



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Analítica
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**“Projeto e Avaliação de um Modulador Criogênico para
Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC)”**

Aluno: Marcio Pozzobon Pedroso
Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto

**Campinas - SP
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

P343p Pedroso, Marcio Pozzobon.
 Projeto e avaliação de um modulador criogênico para
 cromatografia gasosa bidimensional abrangente
 (GCxGC) / Marcio Pozzobon Pedroso. -- Campinas, SP:
 [s.n], 2009.

 Orientador: Fabio Augusto.

 Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto
 de Química.

 1. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente.
 2. Instrumentação analítica. 3. Microextração em fase
 sólida. 4. Abacaxi-voláteis. I. Augusto, Fabio.
 II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
 Química. III. Título.

Título em inglês: Development and evaluation of a cryogenic modulator for
comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC)

Palavras-chaves em inglês: Comprehensive two-dimensional gas chromatography,
Analytical instrumentation, Solid phase microextraction, Pineapple-volatile

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Fabio Augusto (orientador), Prof. Dr. Eduardo Carasek
da Rocha (DQ-UFSC), Prof. Dr. Claudimir Lucio do Lago (IQ-USP-SP), Prof. Dr. Ronei
Jesus Poppi (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 19/11/2009

*“A virtude de uma pessoa mede-se não por ações excepcionais,
mas pelos hábitos cotidianos.”*

Blaise Pascal

Dedico o presente trabalho à minha noiva, Mônica, aos meus pais, Odila Maria e Antônio Gilberto, aos meus irmãos, Silvia e André, pelo carinho, incentivo, confiança e compreensão.

Agradecimentos

- Ao Prof. Dr. Fabio Augusto pela oportunidade de realização desse trabalho, pelas inúmeras contribuições para meu crescimento profissional e pessoal, pela amizade e exemplo.
- Aos Profs. Drs. Eduardo Carasek da Rocha (DQ-UFSC), Claudimir Lucio do Lago (IQ-USP – São Paulo) Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP), Ronei Jesus Poppi (IQ-UNICAMP), Celio Pasquini (IQ-UNICAMP), pelas sugestões e contribuições como banca examinadora da tese e do exame de qualificação.
- Aos amigos e colegas do Laboratório de Cromatografia Gasosa, Adriano (Borges), Alex, André (Gago), Aline, Carlos, Cláudia, Eduardo, Ernesto, Élton, Juliano, Leandro (China), Lucília, Luiz, Maria, Mayra, Raquel, Renata e Sandra, meu muito obrigado pelo companheirismo, amizade, pela contribuição para o meu crescimento científico e pelos bons momentos. Agradecimento especial aos colegas Ernesto e Luiz que contribuíram diretamente no desenvolvimento do trabalho.
- A todos os amigos que fiz nesses anos na UNICAMP, agradeço pela amizade e pelo convívio diário.
- Ao Mário, do setor de mecânica fina – IQ / UNICAMP, e Marcelo, do setor de manutenção, pela construção das peças fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho.
- Aos professores e funcionários do IQ – UNICAMP.
- À minha noiva, Mônica, pelo apoio, incentivo e compreensão durante o decorrer do trabalho.

Curriculum vitae

Formação Acadêmica

- 2006 – 2009: Doutorado em Química, área Química Analítica Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
- 2003 – 2005: Mestrado em Química, área Química Analítica Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).
- 1999 – 2002: Graduação em Química Industrial Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Atuação Profissional

- 08/2004 - 02/2006: Professor substituto da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Depto. de Química. 20 hs semanais. Disciplinas: Química Analítica Qualitativa, Química Analítica Quantitativa e Análise Instrumental.
- 08/2005 - 02/2006: Professor da Universidade de Passo Fundo (UPF / RS), Depto. de Química. 14 hs semanais. Disciplinas: Química Geral Experimental, Química Ambiental, Química Analítica I e II.
- 05/2003 - 08/2005: Químico autônomo da Farmacopéia Brasileira, ANVISA – Ministério da Saúde. Estudos colaborativos para a elaboração de substâncias químicas de referência da Farmacopéia Brasileira.

Prêmios e Títulos

- Melhor trabalho, “Atividade antimicrobiana in vitro de compostos orgânicos voláteis produzidos por *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guignardia citricarpa*”, XXXII Congresso Paulista de Fitopatologia, Águas de São Pedro/SP, 2009.
- Menção honrosa, “Influence of organic chemical modifiers for lead determination in sample of calcium supplements by GF AAS”, 8º Rio Symposium on Atomic Spectrometry, Paraty/RJ, 2004.
- Melhor trabalho, “Combustão Iniciada por microondas: um novo conceito para o preparo de amostras”, tópico Tratamento de Amostras, 12º Encontro Nacional de Química Analítica, São Luis/MA, 2003.

Publicações

- Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC), M.P. Pedroso, L.A.F. de Godoy, C.H.V. Fidélis, E.C. Ferreira, R.J. Poppi, F. Augusto, Quim. Nova 32 (2009) 21.
- Volatiles identification in pineapple submitted to drying in an ethanolic atmosphere, A.M.P. Braga, M.P. Pedroso, F. Augusto, M.A. Silva, Drying Techn. 27 (2009) 248.
- Quantification of kerosene in gasoline by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) and N-way multivariate analysis, L.A.F. de Godoy, E.C. Ferreira, M.P. Pedroso, C.H.V. Fidélis, F. Augusto, R.J. Poppi, Anal. Lett. 41 (2008) 1603.

- Identification of gasoline adulteration using comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) combined to multivariate data processing, M.P. Pedroso, E.C. Ferreira, L.A.F. de Godoy, R.J. Poppi, F. Augusto, J. Chromatogr. A 1201 (2008) 176.
- Determination of copper in medicinal plants used as dietary supplements by atomic absorption spectrometry with direct flame solid analysis, M.P. Pedroso, E.M.M. Flores, A.P.S. Fleig, E.L.M. Flores, M.F. Mesko, V.L. Dressler, C.F. Bittencourt, A.B. Costa, Microchem. J. 77 (2004) 113.
- Volatile composition changes of pineapple during drying in modified and controlled atmosphere, A.M.P. Braga, M.A. Silva, M.P. Pedroso, F. Augusto, L.E.S. Barata, Chin. J. Chem. Engineer. (2009) *aceito*.
- Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot; M.B. Fialho, L. Toffano, M.P. Pedroso, F. Augusto, S.F. Pascholati, World J. Microbiol. Biotechnol. (2010) *aceito*.

Capítulos de livros

- Colaborador do Sexto Fascículo da Farmacopéia Brasileira, 4 ed. São Paulo - SP, 2005.
- Colaborador do Quarto Fascículo da Farmacopéia Brasileira, 4 ed. São Paulo - SP, 2003.

Apresentações em Eventos

- Mini-curso “Cromatografia Gasosa – Fundamentos e Tendências”, apresentado na Semana da Química – Universidade de Passo Fundo (RS). Data: 03/06/2009, Duração: 4 hs
- Palestra “Microextração em Fase Sólida (SPME)”, apresentada na Semana da Química – Universidade de Passo Fundo (RS). Data: 03/06/2009, Duração: 1,5 hs
- Participação docente em curso de extensão da UNICAMP. “Cromatografia Gasosa”, Data: 09/2007, Duração: 24 hs
- Um (01) trabalho como resumo expandido, nove (09) resumos apresentados como painel em congressos internacionais e quatorze (14) em congressos nacionais.
- Três (03) participações em congressos internacionais e dezoito (18) participações em congressos de âmbito nacional.

Outras informações relevantes

- Programa de Estágio Docente (IQ/UNICAMP): aulas teóricas e práticas sobre Métodos Cromatográficos (2º semestre 2007, 1º semestre 2008 e 1º semestre 2009).
- Representante discente – (Mar/2007 – Dez/2009) Dpto. Química Analítica / IQ – UNICAMP; (Mar/2004 – Set/2005) Dpto. Química – UFSM.
- Intercâmbio Acadêmico realizado através da Universidade Federal de Santa Maria, Projeto PIMA - OEI, com a Universidad de Costa Rica (08/2002 a 12/2002).
- Bolsista de Iniciação Científica – CNPq. Data: 08/2000 a 08/2002.

RESUMO

PROJETO E AVALIAÇÃO DE UM MODULADOR CRIOGÊNICO PARA CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (GC×GC)

O objetivo do trabalho foi projetar e avaliar um modulador criogênico para cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC). O modulador projetado foi baseado no modulador de quatro jatos (dois jatos quentes e dois jatos frios); N_2 (g) resfriado em N_2 (l) foi utilizado como fluido criogênico e N_2 (g) aquecido foi utilizado como gás quente. O modulador foi instalado em um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (GC-FID). O controle das válvulas solenóides e a digitalização do sinal analógico do FID foram realizados por *software* escrito em ambiente LabVIEW. Os resultados obtidos com o protótipo GC×GC-FID foram comparados com dados obtidos em um GC×GC-FID comercial. O desempenho de ambos os sistemas pode ser considerado equivalente, levando em consideração eficiência cromatográfica e repetibilidade. O protótipo GC×GC-FID foi empregado na análise de diversas amostras, em especial a fração volátil de polpa de abacaxi fresco e desidratado. Os voláteis foram extraídos por microextração em fase sólida através da extração dinâmica do headspace (DHS-SPME). A identificação dos compostos foi feita por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e avaliação dos índices de retenção. A identificação dos picos no cromatograma GC×GC foi feita através da comparação dos índices de retenção e dos perfis cromatográficos previamente obtidos por GC-MS. Como esperado, a análise por GC×GC-FID apresentou maior detectabilidade e poder de separação quando comparada com GC-FID. Por fim, alguns compostos não identificados por GC-MS foram identificados através de informação obtida pela estruturação cromatográfica da GC×GC.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A CRYOGENIC MODULATOR FOR COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY (GC×GC)

The aim of this project was to develop and evaluate a cryogenic modulator for comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). The design of the modulator was based on a cryogenic quad jet modulator; N_2 (g) cooled with N_2 (l) was used as the cryogenic fluid and heated N_2 (g) was used as the hot gas. The modulator was fitted into a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID). The control of the solenoid valves and digitalization of the analogic FID signal were performed by software written in the LabVIEW platform. Results obtained with the GC×GC-FID prototype were compared with data from a commercial GC×GC-FID system. The performance of both systems was similar regarding chromatographic efficiency and repeatability. The GC×GC-FID was employed for analysis of several samples, specially volatile organic compounds of fresh and dried pineapple pulp. The analytes were isolated by dynamic headspace solid phase microextraction (D-HS-SPME); identification of the compounds was performed by conventional gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and evaluation of retention indexes. The identification of the peaks on the GC×GC chromatograms was carried out by comparison of retention indexes and chromatographic profiles previously obtained by GC-MS. As expected, the detectivity and separation power of the GC×GC-FID analysis was significantly better than that of GC-FID. Moreover, the identity of some compounds not identified by GC-MS was assigned after information obtained from GC×GC chromatographic structure.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiii
1. Introdução	1
2. Objetivos	8
3. Revisão bibliográfica.....	10
3.1. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC)	10
3.1.2. Moduladores	13
3.1.3. Detectores	24
3.1.4. Conjunto de colunas	26
3.1.5. Estruturação cromatográfica.....	30
3.1.6. Processamento dos dados	35
4. Materiais e métodos	42
4.1. Materiais, reagentes e amostras.....	42
4.2. Protótipo GC×GC-FID.....	42
4.3. Colunas cromatográficas	45
4.4. GC×GC-FID comercial.....	46
4.5. Cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas (GC-MS).....	46
4.6. Identificação dos analitos	47
4.7. Microextração em fase sólida	48
5. Resultados e Discussão	52
5.1. Desenvolvimento do protótipo GC×GC.....	52
5.1.1. Protótipo GC×GC versão 1 (modulador “A” – HP 5890).....	52
5.1.2. Protótipo GC×GC versão 2 (modulador “A” – Agilent 6890).....	58
5.1.3. Protótipo GC×GC versão 3 (modulador “B” – Agilent 6890).....	61
5.1.4. Protótipo GC×GC versão 4 (modulador “C” – Agilent 6890).....	68
5.2. Análise da fração volátil da polpa de abacaxi	69
5.2.1. Extração da fração volátil da polpa de abacaxi por SPME	70
5.2.2. Análise por GC-MS	70
5.2.3. Análise por GC×GC-FID	83

5.2.4. Identificação dos compostos no cromatograma GC×GC-FID	89
6. Conclusões	101
7. Referências bibliográficas	104

LISTA DE ABREVIATURAS

- ¹D: primeira dimensão
- 1D-GC: cromatografia gasosa monodimensional
- ¹t_R: tempo de retenção na primeira dimensão
- ²D: segunda dimensão
- ²t_R: tempo de retenção na segunda dimensão
- ²w_b: largura de base do pico na segunda dimensão
- AD/DA: analógico-digital/digital-analógico
- d.e.: diâmetro externo
- d.i.: diâmetro interno
- DBWax: polietilenoglicol
- DHS-SPME: microextração em fase sólida através da extração dinâmica do *headspace*
- ECD: detector por captura de elétrons
- FID: detector por ionização em chama
- GC-MS: cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas
- GC: cromatografia gasosa
- GC×GC: cromatografia gasosa bidimensional abrangente
- GC×GC-FID: cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detecção por ionização em chama
- GC×GC-qMS: cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas quadrupolar
- GC×GC-TOFMS: cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo
- GC-GC: cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais (ou por *heartcut*)
- HP-5: 5% fenil-95% dimetilsiloxano
- HP-50: 50% fenil-50% dimetilsiloxano
- HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
- HS-SPME: microextração em fase sólida através da extração do *headspace*
- LMCS: sistema criogênico longitudinalmente modulado
- LTPRI: índice de retenção com programação linear de temperatura
- m/z: razão massa / carga

MS: espectrometria de massas

PM: período de modulação

qMS: espectrometria de massas com analisador quadrupolar

SPME: microextração em fase sólida

SPWax: polietilenoglicol

TOFMS: espectrometria de massas por tempo de voo

Lista de Tabelas

Tabela 1. Conjuntos de colunas empregados para análises por GC×GC-FID.....	46
Tabela 2. Análise da fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado por GC-MS (coluna HP-5) e GC×GC-FID (conjunto de colunas 1).	72
Tabela 3. Análise da fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado por GC-MS (coluna DBWax) e GC×GC-FID (conjunto de colunas 3).	78

Lista de Figuras

- Figura 1.** Comparação da capacidade de picos para 1D-GC, GC-GC para a transferência de uma fração e para GC×GC. 3
- Figura 2.** Resultado do processo de modulação: série de picos modulados correspondentes ao pico não modulado (linha cheia), o qual foi aumentado dez vezes para melhor visualização (linha tracejada). Adaptado de Górecki *et al.* [24]. 11
- Figura 3.** Construção dos cromatogramas sinal \times $^1t_R \times$ 2t_R em GC×GC. Adaptado de Dallüge *et al.* [15]. 12
- Figura 4.** Seções de cromatogramas de gasolina: (a) GC-FID e (b) GC×GC-FID. Colunas: GC-FID: 5% difenil-95% dimetilsiloxano (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m); GC×GC-FID: 5% difenil-95% dimetilsiloxano (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m) + polietilenoglicol (1,0 m \times 0,1 mm \times 0,1 μ m). 13
- Figura 5.** Diagrama do sistema GC×GC de Liu e Phillips [14]: A – injetor; B – coluna da 1D ; C – coluna da 2D ; D – modulador; E – fonte de corrente contínua e F – detector. .
..... 14
- Figura 6.** Ciclo de funcionamento do modulador térmico de Liu e Phillips [14]. Funcionamento descrito no texto. 15
- Figura 7.** (a) Diagrama do modulador térmico de varredura. (b) Princípio de operação do modulador: A – banda do analito elue lentamente pelo capilar de coleta; B – aquecedor dissolve termicamente parte das moléculas do analito, enquanto o restante das moléculas continua o processo lento de eluição; C – o movimento rotatório do aquecedor no sentido do gás de arraste reconcentra os analitos; D – analitos são transferidos para a 2D . Adaptado de Górecki *et al.* [24]. 16
- Figura 8.** (a) Diagrama do LMCS; “c” corresponde à posição de coleta e “f” à de focagem. (b) Princípio de operação do modulador: A - banda do analito elue pela 2D e é coletada pela camisa de aço resfriada, que está na posição de coleta; B – após a coleta, a camisa é movida rapidamente para a posição de focagem e a fração coletada elue, (C) até ser reconcentrada na etapa de focagem. (D) A camisa de aço é movida para a posição de coleta, enquanto a fração reconcentrada elue pela 2D . Adaptado de Górecki *et al.* [24]. 17

Figura 9. (a) Diagrama do modulador de duplo jato de CO₂ (1). (b) Princípio de operação do modulador: A – válvula de coleta aberta aprisiona os compostos, enquanto a válvula de focagem permanece fechada; B – sincronizadamente, válvula de coleta é fechada e a de focagem é aberta, ocorrendo a etapa de focagem; C – válvulas retornam à condição inicial e fração reconcentrada elue pela ²D. Adaptado de Górecki *et al.* [24]. 19

Figura 10. (a) Modulador com dois jatos criogênicos e dois jatos aquecidos (*quad jet*) e (b) modulador criogênico com um jato criogênico e um jato aquecido (*loop modulator*). Adaptado de Górecki *et al.* [24]..... 20

Figura 11. (a) Modulador baseado em sistema de válvulas e (b) e em sistema de válvulas com fluxo diferencial para modulação, através do uso de alça de amostragem. Adaptado de Górecki *et al.* [24]..... 22

Figura 12. Fenômeno de *solute breakthrough* observado por: (a) manchas verticais destacadas por círculos em vermelho [45] e (b) duplicação dos picos, destacados por polígonos em verde [47]..... 24

Figura 13. Influência da saturação da fase estacionária da coluna cromatográfica na retenção na ¹D e na ²D. (a) Pico saturado em ambas as dimensões e (b) pico não saturado [54]. 27

Figura 14. Estruturação cromatográfica em cromatograma GC×GC de óleo diesel. Adaptado de Vendevre *et al.* [60]..... 31

Figura 15. (a) Cromatograma GC×GC referente às propriedades químicas dos analitos no cromatograma GC×GC para o conjunto de colunas *normal*; separação (b) com ajuste da programação da temperatura do forno do cromatógrafo e (c) sem ajuste. Manchas em vermelho representam série homóloga de alcanos lineares e manchas em azul, alcoóis lineares. 32

Figura 16. (a) Cromatograma GC×GC de óleo essencial de folhas de eucalipto. A = alcoóis lineares, B = aldeídos, C = acetatos, D = monoterpenos não oxigenados, E = alcoóis de monoterpenos, F = acetatos de monoterpenos, G = sesquiterpenos não oxigenados, H = sesquiterpenos oxigenados [63]. (b) Corte de cromatograma GC×GC de ésteres metílicos derivados de ácidos graxos com 20 átomos de carbono. Linhas pretas indicam a posição de eluição em relação ao número de insaturações na molécula, enquanto que linhas em verde indicam a posição da insaturação [64]..... 34

- Figura 17.** (a) Mapa de retenção para cálculo dos índices de retenção na 1D e 2D (adaptado de Bieri e Marriott [74]). Linha espessa mostra mapa de retenção para a 1D obtido com injeção de série homóloga de alcanos (C10-C23) em $t = 0$ min. Linhas finas obtidas com múltiplas injeções por SPME de série homóloga de alcanos (diferente composição em cada injeção), formando as curvas de isovolatilidade para cada alcano. (b) Cromatograma referente à injeção de alcanos (C12-C18) por SPME a 36,2 min de análise. 37
- Figura 18.** Diagrama geral do protótipo GC×GC-FID. (1) sistema de controle de aquecimento, (2) sistema de aquecimento, (3) modulador, (4) amplificador, (5) conversor AD/DA, (6) relês, (7) dewar, (8) válvulas solenóides 3 vias. 43
- Figura 19.** Interface do usuário do programa de controle e aquisição de dados do GC×GC na plataforma LabVIEW..... 44
- Figura 20.** (a) Dispositivo para D-HS-SPME. (b) Sistema D-HS-SPME em repouso e (c) em operação. 49
- Figura 21.** Diagrama do modulador “A”. (a) Desenho do modulador com tubos para entrada e saída dos gases; (b) vistas lateral, (c) superior e (d) frontal do modulador, sem os tubos. Dimensões em mm..... 53
- Figura 22.** Cromatograma de gasolina obtido com o protótipo GC×GC versão 1 sem otimização das condições de separação e dos parâmetros do modulador. HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μ m) + DBWax (1,0 m × 0,10 mm × 0,10 μ m). Programação do forno do GC: 60 °C até 160 °C a 6 °C min⁻¹ até 240 °C (3 min) à 20 °C min⁻¹; razão de divisão do injetor 1:100; 0,6 μ L de amostra; PM 4 s. Gases coleta: quente 15 psi – frio 10 psi; gases focagem: quente 15 psi – frio 15 psi. Tempo incidência dos gases: coleta 3 s; focagem 1 s. 54
- Figura 23.** Ciclo de operação do modulador “A”. (a) coleta, (b) coleta com resfriamento simultâneo das duas câmaras e (c) focagem. Gás quente representado em vermelho e gás frio representado em azul. 55
- Figura 24.** Cromatogramas de gasolina: (a) GC-FID e (b) GC×GC-FID versão 1. Em (b): E = etanol, B=benzeno, B1=tolueno, B2=benzeno C2 substituído, B3=benzeno C3 substituído, B4=benzeno C4 substituído, B5=benzeno C5 substituído, B6=benzeno C6 substituído, A=alcanos, alcenos e cicloalcanos e N=naftalentos. HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μ m) + DBWax (1,0 m × 0,10 mm × 0,10 μ m). Programação do forno do GC: 40

- °C (3 min) até 160 °C à 4 °C min⁻¹ e até 240 °C (3 min) à 20 °C min⁻¹; razão de divisão do injetor 1:300; Vinj 0,6 µL de amostra; PM 6 s. 57
- Figura 25.** Esquema do modulador “A” no protótipo GC×GC versão 2 no qual o gás quente (pressão elevada) avança sobre a câmara contendo o gás frio..... 60
- Figura 26.** Cromatograma de gasolina tipo C obtido com o protótipo GC×GC versão 2. HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) + DBWax (1,0 m × 0,10 mm × 0,10 µm). Programação do forno do GC: 40 °C (3 min) até 160 °C a 4 °C min⁻¹ e até 240 °C (3 min) a 20 °C min⁻¹; razão de divisão do injetor 1:300; PM = 6 s. 60
- Figura 27.** Modulador “B” empregado no sistema GC×GC versão 3. (a) Desenho do modulador “B”, com destaque para os estágios de funcionamento, explicado no texto. (b) Foto do modulador instalado no forno do cromatógrafo; em destaque, modulador na posição vertical, com tubulação de entrada dos gases isolada termicamente. 61
- Figura 28.** Cromatograma modulado bruto e cromatograma GC×GC de etilbenzeno, *p*-xileno e *o*-xileno para avaliação da influência da pressão do gás frio no processo de modulação. Descrição apresentada no texto. 63
- Figura 29.** Óleo essencial de folhas da planta amazônica macacaporanga (*Aniba fragrans*) (a) a 10% v/v em etanol obtido com o protótipo GC×GC versão 1 e a (b) 1% v/v em etanol com a Versão 3. Conjunto de colunas: HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) + DBWax (1,0 m × 0,10 mm × 0,10 µm). Condições cromatográficas: Tcol = 60 °C a 3 °C min⁻¹ até 240 °C; Tinj = Tdet = 250 °C; gás de arraste = H₂ à 0,6 mL min⁻¹; Vinj = 1,0 µL com razão de divisão 1:200; PM = 6 s. 64
- Figura 30.** Seção dos cromatogramas GC×GC de óleo essencial de folhas da planta amazônica virola (*Virola surinamensis*) 1% (v/v) em pentano, obtido (a) com o sistema GC×GC Versão 3 e (b) com o equipamento comercial LECO®. Condições cromatográficas: (a) conjunto de colunas 1; 60 °C a 3 °C min⁻¹ até 240 °C; Tinj = Tdet = 250 °C; gás de arraste = H₂ a 0,6 mL min⁻¹; Vinj = 1,0 µL com razão de divisão 1:50; PM = 6 s. (b) coluna HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) + DBWax (2,0 m x 0,1 mm x 0,10 µm); Tcol = 60 °C a 3 °C min⁻¹ até 135 e até 200 °C a 1 °C min⁻¹; Tmodulador = + 35 °C; Forno secundário = + 10; Tinj = Tdet = 250 °C; gás de arraste = H₂: 1,4 mL min⁻¹; Vinj = 1,0 µL razão de divisão 1:100; PM = 7 s..... 66

- Figura 31.** Modulador “C” empregado no protótipo GC×GC versão 4: (a) modulador aberto e (b) fechado sem os tubos e (c) instalado no forno do cromatógrafo..... 69
- Figura 32.** Cromatogramas obtidos para a fração volátil da polpa de abacaxi (a) fresco e (b) desidratado, empregando coluna HP-5. O eixo “y” corresponde à altura do pico em relação ao pico mais intenso de cada cromatograma. Condições de extração: 1,5 g de amostra, 60 °C, vazão = 5,5 mL min⁻¹, pré-equilíbrio = 5 min, extração = 15 min, dessorção de 2 min. Identificação dos compostos está apresentada na Tabela 2..... 71
- Figura 33.** Cromatogramas obtidos para a fração volátil de polpa de abacaxi (a) fresco e (b) desidratado, empregando a coluna DBWax. O eixo “y” corresponde à altura do pico em relação ao pico mais intenso de cada cromatograma. Condições de extração: 1,5 g de amostra, 60 °C, vazão = 5,5 mL min⁻¹, pré-equilíbrio = 5 min, extração = 15 min, dessorção de 2 min. Identificação dos compostos está apresentada na Tabela 3. 77
- Figura 34.** Fração volátil da polpa de abacaxi fresco analisada usando conjunto de colunas 1. (a) cromatograma 1D-GC-FID; (b) cromatograma GC×GC modulado bruto, PM = 6 s; (c) cromatograma GC×GC, PM = 6 s; (d) cromatograma GC×GC, PM = 7 s. 85
- Figura 35.** Fração volátil da polpa de abacaxi desidratado analisada usando conjunto de colunas 1. Cromatograma GC×GC-FID (a) com PM = 6 s e (b) PM = 7 s..... 86
- Figura 36.** Análise da fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado empregando os conjuntos de colunas 1, 2 e 3. Os cromatogramas GC×GC (a), (b) e (c) foram obtidos para a fração volátil da polpa de abacaxi fresco com os conjuntos de colunas 1, 2 e 3, respectivamente. Os cromatogramas GC×GC (d), (e) e (f) foram obtidos para a fração volátil da polpa de abacaxi desidratado com os conjuntos de colunas 1, 2 e 3, respectivamente. 88
- Figura 37.** Comparação dos perfis cromatográficos da fração volátil da polpa de abacaxi fresco para as análises por (a) GC-MS e (b) GC×GC-FID, com respectivos LTPRI para alguns picos. 90
- Figura 38.** Corte do cromatograma mostrado na Figura 37(b), destacando em preto a posição de eluição da série de ésteres metílicos alifáticos e, em verde, a posição de eluição da série de aldeídos alifáticos, com os respectivos números referentes à Tabela 2. 91
- Figura 39.** Cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi fresco com atribuição da identidade dos picos. Numeração referente à Tabela 2. 93

- Figura 40.** Seção do cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi desidratado obtido com o conjunto de colunas 1. Linha em preto destaca a posição de eluição da série de ésteres metílicos alifáticos e, em vermelho, a posição de eluição da série de ésteres etílicos alifáticos, com os respectivos números referentes à Tabela 2. Linhas em laranja relacionam a posição de eluição de pares de ésteres isômeros com o mesmo número de átomos de carbono na molécula. 94
- Figura 41.** Cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi desidratado com atribuição da identidade dos picos; numeração referente à Tabela 2. 95
- Figura 42.** Cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi fresco empregando o conjunto de colunas 3 (*inverso*), com atribuição da identidade dos picos. Numeração referente à Tabela 3. 96
- Figura 43.** Seção do cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi fresco, obtido com o conjunto de colunas 3. Linha em preto destaca a posição de eluição da série de ésteres metílicos alifáticos e, em vermelho, a posição de eluição da série de ésteres etílicos alifáticos, com os respectivos números referentes à Tabela 3. Linhas em laranja relacionam a posição de eluição de pares de ésteres isômeros com o mesmo número de átomos de carbono na molécula. 97
- Figura 44.** Seção do cromatograma GC×GC da fração volátil da polpa de abacaxi fresco obtido com o conjunto de colunas 3. Elipses em vermelho destacam a posição de eluição de ésteres metílicos alifáticos e os retângulos em laranja destacam a posição de eluição dos isômeros insaturados dos ésteres metílicos. Setas em verde indicam possíveis isômeros que não foram identificados. Números referentes à Tabela 3. 98
- Figura 45.** Cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi desidratado empregando o conjunto de colunas 3 (*inverso*), com atribuição da identidade dos picos; numeração referente à Tabela 3 99

Capítulo 1:

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A análise cromatográfica de algumas amostras pode ser considerada um desafio, principalmente nas quais o número de compostos presentes é da ordem de algumas centenas e, também, quando muitos dos analitos presentes estão em concentração muito baixa. Para análise de compostos voláteis e semi-voláteis, a cromatografia gasosa (GC) é a técnica de separação mais indicada. Entretanto, mesmo em situações nas quais a separação por GC é otimizada, é comum que muitos compostos não estejam totalmente resolvidos [1]. Com isso, tanto a identificação como a quantificação dos compostos pode ser incorreta.

O poder de separação da GC pode ser mensurado pela capacidade de pico do sistema cromatográfico, que é definida como o número máximo de constituintes que podem ser separados sob determinadas condições cromatográficas. Baseado em dados calculados pela teoria estatística de sobreposição de picos, em amostras com 60 picos já são observados problemas para separação individual dos analitos [2]. Ainda, para separar individualmente todos os compostos presentes em uma mistura contendo 100 analitos, seria necessário usar uma coluna convencional (diâmetro interno de 0,25 mm) de 500 m. Para contornar os problemas relacionados à coeluição e aumentar o poder de separação em uma análise por GC, alguns artifícios são comumente adotados, como aumentar o comprimento da coluna ou diminuir o diâmetro da mesma. Outra abordagem para contornar a falta de separação cromatográfica é o uso de detecção seletiva, como a espectrometria de massas (MS) ou a espectrometria de infravermelho com transformada de Fourier [3].

Uma alternativa às abordagens descritas se baseia em um conceito já há muito conhecido: o de separação multidimensional, no qual a amostra é submetida sequencialmente a diferentes processos de eluição. Nas separações multidimensionais ocorre um aumento na capacidade de pico e/ou na seletividade da análise em relação às separações monodimensionais [2]. Para que a separação seja realmente multidimensional, dois requisitos devem ser seguidos: *i*) os componentes da mistura devem ser submetidos a duas (ou mais) etapas ou mecanismos de separação, sendo eles independentes entre si; *ii*) quando dois componentes são separados em uma etapa, eles devem permanecer separados durante toda a análise [4].

Separações bidimensionais são muito usadas em cromatografia planar [5]: a amostra é aplicada no canto de uma cromatoplaça 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 (HPLC), sendo a segunda eluição feita em outra coluna de HPLC [6] ou mesmo com outras técnicas, como eletroforese capilar [7] ou GC [8]. Em qualquer caso, espécies coeluídas na primeira etapa podem ser separadas na segunda eluição, especialmente se os mecanismos de separação das etapas forem diferentes. Já operacionalização de separações bidimensionais em GC é muito mais complexa por se tratar de um efluente gasoso e, assim, a coleta de frações do eluato da primeira coluna e transferência para segunda coluna sem perdas, contaminação ou alargamento excessivo da banda cromatográfica não é trivial.

Bertch [1][9] apresentou uma revisão, em duas partes, sobre a cromatografia gasosa bidimensional, destacando os princípios e a instrumentação necessária. Basicamente, a cromatografia gasosa bidimensional pode ser dividida em dois tipos: a cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais (também chamada de *heartcut*, GC-GC) e a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC). A diferença entre essas técnicas baseia-se na fração da amostra que é submetida à separação nas duas dimensões. Na GC-GC algumas frações do efluente da primeira coluna são transferidas para a segunda coluna, melhorando a separação dos picos cromatográficos das frações amostradas; como apenas poucas frações são transferidas para a segunda coluna, há apenas um pequeno aumento na capacidade de pico desse sistema em relação à GC monodimensional (1D-GC). Já na GC×GC, o termo abrangente refere-se ao fato de que todo o efluente da primeira coluna (ou uma fração representativa) é transferido para a segunda coluna. Com isso toda a amostra é realmente submetida à separação em duas dimensões e, portanto, o poder de separação GC×GC será muito maior quando comparado à 1D-GC ou à GC-GC.

A principal vantagem da GC×GC frente à GC-GC ou a 1D-GC é a grande capacidade de pico da técnica [10], ou seja, o número máximo de compostos que podem ser separados em uma mesma análise. Pode-se assumir que a capacidade de pico da primeira dimensão (¹D) é n_1 picos, enquanto que a da segunda dimensão (²D) é

n_2 picos. Assim, a capacidade de picos da GC×GC será $n_1 \times n_2$ picos, visto que toda a amostra é submetida à separação em ambas as dimensões. Comparativamente, a capacidade de pico da GC–GC será $n_1 + (y \times n_2)$, uma vez que apenas y frações da amostra são submetidas à separação na ²D. Na Figura 1 está mostrado um comparativo da capacidade de pico da 1D-GC, GC-GC e GC×GC. Imaginando que a capacidade de pico da coluna da primeira dimensão (igual para todos os casos) seja 250 e a da segunda dimensão (igual para os dois casos) seja 10, a capacidade de pico da GC-GC será 260, valor pouco maior que a da 1D-GC, que será 250, porém muito inferior à da GC×GC, que será de 2500 [11].

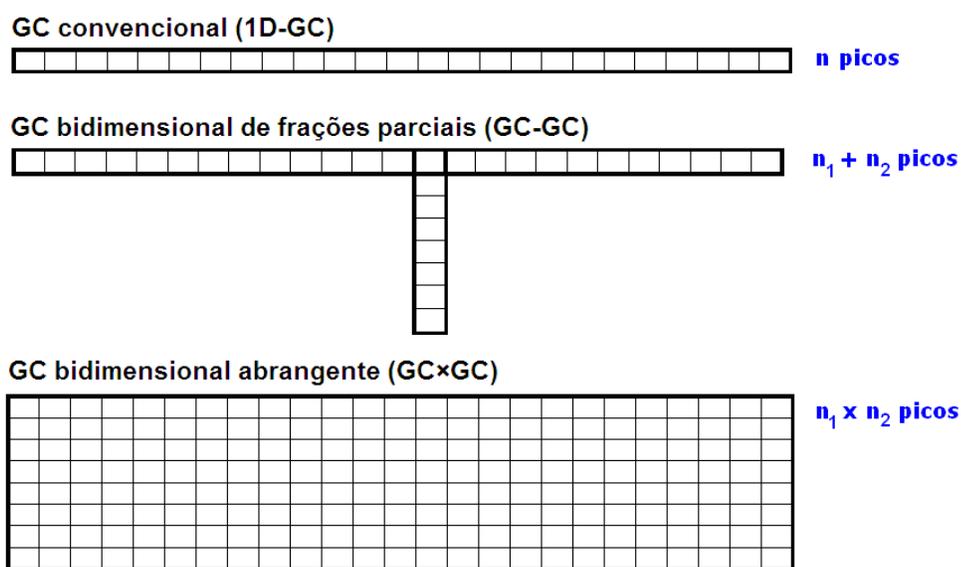


Figura 1. Comparação da capacidade de picos para 1D-GC, GC-GC para a transferência de uma fração e para GC×GC.

A primeira tentativa de implementação da GC-GC foi o “cromatógrafo a gás de dois estágios” de Simmons e Snyder [12], que empregava um arranjo complexo de válvulas como interface entre duas colunas recheadas. Nesse sistema, frações selecionadas do eluato da primeira coluna apolar, contendo analitos não separados, eram desviadas para uma segunda coluna com fase estacionária polar. Posteriormente, em 1968, surgiu um dispositivo pneumático mais conveniente para a transferência das frações: o “Inversor de Dean” (*Deans Switch*) [13]. Assim, a GC-GC começou a ser

aplicada mais intensivamente, sendo ainda hoje eventualmente usada para algumas amostras [1].

No início da década de 90 foi desenvolvido o primeiro sistema para GC×GC [14]. O surgimento da GC×GC só foi possível após o desenvolvimento de uma interface denominada de modulador, que tem como função coletar continuamente frações do efluente da primeira coluna e transferi-las para a segunda coluna. O número de compostos que podem ser separados em uma análise por GC×GC depende da largura de base dos picos na segunda dimensão (2w_b), a qual está diretamente relacionada à eficiência do modulador empregado. O modulador é considerado a parte fundamental de um equipamento GC×GC e, basicamente, três tipos de moduladores foram desenvolvidos. Os primeiros moduladores, hoje em desuso, eram denominados moduladores térmicos, os quais foram substituídos por moduladores criogênicos e moduladores baseados em válvulas. A descrição desses moduladores será aprofundada na revisão bibliográfica.

Além da presença de um modulador, outras diferenças são observadas entre a 1D-GC e a GC×GC. Os cromatogramas de GC×GC apresentam valores de retenção em duas dimensões e, por isso, os cromatogramas são apresentados como gráficos tridimensionais. Também, diferenças relacionadas à otimização dos parâmetros cromatográficos, bem como os novos parâmetros intrínsecos à GC×GC, à terminologia específica e à interpretação de dados com volume de informação muito maior, impõem ao analista uma nova abordagem para interpretar os dados.

