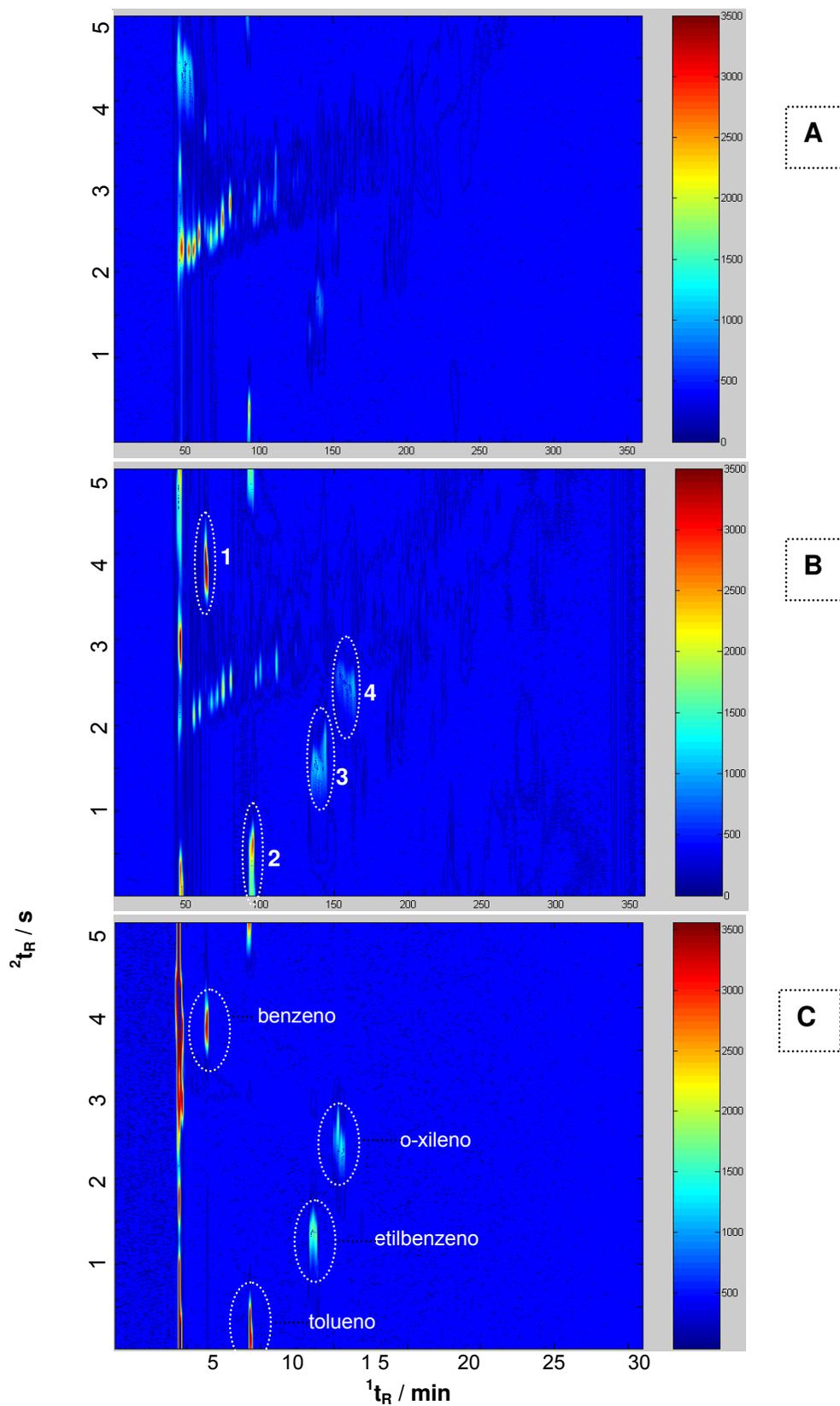


Figura 39. Cromatogramas (diagramas de contorno) obtidos em estudo simulando adulteração de gasolina por querosene. A: gasolina pura; B: gasolina com 28 % de querosene; C: BTEX (puro). 1 a 4 correspondem a benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno, respectivamente.

A replicata que se encontra na parte inferior da Figura 38 apresenta alguns compostos em maior concentração, a maioria comum entre querosene e gasolina (hidrocarbonetos alifáticos). Isto fica evidente pelas maiores intensidades apresentadas por algumas manchas. Esta é mais uma vantagem da técnica. A apresentação dos resultados da separação na forma de diagramas de contorno possibilita, com uma análise visual rápida, chegar-se a algumas conclusões a respeito da composição da amostra analisada.