Embora a GC×GC tenha sido desenvolvida na década de 90, no Brasil ela ainda é uma técnica recente. Hoje há três grupos que desenvolvem pesquisa em GC×GC. Entretanto, em 2006, ano do início do projeto de doutorado, o único equipamento GC×GC em atividade no país era um protótipo desenvolvido no laboratório do Prof. Fabio Augusto pelo ex-aluno de doutorado Carlos H.V. Fidélis. O protótipo GC×GC com detecção por ionização em chama (GC×GC-FID) era equipado com um modulador baseado no design de duplo jato criogênico, situado fora do forno do cromatógrafo, que empregava N_2 (g) resfriado em N_2 (l) como fluido criogênico. Contudo, o desempenho desse protótipo era muito limitado em relação aos resultados descritos na literatura. Portanto, o desenvolvimento de um novo protótipo, principalmente em relação ao

modulador empregado, era necessário para obter o real poder de separação proporcionado pela GC×GC.

Antes de projetar e desenvolver o novo protótipo, alguns testes foram realizados naquele equipamento para familiarização com a técnica e para melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na GC×GC. Com base nos dados apresentados na literatura, verificou-se que os moduladores criogênicos apresentavam melhores resultados e, portanto, optou-se por desenvolver um modulador criogênico com dois jatos criogênicos e dois jatos quentes. Outra mudança em relação ao protótipo disponível no laboratório foi a transferência do modulador para dentro do forno do cromatógrafo e, para isso, foi necessário diminuir as dimensões do modulador. Ao longo do projeto, diferentes moduladores foram projetados, construídos e avaliados, os quais serão apresentados, bem como os resultados obtidos.

Após atingir a versão final do modulador, o mesmo foi avaliado na análise da fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado. Foi feita a otimização da separação por GC×GC, sendo que foram investigados três conjuntos de colunas diferentes. Essa amostra foi escolhida por ser considerada complexa, pois apresenta muitos compostos em pequenas quantidades, os quais são importantes para o aroma da fruta. Além disso, alguns deles são isômeros ou constituintes de séries homólogas. A presença desses compostos possibilita obter a estruturação cromatográfica, que é o ordenamento no cromatograma GC×GC de compostos quimicamente relacionados [15]. Através da estruturação cromatográfica é possível obter informações estruturais de compostos não identificados.

A identificação dos picos em um cromatograma GC×GC-FID normalmente é feita por injeção de padrões. Entretanto, nesse trabalho os compostos foram identificados por GC acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). A atribuição da identidade dos picos no cromatograma GC×GC-FID foi feita por comparação dos índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI) para os picos identificados por GC-MS com os LTPRI para os picos do cromatograma GC×GC. Quando o perfil de ambos os cromatogramas e os índices de retenção eram compatíveis entre as duas formas de análise, foi atribuída a identidade ao pico no cromatograma GC×GC. Essa abordagem permite ampliar as informações obtidas em uma análise por GC×GC-FID, bem como complementar a identificação fornecida pela GC-MS.

Com respeito à etapa de tratamento da amostra, os procedimentos de extração para compostos voláteis e semi-voláteis nas mais diversas matrizes comumente são baseados em extração direta com solventes apropriados, processos de destilação ou através da manipulação do *headspace* da amostra [16]. Técnicas tradicionais como a extração por solvente e a extração/destilação simultânea (técnica Lickens-Nickerson) têm sido abandonadas por demandarem de grande volume de solventes orgânicos e elevado tempo de análise. Por outro lado, a microextração em fase sólida (SPME) através da extração do *headspace* (HS-SPME) é uma técnica sem uso de solventes, rápida e simples, que consiste em expor a fibra de SPME ao *headspace* da amostra por um determinado tempo para a extração dos analitos [17][18].

Para a extração da fração volátil da polpa de abacaxi a SPME poderia ser empregada; entretanto, para matrizes sólidas, suspensões ou líquidos muito viscosos a aplicação da HS-SPME pode ser problemática. Nesse caso, a SPME através da extração dinâmica do *headspace* (DHS-SPME) pode ser uma alternativa para contornar os problemas associados à extração [19][20]. Na DHS-SPME um fluxo de gás passa através do frasco da amostra e arrasta continuamente os compostos voláteis presentes no *headspace*, enquanto que a fibra de SPME é exposta a esse fluxo de gás para a extração dos compostos. A extração da fração volátil da polpa de abacaxi não foi o objeto de estudo desse trabalho e, embora a otimização das condições de extração tenha sido realizada para a polpa de abacaxi desidratado [21], este tópico não será abordado na revisão bibliográfica.

Capítulo 2:

OBJETIVOS

2. Objetivos

De acordo com o que foi explicado na parte introdutória desse trabalho, para que o protótipo GC×GC-FID disponível no laboratório apresentasse desempenho similar aos equipamentos descritos na literatura, era necessário, entre outras modificações, desenvolver um novo modulador. Baseando-se nas limitações apresentadas pelo protótipo descrito, os objetivos desse trabalho foram:

- i)* desenvolver um novo modulador para GC×GC, baseado no princípio do modulador *quad jet* empregando N_{2 (g)} resfriado em N_{2 (l)} como fluido criogênico;
- ii)* diminuir as dimensões do modulador e transferi-lo para dentro do forno do cromatógrafo, sem que exista influência da temperatura do forno sobre o processo de modulação;
- iii)* avaliar o protótipo GC×GC-FID utilizando amostras de gasolina e de óleos essenciais e, posteriormente, empregá-lo na análise da fração volátil de polpa de abacaxi;

Capítulo 3:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3. Revisão bibliográfica

3.1. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC)

A GC×GC foi desenvolvida há quase vinte anos [14]; contudo, pode-se dizer que a técnica é nova, visto que o número de publicações nos últimos sete anos representa mais de 80% do total das publicações, segundo pesquisa no sitio *Web of Science*, buscando o termo *comprehensive two-dimensional gas chromatography* no título do artigo.

Na GC×GC duas colunas são conectadas sequencialmente, sendo a coluna da ¹D de dimensões convencionais e a da ²D mais curta (do tipo de coluna usada em cromatografia gasosa rápida), havendo um modulador posicionado entre elas. A função do modulador pode ser dividida em três processos: *i*) coletar ou amostrar continuamente frações pequenas do efluente da ¹D, garantindo que a separação nessa dimensão seja mantida; *ii*) reconcentrar ou focalizar o efluente da ¹D em uma banda estreita e, *iii*) transferir rapidamente para a ²D a fração coletada e focalizada como um pulso estreito [22]. O conjunto dessas três etapas é denominado ciclo de modulação, que é repetido durante toda a corrida cromatográfica. O tempo necessário para realizar um ciclo é denominado período de modulação (PM), o qual tem duração típica entre 2 s e 10 s e está relacionado ao tempo necessário para que os compostos sejam eluídos na ²D. O PM deve ser o menor possível, a fim de que a separação obtida na ¹D não seja perdida.

Na GC×GC é fundamental o uso de uma ²D curta e eficiente: misturas simples (como as frações coletadas na ¹D e transferidas para a ²D) podem ser separadas em alguns segundos, possibilitando ciclos de modulação curtos e fracionamento completo da amostra eluída, sem aumento do tempo total de análise em relação a uma separação por 1D-GC. O mecanismo de separação da ¹D deve ser diferente da fase estacionária da ²D, permitindo que a separação pouco eficiente obtida na ¹D seja melhorada na ²D.

Outro aspecto fundamental de GC×GC que pode ser destacado é que a reconcentração do efluente da ¹D, que ocorre durante a modulação, ocasiona um

aumento significativo da sensibilidade. A comparação entre o pico antes e após a modulação está mostrada na Figura 2. Em vez do pico primário (efluente da 1^{D} que chega ao modulador) eluir como um pico largo e pouco intenso, cada analito elui como uma série de picos estreitos e intensos (altas relações sinal / ruído), sendo facilmente detectados [9]. O processo de modulação faz com que as bandas cromatográficas em sistemas GC \times GC sejam 10 a 50 vezes mais estreitas que em 1D-GC, resultando em valores para a 2w_b entre 50 ms a 500 ms, o que exige detectores com resposta rápida e com pequenos volumes internos [23].

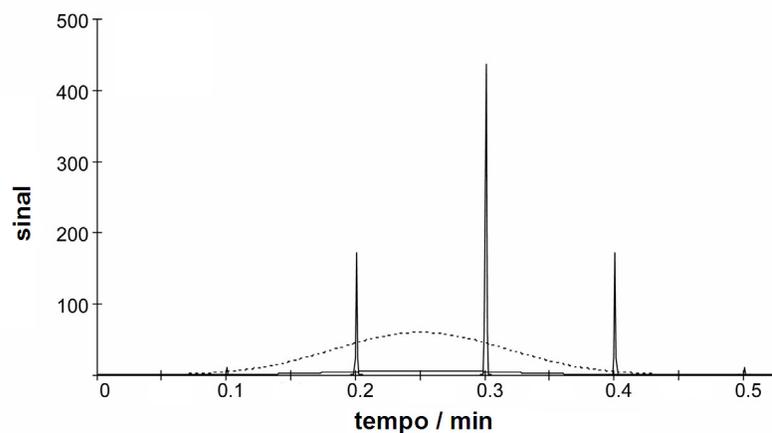


Figura 2. Resultado do processo de modulação: série de picos modulados correspondentes ao pico não modulado (linha cheia), o qual foi aumentado dez vezes para melhor visualização (linha tracejada). Adaptado de Górecki *et al.* [24].

Outra diferença da GC \times GC frente à 1D-GC é a forma de representação dos cromatogramas. O registro do sinal do detector em função do tempo em um sistema GC \times GC é uma seqüência contínua e encadeada dos cromatogramas curtos para cada fração eluída na 2^{D} [15]. A partir desse registro digitalizado, e conhecido o PM (intervalo de tempo para cada ciclo de modulação) pode-se construir gráficos tridimensionais sinal do detector \times tempo de retenção na 1^{a} coluna (1t_R) \times tempo de retenção na 2^{a} coluna (2t_R). Na Figura 3 uma banda cromatográfica larga, consistindo de três analitos não separados na 1^{D} (A), é modulada e eluída na 2^{D} , gerando um cromatograma modulado bruto (B). Cada um dos cromatogramas individuais das frações pode ser destacado do cromatograma bruto (C) e a partir deles pode-se gerar cromatogramas GC \times GC do tipo sinal \times $^1t_R \times ^2t_R$ como: diagrama tridimensional (“3D Plot”, D), como uma série de curvas de nível monocromáticas chamadas de diagrama de contorno (“Contour Plot”, E) ou

usando escalas cromáticas de intensidade de sinal, o diagrama de cores (“Colour Plot”, F). Nesse trabalho os cromatogramas GC×GC serão apresentados na forma de diagramas de cores.

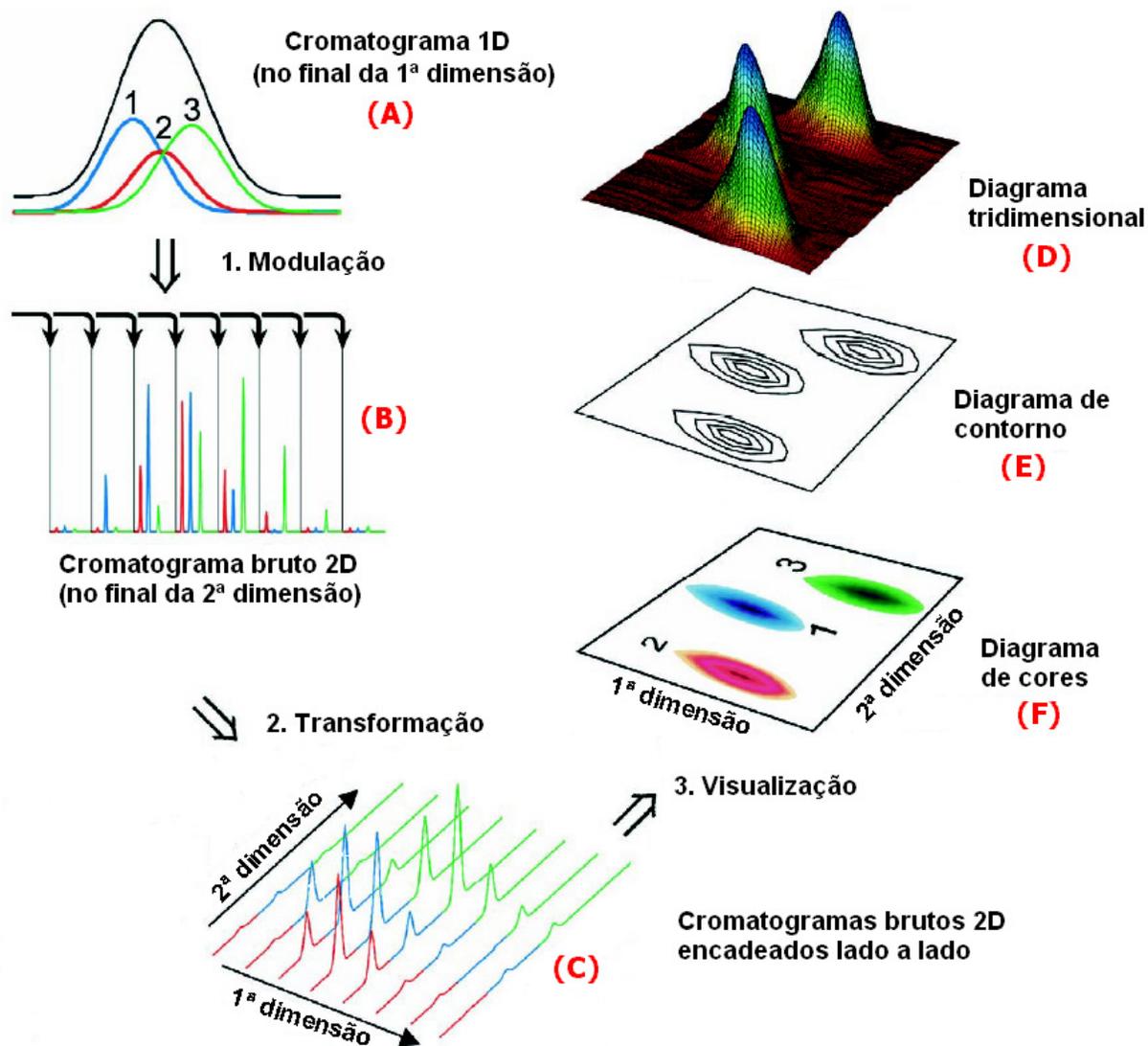


Figura 3. Construção dos cromatogramas sinal \times ${}^1t_R \times {}^2t_R$ em GC×GC. Adaptado de Dallüge et al. [15].

Na Figura 4(a) é mostrada uma parte de um cromatograma de amostra de gasolina obtido por um sistema 1D-GC-FID enquanto que na Figura 4(b) é mostrado, na mesma escala de tempo, o cromatograma da mesma amostra obtido em um sistema GC×GC-FID (cromatograma em escala de cinza). Essa comparação é especialmente

ilustrativa do poder de separação da GC×GC. Nessa região do cromatograma 1D-GC alguns picos com sinal intenso se sobrepõem em relação a diversos picos com baixa relação sinal/ruído que coeluem, sendo que é difícil definir o que é ruído e o que é sinal. Em contrapartida, no cromatograma GC×GC, na mesma faixa de tempo de corrida, diversas manchas de analitos aparecem resolvidas e grupos de eluatos quimicamente correlacionados são visíveis na forma de diagonais. Assim, obtém-se um quadro muito mais claro da composição e diversidade da amostra, embora ainda existam coeluições devido a grande complexidade da amostra.

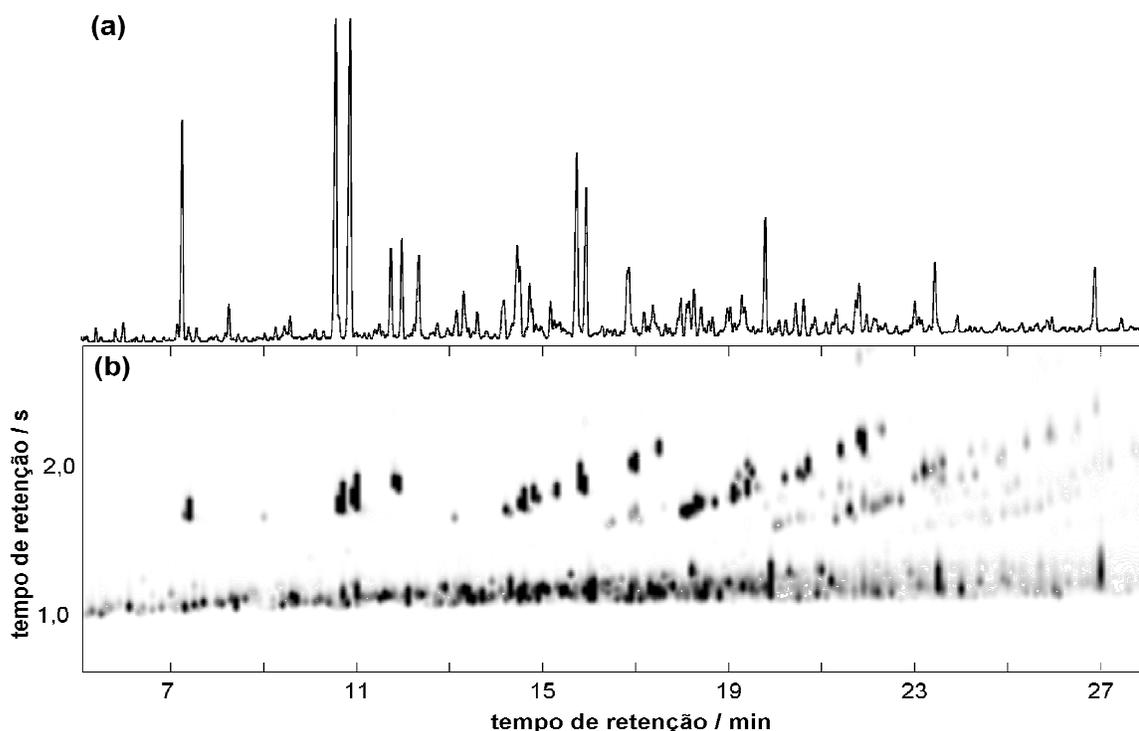


Figura 4. Seções de cromatogramas de gasolina: (a) GC-FID e (b) GC×GC-FID. Colunas: GC-FID: 5% difenil-95% dimetilsiloxano (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm); GC×GC-FID: 5% difenil-95% dimetilsiloxano (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) + polietilenoglicol (1,0 m × 0,1 mm × 0,1 μm).

3.1.2. Moduladores

O modulador é considerado o componente principal de um equipamento GC×GC e, por isso, o desenvolvimento de um modulador robusto, de fácil operação e aplicável a diversos tipos de analitos ainda é o foco de trabalhos em GC×GC. O primeiro modulador foi desenvolvido por Liu e Phillips [14]. Um pedaço do início da ²D, recoberto

com um filme de ouro, era mantido fora do forno do cromatógrafo. O setor metalizado da ²D era conectado a uma fonte de corrente contínua, em três terminais, formando dois circuitos separados (S1 e S2 na Figura 5).

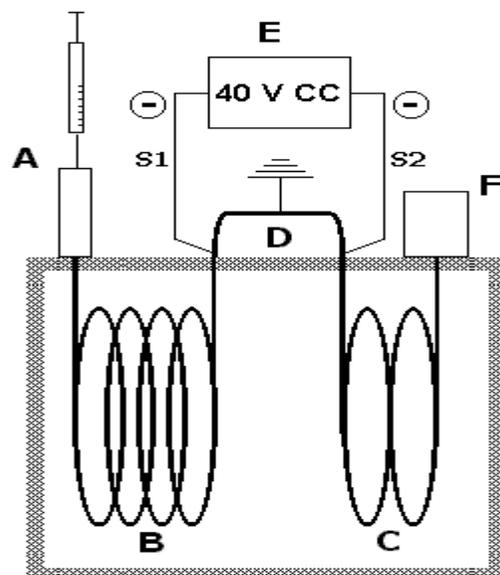


Figura 5. Diagrama do sistema GCxGC de Liu e Phillips [14]: A – injetor; B – coluna da ¹D; C – coluna da ²D; D – modulador; E – fonte de corrente contínua e F – detector.

Inicialmente, com o circuito S1 não energizado e o circuito S2 energizado, a seção inicial do modulador (Figura 6) fica a temperatura ambiente e assim retém eluato vindo da ¹D (a). Durante certo intervalo de tempo, todo material eluído da ¹D é sorvido pelo filme de fase estacionária na seção inicial da ²D (b), sendo essa etapa denominada de coleta. Em seguida, o circuito S1 é acionado e o circuito S2 desligado, aquecendo rapidamente a seção inicial do modulador pela passagem de corrente elétrica através do filme metálico. Assim, os analitos que estavam retidos são desorvidos termicamente e eluem para a seção final do modulador (agora à temperatura ambiente), sendo recoletados na forma de uma banda estreita (c), perfazendo a etapa denominada de focagem. Dada a baixa capacidade térmica das paredes da coluna cromatográfica, assim que cessada a corrente elétrica cada seção 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 na seção final elui pela ²D, onde é separada, enquanto uma nova fração do eluato da ¹D

começa a ser sorvida na seção inicial do modulador, dando início a um novo ciclo de modulação, composto pelas etapas de coleta e focagem.

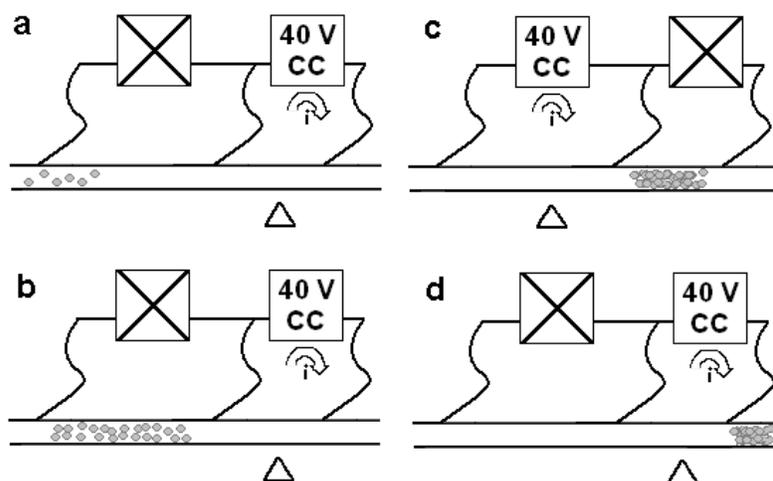


Figura 6. Ciclo de funcionamento do modulador térmico de Liu e Phillips [14]. Funcionamento descrito no texto.

No modulador desenvolvido por Phillips, a reconcentração do efluente da ¹D se deu à baixa migração dos compostos à temperatura ambiente. A remobilização dos compostos coletados ocorreu por aquecimento resistivo e, portanto, o modulador foi denominado de modulador térmico. O aperfeiçoamento desse conceito resultou no modulador térmico de varredura (*thermal sweeper modulator*) [25], que foi o primeiro modulador para GC×GC disponível comercialmente. Ele consiste em um capilar de sílica com um filme espesso de fase estacionária, conectado entre as duas colunas, usado para coletar o efluente da ¹D. Um esquema do modulador térmico de varredura está apresentado na Figura 7(a) e seu princípio de operação está mostrado na Figura 7(b). O movimento rotatório de um aquecedor desliza e arrasta continuamente os analitos ao longo do capilar, até a transferência dos mesmos para a ²D. Para remobilizar os analitos coletados, o aquecedor deve ser mantido 100 °C acima da temperatura do forno do cromatógrafo. Isso limitou a temperatura máxima do forno do cromatógrafo, que era 100 °C inferior ao limite de temperatura do capilar (em torno de 230 °C). A ²w_b típica varia entre 200 ms a 600 ms para esse modulador [26], que era mais robusto que o modulador de Phillips (porém com partes móveis) e respondeu por

aplicações reportadas em GC×GC até o final da última década, sendo progressivamente substituído por outros tipos de moduladores.

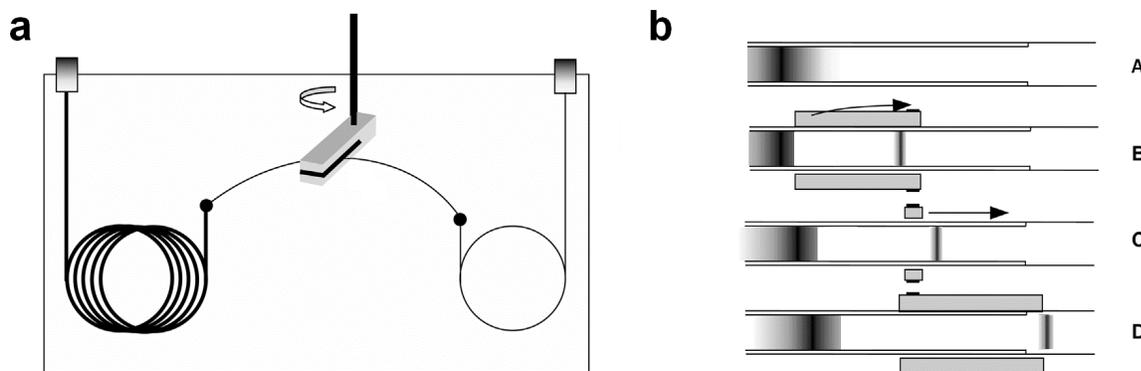


Figura 7. (a) Diagrama do modulador térmico de varredura. (b) Princípio de operação do modulador: A – banda do analito elue lentamente pelo capilar de coleta; B – aquecedor desorve termicamente parte das moléculas do analito, enquanto o restante das moléculas continua o processo lento de eluição; C – o movimento rotatório do aquecedor no sentido do gás de arraste reconcentra os analitos; D – analitos são transferidos para a 2^{a} D. Adaptado de Górecki *et al.* [24].

Os moduladores térmicos foram preteridos em favor de outra forma de modulação, realizada por moduladores criogênicos. Nesses moduladores, em vez do efluente da 1^{a} D ser coletado por meio de um capilar com filme espesso, o efluente é coletado pelo resfriamento pontual de um pequeno setor da própria coluna da 2^{a} D, através de um fluido criogênico. O primeiro modulador criogênico foi o sistema criogênico longitudinalmente modulado (LMCS), no qual o resfriamento é feito de forma indireta e a remobilização dos analitos coletados é feita pelo próprio ar aquecido do forno do cromatógrafo [27][28][29]. Inicialmente, o LMCS não foi usado como um modulador para GC×GC, mas sim para coletar os analitos antes que os mesmos chegassem ao detector, e liberá-los na forma de um pico estreito e intenso, causando aumento na sensibilidade [30]. Posteriormente, o LMCS foi empregado como modulador para GC×GC, o que proporcionou resultados muito mais interessantes que o simples aumento de sensibilidade para um sistema 1D-GC.

Um esquema do LMCS está mostrado na Figura 8(a): ele consiste em uma camisa em aço, resfriada internamente pela passagem de CO_2 (l), que se move sobre um trilho instalado no forno do cromatógrafo. Essa camisa de refrigeração envolve

cerca de 3 cm do início da 2D e atua como armadilha criogênica. Na Figura 8(b) está mostrado o princípio de operação do LMCS. Para a etapa de coleta do efluente da 1D , a camisa é posicionada na extremidade inferior do trilho resfriando um setor inicial da 2D . Em seguida, a camisa é movida rapidamente para cima; o setor da coluna, antes resfriado, é aquecido pelo ar quente no forno do cromatógrafo. Com o aquecimento, o material coletado elui e é reconcentrado na seção posterior da 2D , agora resfriada pela camisa móvel que foi reposicionada, correspondente à posição de focagem. Assim que a camisa de refrigeração retorna à posição inicial de coleta, o material reconcentrado começa a eluir pela 2D e uma nova fração proveniente da 1D será coletada, completando e reiniciando o ciclo de modulação.

Como características desse modulador, a 2w_b típica varia entre 200 ms e 400 ms e a temperatura de aprisionamento pode atingir $-50\text{ }^\circ\text{C}$ [29]. O LMCS consiste em um avanço às alternativas antes disponíveis, entretanto, ainda apresenta alguns inconvenientes. A temperatura alcançada durante o resfriamento não é suficiente para coletar compostos voláteis, e portanto a faixa de ponto de ebulição dos compostos analisados varia entre $125\text{ }^\circ\text{C}$ e $450\text{ }^\circ\text{C}$. Além disso, o LMCS apresenta partes que se movem muito próximas da frágil coluna usada como 2D ; como a instalação do modulador e do conjunto de colunas é complexa, qualquer desajuste pode levar à quebra da coluna [15].

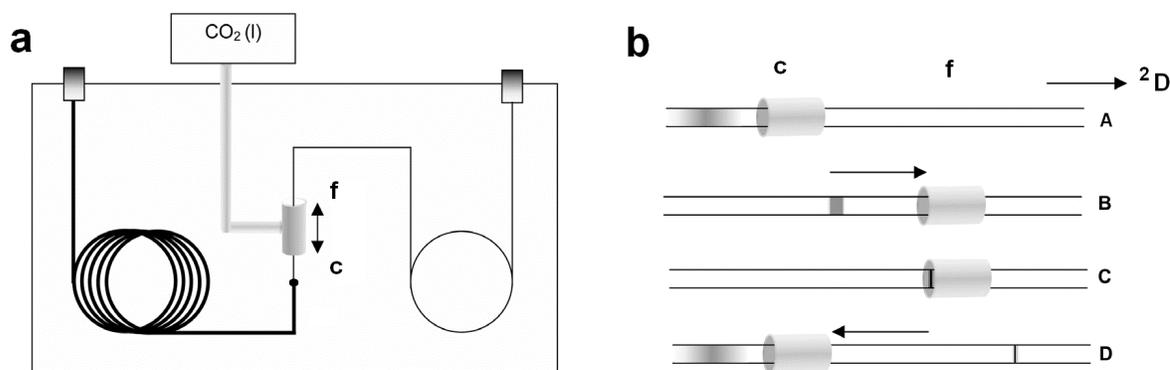


Figura 8. (a) Diagrama do LMCS; “c” corresponde à posição de coleta e “f” à de focagem. (b) Princípio de operação do modulador: A - banda do analito elui pela 2D e é coletada pela camisa de aço resfriada, que está na posição de coleta; B – após a coleta, a camisa é movida rapidamente para a posição de focagem e a fração coletada elui, (C) até ser reconcentrada na etapa de focagem. (D) A camisa de aço é movida para a posição de coleta, enquanto a fração reconcentrada elui pela 2D . Adaptado de Górecki *et al.* [24].

Moduladores criogênicos baseados em jatos criogênicos foram desenvolvidos para contornar as limitações do LMCS e, hoje em dia, são os principais moduladores instalados em sistemas comerciais. Nestes moduladores, o resfriamento é feito através de jatos de CO_2 (l) ou de N_2 (l) diretamente lançados sobre a coluna. Válvulas instaladas fora do forno são abertas e fechadas sincronizadamente, criando ciclos de modulação através do resfriamento alternado de seções da ^2D . Esses moduladores, desenvolvidos entre os anos 2001 e 2003, apresentam como vantagens frente ao LMCS a robustez do sistema (eles não têm partes móveis) e a alta eficiência de resfriamento, uma vez que ocorre contato direto entre o fluido criogênico e a coluna, o que permite modular compostos mais voláteis [15].

Um dos primeiros moduladores criogênicos à base de jatos foi o modulador de duplo jato criogênico (*dual jet*), o qual utiliza CO_2 (l) como fluido criogênico [31] e está mostrado na Figura 9(a). O princípio de operação desse modulador está mostrado na Figura 9(b). A etapa de coleta do efluente da ^1D ocorre quando a válvula do jato mais próximo da ^1D está aberta. Sincronizadamente, a primeira válvula é fechada e a segunda é aberta; os compostos coletados são remobilizados pelo ar aquecido do forno do cromatógrafo e, então, são aprisionados pelo segundo jato criogênico, correspondente à etapa de focagem. Quando as válvulas retornam ao estado inicial, os compostos são remobilizados pelo ar aquecido, e o ciclo de modulação é reiniciado. Embora ocorra contato direto entre a coluna e o fluido criogênico, o tempo necessário para aquecer a coluna capilar até a temperatura do forno do cromatógrafo é de 13 ms para colunas com d.i. de 0,1 mm.

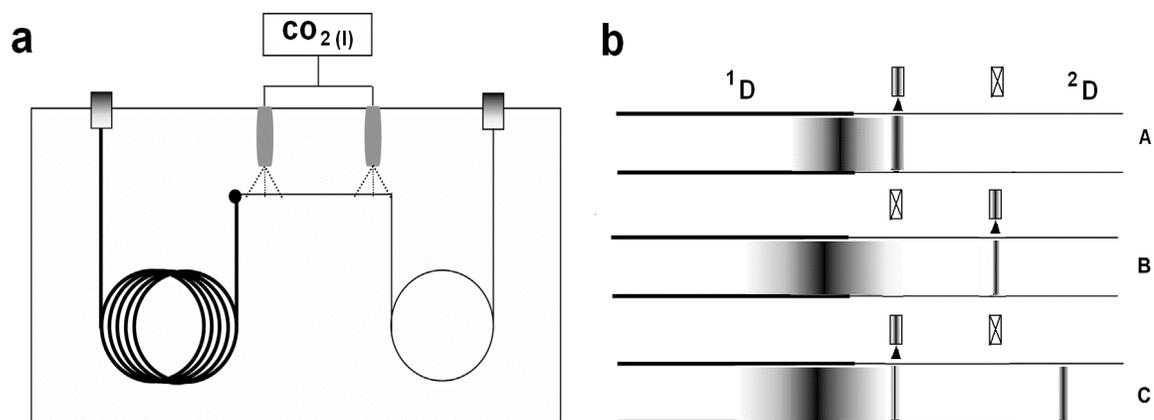


Figura 9. (a) Diagrama do modulador de duplo jato de CO₂(l). (b) Princípio de operação do modulador: A – válvula de coleta aberta aprisiona os compostos, enquanto a válvula de focagem permanece fechada; B – sincronizadamente, válvula de coleta é fechada e a de focagem é aberta, ocorrendo a etapa de focagem; C – válvulas retornam à condição inicial e fração reconcentrada elue pela 2^oD. Adaptado de Górecki *et al.* [24].

Outros moduladores criogênicos que merecem destaque são o de duplo jato frio e duplo jato quente (*quad jet*) [32][33] e o modulador com um jato frio e um quente (*loop modulator*) [34], os quais estão apresentados na Figura 10. A coleta para esses moduladores é efetiva até mesmo para analitos altamente voláteis, como butano, uma vez que o N₂(l) é usado como fluido criogênico, sendo usado N₂(g) aquecido para remobilização dos compostos, em vez do ar do forno do cromatógrafo. Como a temperatura dos jatos quentes pode ser ajustada para valores superiores à temperatura do forno do cromatógrafo, a remobilização é mais eficiente. Como resultado da combinação de coleta e liberação mais efetivas que os outros moduladores criogênicos, os valores para 2w_b são os menores observados. A 2w_b típica depende do design do modulador e do fluido criogênico empregado: os valores variam entre 80 ms e 200 ms, sendo que os valores são menores para moduladores que empregam jatos quentes para remobilização dos compostos em vez do próprio ar do forno do cromatógrafo [24].

O princípio de funcionamento do modulador com quatro jatos é idêntico ao apresentado para o de duplo jato de CO₂(l), exceto pelo fato de que o aquecimento é controlado de forma independente. Para o modulador com um jato criogênico e um jato aquecido [35], é necessário um pequeno *loop* no início da coluna da 2^oD para realizar as etapas de coleta e focagem. Para tal, o jato criogênico incide simultaneamente em dois

pontos distintos da coluna cromatográfica, exatamente sobre as duas partes da coluna que formam o *loop*.

Quando o jato criogênico é acionado, os analitos são aprisionados na primeira parte do *loop*; por alguns milissegundos o jato criogênico é desligado e o jato aquecido é acionado. Os compostos aprisionados na etapa de coleta eluem através da seção da coluna formada pelo *loop*. Antes dos analitos atingirem o segundo ponto do *loop* sobre o qual os jatos incidem, o jato quente é desligado e o criogênico acionado, para aprisionamento dos analitos na etapa de focagem. Nesse mesmo momento, a nova fração do eluato da ¹D também está sendo coletada no primeiro setor da coluna. Após nova inversão dos jatos, os analitos aprisionados no segundo setor eluem pela ²D, enquanto que os analitos coletados no primeiro setor eluem através do *loop*. Nesse modulador, o tamanho do *loop* empregado depende do PM escolhido. Uma alternativa ao uso de fluido criogênico é apresentada para esse modulador, através do uso de ar resfriado em substituição ao N₂ (l). Nesse caso, a modulação é efetiva para compostos menos voláteis; entretanto, não há a necessidade de utilizar fluido criogênico [36].

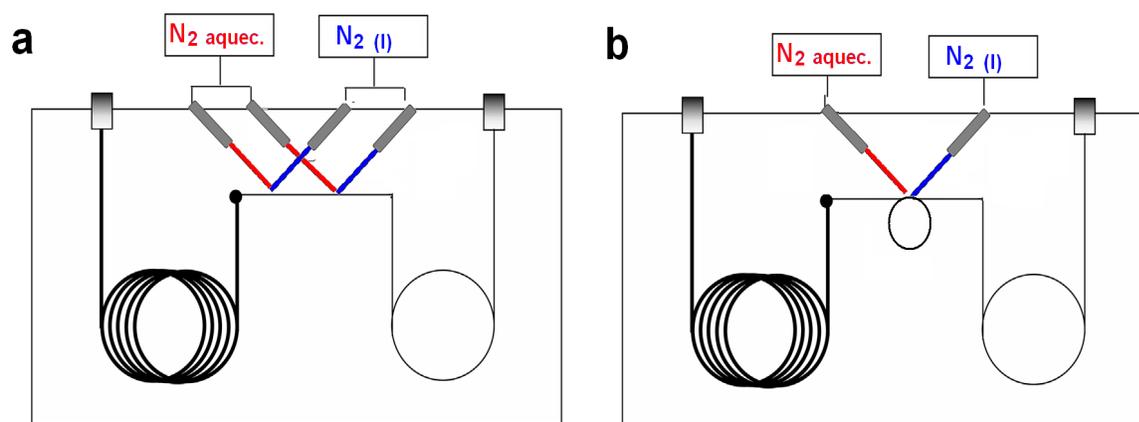


Figura 10. (a) Modulador com dois jatos criogênicos e dois jatos aquecidos (*quad jet*) e (b) modulador criogênico com um jato criogênico e um jato aquecido (*loop modulator*). Adaptado de Górecki *et al.* [24].

Outra classe de moduladores engloba dispositivos baseados em válvulas divisoras de comando eletrônico ou pneumático instaladas entre as colunas, que coletam frações do efluente da ¹D e as transferem para a ²D [15]. Nos primeiros moduladores baseados em válvulas, como o mostrado na Figura 11(a), a transferência das frações da ¹D para a ²D foi feita com válvulas de quatro ou de seis vias, conectadas

entre as duas dimensões. Durante o tempo em que a válvula permanece na posição de injeção, que corresponde a 10-20% do PM, o efluente é transferido para a ²D sem que ocorra a reconcentração. Quando a posição da válvula é modificada, que corresponde ao resto do PM, o efluente proveniente da ¹D é descartado, enquanto ocorre a separação na ²D; para isso, o fluxo de fase móvel na ²D é mantido por um suprimento auxiliar de gás de arraste [37]. Como a maior parte da amostra é descartada durante a análise cromatográfica, a sensibilidade da análise fica comprometida. Além disso, não há reconcentração do efluente da ¹D.

Para contornar a baixa sensibilidade ocasionada pelo descarte da maior parte da amostra, foi desenvolvido o modulador baseado em válvulas com fluxo diferencial [38]. Nesse modulador, uma alça de amostragem foi inserida no sistema de válvulas para coletar o efluente da ¹D, que pode ser reconcentrado devido à compressão do gás. A válvula permanece cerca de 80% do PM na posição de coleta e o resto do tempo na posição de injeção (durante a injeção o efluente da ¹D é descartado). A vazão do gás de arraste na ²D (também usado um gás auxiliar) foi cerca de vinte vezes maior que na ¹D, com a finalidade de diminuir o tempo de injeção e permitir PM tão curtos quanto 1 s. Os moduladores baseados em válvulas apresentam como inconveniente o fato de, praticamente, não reconcentrar as frações amostradas e de ter sensibilidade inferior em relação aos outros moduladores, além de limitações relativas à máxima temperatura de trabalho. Por outro lado, as vantagens desse grupo de moduladores são o fato de não utilizar fluido criogênico e a aplicabilidade a compostos voláteis, visto que até gases podem ser modulados, já que o efluente é coletado em uma alça de amostragem ou transferido diretamente para a ²D [24].

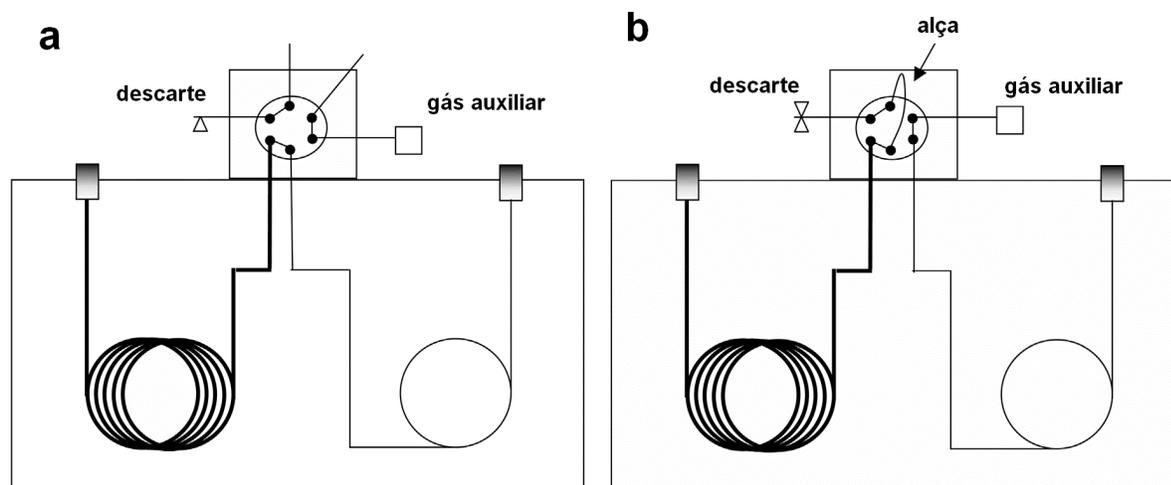


Figura 11. (a) Modulador baseado em sistema de válvulas e (b) e em sistema de válvulas com fluxo diferencial para modulação, através do uso de alça de amostragem. Adaptado de Górecki *et al.* [24].

Os moduladores até aqui descritos são os mais empregados em GC×GC; porém, existem outros moduladores projetados e desenvolvidos como protótipos em laboratório ou como modificações de moduladores disponíveis comercialmente. Ao total, cerca de 20 diferentes moduladores foram desenvolvidos para GC×GC [39], sendo alguns deles brevemente discutidos. Embora vários moduladores tenham sido desenvolvidos, o princípio de operação dos mesmos é similar aos já apresentados, sendo que pequenas modificações são realizadas. Hyötyläinen *et al.* [40] desenvolveram um modulador com duplo jato rotativo de CO_2 (l). A principal diferença em relação ao modulador de duplo jato proposto por Beens [31] é que no modulador rotativo CO_2 (l) não há válvulas. O modulador é um tubo, com duas ranhuras de tamanhos e posições distintas, que libera CO_2 (l) continuamente através dessas ranhuras. O tubo gira em torno do próprio eixo, fazendo com que ora uma ranhura, ora a outra ranhura libere o fluido criogênico sobre a coluna, proporcionando o ciclo de modulação. Quando o tubo gira 360° , o ciclo de modulação é reiniciado. Segundo os autores, esse design não apresenta o inconveniente do CO_2 (l) continuar a ser lançado sobre a coluna mesmo quando as válvulas são fechadas. Esse mesmo problema também foi constatado por Harynuk e Górecki [41] ao desenvolver um modulador criogênico com jatos de N_2 (l). O problema foi contornado através do uso de uma segunda válvula solenóide para desviar o N_2 (l) que permanece na tubulação após a primeira válvula ter sido fechada.

Libardoni *et al.* [42] desenvolveram um modulador com aprisionamento dos compostos por ar resfriado e aquecimento elétrico diretamente sobre a coluna. Mesmo sem empregar fluido criogênico para coleta dos analitos, a 2w_b obtida para o octano foi ordem de 200 ms, o que pode ser considerado um valor pequeno. Entretanto, foi observado que para compostos em concentração maior que 1,5 ppm a coleta não é efetiva.

Gaines e Frysinger [43] avaliaram a temperatura de modulação para o modulador de um jato criogênico e um jato quente, empregando diferentes gases para aprisionamento dos analitos. N_2 (g) foi resfriado de diferentes formas: em N_2 (l), em um banho de gelo e em água à temperatura ambiente. Foi observado que a temperatura para aprisionamento dos compostos deve ser cerca de 130 °C inferior à temperatura de eluição. Quando N_2 (l) foi usado para resfriar o N_2 (g), foi possível modular butano, enquanto que para os dois outros casos, foi possível modular compostos mais pesados que o octadecano. Os autores também avaliaram que ao longo da corrida cromatográfica, o resfriamento é excessivo; assim, a vazão do N_2 (g) foi modificada (através de controle eletrônico de pressão) ao longo da análise para compensar a diminuição do ponto de ebulição dos analitos. Com isso foi possível modular compostos tão pesados quanto um alcano linear saturado com 40 átomos de carbono. Rathbun [44] também variou a vazão do N_2 (g) resfriado em N_2 (l) para modular compostos com ponto de ebulição de até 540 °C.

Durante o desenvolvimento de um modulador, é importante avaliar alguns parâmetros como a 2w_b , que deve ser a menor possível, a variação do 2t_R e, também, observar o fenômeno chamado de *solute breakthrough*, que ocorre quando parte dos analitos passa pelo modulador sem ser aprisionada [42]. Ele pode ser evidenciado no cromatograma GC×GC por uma mancha vertical, como destacado por círculos em vermelho na Figura 12(a) [42][44], ou pela duplicação dos picos, tal qual destacado em verde na Figura 12(b). Como ambos os cromatogramas GC×GC foram obtidos com moduladores criogênicos, o *solute breakthrough* indica que a temperatura não é tão baixa para reter completamente todas as moléculas do analito. Esse fenômeno ocorre, principalmente, para compostos muito voláteis ou para compostos presentes em concentração muito elevada (comumente visualizado para o solvente da amostra); normalmente, os autores não relatam tal fenômeno e tampouco alteram as condições

de modulação para contornar tal problema [45][46][47]. Obviamente, esse fenômeno não é observado quando moduladores com válvulas são empregados, pois não há a possibilidade dos analitos não serem aprisionados.

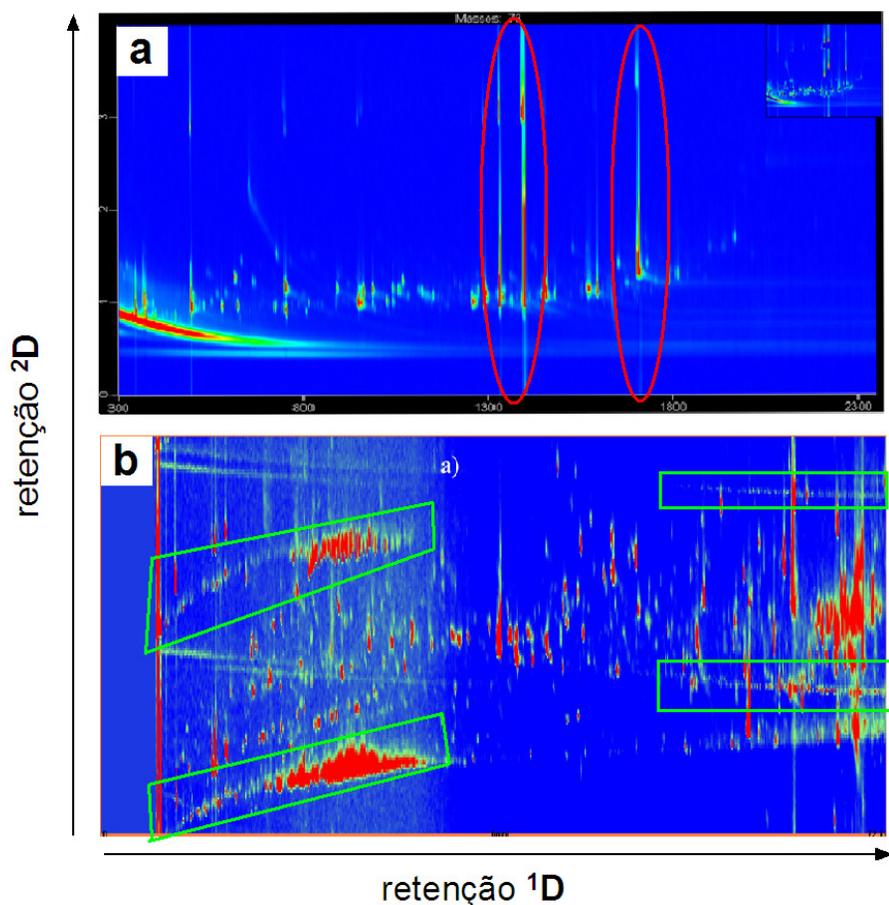


Figura 12. Fenômeno de *solute breakthrough* observado por: (a) manchas verticais destacadas por círculos em vermelho [45] e (b) duplicação dos picos, destacados por polígonos em verde [47].

3.1.3. Detectores

Além de compatibilidade com bandas cromatográficas estreitas, os sistemas eletrônicos e de processamento de dados associados à detecção também devem possibilitar taxas de coleta (número de leituras do sinal digitalizado do detector por segundo) compatíveis: 100 Hz ou mais. Entre os detectores cromatográficos mais populares, o FID é o que melhor se ajusta aos requisitos acima: os FID modernos têm volumes internos desprezíveis e possibilitam taxas de coleta de até 200 Hz [23]; assim,

seu uso tem sido muito difundido em GC×GC. O uso do detector por captura de elétrons (ECD) exige otimização mais cuidadosa de parâmetros operacionais, já que os volumes internos comparativamente grandes dos ECD (150 μ L ou mais) tendem a resultar em respostas mais lentas e maior dispersão das bandas cromatográficas [48].

Já a detecção por MS, que está plenamente sedimentada para 1D-GC, tem sido bastante discutida visto que seu uso para GC×GC não é trivial [49]. Em primeiro lugar, deve-se considerar que os diagramas gerados são na verdade estruturas de dados em quatro dimensões – sinal \times (m/z) \times 1t_R \times 2t_R (m/z = relação massa / carga do fragmento iônico). Espectrômetros de massas com analisadores quadrupolares (qMS) convencionais apresentam taxa de aquisição de pouco mais que dois espectros de massas por segundo, sendo lentos para as bandas cromatográficas estreitas de GC×GC [50]. Contudo, hoje em dia qMS mais rápidos já são disponíveis e, além disso, é possível diminuir a faixa de massas investigada ou monitorar apenas alguns íons durante a corrida, resultando assim em uma maior taxa de aquisição.

Adahchour *et al.* [51] relataram a interdependência entre taxa de coleta do sinal, faixa de massas investigada e 2w_b , de forma que taxa de aquisição de até 50 Hz pode ser obtida desde que a faixa de m/z analisada seja reduzida para 95 u.m.a. e que 2w_b seja maior que 140 ms, o que determina, pelo menos, sete pontos por pico. Com o intervalo de m/z entre 40-240 a taxa de aquisição cai para 20 Hz, a qual permite a coleta de, no mínimo, quatro espectros de massas por pico, o que pode ser considerado suficiente para a identificação de diversos compostos [52]. Cabe ressaltar que os espectros de massas obtidos por GC×GC-qMS são mais “limpos” que aqueles obtidos por GC-qMS, porque a separação na 2D permite resolver o analito de outros interferentes.

Por outro lado, a Espectrometria de Massas por Tempo de Voo (TOFMS) permite a coleta de até 500 espectros de massas por segundo [15] e, portanto, mostra-se superior aos qMS em análises qualitativas e quantitativas [51]. Além disso, dado o elevado número de espectros de massas por pico, torna-se possível a deconvolução espectral de picos que coeluem na 1D e na 2D , o que aumenta a capacidade de separação. Para isso, algoritmos para reconhecimento de picos, deconvolução espectral e comparação com a biblioteca de espectros de massas necessitam ser empregados no processamento e interpretação dos cromatogramas GC×GC-MS, o que

torna a análise complexa e demorada [53]. Devido às características de cada detector, a TOFMS parece ser a detecção ideal para GC×GC, embora o seu custo seja proibitivo para muitos usuários.

3.1.4. Conjunto de colunas

Como descrito anteriormente, em GC×GC é necessário empregar duas colunas conectadas em série através de um conector de volume morto desprezível, normalmente uma conexão tipo *press-fit*, na qual as colunas são fixadas pelo auxílio de poliimida. Em geral, uma coluna convencional para GC (com dimensões tipicamente de 15-30 m × 0,25 mm) é usada como ¹D. A seleção dessa coluna depende dos analitos a serem separados e da separação desejada; contudo, normalmente já existe um método por 1D-GC para a análise em questão e, portanto, a coluna usada na separação por 1D-GC é a mais indicada para ser a ¹D na separação por GC×GC [22].

Para a seleção da coluna usada na ²D é necessário lembrar que, no processo de modulação, a separação na ²D de cada fração transferida deve finalizar antes que a fração subsequente seja transferida. Portanto, a coluna da ²D deve ser curta e eficiente, o que não compromete a análise uma vez que o número de compostos em cada fração a ser analisada é pequeno. Também, cabe lembrar que quanto mais estreitos forem os picos na ²D, maior será o número de compostos que podem ser separados na ²D. Dessa forma, a dimensão típica de uma coluna de ²D é de 0,5 - 2 m × 0,1 mm, embora dimensões um pouco diferentes possam ser empregadas [15]. Como a eficiência da separação também está relacionada à espessura do filme de fase estacionária, colunas com filme de fase estacionária com espessura de 0,10 μm são as empregadas; para espessura de 0,18 – 0,25 μm ocorre alargamento dos picos [54].

Devido às dimensões da coluna usada como ²D, a saturação da mesma é bastante observada. A saturação acontece principalmente porque o filme de fase estacionária da ²D é da ordem de 0,10 μm e por causa da reconcentração da banda cromatográfica, que ocorre em moduladores criogênicos. A saturação produz picos que podem apresentar assimetria em ambas as dimensões, dependendo do grau de saturação em cada dimensão, conforme mostrado na Figura 13 [54]. Os principais

efeitos da saturação são a mudança no tempo de retenção na dimensão que o pico está saturado e a redução da capacidade de pico. Além disso, mudanças nos tempos de retenção em ambas as dimensões podem tornar difícil a identificação do composto em questão.

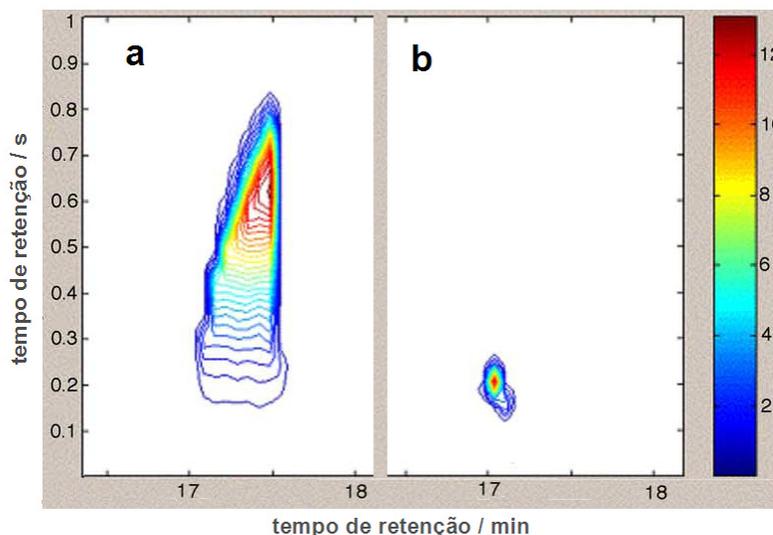


Figura 13. Influência da saturação da fase estacionária da coluna cromatográfica na retenção na 1^{D} e na 2^{D} . (a) Pico saturado em ambas as dimensões e (b) pico não saturado [54].

Com respeito à vazão do gás de arraste na GC \times GC, vale lembrar que como as colunas de 1^{D} e 2^{D} são conectadas em série, a velocidade linear em cada uma das colunas não pode ser selecionada independentemente (embora seja possível se uma válvula de divisão de fluxo for instalada entre as duas colunas [55]). Portanto, deve-se adotar um valor de compromisso para a vazão do conjunto de colunas, no qual a velocidade linear em cada dimensão será diferente do valor ótimo (normalmente maior), porém, a separação em cada dimensão não será comprometida e o tempo total de análise não será excessivo [56]. Normalmente, as separações por GC \times GC são efetuadas com velocidade linear ótima (ou um pouco maior) para a 1^{D} e muito maior que a ideal para a 2^{D} .

A vazão do conjunto de colunas pode ser calculada sob determinadas condições experimentais através da equação de Poiseuille (1) [55][57], sendo que alguns *softwares* dedicados para GC \times GC empregam tal equação para ajustar corretamente os valores de vazão e da razão de divisão do injetor. Já os *softwares* específicos para 1D-GC não calculam corretamente a vazão para o conjunto de colunas. Nesses casos, é necessário

calcular as dimensões de uma coluna que seja equivalente, em termos de resistência à passagem do gás de arraste, à coluna usada na ²D, o que pode ser feito através da equação (1).

$$F = \left[\frac{60\pi r^4}{16\eta L} \right] \left[\frac{(p_i^2 - p_o^2)}{p_o} \right] \quad (1)$$

na qual F é a vazão, r é o raio da coluna, η é a viscosidade dinâmica do gás à temperatura específica, L é o comprimento da coluna, p_i e p_o são a pressão absoluta na entrada e na saída da coluna, respectivamente.

Dessa forma, é possível obter o comprimento de uma coluna com diâmetro idêntico ao da coluna de ¹D que seja equivalente à coluna usada na ²D. Com isso, pode-se trabalhar com valores corretos para a vazão e para a razão de divisão do injetor empregando *softwares* para 1D-GC. Para um conjunto de colunas com dimensões de 30 m × 0,25 mm + 1,0 m × 0,1 mm à 180 °C, a ²D é equivalente a uma coluna de 39 m × 0,25 mm e, dessa forma, a coluna equivalente ao conjunto de colunas tem as dimensões de 69 m × 0,25 mm [55][57].

Em relação às fases estacionárias usadas em cada dimensão, o ideal é que as mesmas apresentem mecanismos de separação independentes. Basicamente, as separações em GC são baseadas em dois parâmetros: *i*) volatilidade dos analitos e *ii*) interação dos mesmos com a fase estacionária, principalmente por ligação de hidrogênio, interação $\pi - \pi$ e forças de van der Waals. Em uma coluna não polar a separação será baseada na volatilidade dos analitos, enquanto que, em todas as outras colunas (mais polares), a separação será governada pela interação dos analitos com a fase estacionária da e, também, pela volatilidade dos mesmos [58].

As fases estacionárias não (ou pouco) polares mais usadas em GC×GC são a 100% polidimetilsiloxano e a 5% polidifenilsiloxano - 95% polidimetilsiloxano, enquanto que as fases estacionárias (semi)polares mais empregadas são 50% polidifenilsiloxano - 50% polidimetilsiloxano, polietilenoglicol e 14% cianopropil-polifenilsiloxano. Com essas fases estacionárias, duas abordagens podem ser destacadas para um conjunto de colunas: *i*) ¹D apolar e ²D polar/semi-polar (apolar × polar); e *ii*) ¹D polar/semi-polar e ²D apolar (polar × apolar). Em função da ortogonalidade do conjunto de colunas, que será descrita em seguida, e pelo fato de existir uma elevada base de dados para LTPRI

em colunas de baixa polaridade, o conjunto de colunas apolar × polar é o mais empregado nas análises por GC×GC. Esse conjunto de colunas foi usado nos primeiros trabalhos de GC×GC e, por isso, é denominado conjunto de colunas *normal*, enquanto que o conjunto de colunas polar × apolar é denominado conjunto de colunas *inverso* [15].

A separação em GC×GC é considerada ortogonal quando os mecanismos de retenção das duas dimensões são completamente independentes [4]. A ortogonalidade em GC×GC é importante, visto que ela determina a magnitude do espaço de separação que será utilizado, o qual é definido como o espaço do cromatograma GC×GC que os compostos podem estar distribuídos. A correlação elevada entre os mecanismos de separação das duas dimensões reduz o espaço de separação, podendo tornar uma separação bidimensional em uma essencialmente unidimensional, na qual os analitos eluem ao longo de uma diagonal no cromatograma GC×GC [59]. Entretanto, a eficiência da separação não depende necessariamente da ortogonalidade da separação, mas sim do tipo de amostra analisada e das colunas usadas na ¹D e ²D. Dessa forma, é possível que o conjunto de colunas indicado para uma determinada separação seja parcial ou relativamente ortogonal.

Para o conjunto de colunas apolar × polar (ou *normal*) a separação pode ser considerada ortogonal, embora em teoria, os mecanismos de separação sejam relacionados. Como a fase estacionária da ¹D é apolar a separação é baseada, principalmente, na pressão de vapor dos analitos. Com isso, compostos com ¹t_R idênticos ou similares, os quais são transferidos para a ²D num mesmo ciclo de modulação, devem apresentar pressão de vapor muito semelhante. Já na ²D, cada separação pode ser considerada isotérmica, visto que em poucos segundos (valores típicos para o PM) a temperatura do forno do cromatógrafo varia menos do que 1 °C. Assim, mesmo que a fase estacionária da ²D seja polar, a influência da pressão de vapor na separação dos analitos (em uma mesma modulação) será semelhante e, com isso, cada uma das separações na ²D será baseada, majoritariamente, na interação dos mesmos com a fase estacionária. Portanto, pode-se dizer que cada uma das separações na ²D em um conjunto de colunas *normal* é, de fato, ortogonal [39]. Já com o conjunto de colunas *inverso*, a separação na ¹D (polar) é baseada na pressão de vapor dos analitos e na interação dos mesmos com a fase estacionária, enquanto que

na ²D (apolar), a separação é governada pela pressão de vapor dos analitos. Observa-se que os mecanismos de separação das duas colunas não são independentes e, portanto, a separação nesse conjunto de colunas nunca será ortogonal.

3.1.5. Estruturação cromatográfica

Os cromatogramas GC×GC podem apresentar uma característica poderosa sob o aspecto qualitativo: a estruturação cromatográfica [14]. Picos de substâncias relacionadas estruturalmente, como séries homólogas, isômeros de cadeia ou de posição, aparecem agrupados em regiões claramente definidas do diagrama GC×GC. Picos de compostos similares se agrupam sobre a superfície $^1t_R \times ^2t_R$, como mostrado Figura 14 para amostra de óleo diesel [60]. Nesse cromatograma, alcanos, alcenos e cicloalcanos encontram-se agrupados (indicados como saturados), da mesma forma que os compostos monoaromáticos, diaromáticos, diaromáticos naftênicos e triaromáticos. Para os subgrupos referentes aos compostos denominados por “saturados”, a numeração corresponde ao número total de átomos de carbono da molécula, enquanto que para os demais subgrupos, a numeração corresponde ao número de átomos de carbono a mais na molécula, em relação à estrutura básica que define o grupo. Para o subgrupo 1 dos “triaromáticos”, os compostos correspondem aos isômeros com um grupo metila a mais em relação à estrutura triaromática.

O agrupamento dos compostos resulta no “efeito telhado”, no qual cada conjunto de “telhas” corresponde a isômeros com propriedades químicas similares (número de átomos de carbono na molécula) [61]. A estruturação cromatográfica já havia sido prevista teoricamente [4], sendo perceptível apenas em amostras ricas em isômeros ou espécies de outra forma relacionadas entre si. Como em GC×GC o número de picos detectáveis tende a ser muito maior que em 1D-GC, a presença da estruturação cromatográfica pode ser de grande valia na identificação dos analitos. Nesse caso, identificando alguns compostos em uma das “telhas”, é possível inferir informações estruturais dos outros compostos da mesma “telha”.

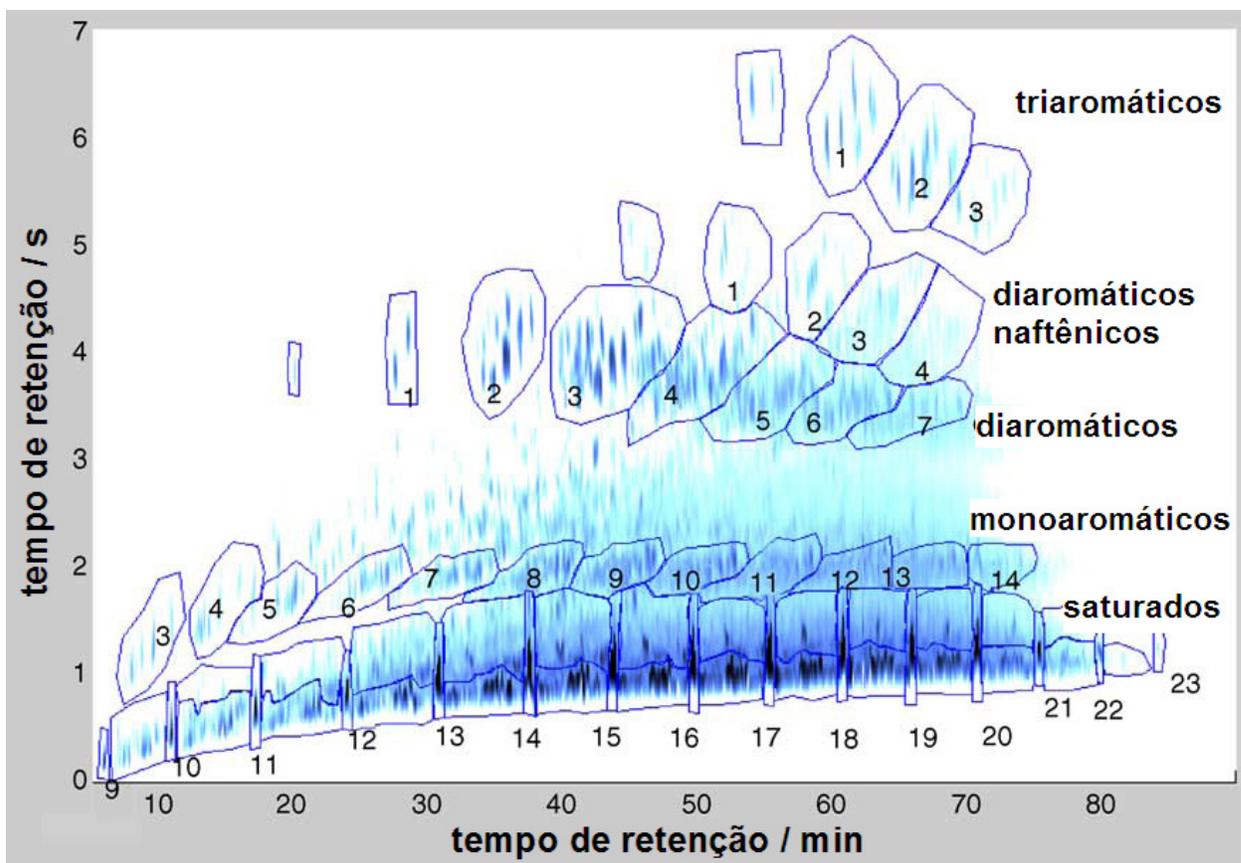


Figura 14. Estruturação cromatográfica em cromatograma GCxGC de óleo diesel. Adaptado de Vendevre *et al.* [60].

A estruturação cromatográfica pode ser observada tanto com conjunto de colunas *normal* ou *inverso*. Em teoria, a posição de eluição dos compostos no cromatograma GCxGC obtido com o conjunto de colunas *normal* pode ser resumida conforme mostrado na Figura 15(a) [62]. Em função do mecanismo de separação da ²D em um conjunto de colunas *normal*, os compostos mais retidos na ²D são compostos mais polares; já referente à ¹D, compostos menos voláteis serão mais retidos, uma vez que o mecanismo de separação na ¹D é baseado na pressão de vapor dos analitos. Portanto, o cromatograma GCxGC pode ser dividido em quatro partes, que revelam a volatilidade e a polaridade do composto de acordo com a posição de eluição do mesmo. Contudo, a obtenção do cromatograma GCxGC tal qual mostrado na Figura 15(a) só será possível se nenhum pico estiver fora de ciclo e, também, se a diminuição da volatilidade dos compostos ao longo da corrida for exatamente compensada pelo aumento da temperatura do forno do cromatógrafo.

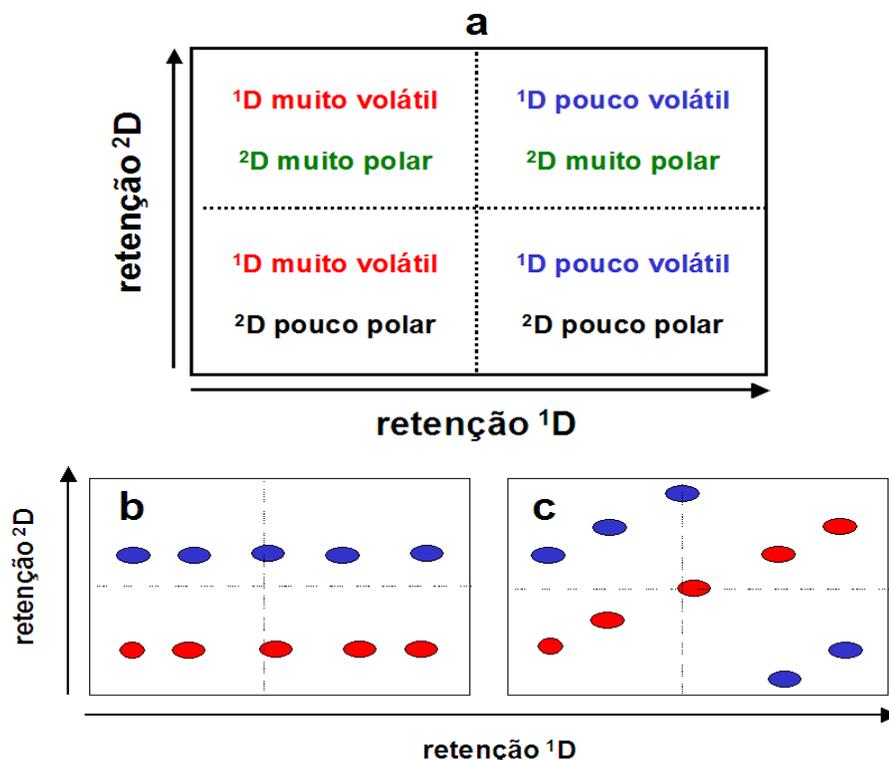


Figura 15. (a) Cromatograma GC×GC referente às propriedades químicas dos analitos no cromatograma GC×GC para o conjunto de colunas *normal*; separação (b) com ajuste da programação da temperatura do forno do cromatógrafo e (c) sem ajuste. Manchas em vermelho representam série homóloga de alcanos lineares e manchas em azul, alcoóis lineares.

O seguinte exemplo ilustra melhor o efeito da programação da temperatura do forno do cromatógrafo na posição de eluição dos compostos. Para uma dada série homóloga, o aumento do ponto de ebulição dos compostos é diretamente proporcional ao aumento da cadeia carbônica; entretanto, a polaridade dos compostos dessa série praticamente não é alterada. Assim, se o aumento da temperatura do forno do cromatógrafo for similar ao aumento do ponto de ebulição dos compostos eluídos, a influência da temperatura na retenção na ²D (não apenas em uma modulação, mas em toda a análise) será idêntica para todos os compostos. Com isso, a separação na ²D será governada pela interação dos compostos com a fase estacionária e, portanto, compostos com polaridade semelhante (como o caso de uma série homóloga) devem apresentar, praticamente, o mesmo ²t_R [22].

Na Figura 15(b,c) está mostrada a separação hipotética dos compostos de uma série homóloga de alcanos lineares (em vermelho) e de alcoóis lineares (em azul). Em ambos os casos, a separação dos compostos foi efetiva. Em (b) a programação da

temperatura do forno do cromatógrafo foi ajustada para compensar o aumento do ponto de ebulição dos compostos da série. Assim, a influência da temperatura na separação dos compostos na ²D é idêntica para todos os compostos da série. Portanto, a separação será baseada, principalmente, na polaridade dos compostos durante toda análise (e não apenas em um ciclo de modulação). Portanto, os compostos com polaridade similar eluem paralelamente ao eixo “x”, apresentando praticamente o mesmo ²t_R.

Em (c), a programação da temperatura do forno não foi ajustada corretamente. Embora a separação em cada uma das frações seja considerada isotérmica, ao longo do cromatograma a influência da temperatura não é idêntica para todos os compostos da série homóloga. Observa-se que os compostos polares são mais retidos que os menos polares, contudo, o ²t_R para compostos com polaridade semelhante são muito diferentes. Ainda, os picos de alguns alcoóis estão fora de ciclo. Nesse caso, o cromatograma GC×GC mostrado em (a) não pode ser aplicado para inferir as propriedades químicas dos compostos no cromatograma GC×GC (c). Por outro lado, a separação com um conjunto de colunas *inverso* não pode ser representada na forma de quadros como mostrada na Figura 15(a), isso porque a ordem de eluição na ¹D não depende apenas de uma propriedade físico-química.

A estruturação cromatográfica pode ser observada em diversas amostras, porém, o “efeito telhado” é comum em amostras de origem petroquímica [15], visto que essas amostras são constituídas de dezenas ou centenas de isômeros. A estruturação cromatográfica também é observada em amostras de plantas e/ou alimentos. Todavia, devido ao menor número de isômeros presentes nessas amostras em relação às de origem petroquímica, nem sempre a estruturação fica evidente no cromatograma.

No caso de óleos essenciais, nos quais a maioria dos compostos são terpenos, é possível obter estruturação de acordo com as classes de terpenos presentes no óleo essencial. Na Figura 16(a) está mostrado um cromatograma GC×GC de óleo essencial de eucalipto [63], no qual a posição de eluição dos monoterpenos não oxigenados está marcada por uma elipse (D), tal qual ocorre com os sesquiterpenos não oxigenados (G). Para os monoterpenos oxigenados é possível observar a separação em função do grupo funcional presente na molécula (E = alcoóis de monoterpenos, F = acetatos de monoterpenos), ao contrário do observado para o grupo de sesquiterpenos (H)

oxigenados. Ainda, outros compostos não terpênicos como alcoóis (A), aldeídos (B) e acetatos (C) presentes na amostra também podem ser agrupados. Nesses casos, a estruturação permite inferir à que classe de compostos, porém, informações mais específicas não são obtidas.