Para realizar a identificação dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno presentes na gasolina, foram feitas separações GC×GC com gasolina pura e após adição desses compostos. A Figura 39 mostra os diagramas de contorno obtidos.

Nota-se que para localizar as “manchas” correspondentes aos compostos é suficiente visualizar no diagrama correspondente à gasolina que recebeu uma dopagem dos mesmos, aquelas que apresentaram aumento de intensidade quando comparadas às correspondentes no diagrama da gasolina pura.

Para identificar cada um dos quatro compostos foi realizada uma corrida cromatográfica após injeção da mistura BTEX (Figura 39 C). Comparando-se as localizações de cada composto no espaço bidimensional dos diagramas de contorno pode-se identificar cada um deles.

6 Conclusões

Pode-se considerar que o objetivo do projeto foi alcançado, uma vez que mais de uma versão de modulador para GC×GC foi desenvolvida e adaptada a um cromatógrafo comercial. Apesar de não produzirem resultados publicáveis, estas versões foram capazes de exercer o papel básico de um modulador em um sistema GC×GC e o projeto deu início a uma nova linha de pesquisa no Instituto de Química da Unicamp, estimulando o crescimento desta área no Brasil.

A primeira versão de modulador foi muito importante, pois mostrou a viabilidade do desenvolvimento de um sistema de modulação para GC×GC em nosso laboratório. O desenvolvimento instrumental, bem como a percepção dos principais fatores que determinavam os resultados foram relativamente lentos no início, no entanto, lançaram as bases de conhecimento para a continuidade da linha de pesquisa.

Na segunda versão de modulador projetada alguns problemas apresentados pela versão anterior foram minimizados, senão contornados, tais como vazamento de CO₂(l), formação de gelo no compartimento modulador, baixa repetibilidade, quebra de coluna capilar e aperfeiçoamento do sistema de resfriamento. Entretanto, limitações instrumentais restringiram o desempenho do sistema de modulação. Dentre estas estão principalmente a baixa frequência de leitura do eletrômetro do cromatógrafo utilizado e erros temporais tanto de acionamento das válvulas solenóides controladoras da modulação quanto de aquisição de dados. Para este último erro contribuiu sobretudo a falta de memória de armazenamento da placa A/D de 12 bits utilizada para controle do sistema.

Além das limitações citadas, a aposta em cabeçotes de modulação com dimensões relativamente grandes causou dificuldades quanto ao equilíbrio resfriamento/congelamento nos segmentos de coluna nos quais ocorria a modulação. Este foi um fator determinante para a dificuldade em obter-se uma boa repetibilidade dos resultados, bem como para obter melhor definição dos picos nos diagramas de contorno. Foram observados tempos elevados de reaquecimento nos pontos da coluna capilar resfriados pelos fluidos criogênicos, especialmente quando foi utilizado N₂(l). As dimensões dos cabeçotes de modulação projetados

parecem ter sido responsáveis por esse efeito, que causou dispersão lenta das bandas aprisionadas e focadas, alargando os picos e diminuindo a repetibilidade. O resfriamento destes cabeçotes exigia um tempo relativamente alto para o reaquecimento dos mesmos e conseqüentemente também dos setores de coluna capilar resfriados durante a modulação.

O posicionamento do compartimento modulador fora do forno principal trouxe vantagens quanto à simplificação da montagem e manuseio do sistema. Entretanto, tal configuração causou diferenças de temperatura entre o forno do cromatógrafo e o compartimento modulador de maneira a comprometer a separação de compostos com massa molar elevada. A repetibilidade também parece ter sido prejudicada por este desenho, devido provavelmente a trocas de calor entre o compartimento modulador e o ambiente.

A falta de *softwares* específicos para o tratamento dos dados gerados em separações GC×GC foi um grande desafio durante o trabalho. O desenvolvimento em paralelo do programa de aquisição de dados, e posteriormente de tratamento dos mesmos, ocasionou atrasos no andamento do projeto. No entanto, a disponibilidade de um pacote de *softwares* especialmente dedicados à GC×GC contornou um obstáculo que inviabilizaria a realização do projeto. Além disso, cabe ressaltar a questão do alto custo de um *software* comercial, e o fato do desenvolvimento destes programas de computador ter possibilitado a obtenção de resultados com tecnologia basicamente nacional, exceto pelo cromatógrafo utilizado.