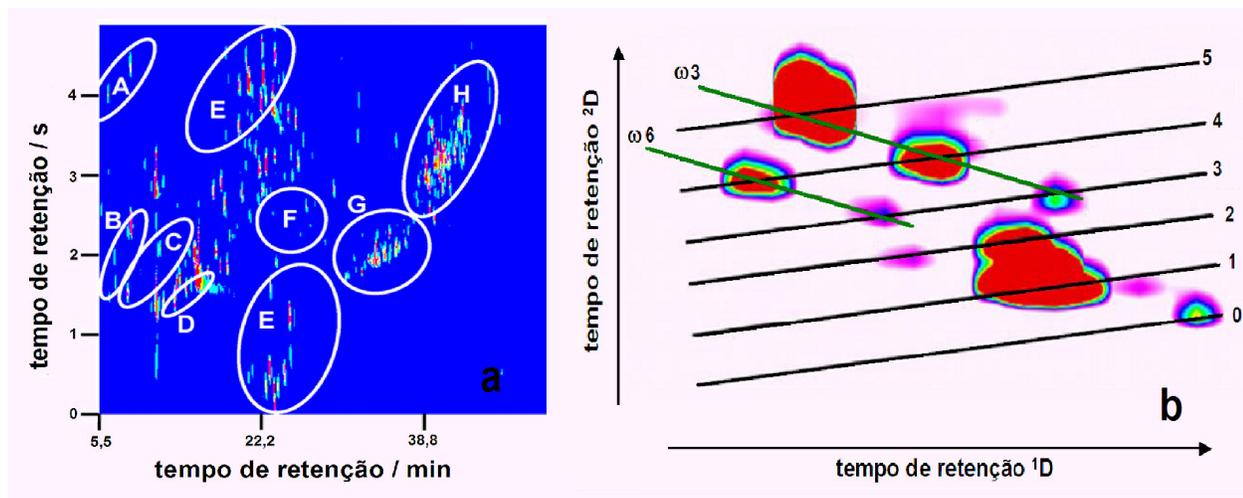


Figura 16. (a) Cromatograma GC×GC de óleo essencial de folhas de eucalipto. A = alcoóis lineares, B = aldeídos, C = acetatos, D = monoterpenos não oxigenados, E = alcoóis de monoterpenos, F = acetatos de monoterpenos, G = sesquiterpenos não oxigenados, H = sesquiterpenos oxigenados [63]. (b) Corte de cromatograma GC×GC de ésteres metílicos derivados de ácidos graxos com 20 átomos de carbono. Linhas pretas indicam a posição de eluição em relação ao número de insaturações na molécula, enquanto que linhas em verde indicam a posição da insaturação [64].

Na Figura 16(b) está mostrado parte do cromatograma de óleo de fígado de bacalhau obtido com conjunto de colunas *normal*, no qual os ácidos graxos da amostra foram convertidos em ésteres metílicos [64]. Nessa parte do cromatograma GC×GC está mostrado o grupo dos ésteres derivados dos ácidos graxos com 20 átomos de carbono (esse tipo de agrupamento também é visualizado para ésteres com mais e menos átomos de carbono). Observa-se que os ésteres metílicos encontram-se ordenados no espaço de separação de acordo com o número de insaturações na molécula (marcadas por linhas pretas) e a posição das insaturações (linhas verdes). Assim, se alguns dos compostos desse grupo forem identificados, é possível definir as linhas relacionadas ao número e posição das insaturações e, em seguida, identificar os demais picos sem a necessidade de usar padrões ou detecção por MS.

3.1.6. Processamento dos dados

Da mesma forma que em 1D-GC, os cromatogramas obtidos em GC×GC contêm informações qualitativas e quantitativas sobre a composição da amostra cromatografada. Entretanto, a forma de obtenção dos resultados a partir dos cromatogramas GC×GC é bastante diferente daquela empregada convencionalmente. Para realizar a identificação de um analito através de 1D-GC ou de GC×GC é desejável, mas não imprescindível, que este esteja resolvido dos demais compostos presentes na amostra. O cálculo de resolução para 1D-GC é feito, conforme a equação (2), levando em consideração um pico “vizinho” ao analito, sendo possível apenas um pico “vizinho” antes e outro após a eluição do analito. Entretanto, em GC×GC mais de um pico pode ser considerado vizinho do analito e, portanto, o conceito de resolução deve ser redefinido. Duas formas de calcular a resolução para GC×GC já foram propostas, porém não se possa afirmar qual delas é a mais adequada. Adam *et al.* [65][66] calcularam a resolução para GC×GC através da média euclidiana da resolução em cada uma das dimensões ($R_{s,x}$ e $R_{s,y}$), mostrada nas equações (3) e (4).

$$R_s(A, B) = \sqrt{\left(\frac{2\delta_{tR}}{\omega_A + \omega_B}\right)^2} \quad (2)$$

$$R_{s,x}(A, B) = \sqrt{\left(\frac{2\delta_{tR,x}}{\omega_{A,x} + \omega_{B,x}}\right)^2} \quad (3)$$

$$R_{s,y}(A, B) = \sqrt{\left(\frac{2\delta_{tR,y}}{\omega_{A,y} + \omega_{B,y}}\right)^2} \quad (4)$$

nas quais $\delta_{tR,x}$ e $\delta_{tR,y}$ são as diferenças entre os tempos de retenção dos compostos A e B nos eixos x e y, respectivamente; $\omega_{A,x}$ e $\omega_{B,x}$ são as larguras de pico para A e B na 1D, assumindo que elas são iguais ao produto entre período de modulação e o número de modulações para um mesmo composto; $\omega_{A,y}$ e $\omega_{B,y}$ são as larguras para o pico modulado mais intenso dos compostos A e B. Uma outra forma de calcular a resolução é baseada no conceito razão “vale-pico” [67]. Na teoria da razão “vale-pico” uma reta é traçada entre os máximos dos picos dos dois compostos, sendo identificado o ponto de menor intensidade sobre a reta. Para o cálculo da resolução emprega-se a distância entre os máximos dos dois picos e o ponto de menor intensidade e, também, os valores

de intensidade nesses três pontos. Os valores de resolução obtidos dessa forma podem ser aplicados tanto a separações em uma ou em duas dimensões. Peters *et al.* [68] mostraram que a resolução calculada através da razão “vale-pico” é válida apenas para picos (ou manchas no caso de GC×GC) gaussianos; porém, com pequenas modificações na forma de calcular a razão “vale-pico”, pode-se calcular a resolução para picos não gaussianos. Além disso, os autores definiram um novo conceito de “vizinhança” para GC×GC, visto que um composto pode ter mais que apenas dois “vizinhos”.

Outra modificação necessária para GC×GC refere-se ao uso de índices de retenção de Kováts [69] ou aos LTPRI [70] para a identificação de analitos. Em 1D-GC esses índices são bem estabelecidos e podem ser empregados para a retenção na ¹D em um cromatograma GC×GC [63]. Contudo em GC×GC a retenção é caracterizada por dois valores independentes (¹t_R e ²t_R) e, em decorrência disso, ainda encontra-se em estudo um sistema similar de índices de retenção para a ²D que seja universalmente aceito. Western e Marriott [71][72] propuseram um novo conceito de índices de retenção exclusivo para GC×GC, os chamados mapas de retenção, que possibilitam os cálculos dos índices de retenção na ²D. Bieri e Marriott [73] desenvolveram mapas de retenção múltiplos, empregando um sistema GC×GC no qual o eluato da ¹D foi transferido para duas diferentes ²D, através de um divisor em forma de “y”. Desta forma, foi possível obter índices de retenção para a ¹D e dois diferentes índices de retenção para a ²D. Posteriormente, os mesmos autores [74] utilizaram dois injetores, dois detectores e outras pequenas modificações no sistema para obter de forma mais correta os valores de índices de retenção para ¹D e ²D, eliminando erros de até 20 unidades nos índices de retenção de ¹D observados por outros autores [75].

A Figura 17(a) mostra um cromatograma GC×GC para séries homólogas de alcanos, resultando no mapa de retenção para ambas as dimensões. A linha mais escura representa a injeção de uma solução de alcanos lineares entre 10 e 23 átomos de carbono, para calcular os LTPRI na ¹D. Para calcular os índices de retenção na ²D é necessário construir curvas de isovolatilidade para alguns alcanos. Para construção de tais curvas, séries de alcanos são injetadas em intervalos de tempo definidos, preferencialmente por SPME. A Figura 17(b) mostra um cromatograma da ²D referente à injeção de uma das séries de alcanos. A união entre os pontos referentes a cada

alcano resulta na curva de isovolatilidade desse composto, como representado pelas linhas mais finas na Figura 17(a), definindo o 2t_R do alcano para qualquer valor de 1t_R . Como diversas curvas são geradas no espaço de separação, é possível calcular, por interpolação entre duas curvas, o índice de retenção na 2D de um composto desconhecido. Mesmo que bem fundamentada sob o aspecto teórico e com algumas limitações práticas, esta sistemática ainda não foi suficientemente avaliada para que sejam averiguadas suas potencialidades e limitações. Para obtenção de valores corretos dos índices de retenção em ambas as dimensões é obrigatório verificar se o pico não está fora de ciclo.

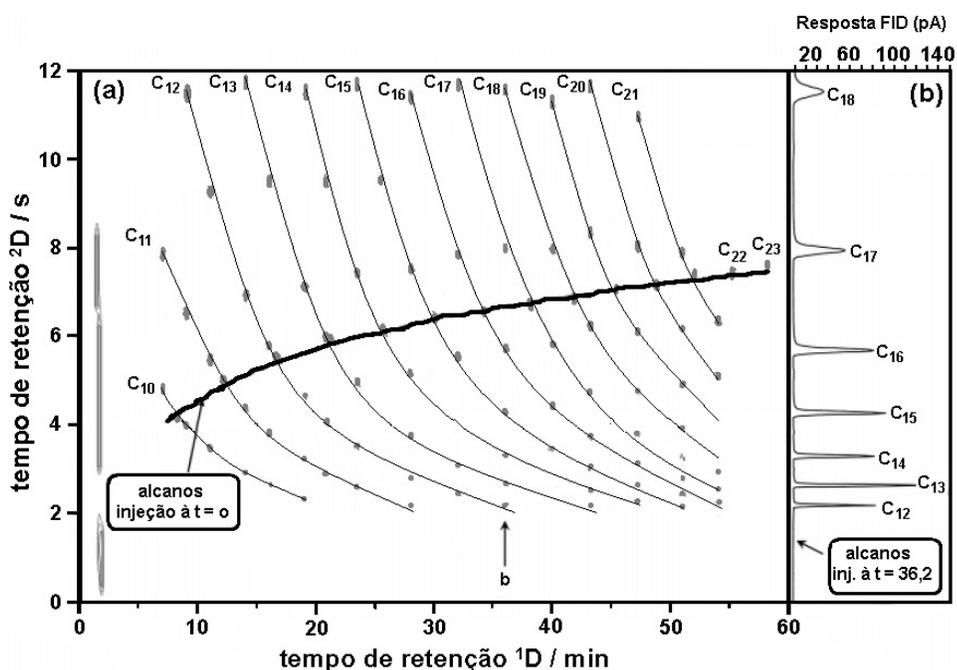


Figura 17. (a) Mapa de retenção para cálculo dos índices de retenção na 1D e 2D (adaptado de Bieri e Marriott [74]). Linha espessa mostra mapa de retenção para a 1D obtido com injeção de série homóloga de alcanos (C₁₀-C₂₃) em $t = 0$ min. Linhas finas obtidas com múltiplas injeções por SPME de série homóloga de alcanos (diferente composição em cada injeção), formando as curvas de isovolatilidade para cada alcano. (b) Cromatograma referente à injeção de alcanos (C₁₂-C₁₈) por SPME a 36,2 min de análise.

Da mesma forma que em 1D-GC, a identificação confiável de picos em GC×GC demanda a combinação dos dados de retenção e da identificação por MS. Entretanto, como discutido anteriormente, a quantidade de informação nos diagramas gerados por esses sistemas requer estratégias diferenciadas para sua avaliação, sendo absolutamente imprescindível a adoção de rotinas computacionais com alto grau de

automação. O uso de algumas ferramentas quimiométricas é a abordagem ideal para o volume de dados gerados, porém não será discutida. Dallüge *et al.* [76] detalharam algumas abordagens possíveis. Se as espécies de interesse para o problema em questão – i.e., os analitos-alvo – já são conhecidos (por exemplo, detecção e identificação de um fármaco, seus metabólitos e contaminantes na urina de pacientes sendo tratados com medicamentos conhecidos), o processamento é relativamente simples e rápido. Neste caso, os tempos de retenção aproximados nas duas dimensões e espectros de massas de referência dos analitos-alvo seriam determinados preliminarmente, com uso de padrões. Para as amostras, seriam inspecionados e comparados com espectros de referência apenas os espectros correspondentes a picos pré-detectados com retenção próxima à de analitos-alvo.

Outro caso seria a varredura (*screening*) de amostras pouco conhecidas ou onde não existir possibilidade de definição prévia de analitos-alvo. Para essas análises, deve-se objetivar a identificação do maior número de picos possível dentre todos aqueles pré-detectados. Pela complexidade e pelo grande número de picos nos cromatogramas GC×GC, essa tarefa demanda muitas horas de processamento, mesmo em microcomputadores poderosos. De forma semelhante ao que ocorre em GC-MS, é conveniente que os resultados de algoritmos de identificação sejam, tanto quanto possível, confirmados e, eventualmente, refinados por inspeção manual. Vale lembrar que a estruturação cromatográfica presente na GC×GC facilita a análise qualitativa: a identificação de um ou mais picos de um grupo pode fornecer informações sobre a estrutura das demais espécies do grupo, evitando atribuição errônea da identidade dos compostos.

A quantificação em GC×GC depende da medida da área dos picos detectados - ou, mais corretamente, do seu volume, já que aqui eles são definidos em três dimensões ($\text{sinal} \times {}^1t_R \times {}^2t_R$). A forma mais fácil de integração de picos de GC×GC é pela soma das áreas dos picos modulados usados para construir o cromatograma GC×GC: algoritmos apropriados detectam os pontos de início e fim dos picos e somam os sinais entre os dois pontos, descontando a área sob a linha de base. Embora essa tarefa possa ser feita através da adaptação de algoritmos usuais de processamento de dados, existem softwares específicos para integração de picos de GC×GC [31] e

algumas ferramentas quimiométricas também podem substituir a integração convencional.

Qualquer que seja a forma de medida dos volumes dos picos, a exatidão e precisão de GC×GC é equivalente à de 1D-GC. Beens *et al.* [23] compararam a quantificação de misturas de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos por GC×GC-FID e por GC-FID. As concentrações obtidas por ambas as técnicas foram equivalentes e a repetibilidade dos resultados (expressa como estimativa dos desvios-padrão relativos) variou de 0,24 % a 2,33 % - mesma ordem de grandeza de 1D-GC. Quanto a sensibilidade, ela é incrementada em GC×GC: a compressão das bandas cromatográficas na modulação gera picos mais altos, melhorando as razões sinal/ruído. Isso foi demonstrado por de Geus *et al.* [77], que observaram um aumento de 50 vezes na altura de um pico de n-dodecano em GC×GC quando comparada a eluição em 1D-GC, porém sem alterações em sua área. Lee *et al.* [78] demonstraram que com períodos de modulação curtos o incremento na altura é menor; porém, a melhoria nas razões sinal / ruído nunca é numericamente igual ao aumento na altura dos picos. Uma explicação é que para registrar picos estreitos, o sinal do detector deve ser coletado com maior frequência, o que aumenta o nível de ruído registrado. Ainda assim, a sensibilidade típica em GC×GC-FID é 4 a 5 vezes melhor que a de GC-FID.

A quantificação por GC×GC-qMS tem sido investigada devido ao número de pontos necessários para definir um pico. Cordero *et al.* [79] compararam o número de pontos por pico obtidos através da varredura de íons entre os valores de m/z 40-240 e pelo modo de íons selecionados. Em média, 14 pontos por pico foram obtidos para os dois modos de aquisição e, mesmo que exista divergência quanto ao número mínimo de pontos por pico para quantificação, esse valor foi considerado pequeno. Assim, para a quantificação dos compostos o detector qMS foi preterido em relação ao FID, devido ao maior número de pontos por pico, maior robustez e faixa linear.

Debonneville e Chaintreau [80] empregaram o modo de íons selecionados com taxa de aquisição de 30,7 Hz, o que resultou na aquisição de 28 pontos para um pico de limoneno, sendo observados três picos modulados. O desvio padrão relativo para os valores de área de cada um dos picos modulados (cinco replicatas) variou entre 16% e 169%, enquanto que o desvio padrão relativo da soma das áreas dos três picos modulados foi de cerca de 4%, valor aceitável para fins quantitativos.

Capítulo 4:

MATERIAIS E MÉTODOS

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais, reagentes e amostras

Todos os reagentes empregados foram grau P.A. ou superior. A fibra de SPME empregada foi a DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno/ carboxen/ polidimetilsiloxano), adquirida junto a Supelco (Bellefonte, Pensilvânia, EUA), bem como o próprio *holder*. A fibra foi condicionada de acordo com as recomendações do fornecedor antes de ser utilizada. Para a obtenção dos LTPRI foi empregada a solução de alcanos lineares entre 8 e 20 átomos de carbono (Fluka, Steinheim, Suíça).

As amostras de gasolina foram cedidas pela Central Analítica (CA/UNICAMP). As amostras de gasolina foram armazenadas a 4 °C previamente às análises. Abacaxi fresco (*Ananas comosus* L. Merr), denominado no comércio por “abacaxi hawaii”, foi obtido diariamente no mercado local, em grau de maturação no qual cerca de 50% da casca apresenta coloração laranja e 50% coloração verde. Abacaxi desidratado “Nostro Campo” (Pinheiro Preto, SC, Brasil) também foi obtido no comércio local. Para triturar as amostras foi utilizado um liquidificador com copo de aço-inox, específico para o uso em laboratório (Waring Commercial, Connecticut, EUA). As amostras de óleo essencial de virola (*Virola surinamensis*) e de macacaporanga (*Aniba parviflora*), obtidas através de hidrodestilação das folhas frescas de cada planta, foram cedidas pelo prof. Lauro E. Barata.

4.2. Protótipo GC×GC-FID

O protótipo GC×GC empregado em testes iniciais (protótipo GC×GC versão 1) consistiu em um cromatógrafo a gás HP 5890 (Wilmington, DE, EUA) com detector FID e equipado com injetor do tipo *split-splitless*. Para as demais versões (protótipos GC×GC versões 2 a 4) foi usado um Cromatógrafo a gás Agilent 6890 (Wilmington, DE, EUA) com detector FID e injetor *split-splitless*. A usinagem da peça de aço para confecção dos moduladores projetados foi feita na Oficina de Mecânica Fina do Instituto de Química (IQ-UNICAMP). O modulador projetado (nas diferentes versões) foi baseado no princípio do modulador *quad jet* descrito na literatura [33]. Ao contrário dos

demais, os moduladores projetados envolvem a coluna cromatográfica, formando câmaras nas quais ocorre o processo de modulação. Foi usado $N_2(g)$ resfriado em $N_2(l)$ como fluido criogênico e $N_2(g)$ aquecido como gás quente. Os gases usados para a modulação foram controlados por duas válvulas solenóides de três vias (Ascoval Ind. e Com. Ltda, Brasil). O controle do sistema GC×GC foi baseado na plataforma LabVIEW® e foi utilizado o conversor AD/DA de 16 bits National Instruments DAQ-PAD6015 (Austin, TX, EUA). O diagrama genérico do protótipo GC×GC está mostrado na Figura 18.

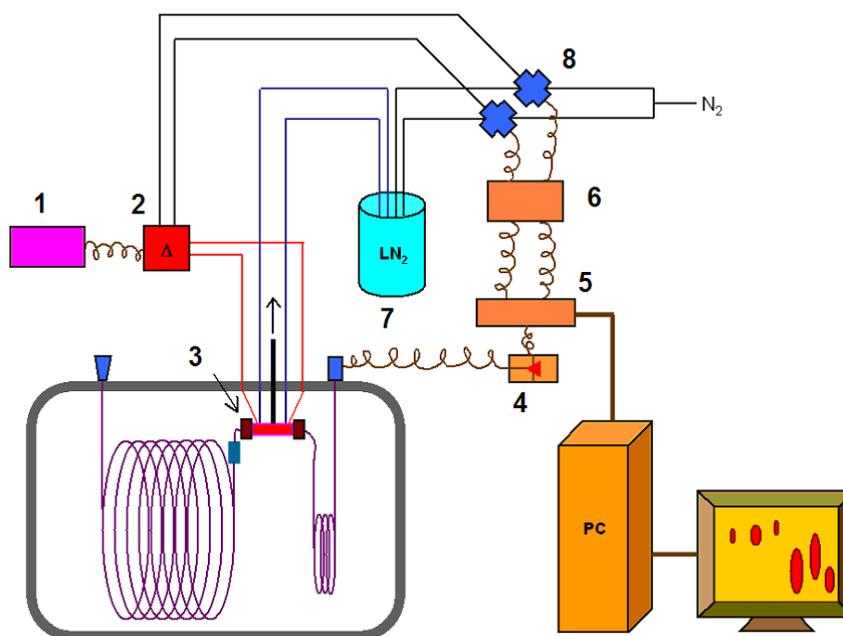


Figura 18. Diagrama geral do protótipo GC×GC-FID. (1) sistema de controle de aquecimento, (2) sistema de aquecimento, (3) modificador, (4) amplificador, (5) conversor AD/DA, (6) relês, (7) dewar, (8) válvulas solenóides 3 vias.

A aquisição dos dados digitalizados do sinal do detector, o controle das válvulas solenóides e a sincronização entre o início da operação das válvulas com o início da corrida cromatográfica foram feitos empregando o *software* LabVIEW. O desenvolvimento da interface em ambiente LabVIEW foi feito pelo aluno de doutorado Ernesto Correia Ferreira. A Figura 19 mostra a tela da interface de uso. Nessa interface, antes do início da corrida o usuário deve informar o período de modulação e as frações desse período de modulação em que as seções de coleta e focalização ficam resfriadas ou aquecidas (canto esquerdo superior da tela). O estado de cada seção do modificador (aquecido ou resfriado) é monitorado pelo usuário em tempo real, através dos

indicadores coloridos no canto superior esquerdo da interface (azul = câmara resfriada; vermelho = câmara aquecida). O usuário deve informar a taxa de aquisição e o tempo total de corrida – expresso pelo número de pontos digitalizados a coletar (caixas no centro da tela). No exemplo da figura, a taxa de aquisição é de 100 Hz e o tempo total da corrida foi ajustado para 40 min (240.000 pontos a 100 Hz = 2.400 s = 40 min). A corrida pode ser abortada antes disso sem perda dos dados. O cromatograma sendo adquirido é visualizado em tempo real, na janela que ocupa a parte inferior da tela; outra janela à esquerda, no centro da tela, mostra também em tempo real uma expansão do cromatograma no eixo de tempo, cobrindo um intervalo aproximadamente igual ao do período de modulação, para melhor observação do perfil dos picos modulados.

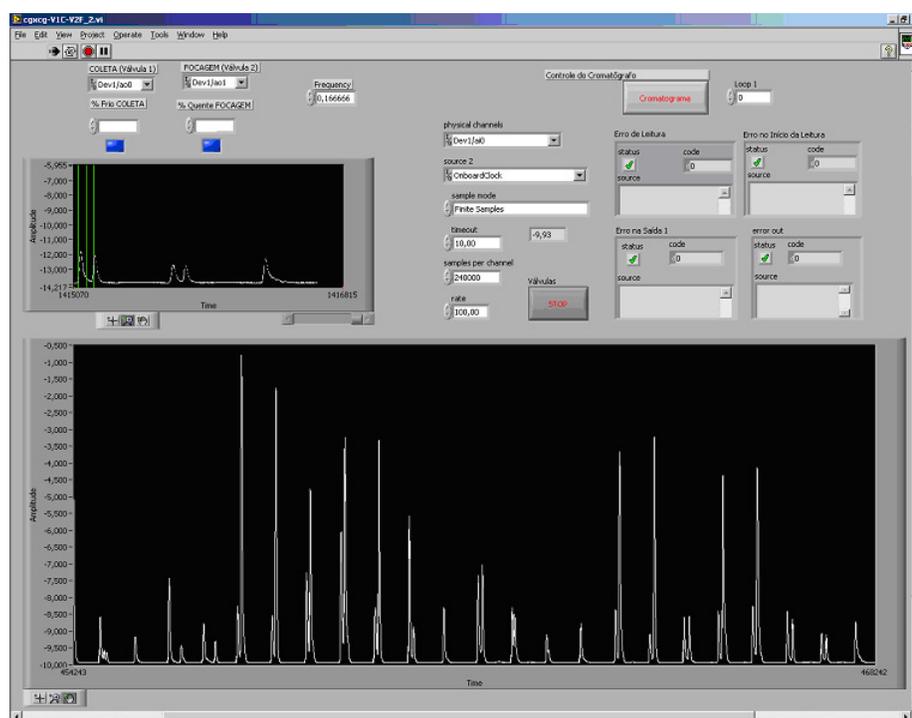


Figura 19. Interface do usuário do programa de controle e aquisição de dados do GC×GC na plataforma LabVIEW.

O sinal do detector é gravado em arquivos com formato ASCII - na forma de um vetor de números reais. O programa usado para construção dos cromatogramas GC×GC foi o MatILab, o qual importa diretamente os arquivos no formato ASCII. O vetor de dados é transformado em uma matriz, na qual o número de colunas da matriz

corresponde ao número de pontos por modulação e o número de linhas, ao número de modulações. Para uma análise de 40 minutos (2400 s) e taxa de coleta do sinal do detector a 100 Hz foram coletados 240.000 pontos. Para período de modulação de 6 s, foram feitas 400 modulações (2400 s / 6 s = 400), sendo que para cada modulação foram adquiridos 600 pontos (6 s × 100 Hz). Dessa forma, o vetor de dados de 240.000 pontos foi convertido em uma matriz de dimensões 400×600. O gradiente de cores dos cromatogramas GC×GC foi construído com 256 níveis. Não foi aplicado nenhum tipo de filtro matemático para suavizar os picos cromatográficos.

Para os testes envolvendo as amostras de gasolina, injetor e detector foram mantidos a 250 °C. Hidrogênio 5.0 foi usado como gás de arraste a 0,6 mL min⁻¹; a taxa de coleta do sinal do FID foi 100 Hz. A programação da temperatura do forno do cromatógrafo, razão de divisão no injetor e outros parâmetros cromatográficos serão descritos para cada análise apresentada. Nitrogênio proveniente da linha de gases do laboratório foi usado para os jatos quentes e frios no processo de modulação. A temperatura do bloco de aquecimento (para aquecer o N₂ (g) usado para no modulador) foi ajustada para o limite máximo de temperatura da fase estacionária das colunas de ²D.

Para as análises da fração volátil de polpa de abacaxi por GC×GC-FID, basicamente as mesmas condições descritas anteriormente foram adotadas. O injetor foi operado no modo *splitless* e o forno do cromatógrafo foi programado de 40 °C até 150 °C a 3 °C min⁻¹ e então até 250 °C a 10 °C min⁻¹. A vazão dos gases usados na modulação foi controlada através de reguladores de pressão: a pressão do gás frio foi de 9 psi na coleta e 12 psi na focagem. A pressão do gás quente foi mantida em 100 psi na coleta e focagem.

4.3. Colunas cromatográficas

Para as análises feitas por GC×GC-FID, os conjuntos de colunas empregados e as dimensões de cada coluna estão listados na Tabela 1. Além das colunas descritas para GC-MS, também foram empregadas as colunas HP-50 (50% fenil-50% dimetilsiloxano) e SPWax (polietilenoglicol). As dimensões das colunas estão descritas na Tabela 1; o comprimento apresentado para as colunas de ²D é referente ao

comprimento efetivo para separação na 2D , sendo o comprimento real 5 cm maior, devido ao setor de coluna situado dentro do modulador e antes dele.

Tabela 1. Conjuntos de colunas empregados para análises por GC×GC-FID

Conjunto	1D	2D
1	HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μ m)	SPWax (1 m × 0,1 mm × 0,1 μ m)
2	HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μ m)	HP-50 (1 m × 0,1 mm × 0,1 μ m)
3	DBWax (25 m × 0,20 mm × 0,20 μ m)	HP-5 (1 m × 0,1 mm × 0,1 μ m)

Em todos os testes realizados no sub-item “5.1. Desenvolvimento do protótipo GC×GC” foi utilizado o conjunto de colunas 1. Nas análises apresentadas no sub-item “5.2 Análise da fração volátil de polpa de abacaxi”, os três conjuntos de colunas foram avaliados.

4.4. GC×GC-FID comercial

O equipamento GC×GC-FID comercializado pela LECO[®] foi usado para comparação com o protótipo desenvolvido, no qual foi injetado óleo essencial de folhas da planta amazônica virola (*Virola surinamensis*). O equipamento possui ajuste de temperatura para a 2D (forno secundário) e para o modulador, as quais foram ajustadas 10 °C e 35 °C superior a temperatura da 1D . A programação da temperatura do forno principal foi 60 °C até 135 °C a 3 °C min⁻¹ e até 200 °C a 1 °C min⁻¹ °C. O conjunto de colunas empregado foi HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μ m) + DBWax (2,0 m × 0,1 mm × 0,10 μ m). O injetor e o detector foram mantidos a 250 °C, sendo empregada razão de divisão 1:100. H₂ foi usado como gás de arraste a 1,4 mL min⁻¹.

4.5. Cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas (GC-MS)

O GC-MS empregado para a separação e identificação dos analitos foi um Shimadzu QP 5050 (Shimadzu, Kyoto, Japão), equipado com injetor *split-splitless* e operado no modo *splitless*. Foram empregadas as colunas cromatográficas HP-5 (5%

fenil-95% dimetilsiloxano) de dimensões 30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, e DBWax (polietilenoglicol) de dimensões 25 m × 0,20 mm × 0,20 μm. A faixa de razão massa/carga avaliada foi de 40 a 350. As condições de separação foram as mesmas mencionadas para GC×GC-FID, exceto pelo detector que foi operado a 280 °C, o gás de arraste foi He a 1,0 mL min⁻¹ e, em algumas injeções, o injetor foi operado em razão de divisão 1:10.

4.6. Identificação dos analitos

A identificação dos compostos presentes na fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado foi realizada por GC-MS através da comparação entre os espectros de massas de cada eluato com os espectros da biblioteca *mainlib* do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), utilizando os programas *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System* (AMDIS) v. 2.62 e *NIST Mass Spectral Search Program* v. 2.0 (NIST, Washington - DC, EUA). Foram considerados somente picos em que a similaridade entre os espectros foi maior que 80%. Além da similaridade entre os espectros de massas, os LTPRI foram obtidos para as análises com as colunas HP-5 e DBWax. Os valores experimentais de LTPRI obtidos com coluna HP-5 foram comparados com valores de LTPRI tabelados [81], enquanto que os LTPRI obtidos na análise com coluna DBWax foram comparados com valores encontrados na literatura para compostos de polpa de abacaxi fresco analisados em coluna similar [82][83]. Para obtenção dos LTPRI, 10 μL da solução de alcanos lineares foram adicionados diretamente ao frasco de extração por SPME; o frasco foi mantido destampado por cerca de 5 minutos para evaporação de parte do solvente, antes da transferência da amostra para o frasco. Após, foi feita a análise conforme descrito no item “4.7. Microextração em fase sólida”.

A identificação dos compostos nos cromatogramas GC×GC foi feita de forma tentativa, baseada na identificação por GC-MS e na comparação dos valores de LTPRI. O procedimento para obtenção dos LTPRI para as análises por GC×GC foi feita de forma similar ao descrito para GC-MS, sendo que o ¹t_R foi utilizado para os cálculos, sem levar em consideração o ²t_R. Os valores de LTPRI obtidos nas análises por GC×GC-FID foram comparados com os LTPRI experimentais dos compostos

identificados nas análises por GC-MS; além disso, foi feita a comparação dos perfis desses cromatogramas. Dessa forma, foi possível inferir a identidade de diversos compostos nos cromatogramas GC×GC. Foram apresentados os resultados referentes aos casos em que a atribuição da identidade pode ser feita sem equívocos.

4.7. Microextração em fase sólida

As amostras de abacaxi fresco e desidratado foram trituradas imediatamente antes a cada extração. Para facilitar o processo de trituração e minimizar a perda ou degradação dos voláteis, barras de gelo seco foram trituradas juntamente com as amostras. Após sublimação do gelo seco, 1,5 g da amostra foram transferidas para o frasco de extração.

A extração da fração volátil da polpa de abacaxi foi feita por DHS-SPME. O sistema para D-HS-SPME, mostrado na Figura 20(a), consiste em um frasco de 5 mL com uma tampa de Teflon modificada, com dois orifícios, que permite a passagem de um gás para purgar o *headspace* da amostra. O gás arrasta os compostos voláteis da amostra através de um tubo de vidro (50 mm comprimento × 1 mm d.i. × 5 mm d.e.), no qual a fibra de SPME está exposta para coletar os analitos. Ar pré-aquecido por imersão do tubo de transferência em um banho termostatizado foi usado como gás de purga. Para propulsão do ar foi usada uma bomba peristáltica de dois canais (Ismatec, Zurique, Suíça), a qual mantinha a vazão de aproximadamente 5 mL min⁻¹. Para a extração, o sistema foi mantido a 60 °C por 5 minutos sem a passagem do gás de purga - Figura 20(b); em seguida a bomba peristáltica foi acionada e a fibra foi exposta ao gás de purga por 15 min - Figura 20(c) - e, posteriormente, inserida por 2 minutos no injetor do cromatógrafo a gás para dessorção dos analitos.

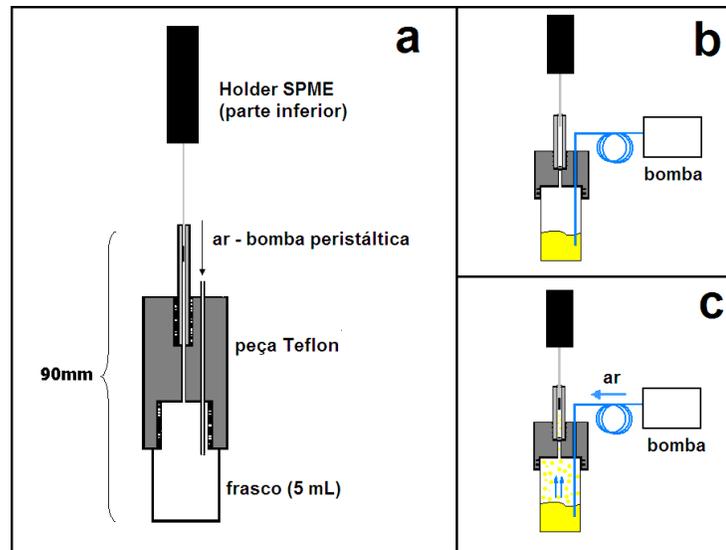


Figura 20. (a) Dispositivo para D-HS-SPME. (b) Sistema D-HS-SPME em repouso e (c) em operação.

Capítulo 5:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. Resultados e Discussão

5.1. Desenvolvimento do protótipo GC×GC

Conforme mencionado nos objetivos desse trabalho, o protótipo GC×GC-FID disponível no laboratório apresentava algumas limitações quanto ao desempenho. Dentre os moduladores apresentados na literatura, o modulador *quad jet* (dois jatos frios e dois jatos quentes) apresenta os melhores resultados, bem como maior flexibilidade para os parâmetros envolvidos na modulação. Com isso, o design baseado em quatro jatos foi escolhido para o desenvolvimento do modulador. O modulador mostrado na Figura 21 (denominado de modulador “A”) foi o terceiro modulador projetado; entretanto, foi o primeiro a ser instalado no cromatógrafo e avaliado. Esse modulador foi instalado no GC-FID HP 5890, sendo essa configuração denominada de protótipo GC×GC versão 1, uma vez que ao longo do desenvolvimento do projeto modificações foram feitas nos protótipos. Para avaliação do desempenho do modulador foram utilizadas amostras de gasolina. Uma vez que essa amostra foi bastante avaliada em outros trabalhos presentes na literatura, a comparação entre os cromatogramas GC×GC pode ser útil para a avaliação do desempenho do modulador. Também foram empregadas amostras de óleos essenciais para avaliação do desempenho do modulador para compostos mais polares e com maior ponto de ebulição.

5.1.1. Protótipo GC×GC versão 1 (modulador “A” – HP 5890)

Um desenho do modulador “A” está mostrado na Figura 21(a). O modulador “A” foi confeccionado em uma barra de inox em formato hexagonal de 4,8 mm de diâmetro, com comprimento total de 25 mm. Um orifício de 1,6 mm de d.i. foi feito longitudinalmente na peça. Dois orifícios de 3 mm de diâmetro foram feitos em cada uma das extremidades da peça e outro orifício idêntico foi feito no centro da peça. Na Figura 21(b - d) estão mostradas as vistas lateral, superior e frontal do modulador, respectivamente. Tubulações de aço foram soldadas com solda-prata nos orifícios para condução dos gases quentes e frios usados para o processo de modulação. A entrada

dos gases ocorre pelos tubos situados em ambas as extremidades da peça e a saída dos gases, pelo tubo central. Dessa forma, de acordo com a passagem dos gases a peça pode ser dividida em duas câmaras, denominadas de câmaras de coleta e de focagem. Em cada uma das câmaras há uma entrada de $N_2(g)$ resfriado em $N_2(l)$ [a,b na Figura 21(c) e (d)], uma entrada de gás aquecido (c,d), sendo a saída desses gases comum às duas câmaras [tubo central(e)].

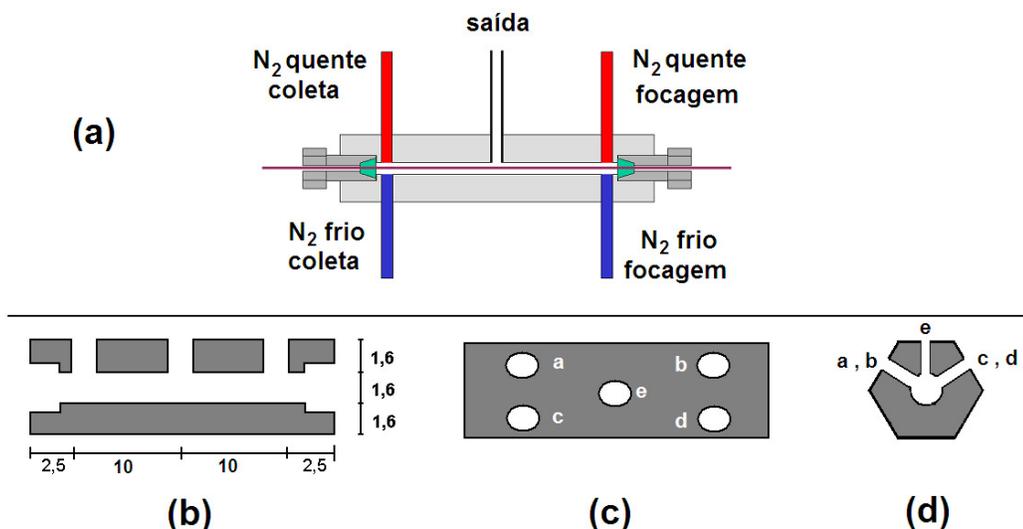


Figura 21. Diagrama do modulador "A". (a) Desenho do modulador com tubos para entrada e saída dos gases; (b) vistas lateral, (c) superior e (d) frontal do modulador, sem os tubos. Dimensões em mm.

O $N_2(g)$ foi aquecido através da passagem por uma serpentina de cobre com comprimento de 1,0 m e diâmetro interno de 6 mm, imersa em um banho de areia aquecido por um bloco de aquecimento com controle de temperatura entre 20-400 °C. Para o resfriamento do $N_2(g)$, duas espirais idênticas àquelas descritas foram imersas em $N_2(l)$. Duas válvulas solenóides foram utilizadas para direcionamento dos gases, uma para o controle dos gases usados na coleta e outra para aqueles usados na focagem. Essas válvulas foram posicionadas antes do $N_2(g)$ ser aquecido ou resfriado, pois assim evitou-se o uso de válvulas criogênicas. O acionamento das válvulas faz com que ora a câmara de coleta esteja preenchida pelo gás quente, ora pelo gás frio; alternada e sincronizadamente, a câmara de focagem também é preenchida pelos gases, repetindo este processo por todo o tempo da análise. A disposição das válvulas foi avaliada durante os testes iniciais. A vazão dos gases foi controlada através de

reguladores de pressão. Tanto o modulador quanto os tubos para condução dos gases, estes isolados termicamente, foram introduzidos e fixados no forno do cromatógrafo através de uma abertura superior na parede do forno. O início da coluna da ²D foi posicionado no interior do modulador e a coluna foi fixada nas extremidades do mesmo utilizando porcas e anilhas de grafite.

O cromatograma mostrado na Figura 22 foi obtido com o protótipo GC×GC versão 1 durante a otimização das condições cromatográficas e dos parâmetros do modulador. Uma vez que o cromatograma GC×GC apresentado na Figura 22 difere bastante dos cromatogramas de gasolina apresentados na literatura, diversos testes foram conduzidos com a amostra teste para o estabelecimento das condições gerais de uso deste modulador. A vazão dos gases foi ajustada para que não ocorresse retenção excessiva dos compostos e, com isso, foi observada a duplicação dos picos no cromatograma GC×GC, fenômeno descrito como *solute breakthrough*. Este fenômeno indica que, em alguma etapa do processo de modulação a temperatura dos jatos criogênicos não é tão baixa para a completa retenção dos analitos na coluna capilar.

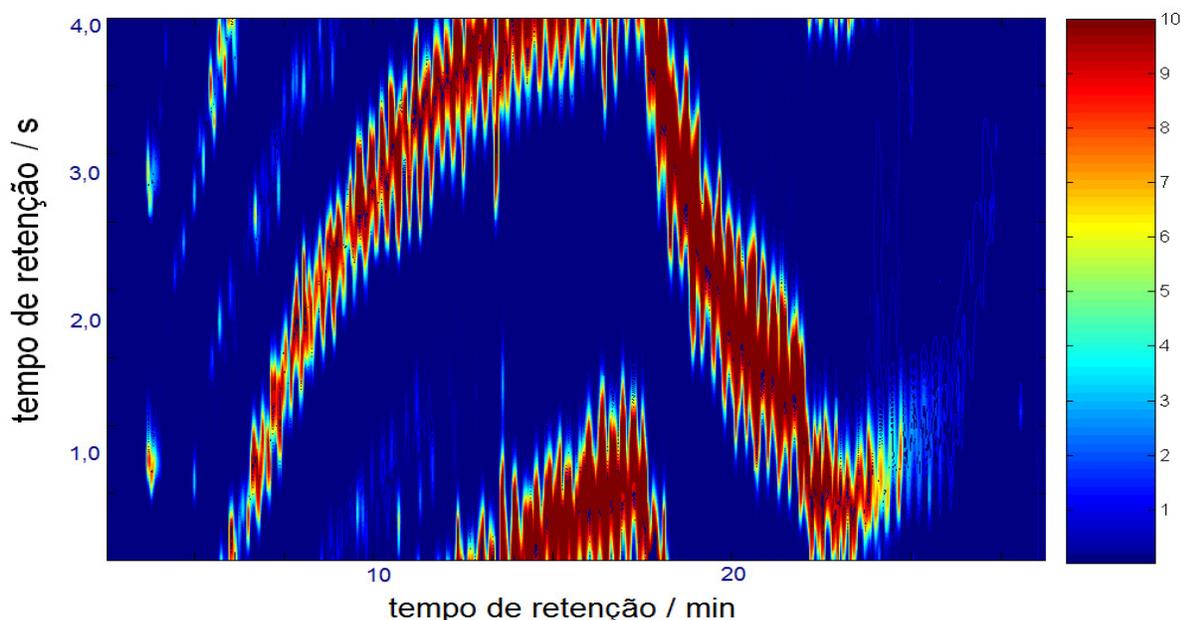


Figura 22. Cromatograma de gasolina obtido com o protótipo GC×GC versão 1 sem otimização das condições de separação e dos parâmetros do modulador. HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) + DBWax (1,0 m × 0,10 mm × 0,10 μm). Programação do forno do GC: 60 °C até 160 °C a 6 °C min⁻¹ até 240 °C (3 min) à 20 °C min⁻¹; razão de divisão do injetor 1:100; 0,6 μL de amostra; PM 4 s. Gases coleta: quente 15 psi – frio 10 psi; gases focagem: quente 15 psi – frio 15 psi. Tempo incidência dos gases: coleta 3 s; focagem 1 s.

O seguinte problema foi constatado: quando ocorria a inversão dos jatos (quentes e frios) na coleta e na focagem, em alguns casos, parte dos analitos mais voláteis não era aprisionada na focagem, sendo transferida diretamente para a segunda coluna, o que resultava na duplicação dos picos na 2D . Esse processo ocorreu porque a câmara de focagem estava mais quente do que o necessário para reconcentrar os compostos. Assim, determinou-se que a operação desse modulador deve ser diferente daquela dos moduladores criogênicos convencionais, no qual o ciclo de modulação é simplesmente dividido em períodos seqüenciais de coleta e de focagem.

Entre as etapas de coleta (Figura 23a) e de focagem (Figura 23c) foi necessário introduzir uma etapa curta – de 300 ms a 600 ms – com resfriamento simultâneo das duas câmaras (Figura 23b). Assim, a parte da coluna de 2D situada na câmara de focagem já está fria quando a fração coletada na câmara de coleta é desorvida e transferida para a etapa de focagem. Para que fosse possível manter ambas as câmaras do modulador resfriadas simultaneamente, foi necessário modificar a disposição das válvulas solenóides. Nos testes iniciais, uma válvula era usada para direcionar o gás frio para as câmaras do modulador, enquanto a outra válvula direcionava o gás quente para outra câmara. Para possibilitar o resfriamento simultâneo das duas câmaras, uma válvula foi usada para controlar os gases usados na câmara de coleta, enquanto outra válvula foi usada para controlar os gases da câmara de focagem.

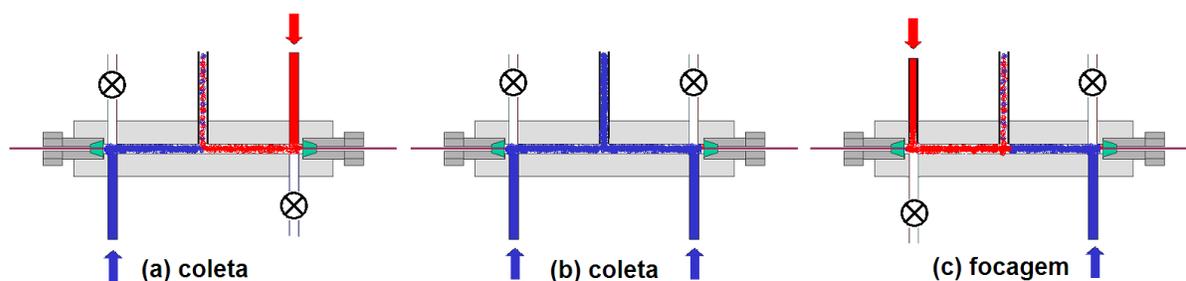


Figura 23. Ciclo de operação do modulador "A". (a) coleta, (b) coleta com resfriamento simultâneo das duas câmaras e (c) focagem. Gás quente representado em vermelho e gás frio representado em azul.

Com a etapa de resfriamento simultâneo das duas câmaras do modulador, foi observado que a duração total das etapas de coleta (a + b) não deve ser maior que 75 % do período total de modulação (a + b + c), para evitar resfriamento excessivo e,

conseqüentemente, aprisionamento dos compostos no modulador. Assim, para os testes subseqüentes, a câmara de coleta permaneceu 60% do tempo resfriada e a câmara de focagem foi aquecida no período final do ciclo de modulação, correspondente a 30% do tempo, sendo que em 10% do tempo ambas as câmaras permaneceram resfriadas. Para um PM = 6 s, o modulador permaneceu de 0 s a 3,6 s com as câmaras de coleta fria e a de focagem quente, entre 3,6 s a 4,2 s com coleta e focagem resfriadas, e de 4,2 a 6,0 s a coleta quente e a focagem fria. Ao ciclo ser reiniciado, o eluato coletado era transferido para a 2D .

Durante os ensaios preliminares, outros aspectos relevantes do sistema foram determinados. Determinou-se que as vazões de N_2 (g) aquecido e resfriado não devem ser iguais: a vazão do gás resfriado deve ser inferior à do gás aquecido, e otimizada caso a caso em função da pressão de vapor dos analitos e do período de modulação adotado (testaram-se PM de 3 s a 8 s). O gás de aquecimento deve sempre estar com a maior vazão possível (25 L min^{-1}), e o gás de resfriamento com vazões de até 5 L min^{-1} . Considerando a variação e robustez do protótipo GC×GC versão 1, o desempenho do mesmo foi excelente. A variação no 2t_R foi estimada em cerca de 10 ms, mesmo com injeção manual e sem sincronização automática do início da coleta do sinal do detector e da modulação. Para amostras petroquímicas a 2w_b foi da ordem de 300 ms (alcanos) a 600 ms (naftaleno). Entretanto, esse ainda é um valor elevado para 2w_b e resulta da incompatibilidade entre a largura dos picos modulados (ordem de milissegundos) e a constante de tempo do eletrômetro, que foi projetado para picos de colunas capilares convencionais (ordem de segundos).

Mesmo com limitações referente à 2w_b , o protótipo GC×GC versão 1 foi empregado na identificação da adulteração de gasolinas. Foi realizado um trabalho em colaboração com o doutorando Luiz A.F. Godoy Jr., orientado pelo professor Ronei J. Poppi, para identificação de adulteração de gasolina por GC×GC-FID e análise quimiométrica dos dados [84]. O tratamento dos dados faz parte da tese de doutorado do aluno Luiz A.F. Godoy Jr, e para tal foram usadas ferramentas quimiométricas de ordem superior para análise dos dados. O objetivo do trabalho foi identificar e, quando possível, quantificar alguns adulterantes comumente presentes em gasolina tipo C. Gasolina, querosene, *thinner* e aguarrás, bem como misturas dessas amostras foram

analisadas por GC×GC-FID, sendo os dados destinados aos modelos quimiométricos de calibração e previsão.

As condições cromatográficas relacionadas à GC×GC foram otimizadas para permitir a separação em um menor tempo, sem perder a separação na 1^aD. O PM foi ajustado para 6 s para evitar que compostos oxigenados presentes no *thinner* e que o etanol, este presente na gasolina tipo C, estivessem fora de ciclo e coeluissem com os alcanos eluidos na modulação subsequente. Na Figura 24(a) está mostrado um cromatograma de amostra de gasolina obtido por 1D-GC-FID (nesse caso foi usado o conjunto de colunas 1, porém com o modulador desligado), enquanto que na Figura 24(b) é mostrado, na mesma escala de tempo, o cromatograma GC×GC-FID da mesma amostra. À direita do cromatograma está mostrada a barra de cores referente à intensidade das manchas no cromatograma GC×GC, sendo a cor vermelha referente aos picos mais intensos. A barra de cores será omitida das figuras subsequentes, porém o padrão de cores será mantido.

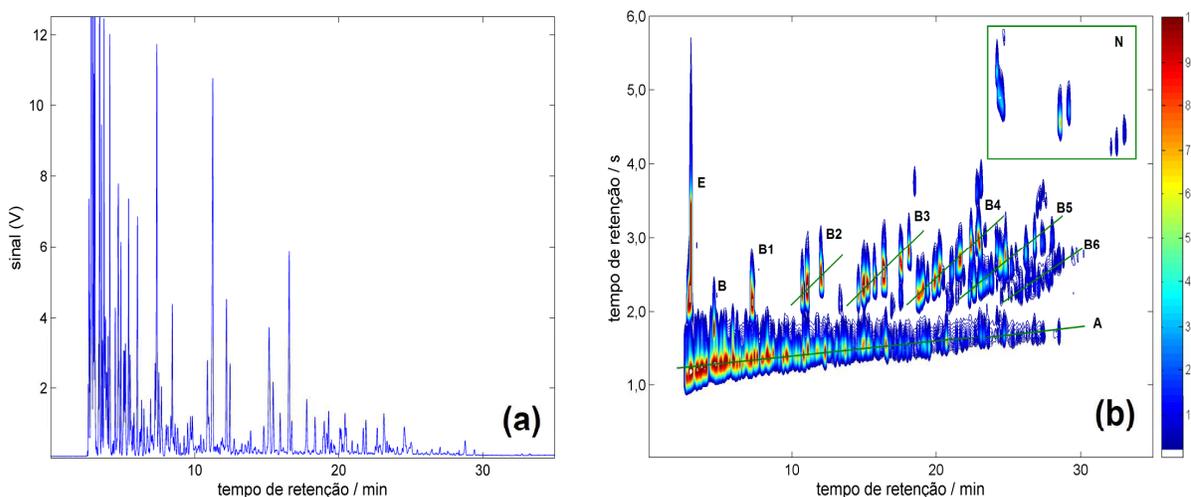


Figura 24. Cromatogramas de gasolina: (a) GC-FID e (b) GC×GC-FID versão 1. Em (b): E = etanol, B=benzeno, B1=tolueno, B2=benzeno C2 substituído, B3=benzeno C3 substituído, B4=benzeno C4 substituído, B5=benzeno C5 substituído, B6=benzeno C6 substituído, A=alcanos, alcenos e cicloalcanos e N=naftalentos. HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) + DBWax (1,0 m × 0,10 mm × 0,10 μm). Programação do forno do GC: 40 °C (3 min) até 160 °C à 4 °C min⁻¹ e até 240 °C (3 min) à 20 °C min⁻¹; razão de divisão do injetor 1:300; Vinj 0,6 μL de amostra; PM 6 s.

A comparação entre os dois cromatogramas da Figura 24 mostra o poder de separação da GC×GC, bem como a estruturação cromatográfica. Pode-se observar na

região entre 20 min e 30 min do cromatograma de 1D-GC que alguns picos com sinal intenso se sobrepõem em relação aos diversos picos com baixa relação sinal/ruído que coeluem, sendo difícil definir o que é ruído e o que é sinal. Em contrapartida, no cromatograma GC×GC-FID, na mesma faixa de tempo, diversas manchas de analitos são detectadas e resolvidas. Maior quantidade de picos no cromatograma GC×GC só não pode ser observada devido ao alargamento dos picos causado pela eletrônica lenta do eletrômetro do detector do GC-FID HP 5890 e, também, às limitações do software MatLab para a construção de superfícies de contorno com o detalhamento necessário.

A estruturação cromatográfica pode ser observada na Figura 24(b). O quadro em verde, indicado com a letra “N”, mostra a posição de eluição do naftaleno e metil-naftalenos. Sob linha denominada como “A” eluem os alcanos, alcenos e cicloalcanos, que não são separados na ²D com o conjunto de colunas empregado. O benzeno e tolueno são os picos “B” e “B1”, respectivamente. A partir do tolueno, a presença de mais átomos de carbono na molécula permite a formação de isômeros, que por apresentarem características similares se agrupam em regiões definidas do cromatograma GC×GC, nesse caso, em diagonais. Assim, as diagonais identificadas como “B2” até “B6” representam a posição de eluição dos isômeros que apresentam entre 2 e 6 átomos de carbono a mais na molécula em relação ao benzeno. O cromatograma GC×GC permite obter um quadro muito mais claro da composição amostra. Além disso, os dados de GC×GC contêm mais informação que os de 1D-GC, sendo mais adequados para a análise quimiométrica, uma vez que diversas coeluições foram resolvidas.

5.1.2. Protótipo GC×GC versão 2 (modulador “A” – Agilent 6890)

No protótipo GC×GC versão 2 o mesmo modulador empregado na versão 1 (modulador “A”) foi instalado, através de um orifício na parede lateral do forno do cromatógrafo, em um GC-FID Agilent 6890. A eletrônica do detector desse equipamento permite frequência de aquisição do sinal de até 200 Hz e a constante de tempo (τ) do eletrômetro é de 5 ms, valores adequados à largura dos picos gerados por GC×GC. O recomendado para a constante de tempo do eletrômetro é que ela seja inferior a 10% da largura de pico a meia altura [58]. A constante de tempo do eletrômetro do detector

do GC-FID HP 5890 era de 40 ms, o que contribuiu para a elevada largura dos picos na 2D . Os primeiros testes empregando o novo equipamento mostraram que a 2w_b que antes variava entre 300 ms e 600 ms para hidrocarbonetos saturados e aromáticos (independente da concentração dos mesmos), diminuiu para valores entre 80-150 ms, uma vez que o sistema de detecção conseguia registrar o pico sem deformá-lo. Além disso, a intensidade dos picos aumentou, visto que a largura de base do pico diminuiu, aumentando também a razão sinal/ruído. Contudo, uma vez que foi possível observar o real formato do pico cromatográfico foi verificado que, muitas vezes, o pico modulado resultante da transferência de uma única fração do analito para a 2D , era bi ou tripartido.

Picos bi ou tripartidos não são esperados como resultados do processo de modulação de um único composto. Após imaginar algumas razões para esse comportamento, inferiu-se que o formato do pico pode ser originado devido à ondas de pressão dos gases dentro do modulador. Em vez de cada fração do analito ser transferida para a 2D como um único pico, essa fração era liberada em parcelas de acordo com as ondas de pressão.

O modelo proposto para explicar estes pulsos foi baseado no fato de que a pressão do gás quente era cerca de dez vezes maior que a do gás frio. Desta maneira, quando a válvula direcionava o gás quente para uma das câmaras, esse gás comprimia o gás frio presente na outra câmara (fenômeno conhecido popularmente como “golpe de aríete”). O processo no qual o gás quente avança sobre a câmara na qual o gás frio estava presente é mostrado na Figura 25. Como alternativa para contornar os picos bi ou tripartidos, a pressão do gás frio foi aumentada para 20 psi, para compensar a pressão exercida pelo gás quente. Com isso, a câmara de coleta tornava-se excessivamente fria e o gás quente era insuficiente para liberar analitos menos voláteis, os quais ficavam aprisionados no próprio modulador. Portanto, a faixa de pressão de vapor dos compostos analisados era limitada [comparada à faixa entre os pontos de ebulição do hexano (p.e. 69 °C) e do dodecano (p.e. 216 °C)]. Além disso, o consumo de N_2 (l) foi estimado em cerca de 2,5 L h⁻¹.

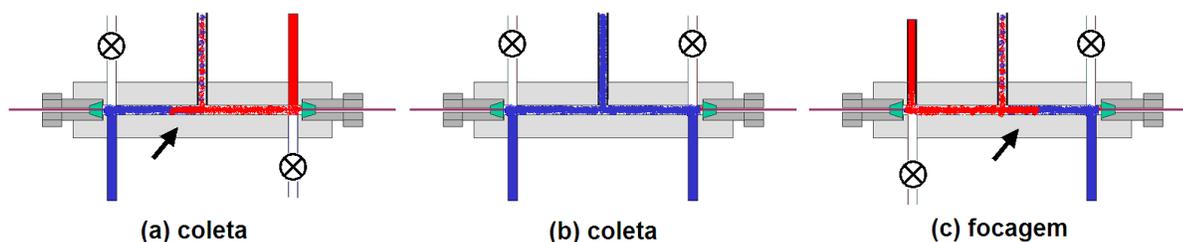


Figura 25. Esquema do modulador “A” no protótipo GC×GC versão 2 no qual o gás quente (pressão elevada) avança sobre a câmara contendo o gás frio.

Embora houvesse a limitação da faixa de pressão de vapor dos compostos modulados, o desempenho do protótipo GC×GC versão 2 foi avaliado e comparado com a versão 1, empregando amostras de gasolina. A Figura 26 mostra o cromatograma de gasolina tipo C obtido com o protótipo GC×GC versão 2, no qual pode ser observado 2w_b compatível com os valores descritos na literatura.

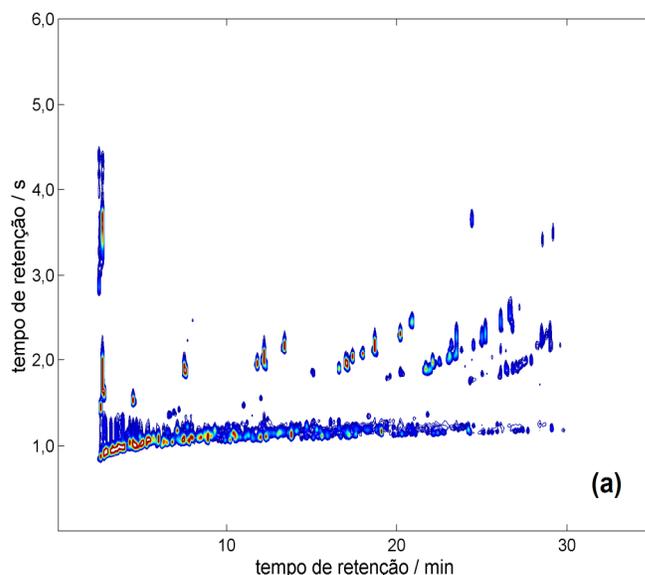


Figura 26. Cromatograma de gasolina tipo C obtido com o protótipo GC×GC versão 2. HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) + DBWax (1,0 m × 0,10 mm × 0,10 μm). Programação do forno do GC: 40 °C (3 min) até 160 °C a 4 °C min⁻¹ e até 240 °C (3 min) a 20 °C min⁻¹; razão de divisão do injetor 1:300; PM = 6 s.

Em resumo, o protótipo GC×GC versão 2 apresentou avanços em relação à versão 1, principalmente quanto à 2w_b . Contudo, modificações devem ser feitas no design do modulador para contornar problemas quanto aos picos partidos e à faixa limitada da pressão de vapor dos compostos analisados.

5.1.3. Protótipo GC×GC versão 3 (modulador “B” – Agilent 6890)

Conforme citado como limitação do protótipo GC×GC versão 2, a pressão do gás frio era bastante elevada para evitar as ondas de pressão dentro do modulador. Por isso, o modulador “B” foi construído, com algumas mudanças em relação ao modulador “A”. Basicamente, o diâmetro interno do modulador foi aumentado para 3,4 mm (todas as outras dimensões foram mantidas) e as câmaras de coleta e de focagem foram separadas por uma parede com um pequeno orifício, pelo qual passava a coluna da ²D. Além disso, um tubo para saída dos gases foi fixado em cada câmara e os tubos de entrada do gás frio foram fixados em frente aos tubos de saída dos gases. Por fim, as anilhas e porcas foram substituídas por tampas com rosca com um pequeno orifício no centro. A Figura 27(a) mostra um desenho do modulador e os estágios de modulação (semelhante ao descrito para o modulador “A”) e em (b) está mostrada uma foto do modulador instalado dentro do forno do cromatógrafo, com destaque para o modulador.

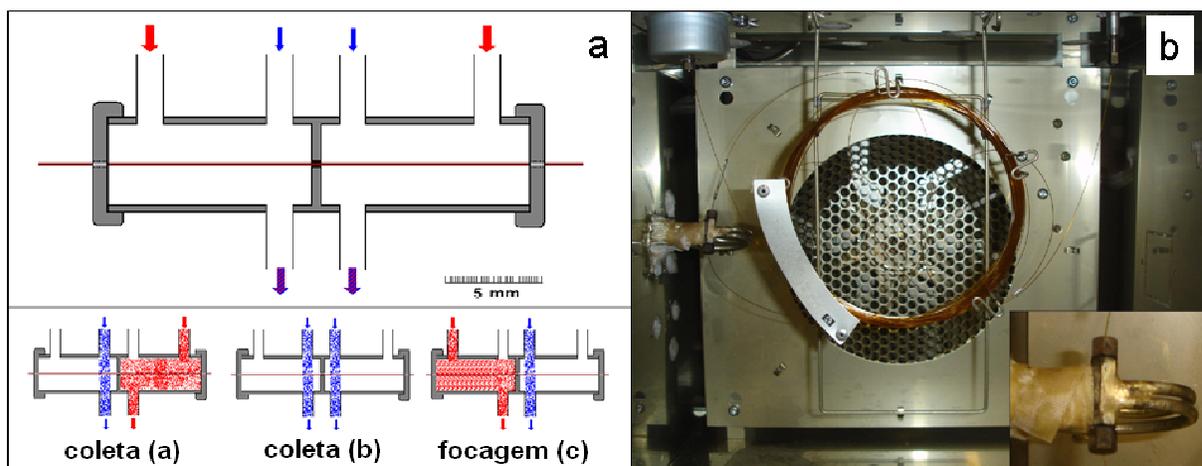


Figura 27. Modulador “B” empregado no sistema GC×GC versão 3. (a) Desenho do modulador “B”, com destaque para os estágios de funcionamento, explicado no texto. (b) Foto do modulador instalado no forno do cromatógrafo; em destaque, modulador na posição vertical, com tubulação de entrada dos gases isolada termicamente.

Além do modulador, partes do sistema de aquecimento e resfriamento também foram modificadas. No sistema de aquecimento, o banho de areia foi substituído por dois cilindros de aço inox (15 cm altura, 6 cm d.e.), perfurados no centro da peça, e em cada cilindro foi introduzido um cartucho de aquecimento com potência de 400 W. Ranhuras de 6 mm de largura (na forma de espirais) foram feitas na parte externa do cilindro de aço inox, nas quais foram enrolados os tubos de cobre que transportam o N₂.

(g) a ser aquecido. Um dos cilindros foi usado para aquecimento do gás da câmara de coleta e o outro, para o gás da câmara de focagem. Além disso, o comprimento dos tubos de cobre usados no aquecimento e resfriamento dos gases foi aumentado para 5 m, para garantir que o aquecimento/resfriamento do N_2 (g) fosse constante durante toda a análise.

Embora os moduladores “A” e “B” pareçam similares, o desempenho do modulador “B” é superior. No modulador “A” o gás frio resfriava toda a câmara antes de alcançar o tubo de saída dos gases (por isso a peça resfriava excessivamente). Por outro lado, no modulador “B” o gás resfria a coluna sem resfriar toda a câmara, já que a saída dos gases está situada em frente à entrada do gás frio. Já o gás quente continua a aquecer toda a câmara, o que torna mais eficiente a remobilização dos analitos aprisionados. Para otimização dos parâmetros operacionais do modulador “B” a pressão N_2 (g) aquecido foi fixada em 100 psi (valor máximo, 25 mL min^{-1}), variando-se a pressão do gás frio nas câmaras de coleta e focagem. Os tempos de incidência dos gases foram os mesmo descritos para o modulador “A”,.

A otimização da vazão (através do controle da pressão) do gás frio usado nas etapas de coleta e focagem foi feita de forma independente, avaliando o perfil cromatográfico para os picos de uma solução contendo etilbenzeno, *p*-xileno e *o*-xileno. Na Figura 28 estão mostrados o cromatograma modulado bruto e o cromatograma GC×GC obtidos sob diferentes pressões para o gás frio. Em (a) e (b) está mostrado uma duplicata quando a pressão do gás frio foi 9 e 12 psi na coleta e na focagem, respectivamente. Em (c) a pressão na coleta foi aumentada para 20 psi (focagem mantida em 12 psi) e observou-se retenção excessiva na ¹D, já que parte dos compostos não era transferida para a câmara de focagem e ficava retida no modulador, sendo transferida para a ²D alguns ciclos de modulação após ter sido coletados. Já em (d) a pressão da coleta foi diminuída para 8 psi e pôde-se verificar que uma cauda na ²D, originada por parte dos compostos que deveriam ter sido aprisionados na câmara de coleta, mas foram transferidos diretamente para a ²D pois a temperatura atingida nesse ponto da coluna não era baixa o suficiente para retê-los.

Em (e) e (f) a pressão do jato frio na focagem foi 20 psi e 10 psi, respectivamente. Com a pressão elevada (e) a coluna é resfriada demasiadamente e ocorre retenção excessiva na ²D, observada pela mudança no ²t_R para valores maiores,

porém sem aumento na 2w_b . Com a pressão baixa para o gás frio (f), o tempo necessário para que a temperatura na câmara de focagem seja suficiente para aprisionar os compostos é maior que nos outros casos. Com isso, no momento que o gás frio é direcionado para a câmara de focagem, a temperatura não é baixa o suficiente para aprisionar todas as moléculas do analitos proveniente da câmara de coleta e, portanto, um pico é observado no cromatograma. Entretanto, naquela temperatura, parte dos analitos foi aprisionada na focagem. Quando ocorre o aquecimento da câmara de focagem, outro pico é observado, sendo esse o 2t_R correto para o analito. Portanto, dois picos são observados para um mesmo analito, o que não é coerente com o processo de modulação.

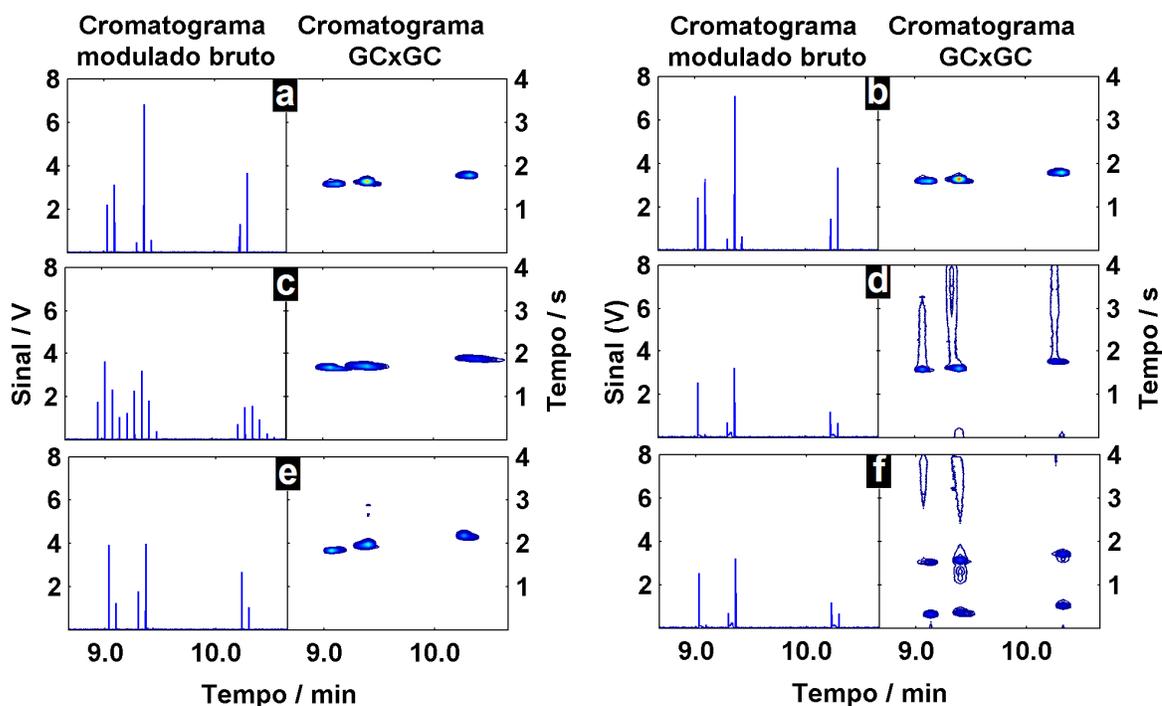


Figura 28. Cromatograma modulado bruto e cromatograma GC×GC de etilbenzeno, *p*-xileno e *o*-xileno para avaliação da influência da pressão do gás frio no processo de modulação. Descrição apresentada no texto.

Para que a modulação ocorra de forma correta, os valores para a pressão do gás frio nas etapas de coleta e de focagem devem estar entre 9-14 psi e 12-16 psi, respectivamente. Nessas condições, a volatilidade dos compostos analisados em uma

mesma corrida foi ampliada em relação ao protótipo GC×GC versão 2, sendo possível modular compostos com pressão de vapor equivalente ao hexano (ponto de ebulição 69 °C) e ao tetracosano (alcano alifático com 24 átomos de carbono, ponto de ebulição 391 °C). Compostos mais voláteis como pentano ou butano podem ser modulados, desde que a vazão do gás frio em ambas as câmaras seja aumentada. Entretanto, nessa situação, a análise de compostos de volatilidade similar ao tetracosano fica comprometida.

Até este ponto do projeto a maior parte dos testes foi feita empregando amostras de gasolina, visto que a pressão de vapor dos constituintes da amostra era compatível com a faixa de pressão de vapor dos compostos modulados. Entretanto, o protótipo GC×GC versão 3 permite analisar compostos com ponto de ebulição próximo a 400 °C. Por isso, testes envolvendo óleos essenciais de plantas foram feitos para mostrar a aplicabilidade do novo protótipo GC×GC. Na Figura 29 estão mostrados dois cromatogramas GC×GC para o óleo essencial de folhas da planta amazônica macacaporanga (*Aniba parviflora*): o cromatograma mostrado em (a) foi obtido com o protótipo GC×GC versão 1 enquanto que o cromatograma (b) foi obtido com o protótipo GC×GC versão 3.

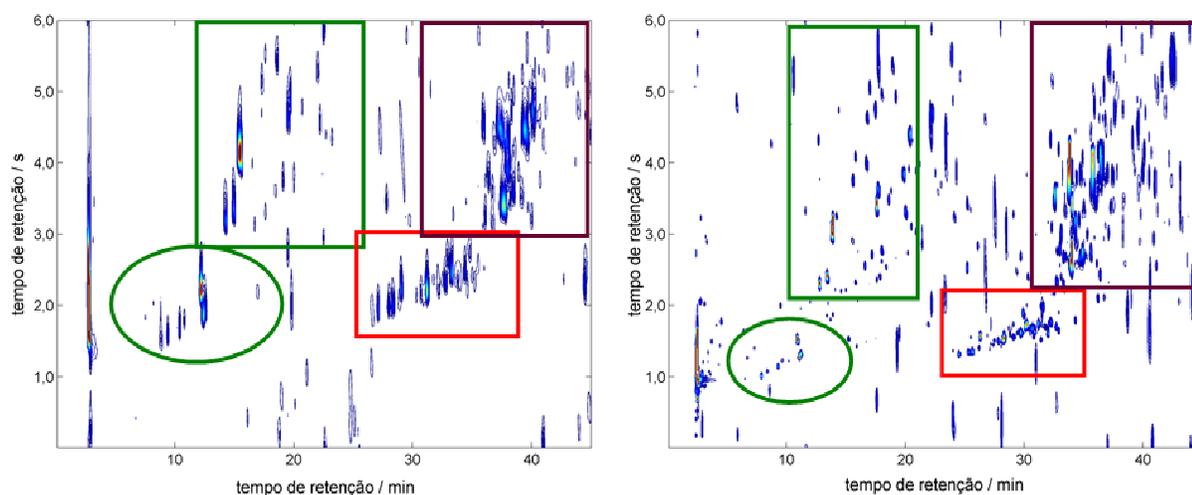


Figura 29. Óleo essencial de folhas da planta amazônica macacaporanga (*Aniba fragrans*) (a) a 10% v/v em etanol obtido com o protótipo GC×GC versão 1 e a (b) 1% v/v em etanol com a Versão 3. Conjunto de colunas: HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) + DBWax (1,0 m × 0,10 mm × 0,10 μm). Condições cromatográficas: Tcol = 60 °C a 3 °C min⁻¹ até 240 °C; Tinj = Tdet = 250 °C; gás de arraste = H₂ à 0,6 mL min⁻¹; Vinj = 1,0 μL com razão de divisão 1:200; PM = 6 s.

Nesses cromatogramas é possível observar a diferença na 2w_b entre os protótipos e, por conta disso, é possível observar maior quantidade de compostos com o protótipo GC×GC versão 3 (o sistema de detecção da Versão 1 deformava os picos). Em ambos os cromatogramas a estruturação cromatográfica pode ser observada, a qual foi obtida por comparação com os cromatogramas apresentados na literatura para óleos essenciais de folhas de eucalipto [63] e de pelargônio [85], nos quais a análise foi feita GC×GC empregando MS como detecção. O círculo verde delimita a posição do cromatograma GC×GC onde os monoterpenos não oxigenados eluem. O retângulo verde delimita os monoterpenos oxigenados, enquanto que os retângulos vermelho e roxo delimitam, respectivamente, os sesquiterpenos não oxigenados e oxigenados. Esta informação qualitativa é muito mais perceptível em GC×GC que em 1D-GC, e pode ser visualizada apenas para amostras que contenham isômeros em alguns conjuntos de colunas. É possível que outros compostos que não sejam terpenos eluam nas posições delimitadas; entretanto, como não foi feita a detecção por MS, tal confirmação não pode ser feita.