O uso de CO₂(l) mostrou-se pouco interessante, pois houve menor repetibilidade nos experimentos em que o mesmo foi utilizado como fluido criogenico. A causa desse problema pode estar ligada à rápida queda de pressão que ocorre durante o uso do cilindro de CO₂(l) com tubo pescador. A variação da pressão de saída do CO₂ causaria uma mudança de temperatura nos segmentos de coluna resfriados pelos jatos criogênicos, num intervalo de tempo relativamente curto tanto durante quanto entre as corridas cromatográficas e de maneira não reprodutível. Outra provável fonte de falhas no processo de modulação quando

utilizado o dióxido de carbono líquido foi a não homogeneidade (ou constância) dos jatos deste fluido.

A continuidade da linha de pesquisa iniciada no Laboratório de Cromatografia Gasosa do IQ-Unicamp pelo presente projeto, é a confirmação de que o trabalho aqui apresentado esteve de certo modo, sempre “no caminho certo”. Utilizando-se os conhecimentos gerados, deu-se início, no mesmo grupo de pesquisa, a um segundo projeto de doutorado de desenvolvimento instrumental em GC×GC. Até a metade do mesmo haviam sido obtidos diagramas de contorno com larguras de pico de segunda dimensão tão baixas quanto ou menores que as reportadas na literatura, bem como índices de repetibilidade e reprodutibilidade que caracterizam o sistema como robusto. Ferramentas estatísticas de análise multivariada de dados têm sido aplicadas com sucesso. O sistema como um todo continua em pleno desenvolvimento, incluindo o *software* de controle da modulação e aquisição de dados, desenvolvidos simultaneamente com a parte instrumental. As perspectivas futuras são, portanto, as melhores possíveis.

7 Referências Bibliográficas

1. Ferreira, E. C.; Augusto, F.; Vazquez, P. A. M.; Fidelis, C. H. V.; 1^o Congresso Íbero-Americano de Química Analítica e 13^o Encontro Nacional de Química Analítica, 2005, Niterói.
2. Ferreira, E. C.; Fidelis, C. H. V.; Pedroso, M. P.; Vazquez, P. A. M.; Augusto, F.; A software package for Comprehensive Bidimensional Gas Chromatography: 1. Real Time Data Acquisition and System Control. HTC-10 Tenth International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyzers and ExTech-10 - Tenth International Symposium on Advances in Extraction Techniques, 2008, Bruges. HTC-10 EXTech-10, 2008.
3. Desty, D. H.; *Adv. Chromatogr.*, **1965**, 1, 852.
4. Matisova, E.; Domotorova, M.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 199.
5. Rangunathan, N.; Krock, K. A.; Klawun, C.; Sasaki, T. A.; Wilkins, C. L.; *J. Chromatogr. A*, **1999**, 856, 349.
6. Marriot, P. J.; Ong, R.; Shellie, R.; *Am. Lab.*, **2001** 33, 44.
7. J. Giddings, *Multidimensional Chromatography, Techniques and Applications*, Marcel Dekker Inc. 1990.
8. Smits, R.; *LC-GC Int.*, **1994**, 7(9), 505.
9. Poole, C. F.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 963.
10. Hogendoorn, E. A.; Vanzoonen, P.; *J. Chromatogr. A*, **1995**, 703, 149.
11. Issaq, H. J.; Chan, K. C.; Liu, C. S.; Li, Q. B.; *Electrophoresis*, **2001**, 22, 1133.
12. Hyotylainen, T.; Riekkola, M. L.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 357.
13. Giddings, J. C.; *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 1258A.
14. Giddings, J. C.; *HRC & CC*, **1987**, 10, 319.
15. Gorecki, T.; Harynuk, J.; Panic, O.; *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27, 359.
16. Giddings, J. C.; *J. Chromatogr. A*, **1995**, 703, 3.
17. Simmons, M. C.; Snyder, L. R.; *Anal. Chem.*, **1958**, 30, 32.
18. Deans, D. R.; *Chromatographia*, **1968**, 1, 18.

19. Bertsch, W.; *J. High Resol. Chromatogr.*, **1999**, 22, 647.
20. Seeley, J. V.; Micyus, N. J.; Bandurski, S. V.; *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 5, 1840.
21. Liu, Z.; Phillips, J. B.; *J. Chromatogr. Sci.*, **1991**, 29, 227.
22. Dallüge, J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 69.
23. Reddy, C. M.; Eglinton, T. I.; Hounshell, A.; White, H. K.; Xu, L.; Gaines, R. B.; Frysinger, G. S.; *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36, 4754.
24. Liu, Z.; Sirimanne, S. R.; Patterson, D. G.; Needham, L. L.; Phillips, J.B.; Xu, J.; *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3086.
25. Phillips, J. B.; Gaines, R. B.; Blomberg, J.; van der Wielen, F. W. M.; Dimandja, J. M.; Green, V.; Granger, J.; Patterson, D.; Racovalis, L.; de Geus, H. J.; de Boer, J.; Haglund, P.; Lipsky, J.; Sinha, V.; Ledford, E. B. A.; *J. High Resol. Chromatogr.*, **1999**, 22, 3.
26. Consden, R.; Gordon A. H.; Martín, A. J. P.; *J. Biochem.*, **1944**, 38, 244.
27. Kirchner, J. G.; Miller, J. M.; Keller, G.; *Anal. Chem.*, **1951**, 23, 420.
28. Stahl, E.; *Chem. Ztg.*, **1958**, 82, 323.
29. O' Farrell, P. H.; *J. Biol. Chem.*, **1975**, 250, 4007.
30. Issaq, H. J.; Chan, K. C.; Liu, C. S.; Li, Q. B.; *Electrophoresis*, **2001**, 22, 1133.
31. Nyireddy, S.; *lcgceurope*, special issue on Recent Applications in Multidimensional Chromatography, **dez 2003**, disponível em www.lcgceurope.com
32. Bertsch, W. J.; *HRC & GC*, **1978**, 1, 85.
33. Gordon, B. M.; Rix. C. E.; Borgerding, M. F.; *J. Chromatogr. Sci*, **1985**, 23, 51.
34. Namara, K. M.; Leardi, R.; Hoffmann, A., *lcgceurope*, disponível em www.lcgceurope.com
35. Schoenmakers, P.; Marriott P.; Beens, J.; *Coupling Matters, LCGC europe*, **2003**, 16, 6, 335. - disponível em www.lcgceurope.com acessado em 26.06.03.
36. von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J.; *Quím. Nova*, **2007**, 30, 682.

37. Haglund, P.; Harju, M.; Ong, R.; Marriott, P. J.; *J. Microcol. Sep.* **13**, **2001**, 306.
38. Korytár, P.; Leonards, P. E. G.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 958, 203.
39. Mondello, L.; Lewis, A. C.; Bartle, K. D.; *Multidimensional Chromatography*, John Wiley & Sons Ltd, e-Book.
40. Beens, J.; Janssen, H. G.; Adahchour, M.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1086, 141.
41. Phillips, J. B.; Beens, J.; *J. Chromatogr. A*, **1999**, 856, 331.
42. Marriott, P. J.; Kinghorn, R. M.; Ong, R.; Morrison, P.; Haglund, P.; Harju, M.; *J. High Resol. Chromatogr.*, **2000**, 22, 195.
43. Adahchour, M.; Taso, A.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Batenburg A. M.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, 753.
44. Harynuk, J.; Górecki, T.; de Zeeuw, J.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1071, 21.
45. Ong, R.; Marriott, P.; Morrison P.; Haglund, P.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 962, 135.
46. Marriott, P. J.; Massil, T.; Hügel, H.; *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27, 1273.
47. Kueh, A. J.; Marriott, P. J.; Wynne, P. M.; Vine, J. H.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 109, 124.
48. Banerjee, K.; Patil, S. H.; Dasgupta, S.; Oulkar, D. P.; Patil, S. B.; Savant, R.; Adsule, P. G.; *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1190, 1-2, 350.
49. Robert L. Grob e Eugene F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography, Fourth Edition*, 2004, John Wiley & Sons, Inc, New York.
50. Shellie, R.; Marriott, P. J.; Cornwell, C.; *J. Sep. Sci.*, **2004**, 24, 823.
51. Shellie, R.; Marriott, P. J.; *Anal. Chem.*, **2002**, 74, 20, 5426.
52. Zhu, S.; Lu, X.; Dong, Li.; Xing, J.; Su, X.; Kong, H.; Xu, G.; Wu, C.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 107, 114.
53. Ryan, D.; Morrison, P.; Marriott, P.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1071, 47.
54. Liu, Z.; Patterson, D. G.; *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 3840-3845.
55. Shellie, R.; Marriott, P. J.; Morrison, P.; *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 1336.