Para avaliação final do protótipo GC×GC versão 3, esse foi comparado com equipamento comercial Agilent 6890N GC×GC-FID LECO® (St. Joseph, MI, EUA), o qual é equipado com um modulador criogênico do tipo *quad jet*. Para tal, o óleo essencial de folhas da planta amazônica virola (*Virola surinamensis*) foi analisado em ambos os equipamentos. Na Figura 30 estão mostradas seções dos cromatogramas obtidos (a) com o protótipo GC×GC versão 3 e (b) com o sistema comercializado pela LECO®. Comparando ambos os cromatogramas, fica evidente que o perfil de separação para ambos os sistemas é muito semelhante, tanto em função da retenção dos compostos quanto em relação à 2w_b . Obviamente, pequenas discrepâncias podem ser observadas entre os cromatogramas, uma vez que tanto a programação da temperatura do forno do cromatógrafo quanto a vazão são diferentes, bem como a razão sinal/ruído dos dois equipamentos e os *softwares* usados para gerar os cromatogramas GC×GC. Além disso, o equipamento da LECO® possui um forno secundário para a 2D , o qual não existe no protótipo, e um controle individual de temperatura para o modulador. Esses dois parâmetros permitem modificar o 2t_R sem que seja necessário modificar valores de vazão do gás de arraste ou a programação da temperatura do forno do GC.

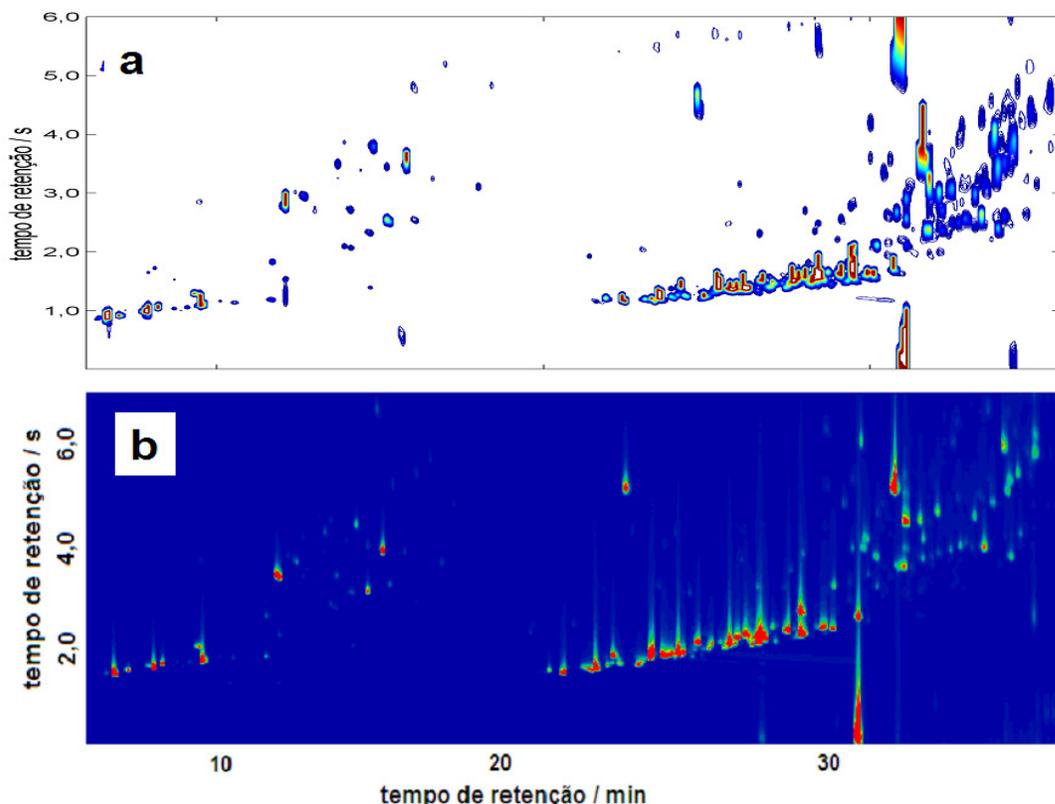


Figura 30. Seção dos cromatogramas GC×GC de óleo essencial de folhas da planta amazônica virola (*Virola surinamensis*) 1% (v/v) em pentano, obtido (a) com o sistema GC×GC Versão 3 e (b) com o equipamento comercial LECO®. Condições cromatográficas: (a) conjunto de colunas 1; 60 °C a 3 °C min⁻¹ até 240 °C; T_{inj} = T_{det} = 250 °C; gás de arraste = H₂ a 0,6 mL min⁻¹; V_{inj} = 1,0 μL com razão de divisão 1:50; PM = 6 s. (b) coluna HP-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) + DBWax (2,0 m × 0,1 mm × 0,10 μm); T_{col} = 60 °C a 3 °C min⁻¹ até 135 e até 200 °C a 1 °C min⁻¹; T_{modulador} = + 35 °C; Forno secundário = + 10; T_{inj} = T_{det} = 250 °C; gás de arraste = H₂: 1,4 mL min⁻¹; V_{inj} = 1,0 μL razão de divisão 1:100; PM = 7 s.

Conforme mostrado na Figura 30, o protótipo GC×GC versão 3 apresenta desempenho similar ou melhor em relação aos moduladores descritos na literatura. A variação no 2t_R foi estimada em cerca de 10 ms; a 2w_b foi da ordem de 100 ms (alcanos) a 400 ms (álcoois e pirazinas), quando os compostos não saturaram a fase estacionária da 2D , e o consumo de N₂ (l) foi de cerca de 1,5 L h⁻¹, valor inferior em relação àqueles obtidos com outros moduladores [33][34]. Por fim, foi feito um estudo comparando a variação da temperatura do forno do cromatógrafo quando os gases do modulador eram removidos do forno do cromatógrafo pelos tubos de saída e quando os gases eram liberados no interior do forno (tal qual ocorre nos moduladores mostrados na Figura 9 e na Figura 10). Observou-se que quando os gases do modulador são liberados dentro do

forno do cromatógrafo, a variação de temperatura é de cerca de 2 °C durante uma mesma modulação, enquanto que com os tubos direcionando os gases para fora do forno, a variação foi idêntica à variação de uma corrida de 1D-GC (menos de 0,5 °C).

Embora esse protótipo não apresente nenhuma limitação relacionada aos parâmetros cromatográficos, havia um inconveniente relacionado à troca do conjunto de colunas. Toda vez que o conjunto de colunas era trocado, o final da ²D necessitava ser cortado porque a porca que conecta a ²D ao detector precisava ser removida. Porém, toda vez que a coluna é cortada, a resistência à passagem do gás de arraste é modificada, o que altera os valores de vazão (e, conseqüentemente, de retenção) para os próximos testes. O corte da ²D também é necessário em alguns sistemas comerciais; contudo, nesses sistemas, a vazão do gás de arraste é recalculada por *softwares* que levam em conta as dimensões do conjunto de coluna, a temperatura do forno e pressão do gás de arraste.

Até esse ponto do trabalho, a vazão do conjunto de colunas era calculada através da razão entre o volume interno do conjunto de colunas e o tempo de retenção para um soluto não retido, e ajustado para o valor de 0,6 mL min⁻¹. Esse artifício foi utilizado porque o cromatógrafo HP-5890, empregado no início do trabalho, não permitia o ajuste automático da vazão do gás de arraste. Entretanto, o equipamento Agilent 6890 permite o ajuste automático dos gases do cromatógrafo através de um controlador eletrônico de pressão e de um *software* específico para 1D-GC. Porém, para empregar um software de 1D-GC para ajustar a vazão em um conjunto de colunas de GC×GC é necessário calcular as dimensões da coluna que é equivalente, em termos de resistência à passagem do gás de arraste, ao conjunto de colunas em questão [55][56].

A coluna equivalente à empregada como ²D (1,0 m × 0,10 mm), calculada através da Equação 1, tem as dimensões de 39 m × 0,25 mm. Com isso, o conjunto de colunas 1 corresponde a uma única coluna com as dimensões 69 m × 0,25 mm. Ao especificar o comprimento da coluna equivalente e a vazão desejada no software de 1D-GC, o mesmo calcula a pressão aplicada na cabeça do conjunto de coluna. Entretanto, o tempo de retenção para o soluto não retido obtido dessa forma foi 3,9 min, muito maior que o valor obtido ao dividir o volume interno do conjunto de colunas pelo tempo de retenção de um soluto não retido (2,52 min para butano). Ou seja, os

cromatogramas obtidos dessas duas formas não foram equivalentes. Como não foi possível assegurar qual a forma mais correta para ajustar a vazão do conjunto de colunas, o cálculo através da Equação 1 foi descartado, com o intuito de manter as mesmas condições de análise ao longo da tese. Portanto, para as análises subsequentes com os conjuntos de colunas 1, 2 e 3, a vazão do gás de arraste foi ajustada para $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ levando em conta o tempo de retenção de um soluto não retido e o volume interno do conjunto de colunas.

Embora o ajuste da vazão do gás de arraste não seja um problema, o corte da ponta da coluna a cada troca do conjunto de colunas altera a retenção dos compostos, o que é indesejável principalmente em estudos que necessitem de diversas análises ao longo de vários meses. Por isso, e também pelo fato da troca do conjunto de colunas ser pouco prática para os moduladores até agora apresentados, um novo modulador (modulador “C”) foi construído, mantendo as características do modulador “B” e permitindo maior facilidade para a troca do conjunto de colunas.

5.1.4. Protótipo GC×GC versão 4 (modulador “C” – Agilent 6890)

O modulador “C” foi projetado e construído levando em consideração as vantagens descritas para o modulador “B” e a possibilidade de trocar o conjunto de colunas sem que seja necessário cortar a ponta da coluna da ²D. Na Figura 31 estão mostradas três fotos do modulador “C”, o qual tem como diferencial uma tampa removível, que permite a inserção e remoção da coluna do interior do modulador, sem que seja removida a porca e a anilha que conectam o final da coluna de ²D ao detector. As dimensões do sistema são $30 \text{ mm} \times 15 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$, com duas entradas de $0,31 \text{ cm}$ para $\text{N}_2 \text{ (g)}$ resfriado e duas saídas de $0,62 \text{ cm}$ em um ângulo de 180° , e duas entradas de $0,31 \text{ cm}$ para $\text{N}_2 \text{ (g)}$ aquecido, em um ângulo de 90° ao outros. O modulador foi avaliado empregando amostras de gasolina e de óleos essenciais. Uma vez que os resultados obtidos com essa versão foram similares aos resultados obtidos com o protótipo GC×GC versão 3 (2w_b entre 80 ms e 400 ms , variação no 2t_R de cerca de 10 ms e faixa de ponto de ebulição dos compostos modulados entre $69 \text{ }^\circ\text{C}$ e $391 \text{ }^\circ\text{C}$), o protótipo GC×GC versão 4 foi considerado a versão definitiva do sistema e, por isso, foi empregado nas análises subsequentes.

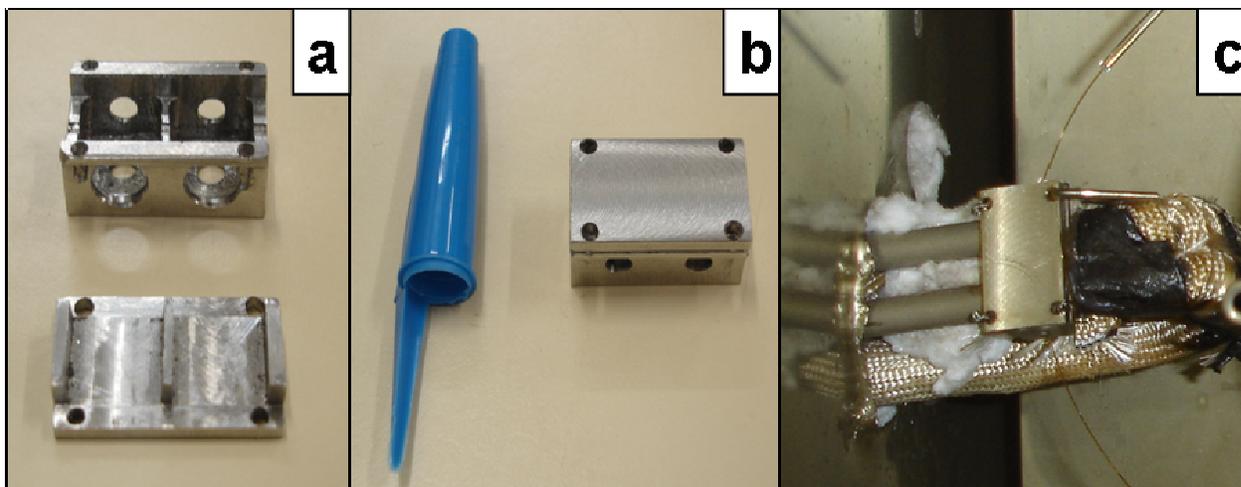


Figura 31. Modulador “C” empregado no protótipo GC×GC versão 4: (a) modulador aberto e (b) fechado sem os tubos e (c) instalado no forno do cromatógrafo.

5.2. Análise da fração volátil da polpa de abacaxi

Para avaliação da potencialidade de separação do GC×GC, a fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado foi analisada. A escolha dessa amostra foi fundamentada na presença de diversos isômeros entre os voláteis de polpa de abacaxi fresco, principalmente ésteres, além da presença de séries homólogas de ésteres e aldeídos [82][83]. Uma amostra constituída por isômeros é interessante para análise por GC×GC, pois é possível obter a estruturação cromatográfica e, desta forma, informações estruturais de picos não identificados podem ser obtidas. Entretanto, a estruturação cromatográfica e o efeito “telhado” têm sido reportados, principalmente, para amostras de origem petroquímica, nas quais se pode fazer análise por classes de compostos em vez da identificação individual de cada um dos compostos, semelhante ao apresentado na Figura 14. Em contrapartida, a estruturação cromatográfica tem sido pouco empregada e/ou observada na análise de óleos essenciais e/ou voláteis de plantas e frutas para a obtenção de informação estrutural dos eluatos. Nesse sentido, a análise da fração volátil das amostras de abacaxi não foi feita pela simples separação e identificação dos compostos, mas, principalmente, para avaliar como a estruturação cromatográfica pode ser empregada para identificar compostos ou para corrigir atribuições errôneas resultantes da identificação por GC-MS.

5.2.1. Extração da fração volátil da polpa de abacaxi por SPME

A extração da fração volátil da polpa de abacaxi foi feita através da SPME. A otimização das condições de extração foi realizada anteriormente para abacaxi desidratado [21] e não será aqui discutida. Foram avaliadas diferentes fibras e foi feito um estudo comparativo entre as técnicas de HS-SPME e DHS-SPME. Nas condições otimizadas para cada um dos sistemas de extração, o sistema DHS-SPME apresentou maior eficiência na extração dos voláteis em um menor tempo de análise. As condições de extração foram: 1,5 g de amostra, temperatura de extração de 60 °C, vazão do gás de purga de 5,5 mL min⁻¹, tempo de pré-equilíbrio de 5 min, tempo de extração de 15 min e tempo de dessorção de 2 min. Um dos motivos para a melhor eficiência do sistema DHS-SPME é a contínua renovação da interface amostra / *headspace*, que favorece a extração das espécies [20]. No sistema HS-SPME, no qual é necessário suspender a amostra em uma solução salina e agitá-la continuamente, não foi possível utilizar mais que 0,25 g de amostra, pois a agitação cessava dada a elevada viscosidade da suspensão formada. Por outro lado, para DHS-SPME foi possível utilizar até 2,5 g de amostra (limitada ao volume do frasco), já que não é necessária a agitação da amostra.

5.2.2. Análise por GC-MS

A análise da fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado foi feita por GC-MS e a identificação dos eluatos foi feita através de comparação entre o espectro de massa de cada pico e do banco de dados da biblioteca *mainlib* NIST. Além disso, foram obtidos os LTPRI para comparação com valores da literatura. As análises foram feitas nas colunas HP-5 e DBWax. Os cromatogramas obtidos por GC-MS para a fração volátil da polpa de abacaxi fresco e de abacaxi desidratado, empregando a coluna HP-5, estão mostrados na Figura 32. Os compostos identificados empregando a coluna HP-5, com os respectivos LTPRI e similaridade espectral, estão mostrados na Tabela 2. Nessa tabela também estão apresentados os dados para GC×GC-FID, os quais serão discutidos posteriormente.

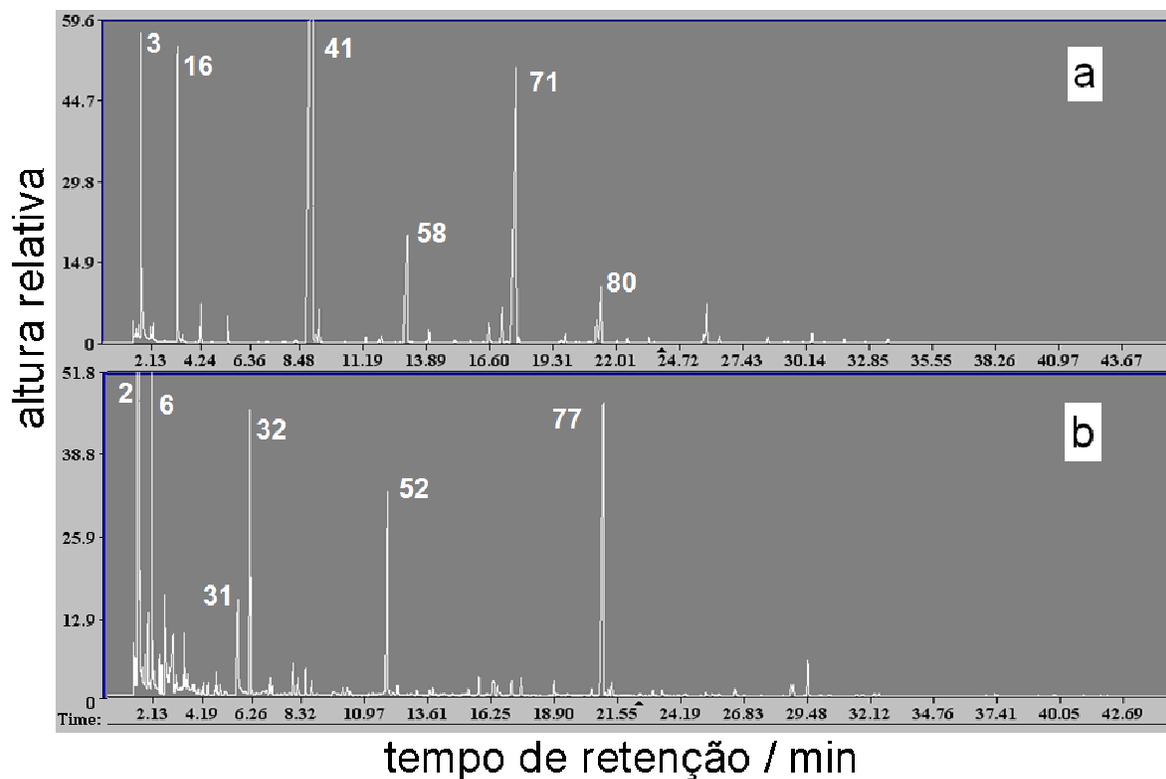


Figura 32. Cromatogramas obtidos para a fração volátil da polpa de abacaxi (a) fresco e (b) desidratado, empregando coluna HP-5. O eixo “y” corresponde à altura do pico em relação ao pico mais intenso de cada cromatograma. Condições de extração: 1,5 g de amostra, 60 °C, vazão = 5,5 mL min⁻¹, pré-equilíbrio = 5 min, extração = 15 min, dessorção de 2 min. Identificação dos compostos está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Análise da fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado por GC-MS (coluna HP-5) e GC×GC-FID (conjunto de colunas 1).

#	Identidade	RI Lit.	fresco				desidratado			
			GC-MS		GC×GC		GC-MS		GC×GC	
			RI	Sim. (%)	RI	² t _R	RI	Sim. (%)	RI	² t _R
1	acetaldeído		x	96,7	x	1,46	x	96,7	x	N
2	etanol		x	94,3	x	1,66	x	94,3	s	1,80
3	acetato de metila		x	92,7	x	1,18	x	92,7	x	1,21
4	2-metil-propanal		x	x	x	x	x	91,2	x	1,85
5	butanodiona		x	x	x	x	x	96,2	x	N
6	acetato de etila	606	x	94,2	x	1,24	x	94,2	x	1,08
7	2-propenoato de metila		x	87,7	x	1,52	x	x	x	x
8	2-metil-1-propanol		x	x	x	x	x	87,7	x	2,85
9	propanoato de metila	634	x	96,2	x	1,37	x	x	x	x
10	2-metil-butanal		x	x	x	x	x	90,6	x	1,38
11	2-metil-butanal		x	x	x	x	x	81,5	x	1,37
12	1-metoxi-2-propanol		x	x	x	x	x	91,5	x	3,38
13	1-metoxi-2-propanona		x	x	x	x	x	95,2	x	N
14	2,3-pentadiona		x	x	x	x	x	87,7	x	N
15	acetato de propila		x	x	x	x	x	91,9	x	N
16	butanoato de metila	686	x	96,2	x	1,58	P	P	x	1,67
17	3-metil-1-butanol		x	x	x	x	x	92,9	x	4,76
18	2 metil-1-butanol		x	x	x	x	x	91,7	x	4,68
19	dimetildisulfeto		x	x	x	x	x	86,3	x	N
20	isobutanoato de isopropila		x	x	x	x	x	84,4	x	1,55
21	tolueno		x	x	x	x	x	90,5	x	N
22	pentanol		x	x	x	x	x	87,1	x	5,37
23	acetato de 2-metilpropil	761	x	90,1	x	1,74	x	84,2	x	1,85
24	2-metil-butanoato de metila	769	x	92,5	x	1,60	x	85,2	x	1,67
25	dietilcarbonato		x	x	x	x	x	81,6	x	2,44

[CONTINUA]

Tabela 2. - CONTINUAÇÃO

#	Identidade	RI Lit.	fresco				desidratado			
			GC-MS		GCxGC		GC-MS		GCxGC	
			RI	Sim. (%)	RI	² t _R	RI	Sim. (%)	RI	² t _R
26	3-metileno-2-pentanona		x	x	x	x	800	91,2	x	N
27	hexanal	801	801	93,0	800	2,02	800	89,9	800	2,17
28	butanoato de etila	802	P	P	803	1,67	802	87,1	803	1,71
29	dihidro-2-metil-3(2h)-furanona		x	x	x	x	807	90,7	N	N
30	pentanoato de metila	822	822	95,3	822	1,97	x	x	822	1,97
31	furfural	828	x	x	x	x	834	93,3	833	2,33
32	2-metil-butanoato de etila	849	P	P	847	1,61	848	88,0	848	1,75
33	acetato de 3-metil-butil	876	876	80,7	N	N	876	82,0	x	x
34	acetato de 2-metil-butil	875	879	85,6	872	1,96	878	80,0	872	2,11
35	pentanoato de etila		x	x	x	x	895	90,6	896	1,92
36	heptanal	901	E	E	900	2,38	902	E	900	2,50
37	3-metilpropional		x	x	x	x	905	89,1	907	3,16
38	acetilfurano		x	x	x	x	910	89,2	912	N
39	5-hexenoato de metila		913	87,0	912	2,81	x	x	x	x
40	2-hidróxi-2-metil-butanoato de metila		x	x	x	x	918	87,9	919	5,37
41	hexanoato de metila	921	923	93,3	921	2,30	924	87,2	921	2,38
42	dimetil malonato		932	88,4	N	N	x	x	x	x
43	1-hexenoato de metila	927	934	87,0	930	2,95	x	x	x	x
44	3-hexenoato de metila		935	77,9	933	2,98	x	x	x	x
45	3-hexenoato de metila		938	93,5	935	3,09	x	x	x	x
46	benzaldeído	952	x	x	x	x	956	87,0	951	2,84
47	2-metil-furfural		x	x	x	x	961	89,3	960	3,38
48	trissulfeto de dimetila		x	x	x	x	964	83,7	967	5,93
49	2-hexenoato de metila		965	88,0	965	2,97	x	x	x	x
50	1-heptanol	959	971	92,0	N	N	x	x	x	x

[CONTINUA]

Tabela 2. - CONTINUAÇÃO

#	Identidade	RI Lit.	Fresco				desidratado			
			GC-MS		GC×GC		GC-MS		GC×GC	
			RI	Sim. (%)	RI	² t _R	RI	Sim. (%)	RI	² t _R
51	5-hepten-2-ona-6-metila	981	987	83,0	986	3,36	987	80,3	986	3,45
52	hexanoato de etila	997	1001	89,2	1000	2,25	1002	92,5	1000	2,26
53	octanal	998	1003	94,5	1004	2,59	1004	87,4	1002	2,73
54	acetato de 3-hexenila	1001	1009	78,4	N	N	x	x	x	x
55	3-hexenoato de etila	x	x	x	x	x	1011	86,0	N	N
56	2,4-hexadienoato de metila		1016	84,5	N	N	x	x	x	x
57	4-heptenoato de metila		1021	81,7	1023	2,86	x	x	x	x
58	3-metiltio-propanoato de metila	1026	1028	90,0	1026	0,77	P	P	1026	0,80
59	heptanoato de metila	1025	E	E	1026	2,50	E	E	1026	2,45
60	2-etil-1-hexanol		x	x	x	x	1030	91,1	1028	5,79
61	fenilacetaldéido	1036	x	x	x	x	1042	91,8	1045	4,46
62	β-ocimeno	1044	1048	92,0	1047	2,03	P	P	1047	1,96
63	1-octanol	1063	1073	82,9	N	N	x	x	x	x
64	2,3 butenodiolacetato		x	x	x	x	1077	82,3	1077	5,21
65	2-metil-acetoacetato de metila		1087	P	1085	5,08	1087	78,0	1085	5,10
66	heptanoato de etila		x	x	x	x	E	E	1098	2,26
67	3-metiltiopropanoato de etila	1098	x	x	x	x	1101	84,7	1100	5,51
68	nonanal	1100	1102	90,6	1104	2,78	1105	89,3	1102	2,76
69	n.i.		x	x	x	x	1117	x	1115	5,45
70	4-octenoato de metila		1117	80,9	1115	3,02	P	P	1117	2,94
71	octanoato de metila	1123	1125	90,2	1123	2,54	1126	89,6	1126	2,58
72	3-octenoato de metila		1133	84,7	1132	3,06	x	x	x	x
73	2-octenoato de metila	1163	1160	81,5	1162	3,11	x	x	x	x
74	nonanol	1165	1173	90,1	1170	5,74	P	P	1170	5,83
75	1,3,5-undecatrieno		1174	85,0	1177	2,58	1174	P	1176	2,54

[CONTINUA]

Tabela 2. - CONTINUAÇÃO

#	Identidade	RI Lit.	fresco				desidratado			
			GC-MS		GC×GC		GC-MS		GC×GC	
			RI	Sim. (%)	RI	² t _R	RI	Sim. (%)	RI	² t _R
76	1,3,5,8-undecatetraeno		1177	88,0	1181	2,51	1176	72,6	1181	2,48
77	octanoato de etila	1196	1199	E	1196	2,30	1199	86,4	1196	2,32
78	decanal	1201	1200	88,6	1200	2,81	1208	84,7	1200	2,67
79	n.i.		1209	x	1202	4,98	x	x	1202	4,79
80	3-acetoxi-hexanoato de metila		1211	91,1	1207	5,58	P	P	1207	5,36
81	nonoato de metila	1223	1226	E	1224	2,47	x	E	1224	2,38
82	nonanoato de etila		x	x	x	x	E	E	1290	2,42
83	undecanal		1308	E	1307	2,82	1308	E	1309	2,78
84	decanoato de metila	1323	1326	89,9	1323	2,52	1324	E	1323	2,53
85	α-copaeno	1374	1374	80,2	1377	1,79	x	x	x	x
86	decanoato de etila		x	x	x	x	1392	90,0	N	N
87	n.i.		1419	n.i.	1418	4,88	P	P	1418	4,82
88	n.i.		1499	n.i.	1498	2,15	P	P	1498	2,20

NOTAS: Sim.= similaridade entre o espectro de massas do analito e o espectro de massas da biblioteca; x = não detectado na amostra; n.i. = detectado, mas não identificado; E = não identificado por GC-MS, mas identificado por estruturação; P = não identificado por GC-MS e identificado por apresentar mesmo ¹t_R e ²t_R de composto identificado na amostra fresca ou desidratada; N = identificado por GC-MS, porém, não foi possível atribuir a identidade no cromatograma GC×GC.

Conforme apresentado na Tabela 2, 42 compostos foram identificados na amostra fresca, enquanto que, na desidratada, foram identificados 60. Os compostos majoritários presentes na amostra fresca são os ésteres acetato de metila, 2-metil-butanoato de metila, hexanoato de metila, 3-metil(tio)propanoato de metila e octanoato de metila; outros ésteres, bem como álcoois e aldeídos também estão presentes. Já na amostra desidratada, os compostos majoritários são etanol, furfural, acetato de etila, 2-metil-butanoato de etila, hexanoato de etila e octanoato de etila. Também foram encontrados outros ésteres, álcoois, aldeídos e outras classes de compostos. Ainda, cabe salientar que diversos picos pouco intensos não foram identificados pela baixa pureza dos espectros de massas.

Para aumentar a confiabilidade da identificação dos compostos, as mesmas amostras foram submetidas à análise por GC-MS empregando a coluna DBWax. Os cromatogramas obtidos para a fração volátil da polpa de abacaxi fresco e de abacaxi desidratado, para análise em coluna polar, estão mostrados na Figura 33. Os compostos identificados através dessas análises estão mostrados na Tabela 3. Nessa tabela também estão apresentados os dados para GC×GC-FID, os quais serão discutidos posteriormente.

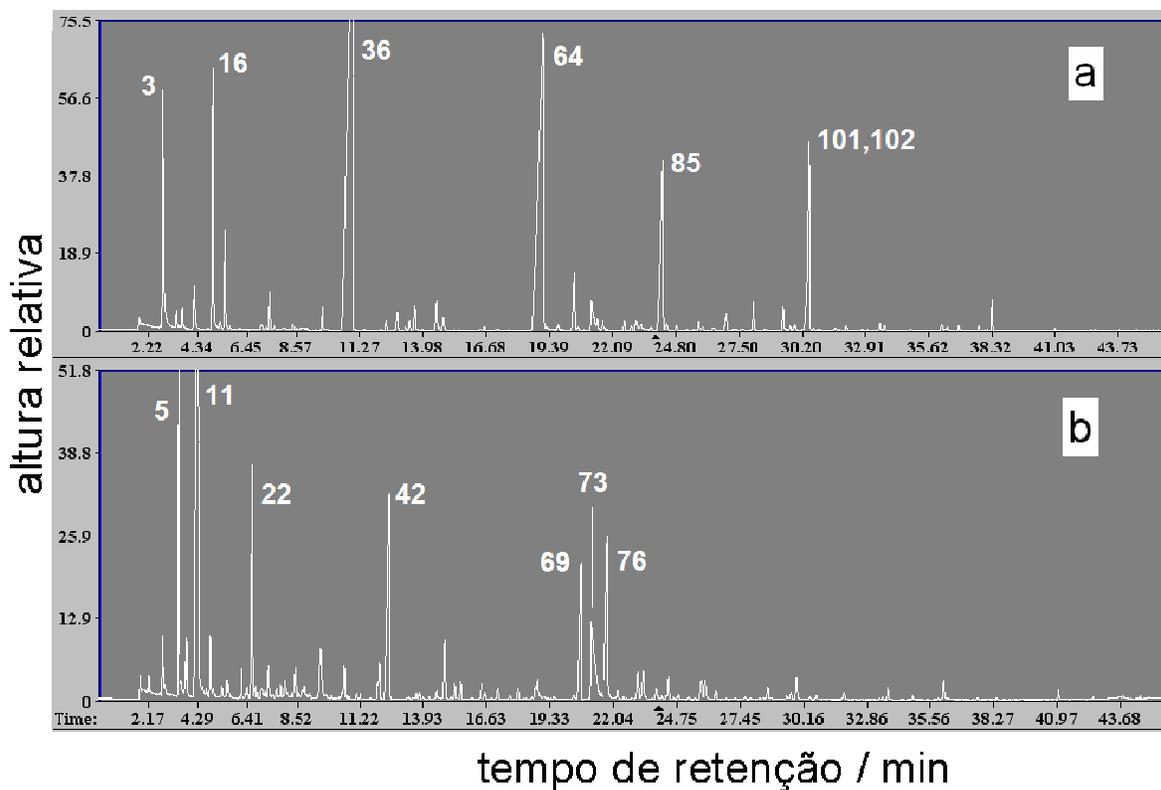


Figura 33. Cromatogramas obtidos para a fração volátil de polpa de abacaxi (a) fresco e (b) desidratado, empregando a coluna DBWax. O eixo “y” corresponde à altura do pico em relação ao pico mais intenso de cada cromatograma. Condições de extração: 1,5 g de amostra, 60 °C, vazão = 5,5 mL min⁻¹, pré-equilíbrio = 5 min, extração = 15 min, dessorção de 2 min. Identificação dos compostos está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Análise da fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado por GC-MS (coluna DBWax) e GC×GC-FID (conjunto de colunas 3).