56. Beens, J.; Blomberg, J.; Schoenmakers, P. J.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **2000**, 23, 182.
57. Venkatramani, C. J.; Xu, J.; Phillips, J. B.; *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 1486.
58. Vendevre, C.; Ruiz-Guerrero, R.; Bertoncini, F.; Duval, L.; Thiébaud, D. Hennion, Marie-Claire., *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1086, 1-2, 21.
59. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; *Fundamentos de Cromatografia*. Editora da Unicamp, Campinas, **2006**.
60. Bruckner, C. A.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E.; *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 2796.
61. Seeley, J. V.; F. Kramp; C. J. Hicks; *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 4346.
62. Bueno, P. A. Jr.; J. V. Seeley; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1027, 3.
63. LaClair, R. W.; Bueno, P. A. Jr.; J.V. Seeley, *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27, 389.
64. Seeley, J. V.; Micyus, N. J.; Seeley, S. K; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1086, 171.
65. Seeley, J. V.; Micyus, N. J.; McCurry, J. D.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1086, 115.
66. Seeley, J. V.; Micyus, N. J.; McCurry, J. D.; Seeley, S. K.; *Am. Lab. News*, **2006**, 38, 24.
67. Seeley, J. V.; Micyus, N. J.; Bandurski, S. V.; Seeley, S. K.; McCurry, J. D.; *Anal. Chem.*, **2007**, In Press.
68. Primeau, J. N.; McCurry, J. D.; Seeley, J. V.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1086, 115.
69. Hamilton, J. C.; Lewis, A.C.; Bartle, K. D.; *J. Sep. Sci.*, **2003**, 26, 578.
70. Mohler, R. E.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E.; *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 555, 1, 68.
71. Wang, F. C. Y.; *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1188, 2, 274.
72. Fraga, C. G.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E.; *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 4154.
73. Sinha, A. E.; Johnson, K. J.; Prazen, B. J.; Lucas, S. V.; Fraga, C. G.; Synovec, R. E.; *J. Chromatogr. A.*, **2003**, 983 (1-2), 195.
74. Harynuk, J.; Gorecki, T.; *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27, 431.
75. Gaines, R. H.; Frysiner, G. S.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1045, 263.

76. Dallüge, J.; Beens, J.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1045, 265.
77. Frysinger, G. S.; Gaines, R. B.; *J. Sep. Sci.*, **2001**, 24, 87.
78. Kallio, M.; Hyötyläinen, T; Jussila, M.; Hartonen, K.; Palonen, S.; Shimmo, M.; Riekkola, M. L.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2003**, 375, 725.
79. Frysinger, G. S.; Gaines, R. B.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **2000**, 23, 197.
80. Kristenson, E. M.; Korytár, P.; Danielsson, C.; Kallio, M.; Brandt, M.; Mäkelä, J.; Vreuls, R. J. J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1019, 65.
81. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; U. A. Th. Brinkman; *Trac-Trends Anal. Chem.*, **2006**, 25, 6, 540.
82. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *Trac-Trends Anal. Chem.*, **2006**, 25, 5, 438.
83. Marriott, P. J.; Kinghorn, K. M.; *Anal. Sci*, **1998**, 14, 651.
84. Kinghorn, K. M.; Marriott, P. J.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1998**, 23, 620.
85. Marriott, P. J.; Kinghorn, K. M.; *Trends Anal. Chem.*, **1999**, 18, 114.
86. Kinghorn, K. M., Marriott, P.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1999**, 22, 235.
87. Marriott, P.J.; Kinghorn, K. M.; Ong, R.; Morrison, P.; Haglund, P.; Harju, M.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **2000**, 23, 253.
88. Marriott, P. J.; Kinghorn, K. M.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 866, 203.
89. Kinghorn, K. M.; Marriott, P. J.; Dawes P. A.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **2000**, 23, 245.
90. Dalluge, J.; M. van Rijn; Beens, J.; Vreuls, R. J.; Brinkman; U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 965 (1-2), 207.
91. Kueh, A. J.; Marriott, P. J.; Wynne, P. M.; Vine, J. H.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1000, 109.
92. Ryan, D.; Shellie, R.; Tranchida, P.; Casilli, A.; Mondello, L.; Marriott, P.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1054 (1-2), 57.
93. Xin, D.; Shellie, R. A.; Marriott; P. J.; Huie, C. W. ; *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27, 451.

94. Song, S. M.; Marriott, P.; Kotsos, A.; Drummer, O.; Wynne, P.; *Forensic Science International*, **2004**, 143, 87.
95. Williams, A.; Ryan, D.; Guasca, A. O.; Marriott, P. J.; Pang, E.; *J. Chromatogr. B*, **2005**, 817, 97.
96. Mondello, L., Casillia, A. , Tranchida, P. Q.; Dugo, G.; Dugo, P.; *J. Chromatogr A.*, **2005**, 1067, 235.
97. Danielsson, C.; Wiberg, K.; Korytár, P.; Bergek, S.; Brinkman, U. A. Th.; Haglund P.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1086, 1-2, 61.
98. Mayadunne, R.; Nguyen, T.-T.; Marriott, P. J.; *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, **2005**, 382, 3, 836.
99. Dunn, M. S.; Vulic, N.; Shellie, R. A.; et al.; *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1130, 1, 122.
100. Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *Anal Bioanal Chem.*, **2004**, 378, 8, 1939.
101. Beens, J., Adahchour, M.; Vreuls, R. J. J.; K. van Altena; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2001**, 919, 1, 127.
102. Morales-Munoz, S.; Vreuls, R. J.; Luque de Castro, M. D.; *J. Chromatogr A*, **2005**, 1086, 1-2, 122.
103. Haglund, P.; Harju, M.; Danielsson, C.; Marriott, P; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 962, 127.
104. Jover, E; Adahchour, M.; Bayona, J. M; Vreuls, R. J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr A*, **2005**, 1086, 2.
105. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J.; Batenburg, A. M.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1054, 1-2, 47.
106. Vendevre, C.; Bertoncini, F.; Espinat, D.; Thiébaud, D.; Hennion, M. C.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1090, 116.
107. Vendevre, C.; Bertoncini, F.; Thiébaud, D.; Martin, M.; Hennion. M. C.; *J. Sep Sci.*, **2005**, 28, 11, 1129.
108. Haglund, P.; Korytar, P; Danielsson, C.; Diaz, J.; Wiberg, K.; Leonards, P.; Brinkman, U. A. Th.; de Boer, J.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 390, 7, 1815.
109. Korytar, P.; Danielsson, C.; Leonards, P. E. G.; Haglund, P.; J. de Boer, Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1038, 189.

110. Danielsson, C.; Wiberg, K.; Korytár, P.; Bergek, S.; Brinkman, U. A. Th.; Haglund, P.; *J. Chromatogr A*, **2005**, 1086, 1-2, 61.
111. Adahchour, M.; Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *The Analyst*, **2003**, 128, 213.
112. Arey, J. S.; Nelson, R. K.; Xu, L.; Reddy, C.M.; *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 22, 7172.
113. Hao, C.; Headley, J. V.; Peru, K. M.; Frank, R.; Yang P.; Solomon, K. R.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1067, 1-2, 277.
114. Pursch, M.; Eckerle, P.; Biel, J.; Streck, R.; Cortes, H.; Sun, K.; Winniford, B.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1019, 43.
115. Harynuk, J.; Górecki, T.; *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1019, 53-63.
116. Cai, H.; Stearns, S. D; *Anal Chem*, **2004**, 76, 6064.
117. Shellie, R.; Xie, L.-L.; Marriott P.; *J. Chromatogr. A*, **2002**, 968, 161.
118. Beens, J.; Boelens, H.; Tijssen, R.; Blomberg, J.; *J. High Resolut., Chromatogr.*, **1998**, 21, 47.
119. Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; *Analyst*, **2005**, 130, 123.
120. Cavagnino, D.; Magni, P.; Zilioli, G.; Trestianu, S.; *J. Chromatogr., A*, **2003**, 1019, 211.
121. Schoenmakers, P. J.; Oomen, J. L. M. M.; Blomberg, J.; Genuit, W.; Van Velzen, G.; *J. Chromatogr. A*, **2000**, 892, 29.
122. Shellie, R. A.; Marriott, P. J.; Morrison, P. D.; Mondello, L.; *J. Sep. Sci.*, **2004**, 27, 504.
123. Vendeuvre, C.; Bertoncini, F.; Duval, L.; Duplan, J.L.; Thiébaud, D.; Hennion, M. C.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1056, 155.
124. Frysinger, G. S.; Gaines, R. B.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1999**, 22, 251.
125. Debonneville, C.; Chaintreau, A.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1027, 109.
126. Ryan, D.; Shellie, R.; Tranchida, P.; Casilli, A.; Mondello, L.; Marriott, P.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1054, 57.
127. Korytár, P.; Parera, J.; Leonards, P. E. G.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1067, 255.
128. Adahchour, M.; Brandt, M.; Baier, H.-U.; Vreuls, R. J. J.; Batenburg, A. M.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr.A*, **2005**, 1067, 245.