#	Identidade	RI Lit.	fresco				desidratado			
			GC-MS		GC×GC		GC-MS		GC×GC	
			RI	Sim. (%)	RI	² t _R	RI	Sim. (%)	RI	² t _R
1	acetaldeído		x	96,7	x	N	x	96,7	x	N
2	metanol		x	94,3	x	1,66	x	94,3	x	1,80
3	acetato de metila	818	x	96,0	x	0,93	x	96,4	x	0,78
4	acetona	827	x	96,2	x	N	x	91,8	x	N
5	acetato de etila	884	x	95,3	x	0,96	x	95,4	x	1,05
6	propanoato de metila	904	x	96,2	x	1,12	x	x	x	1,10
7	2-metil-butanal		x	x	x	x	x	89,4	x	N
8	3-metil-butanal		x	x	x	x	x	93,2	x	N
9	2-metil-propanoato de metila	922	x	91,9	x	N	x	x	x	x
10	2-propenoato de metila		x	94,1	x	N	x	x	x	x
11	etanol		x	95,2	x	1,01	x	96,2	x	0,97
12	propanoato de etila	953	x	x	x	x	x	92,0	x	N
13	2-metil-propanoato de etila	966	x	x	x	x	x	87,1	x	N
14	acetato de propila	972	x	94,7	x	N	X	x	x	x
15	2,3-butanodiona		x	91,0	x	N	X	93,9	x	N
16	butanoato de metila	984	x	94,7	x	1,39	x	87,5	x	1,38
17	n.i.		1002	x	1000	0,85	x	x	x	x
18	2-metil-butanoato de metila	1009	1011	92,7	1005	1,67	1011	91,1	1005	1,68
19	acetato de 2-metilpropil		1015	87,7	N	N	x	x	x	x
20	3-metilbutanoato de metila	1017	1020	83,6	N	N	x	x	x	x
21	butanoato de etila	1035	1037	84,5	N	N	1035	93,3	1032	1,75
22	2-metil-butanoato de etila	1051	1054	80,6	N	N	1052	93,5	N	N
23	2,3-pentadiona		x	x	x	x	1057	89,2	N	N
24	3-metil-butanoato de etila	1067	x	x	x	x	1068	81,0	N	N

[CONTINUA]

Tabela 3. - CONTINUAÇÃO

#	Identidade	RI Lit.	fresco				desidratado			
			GC-MS		GC×GC		GC-MS		GC×GC	
			RI	Sim. (%)	RI	² t _R	RI	Sim. (%)	RI	² t _R
25	dissulfeto de dimetila		x	x	x	x	1069	82,0	N	N
26	acetato de butila	1070	1075	88,3	N	N	1071	82,6	N	N
27	acetato de 2-pentila		1077	87,0	N	N	x	x	x	x
28	hexanal	1078	1084	91,9	1079	1,69	1080	90,1	1079	1,71
29	pentanoato de metila	1082	1090	97,3	1084	1,93	P	P	1084	1,90
30	cabonato de etila	1099	x	x	x	x	1105	95,2	N	N
31	acetato de 2-metilbutil	1123	1116	85,2	1120	2,30	1117	868	1120	2,27
32	4-metil-3-pente-2-ona		x	x	x	x	1129	92,6	N	N
33	1-metoxi-2-propanol		1152	92,0	x	x	1150	92,4	1159	1,11
34	1-butanol	1141	x	x	x	x	1162	91,0	N	N
35	hepatanal		x	x	x	x	1174	82,0	1172	2,09
36	hexanoato de metila	1183	1176	95,0	1172	2,33	1177	87,3	1172	2,36
37	acetato de 4-penten-1-ila		1190	85,8	N	N	1192	x	N	N
38	2-metil-butanol		x	x	x	x	1216	88,6	1211	1,20
39	3-metil-butanol	1208	x	x	x	x	1218	92,1	1216	1,15
40	5-hexenoato de metila	1226	1225	88,4	1220	1,94	P	P	1222	1,97
41	n.i.		x	x	x	x	1228	x	1224	1,47
42	hexanoato de etila	1230	1226	88,1	1222	3,02	1228	94,0	1224	2,90
43	β-ocimeno	1241	1240	88,7	1240	3,76	P	P	1238	3,78
44	acetato de 2-pentenila		1246	84,0	1240	1,95	P	P	1240	1,95
45	3-hexenoato de metila (Z)	1251	1252	92,9	1250	1,99	P	P	1250	1,99
46	pentanol		x	x	x	x	1257	89,3	N	N
47	3-hexenoato de metila (E)	1258	1260	92,9	1259	1,97	x	P	1256	2,00
48	dihidro-2-metil-3(2H)-furanona	1259	x	x	x	x	1260	91,1	N	N
49	octanal		E	E	1273	2,51	1279	89,2	1273	2,54

[CONTINUA]

Tabela 3. - CONTINUAÇÃO

#	Identidade	RI Lit.	fresco				Desidratado			
			GC-MS		GC×GC		GC-MS		GC×GC	
			RI	Sim. (%)	RI	² t _R	RI	Match	RI	² t _R
50	heptanoato de metila	1279	1282	88,0	1276	2,89	E	E	1276	2,83
51	2-hexenoato de metila	1284	1284	87,9	1279	2,16	P	P	1279	2,10
52	n.i.		x	x	1279	1,42	x	x	1279	1,38
53	3-hexenoato de etila (E)	1301	x	x	x	x	1299	92,6	N	N
54	2-hidróxi-etil-butanoato de metila	1301	x	x	x	x	1305	80,0	N	N
55	n.i.		1315	x	1318	2,35	x	x	x	x
56	hepatanoato de etila		E	E	1323	3,50	x	x	x	x
57	n.i.		x	x	x	x	1326	89,8	1323	2,03
58	4-heptenoato de metila	1323	1325	83,0	1318	2,36	P	P	1318	2,36
59	6-metil-5-hepten-2-ona		1329	83,9	N	N	x	x	x	x
60	2-hidroxi-propanoato de etila		x	x	x	x	1344	90,4	N	N
61	2-isopropil-5-metil-2-hexanal		1347	82,0	N	N	x	x	x	x
62	hexanol	1353	x	x	x	x	1357	89,8	1355	1,33
63	trissulfeto de dimetila		x	x	x	x	1365	84,1	N	N
64	octanoato de metila	1383	1384	92,0	1374	3,32	1383	84,9	1384	3,32
65	nonanal	1387	1385	91,3	1382	2,83	1385	91,9	1382	2,87
66	n.i.		1401	x	1403	1,71	1405	x	1403	1,77
67	4 -octenoato de metila (Z)	1412	1415	83,0	1415	2,75	x	x	x	x
68	4 -octenoato de metila (E)		1418	86,9	1421	2,72	P	P	1421	2,70
69	octanoato de etila	1426	1428	86,4	1423	3,91	1427	91,7	1421	3,95
70	acetato de metil(tio)etila	1438	x	x	x	x	1441	85,1	N	N
71	1,3,5,8-undecatetraeno	1440	1442	88,9	1436	3,31	P	P	1434	3,35
72	metil(tio)propanal		X	x	x	x	1449	88,7	1439	1,3
73	ácido acético	1484	1450	95,0	1441	0,99	1444	93,2	1439	0,96
74	3-octenoato de metila	1446	1448	88,4	1444	2,65	P	P	1441	2,61
75	1-octen-3-ol	1451	x	x	x	x	1456	86,0	N	N

[CONTINUA]

Tabela 3. - CONTINUAÇÃO

#	Identidade	RI Lit.	fresco				desidratado			
			GC-MS		GC×GC		GC-MS		GC×GC	
			RI	Sim. (%)	RI	² t _R	RI	Match	RI	² t _R
76	furfural	1451	1454	96,9	x	x	1453	95,3	1454	1,18
77	4-octenoato de etila		x	x	x	x	1465	84,8	N	N
78	copaeno	1471	1472	87,9	1470	1,95	P	P	1470	1,95
79	nonanoato de metila	1481	1483	90,7	1477	3,50	E	E	1477	3,52
80	2-etil-1-hexanol	1491	x	x	x	x	1494	93,9	N	N
81	decanal		1488	88,4	1482	3,23	E	E	1482	3,23
82	n.i.		1500	x	1485	2,72	1503	x	X	x
83	benzaldeido	1506	x	x	x	x	1510	94,9	1501	1,34
84	n.i.		x	x	x	x	1514	x	N	N
85	3-metil(tio)propanoato de metila	1513	1516	89,3	1510	1,62	P	P	1510	1,62
86	2,3-butenodiolacetato		x	x	x	x	1520	83,4	N	N
87	n.i.		1519	x	1516	1,82	1521	x	1519	1,85
88	n.i.		1539	x	1530	1,56	1537	x	1530	1,62
89	octanol		1563	88,2	N	N	x	x	x	x
90	3-metil(tio)propanoato de etila	1558	1560	85,0	1557	1,68	1561	89,4	1556	1,71
91	5-metil-furfural		1565	91,0	N	N	1565	90,2	1566	1,33
92	3-acetoxibutirato de etila	1576	1577	86,8	1583	2,28	x	x	x	x
93	decanoato de metila	1583	1584	83,7	1583	3,91	x	P	1585	3,72
94	n.i.		1594	x	1590	5,96	P	P	1590	5,86
95	4-decenoato de metila	1612	1615	85,0	1609	3,33	P	P	1609	3,27
96	decanoato de etila	1637	E	E	1630	4,29	1635	89,9	1630	4,34
97	4-decenoato de etila		x	x	x	x	1642	82,9	N	N
98	n.i.		1648	x	1647	2,08	x	x	1647	2,03
99	nonanol		1665	92,4	N	N	x	x	x	x
100	ácido 2-metil-butanóico	1666	1663	90,0	1666	1,24	1669	89,7	1663	1,01

[CONTINUA]

Tabela 3. - CONTINUAÇÃO

#	Identidade	RI Lit.	fresco				desidratado			
			GC-MS		GC×GC		GC-MS		GC×GC	
			RI	Sim. (%)	RI	² t _R	RI	Sim. (%)	RI	² t _R
101	n.i.		1678	x	1675	2,86	1680	x	1675	2,75
102	n.i.		1678	x	1678	2,15	1680	x	1678	192
103	n.i.		1683	90,4	N	N	1691	91,3	N	N
104	n.i.		1687	x	1680	5,78	P	P	1677	5,81
105	α-muureleno	1700	1700	80,1	1699	5,38	P	P	1699	5,38
106	n.i.		1704	x	1707	1,97	1704	x	1707	1,92
107	n.i.		x	x	x	x	1738	x	1752	1,83
108	ácido pentanóico		1770	86,6	1767	1,24	1770	P	1767	1,16

NOTAS: Sim.= similaridade entre o espectro de massas do analito e o espectro de massas da biblioteca; x = não detectado na amostra; n.i. = detectado, mas não identificado; E = não identificado por GC-MS, mas identificado por estruturação; P = não identificado por GC-MS e identificado por apresentar mesmo ¹t_R e ²t_R de composto identificado na amostra fresca ou desidratada; N = identificado por GC-MS, porém, não foi possível atribuir a identidade no cromatograma GC×GC.

Ao total, com a coluna DBWax, 60 compostos foram identificados na amostra fresca, enquanto que, na desidratada, foram identificados 57. Os compostos majoritários presentes na amostra fresca são os mesmos obtidos com a coluna HP-5; o mesmo é observado para a amostra desidratada, com exceção do ácido acético, que não havia sido identificado nas análises empregando a coluna HP-5. Em complemento, outros ácidos carboxílicos minoritários foram identificados nessa amostra.

Ao longo das análises foi observado que a variabilidade dos compostos presentes no abacaxi fresco foi pequena; entretanto, a quantidade dos mesmos varia de amostra para amostra, principalmente em relação ao grau de maturação do abacaxi. Observação semelhante pode ser feita para o abacaxi desidratado; contudo, o motivo para a variação na quantidade dos compostos pode ser atribuído ao diferente grau de desidratação das diversas fatias de abacaxi utilizadas para as análises. Em geral, pode-se supor que os ésteres metílicos presentes na amostra fresca são convertidos em ésteres etílicos e, além disso, outros compostos mais polares são formados durante o processo de desidratação [86].

5.2.3. Análise por GC×GC-FID

A fração volátil da polpa de abacaxi fresco e de abacaxi desidratado foi analisada por GC×GC-FID. A programação de temperatura do forno do cromatógrafo foi a mesma empregada na separação por GC-MS e a vazão do gás de arraste foi de 0,6 mL min⁻¹. Os parâmetros referentes ao modulador foram os mesmos apresentados na otimização do protótipo GC×GC versão 3. Na Figura 34 estão mostrados os cromatogramas de 1D-GC-FID e de GC×GC-FID obtidos com o conjunto de colunas 1 (*normal*) para a fração volátil da polpa de abacaxi fresco. A análise por 1D-GD-FID foi feita com o próprio conjunto de colunas 1, porém sem modulação. Quando comparados o cromatograma obtido por 1D-GC-FID (a) e o cromatograma modulado bruto por GC×GC-FID (b), pode ser observado que o perfil do cromatograma é o mesmo, porém ocorre aumento na intensidade dos picos modulados em comparação ao pico primário não modulado. Em (c) está mostrado o cromatograma GC×GC-FID com PM de 6 s, o qual apresenta muito mais picos que em (a). Embora ainda ocorram algumas coeluições em (c), a separação é muito superior em relação ao cromatograma (a), bem como a sensibilidade. Já em (d)

está mostrado o cromatograma GC×GC-FID da mesma amostra, porém, com PM de 7 s.

Análises com diferentes PM permitem visualizar compostos que estão fora de ciclo. Pico fora de ciclo deve ser evitado quando ele coelui com compostos da modulação seguinte ou quando o sinal fica dividido pelo processo de transformar o vetor de dados em uma matriz. Esse é o caso do composto indicado pela seta vermelha em (d): o t_R do composto é 7,5 s (máximo do pico), sendo que a eluição inicia em 6,6 s e termina em 7,7 s. Como o PM escolhido foi 7 s, uma parte do pico está representada num ciclo de modulação e a outra parte no ciclo de modulação subsequente. Para a análise do abacaxi fresco o PM de 6 s foi escolhido para a separação com conjunto de colunas 1 por dois motivos: praticamente não há picos fora de ciclo que coeluem com compostos do ciclo de modulação subsequente e, também, PM mais curtos são mais adequados para minimizar a perda de resolução da 1D , que ocorre quando picos já separados na 1D são coletados no modulador.

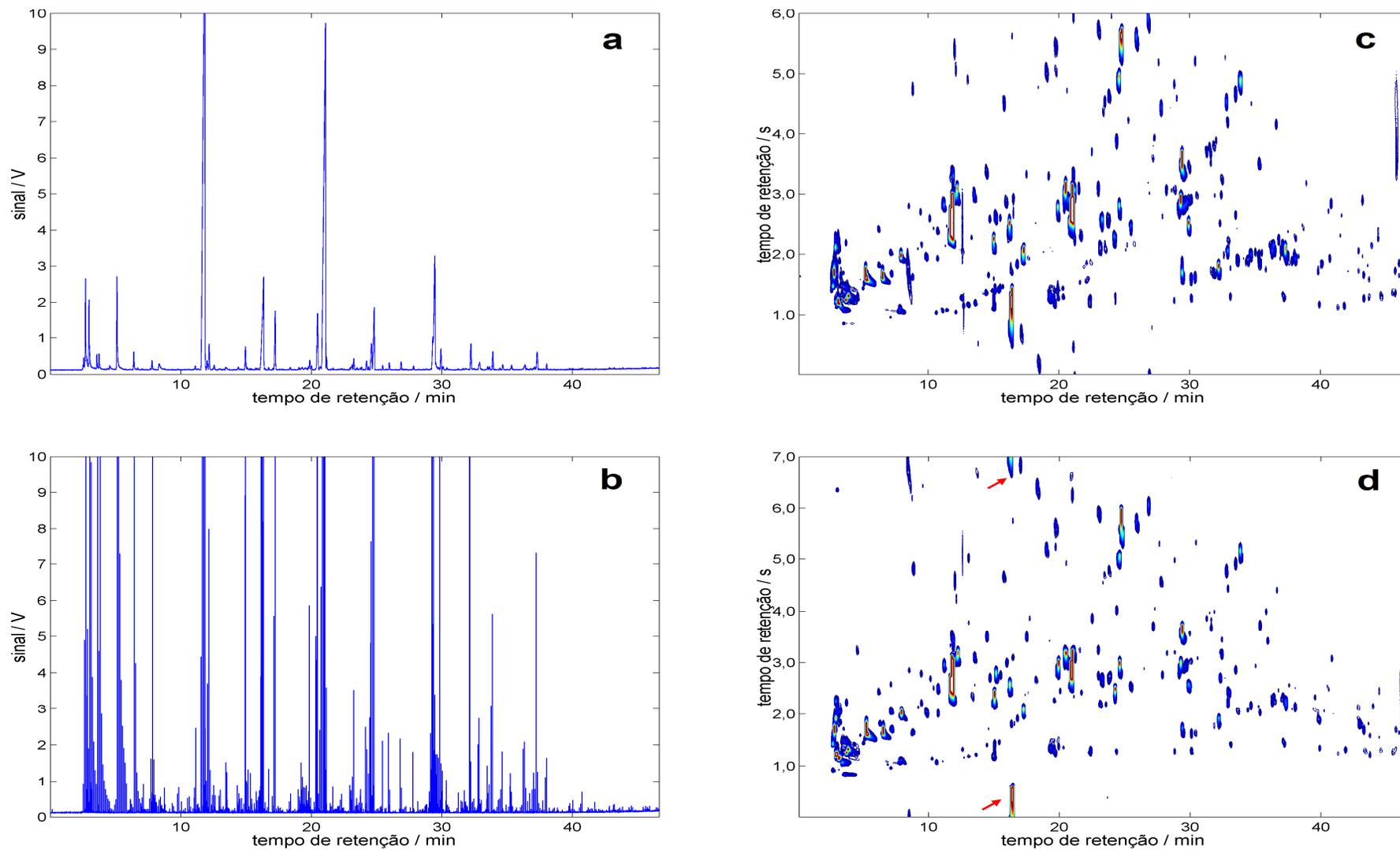


Figura 34. Fração volátil da polpa de abacaxi fresco analisada usando conjunto de colunas 1. (a) cromatograma 1D-GC-FID; (b) cromatograma GCxGC modulado bruto, PM = 6 s; (c) cromatograma GCxGC, PM = 6 s; (d) cromatograma GCxGC, PM = 7 s.

A fração volátil da polpa de abacaxi desidratado também foi analisada empregando o conjunto de colunas 1. Na Figura 35 estão mostrados os cromatogramas GC×GC para PM de 6 s (a) 7 s (b), nos quais a separação é bastante semelhante. Comparativamente aos cromatogramas obtidos para o abacaxi fresco [Figura 34(c) e (d)], pode-se observar que mais compostos com 2t_R elevado são observados no abacaxi desidratado, referente aos compostos mais polares formados durante o processo de desidratação.

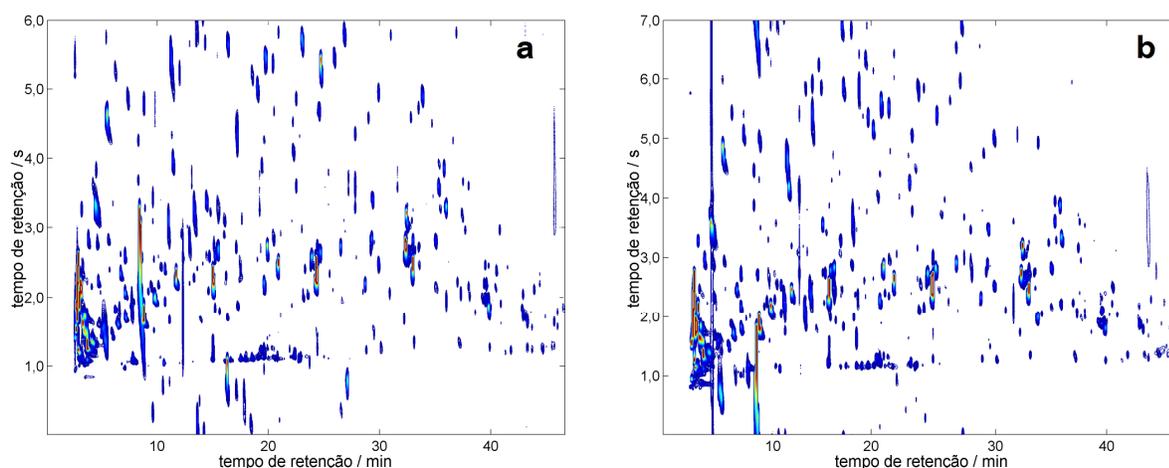


Figura 35. Fração volátil da polpa de abacaxi desidratado analisada usando conjunto de colunas 1. Cromatograma GC×GC-FID (a) com PM = 6 s e (b) PM = 7 s.

A separação obtida para a fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado, empregando o conjunto de colunas 1, parece satisfatória, visto que o espaço de separação foi bem utilizado, sendo mais perceptível nos cromatogramas da amostra desidratada. Entretanto, não existe um consenso do melhor conjunto de colunas para análise de compostos voláteis de plantas, frutas e alimentos ou de compostos presentes em óleos essenciais, da mesma forma que existe para compostos de origem petroquímica, no qual um conjunto de colunas apolar x (semi)polar é o mais indicado.

Um conjunto de colunas polar × apolar (*inverso*) foi empregado na análise de óleo essencial de limão [87] e de voláteis de baunilha e óleo de oliva [88]. Segundo os autores desses trabalhos, uma vantagem de utilizar um conjunto de colunas *inverso* para a análise de compostos mais polares é que o 2t_R é menor que em análises empregando um conjunto de colunas com um conjunto de colunas *normal* e, por isso,

PM menores podem ser escolhidos. Quando os autores usaram o conjunto de colunas *normal*, foi sugerido o uso de um forno secundário para diminuir o t_R^2 . Portanto, outros conjuntos de colunas com fases estacionárias diferentes foram estudados para avaliar a separação dos compostos.

Análises da fração volátil de polpa de abacaxi fresco e desidratado foram realizadas com os conjuntos de colunas especificados na Tabela 1, sendo que todos os cromatogramas resultantes estão mostrados na Figura 36 para efeito de comparação. Os cromatogramas (a) e (d) correspondem às análises com o conjunto de colunas 1 para abacaxi fresco e desidratado, respectivamente. Os cromatogramas (b) e (e) correspondem às mesmas amostras, porém usando o conjunto de colunas 2, e os cromatogramas (c) e (f) são referentes às análises com o conjunto de colunas 3. Numa primeira comparação entre os cromatogramas observa-se que a separação proporcionada pelo conjunto de colunas 2 para abacaxi fresco (b) e desidratado (e) é inferior às respectivas análises com os conjuntos de colunas 1 e 3. Esse resultado é esperado, uma vez que esse conjunto de colunas é o menos ortogonal dentre aqueles estudos: a fase estacionária da 1D é HP-5 enquanto que a da 2D é HP-50. Ou seja, existe correlação entre os mecanismos de separação da 1D e da 2D . Além disso, nesse conjunto de colunas a retenção na 2D é favorecida para compostos aromáticos, os quais não foram encontrados nas amostras estudadas.

Comparando as separações obtidas com os outros dois conjuntos de colunas, observa-se que o número de picos visualizados é próximo de 200 para ambos os conjuntos de colunas, porém um pouco maior para o conjunto de colunas 3. Além disso, o espaço de separação é bem utilizado com ambos os conjuntos de colunas. Em resumo, baseado na separação entre os picos e no número de picos visualizados, os dois conjuntos de colunas são adequados para separação da fração volátil da polpa de abacaxi e, por isso, os dois conjuntos serão investigados na etapa de identificação dos compostos nos cromatogramas GC×GC.

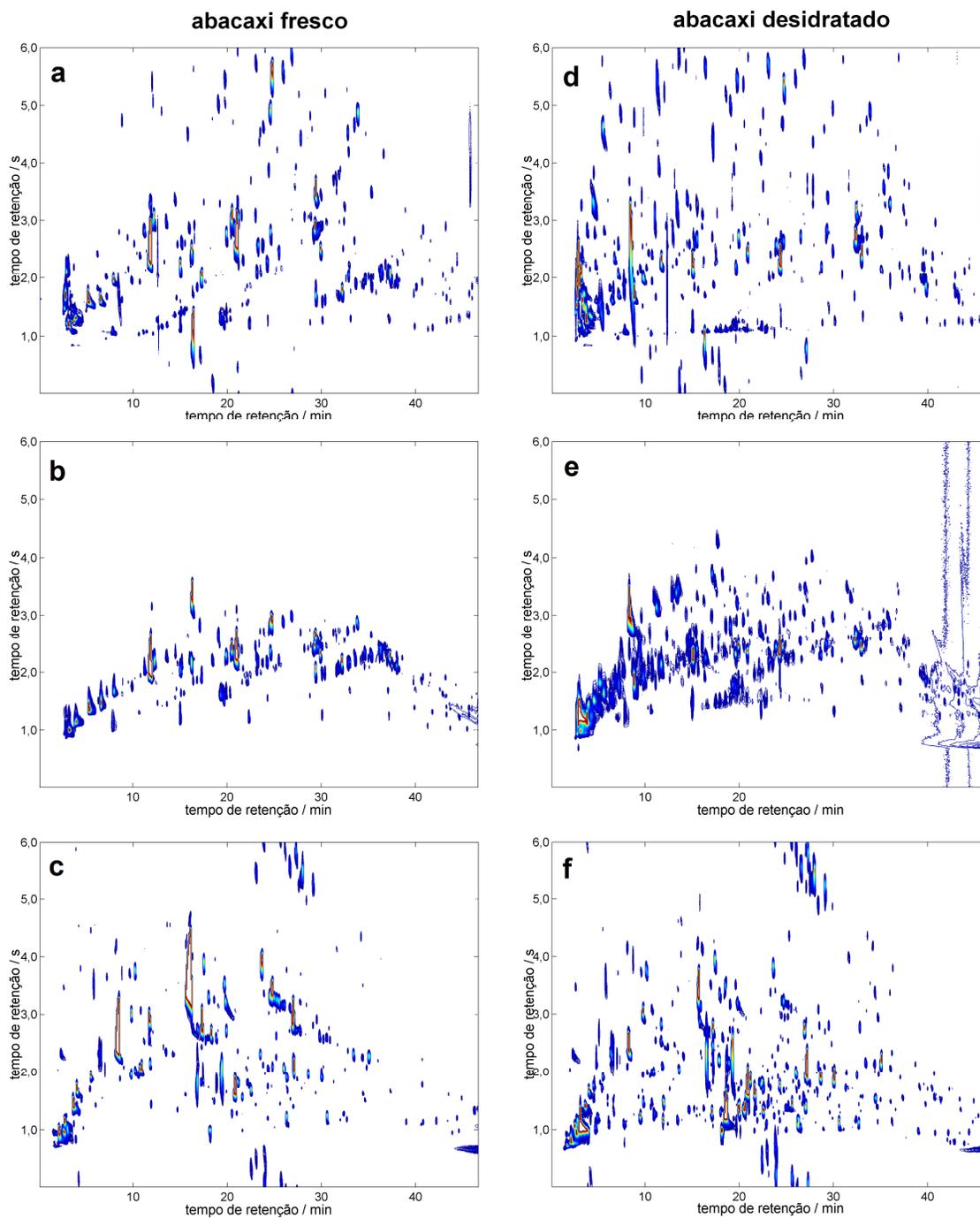


Figura 36. Análise da fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado empregando os conjuntos de colunas 1, 2 e 3. Os cromatogramas GC×GC (a), (b) e (c) foram obtidos para a fração volátil da polpa de abacaxi fresco com os conjuntos de colunas 1, 2 e 3, respectivamente. Os cromatogramas GC×GC (d), (e) e (f) foram obtidos para a fração volátil da polpa de abacaxi desidratado com os conjuntos de colunas 1, 2 e 3, respectivamente.

5.2.4. Identificação dos compostos no cromatograma GC×GC-FID

A atribuição da identidade dos compostos nos cromatogramas GC×GC-FID foi feita por comparação entre os perfis cromatográficos das análises feitas por GC×GC e por GC-MS, com auxílio dos respectivos LTPRI de cada análise. A seguinte abordagem sistemática iterativa foi empregada para processar e interpretar os cromatogramas para cada amostra e conjunto de colunas:

- tabular os LTPRI na 1D e 2t_R dos picos detectados nos cromatogramas de GC×GC-FID;
- tabular a identidade dos compostos, os LTPRI e a similaridade espectral dos picos detectados nos cromatogramas de GC-MS ;
- comparar as tabelas, com base nos LTPRI e perfis cromatográficos, e alocar os picos identificados por GC-MS nos cromatogramas de GC×GC-FID;
- re-examinar os cromatogramas de GC×GC-FID e tabelas de picos, verificando visualmente a presença de séries homólogas ou grupos estruturais evidentes;
- atribuir tentativamente a identidade de picos presentes nas séries homólogas e grupos estruturais determinados pela inspeção visual dos cromatogramas GC×GC-FID, mas que não foram identificados e/ou detectados por GC-MS.
- verificar nos cromatogramas de GC-MS indícios das espécies tentativamente identificados pela estruturação cromatográfica nos dados de GC×GC-FID, mas não identificados na primeira avaliação (por exemplo, picos com LTPRI e fragmentação do espectro de massas compatíveis com certos compostos, cujos espectros de massas não puderam ser encontrados na biblioteca de espectro de massas disponíveis por coeluição com outros compostos ou pela baixa intensidade do espectro de massas).

Na Figura 37 está apresentada a comparação dos cromatogramas GC-MS e GC×GC-FID para fração volátil da polpa de abacaxi fresco, empregando a coluna HP-5 na análise por GC-MS e o conjunto de colunas 1 na análise por GC×GC-FID (no qual a 1D é exatamente igual à coluna usada na análise por GC-MS). Através dessa comparação foi possível atribuir a identidade dos compostos no cromatograma GC×GC-FID. Esta forma de identificação dos compostos no cromatograma GC×GC-FID foi feita somente quando havia concordância entre os LTPRI por ambas as análises. Nos casos em que não houve concordância, o composto identificado por GC-MS foi denominado

pela letra “N” nas colunas referentes aos parâmetros GC×GC, indicando que a atribuição da identidade não foi feita no cromatograma GC×GC.

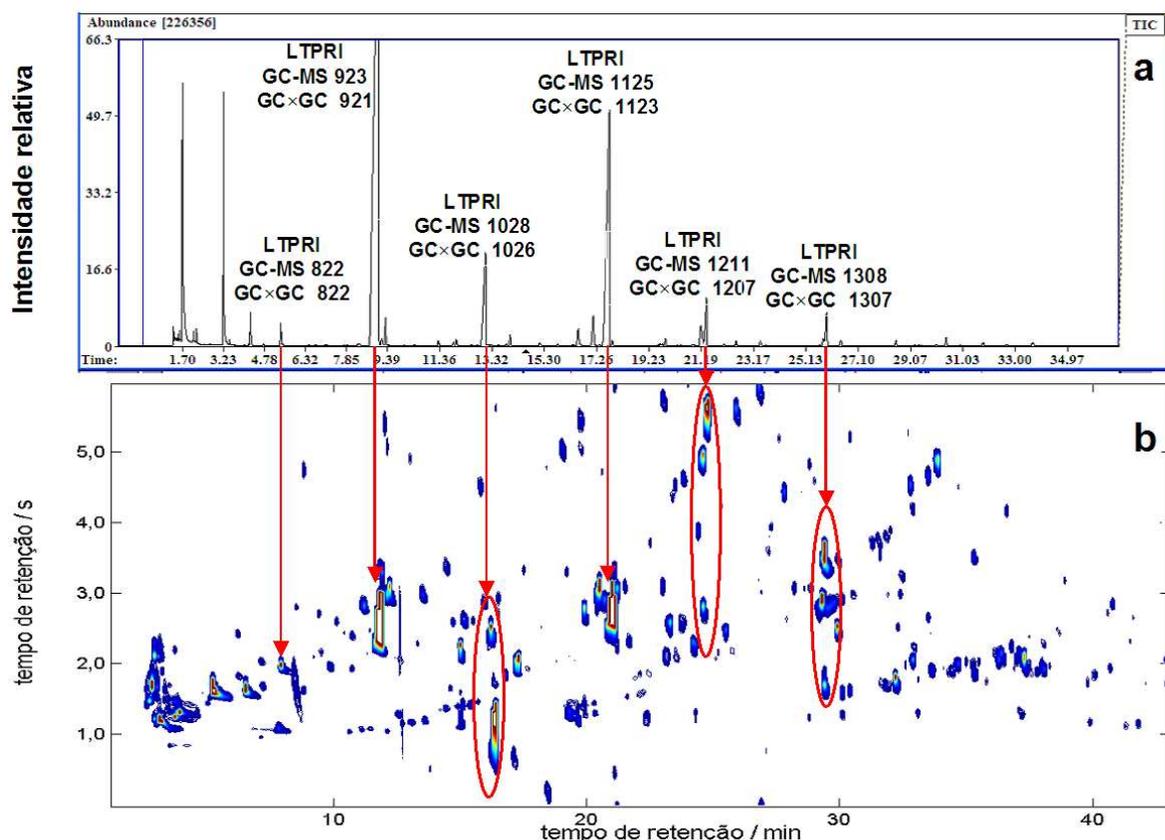


Figura 37. Comparação dos perfis cromatográficos da fração volátil da polpa de abacaxi fresco para as análises por (a) GC-MS e (b) GC×GC-FID, com respectivos LTPRI para alguns picos.

Embora na Figura 37 a estruturação cromatográfica não seja tão aparente como nas amostras petroquímicas, foram observadas algumas relações entre os tempos de retenção na ¹D e na ²D para compostos quimicamente relacionados. Na Figura 38 está mostrado um corte do cromatograma apresentado na Figura 37(b), no qual a posição de eluição dos picos da série homóloga de ésteres metílicos alifáticos (acetato de metila, 3, até decanoato de metila, 84) está destacada por uma linha preta. Os compostos identificados pelos números 59 e 81 não foram usados para construir a linha dos ésteres metílicos, pois os mesmos não haviam sido identificados por GC-MS devido a coeluição com o 3-metil(tio)propanoato de metila e a baixa qualidade do espectro de massas, respectivamente. Entretanto, pode ser observado que a linha referente à posição de eluição dos ésteres metílicos se sobrepõem aos dois compostos não

identificados; além disso, os LTPRI para os compostos 59 e 81 são 1026 e 1224, respectivamente. Esses valores de LTPRI apresentam concordância com os valores tabelados para o heptanoato de metila e nonanoato de metila que são 1025 e 1223, respectivamente.

Desta forma, pode-se inferir que os dois compostos em questão sejam, realmente, os ésteres metílicos citados e, portanto, pode-se dizer que esses compostos foram identificados em função da estruturação cromatográfica. Em casos como esses, a letra “E” será apresentada nas tabelas no lugar do valor de similaridade espectral nas análises por GC-MS, indicando que a identificação do composto foi feita com auxílio da estruturação cromatográfica. A letra “P” foi usada para compostos que não foram identificados por GC-MS nem pela estruturação cromatográfica, mas que apresentam 1t_R e 2t_R idênticos a um composto identificado na amostra desidratada (e vice-versa).

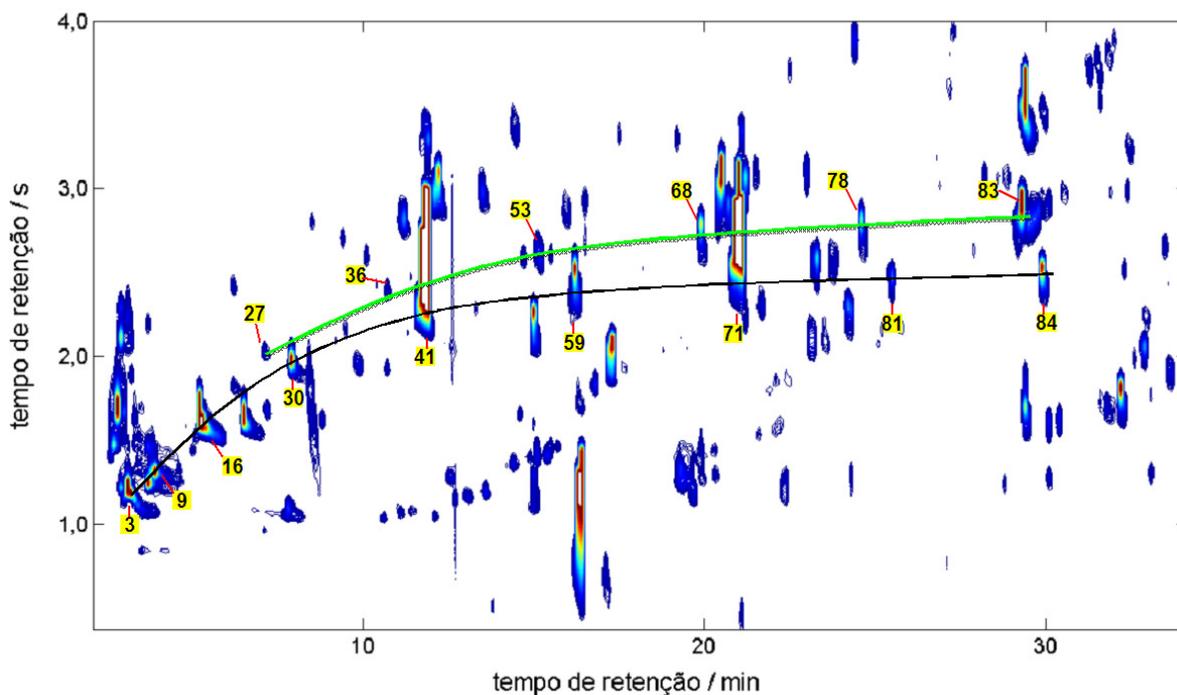


Figura 38. Corte do cromatograma mostrado na Figura 37(b), destacando em preto a posição de eluição da série de ésteres metílicos alifáticos e, em verde, a posição de eluição da série de aldeídos alifáticos, com os respectivos números referentes à Tabela 2.

Na Figura 38 também está destacada, através da linha em verde, a posição da série homóloga dos aldeídos alifáticos (hexanal, 27, até undecanal, 83): nessa série, heptanal (36) e o undecanal (83) não haviam sido identificados por GC-MS, e foram

identificados da por meio de informação referente à estruturação cromatográfica, da mesma forma apresentada para os ésteres metílicos alifáticos.

É importante salientar que tal forma de identificação pode apresentar erros; contudo, essa abordagem pode ser considerada mais confiável que a simples comparação dos LTPRI ou injeção de padrões em análises por 1D-GC-FID. Essa afirmação baseia-se no fato de que dois compostos de polaridades diferentes podem apresentar mesmo LTPRI em uma análise por 1D-GC; entretanto, na análise por GC×GC esses compostos devem apresentar 2t_R diferentes, visto que tem polaridade diferente. Para as análises no conjunto de colunas 1 (conjunto *normal*), os compostos menos polares serão pouco retidos na 2D , enquanto que compostos mais polares serão mais retidos. Esse tipo de informação é importante para fazer a atribuição da identidade dos compostos no cromatograma GC×GC-FID. Uma forma de aumentar a confiabilidade desse tipo de identificação seria através dos índices de retenção na 2D ; contudo, esse tipo de estudo ainda encontra-se em estágio inicial de desenvolvimento. Cabe ressaltar que mesmo sem conhecer os índices de retenção na 2D , é possível obter informação a respeito da polaridade do pico a ser identificado.

A identificação dos compostos presentes na fração volátil da polpa de abacaxi fresco no cromatograma GC×GC-FID, com o conjunto de colunas 1, após atribuir a identidade ao máximo de picos possíveis, está apresentada na Figura 39, com numeração dos compostos referente à Tabela 2.

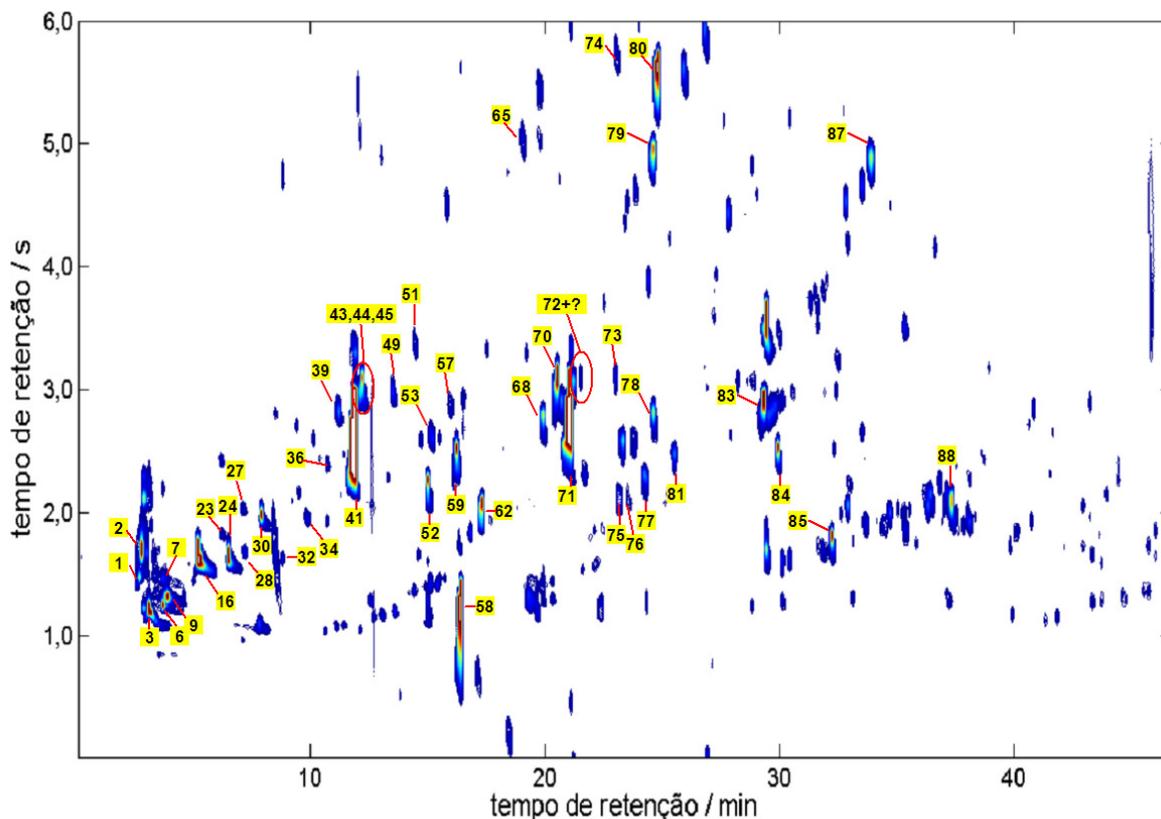


Figura 39. Cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi fresco com atribuição da identidade dos picos. Numeração referente à Tabela 2.