129. Shimmo, M.; Hyötyläinen, T.; Kallio, M.; Antifa, P.; Riekkola, M.-L.; *LC.GC Eur.*, **2004**, 17, 640.
130. Wu, J.; Lu, X.; Tang, W.; Kong, H.; Zhou, S.; Xu, G.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1034, 1-2, 23, 199.
131. Focant, J. -F.; Sjödin, A.; Patterson, Jr., D. G.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1040, 227.
132. Mayadunne, R.; Nguyen, T.-T.; Marriott, P. J.; *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, 3, 382.
133. Banerjee, K.; Patil, S. H, Dasgupta, S.; Oulkar, D. P.; Patil, S. B.; Savant, R.; Adsule P. G.; *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1190, 350.
134. Stepan, R.; Cuhra, P.; Barsova, S.; *Food Addit. Contam.*, **2008**, 25, 5, 557.
135. Korytar, P.; Parera, J.; Leonards, P. E. G.; de Boer, J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A.*, **2005**, 1067(1-2), 255.
136. van Stee, L. L. P.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr., A*, **2003**, 1019, 89.
137. Ong, R.; Shellie, R.; Marriott, P.; *J Sep Sci*, **2001**, 24, 5, 367.
138. Beens, J.; Boelens, H.; Tijssen, R.; Blomberg, J.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1998**, 21, 47.
139. Beens, J.; Boelens, H.; Tijssen, R.; Blomberg, J.; *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1997**, 21, 47.
140. Adahchour, M.; Jover, E.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. Th.; *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1086, 1-2, 9, 128.
141. van Mispelaar, V. G.; Janssen, H-G., Tas, A. C.; Schoenmakers, P. J., *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1071, 1-2, 229.
142. Sinha, A. E.; Hope, J. L.; Prazen, B. J.; Fraga, C. G.; Nilsson, E. J.; Synovec, R. E.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1056, 1-2, 12, 145.
143. J. Dallüge, R. J. J. Vreuls, J. Beens, U. A. Th. Brinkman, *J. Sep. Sci.*, **2002**, 25, 201.
144. Reichenbach, S.E.; Ni, M.; Zhang, D.; Ledford, E.B., *J. Chromatogr. A*, **2003**, 985, 1, 47.
145. Fraga, C. G.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E. *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 4154.
146. Prazen, B. J.; K. J. Johnson, Weber, A.; Synovec, R. E., *Anal. Chem.*, **2001**, 73, 5677.

147. Fraga, C. G.; Prazen, B. J.; Synovec, R. E., *J. High Resolut. Chromatogr.*, **2000**, 23, 215.
148. Xie, L.; Marriott, P. J.; Adams, M., *Anal. Chim. Acta*, **2003**, 500, 211-222.
149. Shao, Y.; Marriott, P.; Hugel, H.; *Chromatographia*, **2003**, 57, S349-S353 Suppl. S.
150. Perera, R. M. M; Marriot, P. J.; Galbally, I. E.; *Analyst*, **2002**, 127, 1601.
151. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Batenbur, A. M.; Rosing, E. A. E.; Brinkman, U. A. Th.; *Chromatographia*, **2002**, 55, 361.
152. Pursch, M.; Sun, K.; Winniford, H, C.; Weber, A.; McCabe, T.; Luong, J.; *Anal. Bioanal. Chem*, **2002**, 373, 356.
153. Venkatramani, C. J.; Phillips, J. B.; *J. Microcol. Sep.*, **1993**, 5, 511.
154. Phillips, J. B.; Xu, J. Z.; *J. Chromatogr. A*, **1995**, 703, 327.
155. Phillips, J. B.; Beens, J.; *J. Chromatogr. A*, **1999**, 856, 331.
156. Phillips, J. B.; Ledford, E. B.; *Field Anal. Chem.*, **1996**, Tech. 1, 23.