A estruturação cromatográfica também foi observada ao avaliar o cromatograma GC×GC-FID para a fração volátil da polpa de abacaxi desidratado com conjunto de colunas 1. Uma seção do cromatograma referente à análise está apresentada na Figura 40. A série homóloga de ésteres metílicos alifáticos, a qual também foi observada para o abacaxi fresco, está destacada por uma linha preta (pentanoato de metila, 30, até decanoato de metila, 84). A linha vermelha destaca a série homóloga de ésteres etílicos alifáticos (butanoato de etila, 20, até nonanoato de etila, 82), os quais estão presentes em maior número na amostra desidratada que na amostra fresca. Os compostos 35 e 82 não foram usados para traçar a linha vermelha. De acordo com a estruturação cromatográfica, esses compostos podem ser identificados como pentanoato de etila (35) e nonanoato de etila (82), respectivamente.

Além da estruturação mostrada para essas séries homólogas, também é possível observar uma relação na posição de eluição entre ésteres alifáticos com mesmo número de átomos de carbono na molécula. Por exemplo, a posição de eluição do hexanoato de etila (52), identificado por GC-MS, foi relacionada à posição do

heptanoato de metila (59), que foi identificado pela estruturação cromatográfica da GC×GC, por uma linha laranja. Se esta mesma linha laranja for transposta para octanoato de etila (77), tal linha ficará sobreposta a outra mancha, provavelmente o nonanoato de metila (81), uma vez que há concordância com o LTPRI e retenção similar aos ésteres metílicos. Essa relação entre esses ésteres pode ser verificada porque a amostra de abacaxi desidratado apresenta ésteres metílicos e etílicos. Essa pode ser considerada outra forma de estruturação cromatográfica, em adição à estruturação apresentada nas séries homólogas, que pode ser empregada para identificação dos compostos.

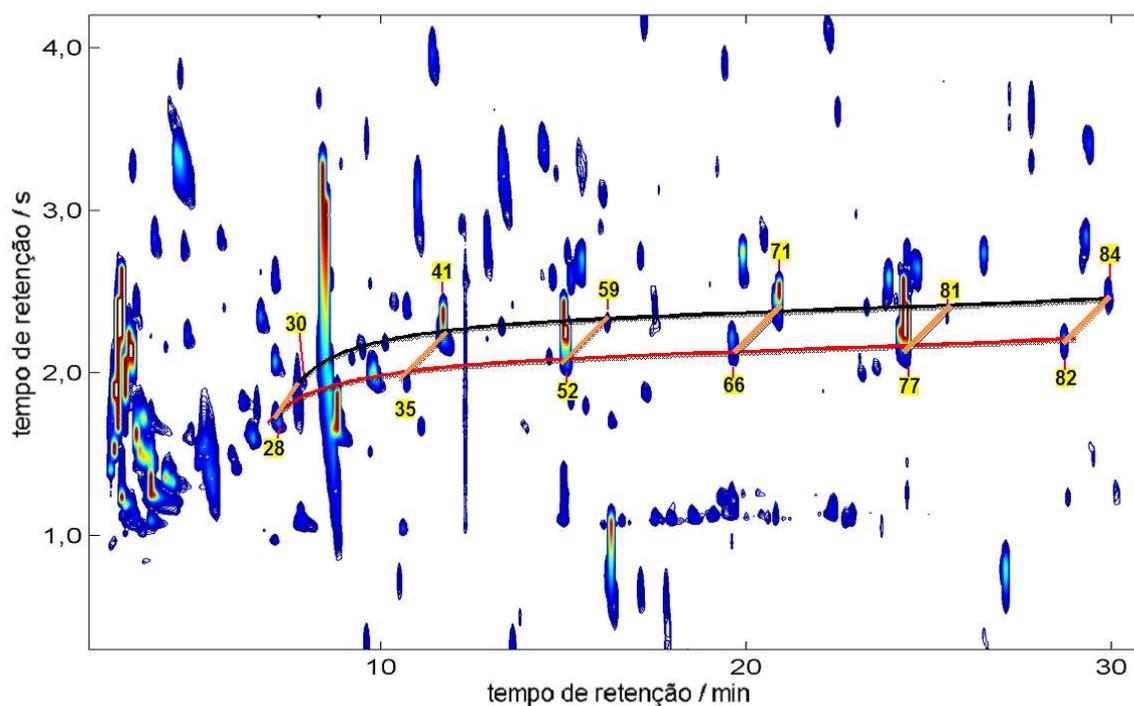


Figura 40. Seção do cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi desidratado obtido com o conjunto de colunas 1. Linha em preto destaca a posição de eluição da série de ésteres metílicos alifáticos e, em vermelho, a posição de eluição da série de ésteres etílicos alifáticos, com os respectivos números referentes à Tabela 2. Linhas em laranja relacionam a posição de eluição de pares de ésteres isômeros com o mesmo número de átomos de carbono na molécula.

O cromatograma GC×GC-FID com a identificação dos compostos presentes na fração volátil da polpa de abacaxi desidratado, obtido com o conjunto de colunas 1, está mostrado na Figura 41. É possível observar que o abacaxi desidratado apresenta mais álcoois e outros compostos polares em relação à amostra fresca, os quais apresentam

t_R superior a 4 s ou estão fora de ciclo. Além disso, observa-se na Figura 41 um grupo de compostos pouco intensos e com pequena w_b que eluem entre 18 min e 25 min da 1D e entre 1,0 s e 1,4 na 2D . Não foi possível identificar nenhum desses picos, porém, pode-se inferir que os compostos sejam alcanos, devido à mínima retenção na coluna polar da 2D . Em resumo, foi possível atribuir identidade para 46 picos no cromatograma GC×GC-FID para a amostra fresca, sendo que 8 desses compostos foram identificados pela estruturação cromatográfica. Para a amostra desidratada, 59 picos no cromatograma GC×GC-FID tiveram a identidade atribuída, sendo que a estruturação cromatográfica permitiu identificar 14 compostos.

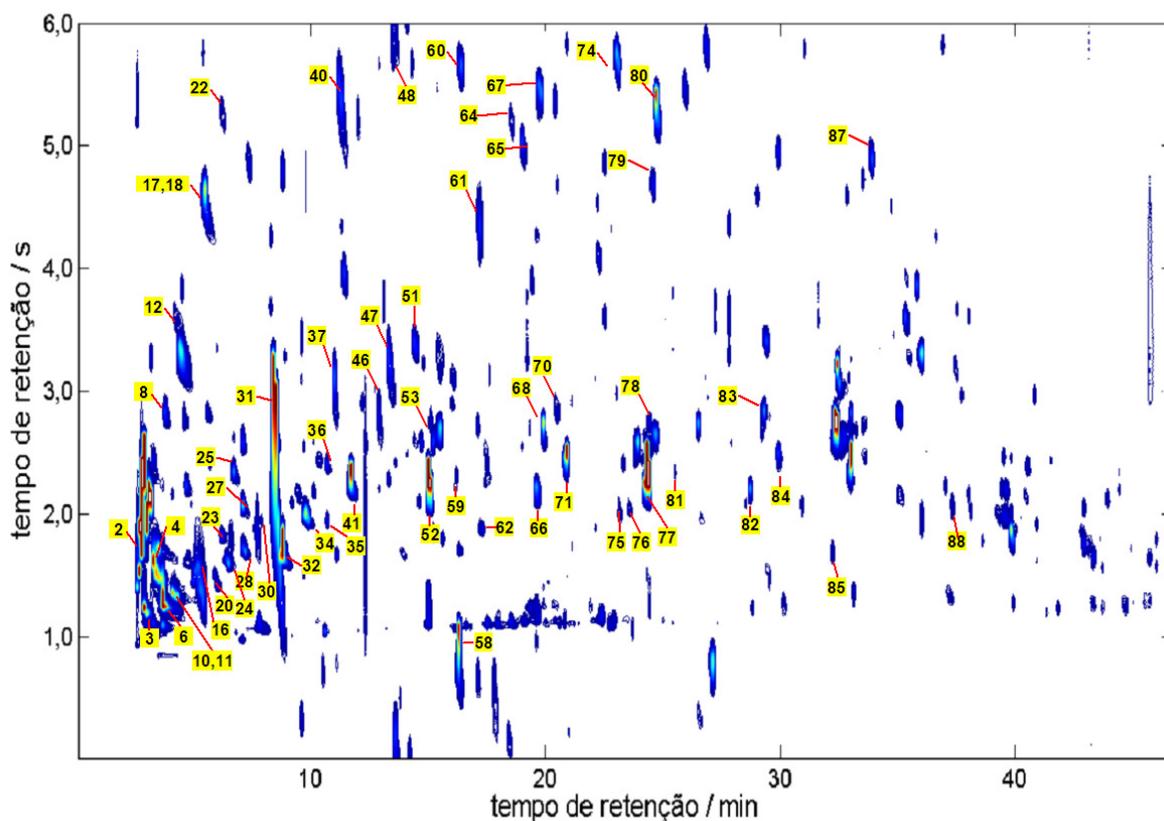


Figura 41. Cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi desidratado com atribuição da identidade dos picos; numeração referente à Tabela 2.

A fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado foi analisada empregando o conjunto de colunas 1, sendo que boa parte dos compostos pode ser identificada nos cromatogramas GC×GC-FID. Entretanto, baseado nos compostos presentes nessas amostras, é possível que o conjunto de colunas 3 (conjunto *inverso*),

possibilite maior separação na 1^{D} e, com isso, forneça mais informações de compostos coeluidos ou isômeros. Na Figura 42 está mostrado o cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi fresco, empregando o conjunto de colunas 3. Na Tabela 3 estão apresentados os dados para comparação entre as análises por GC-MS (coluna DBWax) e por GC×GC-FID, na qual a 1^{D} é idêntica aquela empregada na análise por GC-MS.

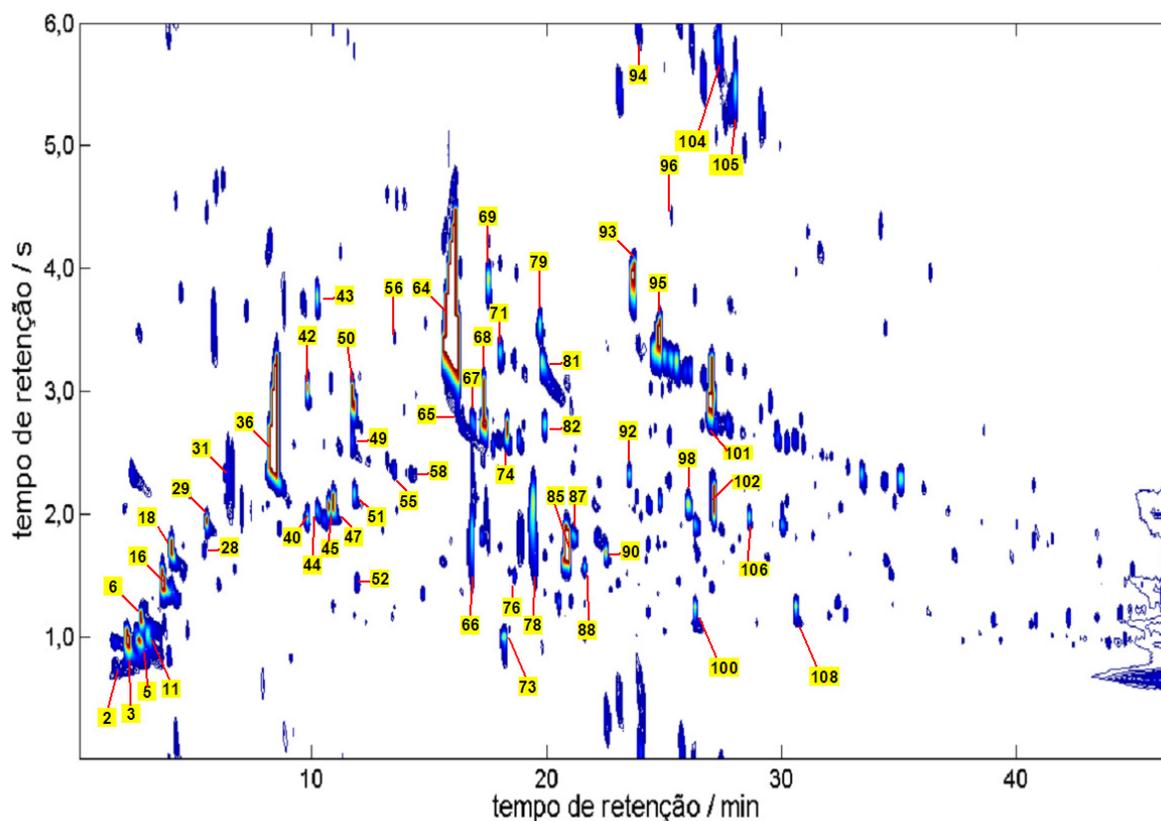


Figura 42. Cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi fresco empregando o conjunto de colunas 3 (*inverso*), com atribuição da identidade dos picos. Numeração referente à Tabela 3.

Como esperado, a estruturação cromatográfica obtida para o conjunto de colunas 3 é diferente daquela obtida pelo conjunto de colunas 1. No conjunto 3, no qual a 2^{D} tem caráter apolar, os compostos mais polares serão menos retidos na 2^{D} , ao contrário do ocorrido com o conjunto normal. Isso pode ser observado na Figura 43: a série de ésteres metílicos alifáticos, destacada por uma linha preta, é menos retida na 2^{D} que a série dos isômeros etílicos, destacada em vermelho. A relação da posição de eluição entre as duas séries está destacada por linhas em laranja. Além disso, na separação obtida com o conjunto de colunas 1, o 2^{t}_{R} para os compostos de uma série

homóloga era aproximadamente o mesmo, evidenciando a separação apenas em função da polaridade. Já com o conjunto de colunas 3, a mesma relação não foi observada, embora ainda possa ser observada a estruturação cromatográfica.

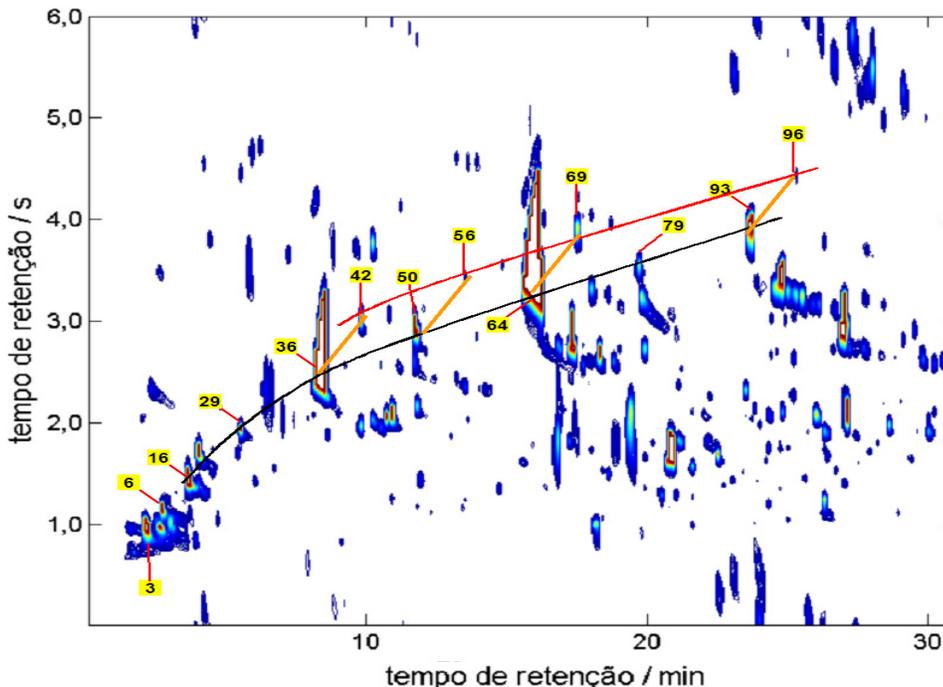


Figura 43. Seção do cromatograma GCxGC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi fresco, obtido com o conjunto de colunas 3. Linha em preto destaca a posição de eluição da série de ésteres metílicos alifáticos e, em vermelho, a posição de eluição da série de ésteres etílicos alifáticos, com os respectivos números referentes à Tabela 3. Linhas em laranja relacionam a posição de eluição de pares de ésteres isômeros com o mesmo número de átomos de carbono na molécula.

A estruturação cromatográfica para ésteres metílicos alifáticos e seus isômeros monoinsaturados também foi observada. Na Figura 44 os ésteres metílicos estão destacados em vermelho, enquanto que os respectivos isômeros insaturados estão destacados por um retângulo laranja. Pode-se observar que os isômeros monoinsaturados do hexanoato de metila (36), dentre os quais foram identificados quatro isômeros do hexenoato de metila e, também, o acetato de 2-pentenila, estão agrupados dentro do retângulo laranja. O mesmo pode ser notado para os isômeros do octanoato de metila (64), agrupados em outro retângulo laranja.

Esse tipo de estruturação é coerente com o conjunto de colunas empregado: isômeros insaturados devem ser mais retidos na 1D (polar) e menos retidos na 2D

(apolar), em relação ao éster metílico saturado. Se o retângulo laranja for transposto para o decanoato de metila (93), pode-se verificar que existem alguns compostos não identificados agrupados dentro do retângulo, os quais estão indicados por setas verdes. Provavelmente, esses compostos são os respectivos isômeros monoinsaturados. Entretanto, em função das diferentes possibilidades de isômeros, não foi atribuída identidade aos compostos.

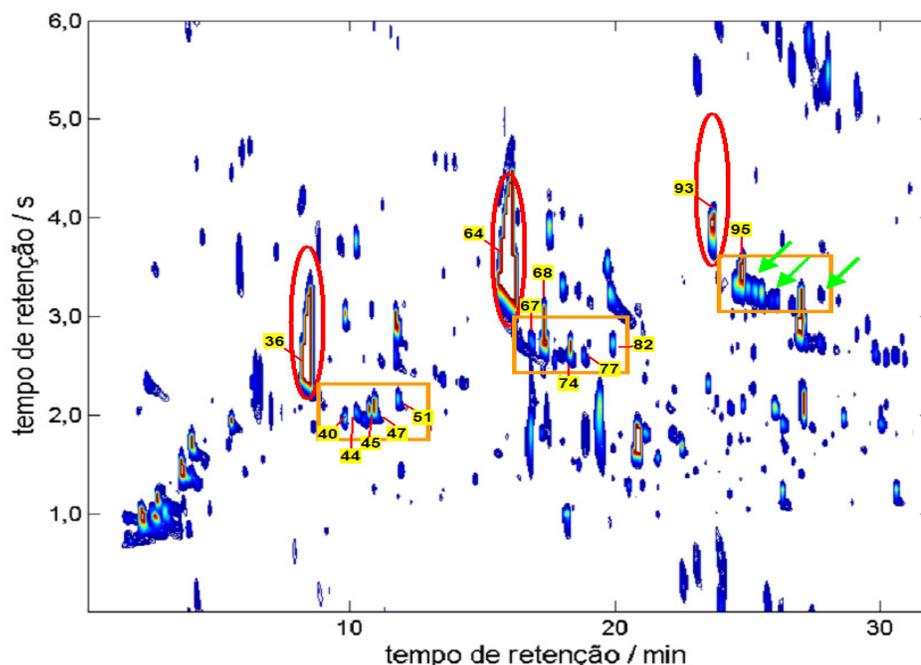


Figura 44. Seção do cromatograma GC×GC da fração volátil da polpa de abacaxi fresco obtido com o conjunto de colunas 3. Elipses em vermelho destacam a posição de eluição de ésteres metílicos alifáticos e os retângulos em laranja destacam a posição de eluição dos isômeros insaturados dos ésteres metílicos. Setas em verde indicam possíveis isômeros que não foram identificados. Números referentes à Tabela 3.

Com o conjunto de colunas 3 foi possível atribuir no cromatograma GC×GC-FID da amostra fresca a identidade de 56 compostos, sendo que 3 compostos foram identificados através da estruturação cromatográfica. Já o cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi desidratado está apresentado na Figura 45, sendo que a identificação dos compostos está apresentada na Tabela 3. Nessa análise, 64 compostos tiveram a identidade atribuída no cromatograma GC×GC-FID, sendo que 22 compostos foram alocados no cromatograma GC×GC-FID em função da estruturação cromatográfica.

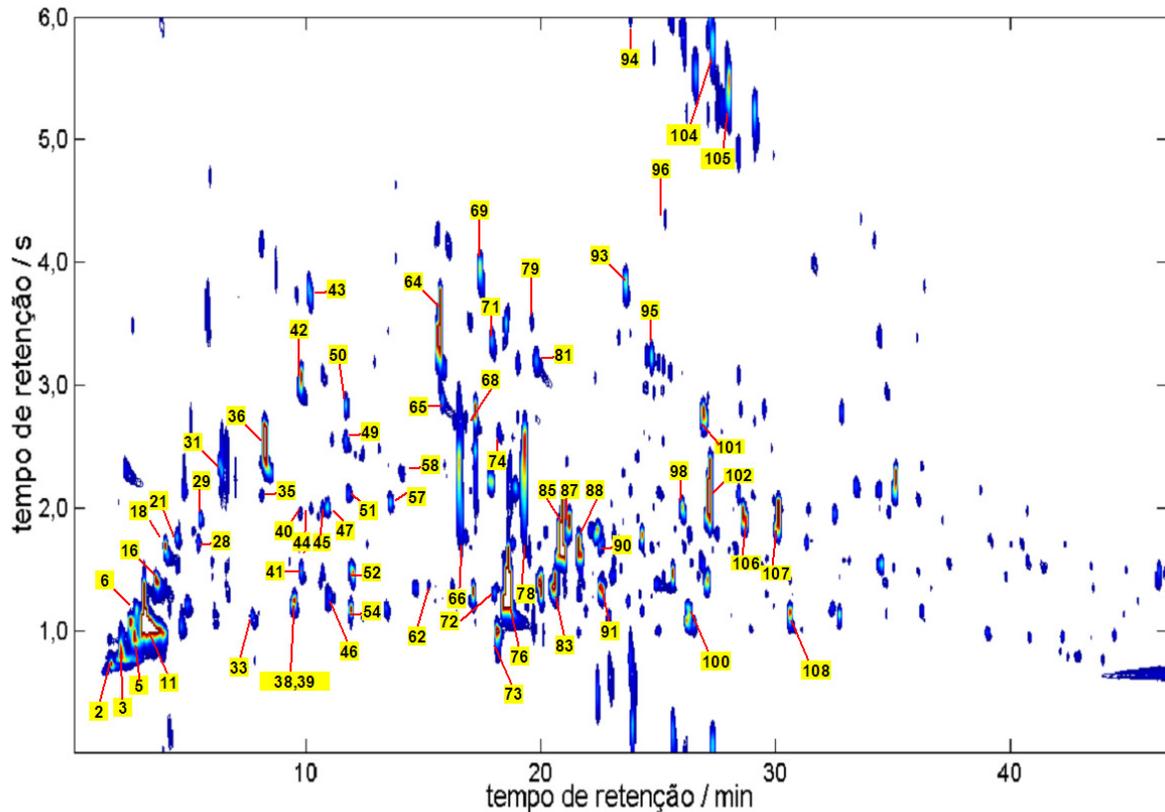


Figura 45. Cromatograma GC×GC-FID da fração volátil da polpa de abacaxi desidratado empregando o conjunto de colunas 3 (inverso), com atribuição da identidade dos picos; numeração referente à Tabela 3

Em resumo, a abordagem de realizar análises por GC-MS e GC×GC-FID e comparar os LTPRI para alocar os compostos no cromatograma GC×GC permite identificar compostos não identificados por GC-MS através da estruturação cromatográfica da GC×GC. Em outros casos é possível obter uma estrutura muito próxima da provável identidade do pico, como a classe do composto e o número de átomos de carbono ou insaturações na molécula. Como explicado anteriormente, a abordagem aqui mostrada requer avaliação detalhada de cada um dos espectros de massas e dos LTPRI nas análises por GC-MS e GC×GC, bem como do perfil dos cromatogramas. Cabe ressaltar que não foram feitas injeções de padrões analíticos para identificar os compostos no cromatograma GC×GC.

Capítulo 6:

CONCLUSÕES

6. Conclusões

Os objetivos propostos no início desse trabalho foram alcançados de forma satisfatória. Diferentes protótipos GC×GC-FID foram construídos e avaliados, observando em cada modulador as limitações, para que as mesmas fossem eliminadas nas versões subsequentes.

O protótipo GC×GC versão 1, equipado com o modulador “A”, apresentou como principal limitação o eletrômetro do detector do GC-FID HP 5890, o qual era lento para registrar os picos sem deformação. No protótipo GC×GC-FID versão 2, a deformação dos picos modulados foi contornada pela troca do equipamento, sendo empregado um GC-FID Agilent 6890, mantendo o mesmo modulador. Entretanto, verificou-se a necessidade de empregar vazões elevadas para os gases resfriados do modulador, o que acarretou na impossibilidade de analisar compostos pouco voláteis. Por isso, o modulador “B” foi construído para o protótipo GC×GC-FID versão 3, o qual apresentou desempenho similar aos equipamentos comerciais. Embora esse modulador não apresentasse limitações quanto ao desempenho, ele foi substituído pelo modulador “C” para facilitar a troca do conjunto de colunas e evitar o corte da ponta da coluna de segunda dimensão.

O modulador criogênico “C” apresentou desempenho similar ao modulador “B” e quando comparado aos moduladores descritos na literatura, o desempenho pode ser considerado compatível. Em resumo, a 2w_b para compostos não saturados na 2D variou entre 80 ms e 400 ms, e a variação no 2t_R foi de cerca de 10 ms. A faixa de ponto de ebulição dos compostos também foi avaliada, sendo possível modular compostos com ponto de ebulição entre 69 °C e 391 °C sem que seja necessário alterar os parâmetros de modulação. Caso seja necessário trabalhar com compostos mais ou menos voláteis, é necessário modificar o ajuste dos gases do modulador. O protótipo GC×GC-FID foi comparado com o sistema GC×GC-FID comercializado pela LECO® e os resultados mostraram que o desempenho pode ser considerado equivalente.

O protótipo GC×GC-FID foi aplicado à análise da fração volátil da polpa de abacaxi fresco e desidratado. Três conjuntos de colunas foram avaliados para separação dos compostos presentes nas amostras. As separações obtidas com os conjuntos de colunas HP-5 + SPWax e DBWax + HP-5 foram consideradas

satisfatórias, considerando o número de compostos separados e o espaço de separação utilizado. Em relação ao conjunto de colunas HP-5 + HP-50, no qual os mecanismos de separação das duas dimensões não são independentes, a separação e a utilização do espaço de separação foram inferiores aos outros conjuntos de colunas avaliados.

A identificação dos compostos no cromatograma GC×GC-FID foi feita sem a utilização de padrões. Para tal, a fração volátil de abacaxi fresco e desidratado foram analisadas por GC-MS e por GC×GC-FID, e os LTPRI para os compostos em ambas as análises foram obtidos e comparados. Os compostos identificados por GC-MS foram alocados no cromatograma GC×GC-FID quando houve concordância entre os LTPRI e perfil cromatográficos por ambas as análises.

Após identificar os compostos majoritários nas amostras estudadas, foi possível obter a estruturação cromatográfica da GC×GC, observada para séries homólogas de ésteres e aldeídos, bem como para alguns ésteres que apresentavam isomeria de posição. Essa informação foi empregada para identificar vários outros compostos não identificados por GC-MS. A identificação de compostos através da estruturação cromatográfica deve ser empregada, sempre que possível, em análises qualitativas por GC×GC-FID e por GC×GC-MS, visto que informações adicionais a respeito da estrutura dos compostos são obtidas por meio dessa característica única da GC×GC.

O principal resultado desse trabalho foi disponibilizar um equipamento GC×GC-FID para ser usado em laboratório em análises de rotina. Uma vez que o desenvolvimento de um modulador criogênico para GC×GC foi realizado com sucesso, o próximo passo deve ser o desenvolvimento de um protótipo GC×GC-MS. Tendo em mãos tal equipamento, a abordagem referente à estruturação cromatográfica para a identificação dos compostos pode ser explorada em sua totalidade.

Capítulo 7:
**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

7. Referências bibliográficas

- [1] W. Bertsch, J. High Resolut. Chromatogr. 22 (1999) 647.
- [2] J.M. Davis, C. Samuel, J. High Resolut. Chromatogr. 23 (2000) 235.
- [3] N. Ragunathan, K.A. Krock, C. Klawun, T.A. Sasaki, C.L. Wilkins, J. Chromatogr. A 856 (1999) 349.
- [4] J.C. Giddings, Anal. Chem. 56 (1984) 1258A.
- [5] C.F. Poole, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 963.
- [6] E.A. Hogendoorn, P. Vanzoonen, J. Chromatogr. A 703 (1995) 149.
- [7] H.J. Issaq, K.C. Chan, C.S. Liu, Q.B. Li, Electrophoresis 22 (2001) 1133.
- [8] T. Hyotylainen, M.L. Riekkola, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 357.
- [9] W. Bertsch, J. High Resolut. Chromatogr. 23 (2000) 167.
- [10] Z. Liu, S.R. Sirimanne, D.G. Patterson, L.L. Needham, J.B. Phillips, J. Xu, Anal. Chem. 66 (1994) 3086.
- [11] J.M. Davis, D.R. Stoll, P.W. Carr, Anal. Chem. 80 (2008) 8122.
- [12] M.C. Simmons, L.R. Snyder, Anal. Chem. 30 (1958) 32.
- [13] D.R. Deans, Chromatographia 1 (1968) 18.
- [14] Z. Liu, J.B. Phillips, J. Chromatogr. Sci. 29 (1991) 227.
- [15] J. Dallüge, J. Beens, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 69.
- [16] F. Augusto, A.L. Leite, C.A. Zini, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 160.
- [17] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 62 (1990) 2145.
- [18] J. Pawliszyn (Ed.), Applications of Solid Phase Microextraction, RCS, Cambridge, 1999.
- [19] T.J. Braggins, C.C. Grimm, S.R. Visser, em Applications of Solid Phase Microextraction, Pawliszyn, J. (Ed.), RCS, Cambridge, 1999.
- [20] R.C. Silva, P.M.S. Aguiar, F. Augusto, Chromatographia 60 (2004) 687.
- [21] M.P. Pedroso, A.B.M. Silva, E.J. Pilau, A.F.P. Biajoli, F. Augusto, 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2007.
- [22] J.B. Phillips, J. Beens, J. Chromatogr. A, 856 (1999) 331.
- [23] J. Beens, H. Boelens, R. Tijssen, J. Blomberg, J. High Resolut. Chromatogr. 21 (1998) 47.
- [24] T. Górecki, J. Harynuk, O. Panic, J. Sep. Sci. 27 (2004) 359.
- [25] J.B. Phillips, R.B. Gaines, J. Blomberg, F.W.M. van der Wielen, J.M. Dimandja, V. Green, J. Granger, D. Patterson, L. Racovalis, H.J. de Geus, J. de Boer, P. Haglund, J. Lipsky, V. Sinha, E.B.A. Ledford, J. High Resolut. Chromatogr. 22 (1999) 3.
- [26] P.J. Marriott, R.M. Kinghorn, R. Ong, P. Morrison, P. Haglund, M. Harju, J. High Resolut. Chromatogr. 23 (2000) 253-258.
- [27] R.M. Kinghorn, P.J. Marriott, J. High Resolut. Chromatogr. 21 (1998) 620.
- [28] R.M. Kinghorn, P.J. Marriott, J. High Resolut. Chromatogr. 22 (1999) 235.
- [29] R.M. Kinghorn, P.J. Marriott, P.A. Dawes, J. High Resolut. Chromatogr. 22 (2000) 245.
- [30] P.J. Marriott, R.M. Kinghorn, Anal. Chem. 69 (1997) 2582.
- [31] J. Beens, M. Adahchour, R.J.J. Vreuls, K. van Altena, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 919 (2001) 127.

- [32] E.B. Ledford, C.A. Billesbach, J.R. Termaat, *Int. Pat. PCT/US01/01065* (2001).
- [33] M. Pursch, P. Eckerle, J. Biel, R. Streck, H. Cortes, K. Sun, B. Winniford, *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 43.
- [34] http://www.zoex.com/docs/technotes/technote_kt030606-1.html, acessada em Julho 2009.
- [35] <http://www.zoex.com/products/zx1.html>, acessada em Julho 2009.
- [36] <http://www.zoex.com/products/zx2.html>, acessada em outubro de 2009.
- [37] C.A. Bruckner, B.J. Prazen, R.E. Synovec, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2796.
- [38] J.V. Seeley, F. Kramp, C.J. Hicks, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4346.
- [39] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 438.
- [40] T. Hyötyläinen, M. Kallio, K. Hartonen, M. Jussila, S. Palonen, M.L. Riekkola, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4441.
- [41] J. Harynuk, T. Górecki, *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 53.
- [42] M. Labardoni, J.H. Waite, R. Sacks, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2786.
- [43] R.B. Gaines, G.S. Frysinger, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 380.
- [44] W. Rathbun, *J. Chromatogr. Sci.* 45 (2007) 636.
- [45] X. Li, Z. Xu, X. Lu, X. Yang, P. Yin, H. Kong, Y. Yu, G. Xu, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 257.
- [46] F. Bianchi, M. Careri, C. Conti, M. Musci, R. Vreuls, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 527.
- [47] J. Vial, H. Noçairi, P. Sassiati, S. Mallipatu, G. Cognon, D. Thiébaud, B. Teillet, D.N. Rutledge, *J. Chromatogr. A* 1216 (2008) 2866.
- [48] E.M. Kristenson, P. Korytár, C. Danielsson, M. Kallio, M. Brandt, J. Mäkelä, R.J.J. Vreuls, J. Beens, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 65.
- [49] L. Modello, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, *Mass Spectrom. Rev.* 27 (2008) 101.
- [50] J. Dallüge, L.L.P. van Stec, X. Xu, J. Williams, J. Beens, R.J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 169.
- [51] M. Adahchour, M. Brandt, H.U. Baier, R.J.J. Vreuls, A.M. Batenburg, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 245.
- [52] L. Modello, A. Casilli, P.Q. Tranchida, G. Dugo, P. Dugo, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 235.
- [53] M. van Deursen, J. Beens, J. Reijenga, P. Lipman, C. Cramers, J. Blomberg, *J. High Resolut. Chromatogr.* 23 (2000) 507.
- [54] J. Harynuk, T. Górecki, J. de Zeeuw, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 21.
- [55] P.Q. Tranchida, A. Casilli, P. Dugo, G. Dugo, L. Modello, *Anal. Chem.* 79 (2007) 2266.
- [56] J. Beens, H.G. Janssen, M. Adahchour, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1086 (2005) 141.
- [57] R. Shellie, P.J. Marriott, P. Morrison, L. Modello, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 504.
- [58] H.M. McNair, J.M. Miller, *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, New York, 1997.
- [59] D. Ryan, P. Morrison, P.J. Marriott, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 47.
- [60] C. Vendevre, R. Ruiz-Guerrero, F. Bertocini, L. Duval, D. Thiébaud, M. Hennion, *J. Chromatogr. A* 1086 (2005) 21.
- [61] C. von Mühlen, C.A. Zini, E.B. Caramão, P.J. Marriott, *Quim. Nova* 30 (2007) 682.
- [62] P.J. Marriott, T. Massil, H. Hügel, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1273.
- [63] C. von Mühlen, C.A. Zini, E.B. Caramão, P.J. Marriott, *J. Chromatogr. A* 1200 (2008) 34.

- [64] L. Mondello, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1566.
- [65] F. Adam, F. Bertocini, V. Coupard, N. Charon, D. Thiébaud, D. Espinant, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 1186 (2008) 236.
- [66] F. Adam, C. Vendeuvre, F. Bertocini, D. Thiébaud, D. Espinant, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 1178 (2008) 171.
- [67] M.R. Schure, *J. Micro. Sep.* 9 (1997) 169.
- [68] S. Peters, G. Vivó-Truyols, P.J. Marriott, P.J. Schoenmakers, *J. Chromatogr. A* 1146 (2007) 232.
- [69] E. Kovats, *Helv. Chim. Acta* 41 (1958) 1915.
- [70] H. van Den Dool, P.D. Kratz, *J. Chromatogr.* 11 (1963) 463.
- [71] R.J. Western, P.J. Marriott, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 832.
- [72] R.J. Western, P.J. Marriott, *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 3.
- [73] S. Bieri, P.J. Marriott, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8089.
- [74] S. Bieri, P.J. Marriott, *Anal. Chem.* 80 (2008) 760.
- [75] N.J. Micyus, S.K. Seeley, J.V. Selley, *J. Chromatogr. A* 1086 (2005) 171.
- [76] J. Dalluge, R.J.J. Vreuls, J. Beens, U.A.T. Brinkman, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 201.
- [77] H.J. de Geus, J. de Boer, J.B. Phillips, E.B. Ledford, U.A.T. Brinkman, *J. High Resolut. Chromatogr.* 21 (1998) 411.
- [78] A.L. Lee, K.D. Bartle, A.C. Lewis, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1330.
- [79] C. Cordero, C. Bicchi, D. Joulain, P. Rubiolo, *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 37.
- [80] C. Debonneville, A. Chaintreau, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 109.
- [81] R.P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th Ed., Allured Publishing Corp., Carol Stream, 2007.
- [82] K. Umamo, Y. Hagi, K. Nakahara, A. Shoji, T. Shibamoto, *J. Agric. Food Chem* 40 (1992) 599.
- [83] G. Takeoka, R.G. Buttery, R.A. Flath, R. Teranishi, E.L. Wheeler, R.L. Wieczorek, M. Guentert, *Flavour Chem.* 18 (1989) 223.
- [84] M.P. Pedroso, E.C. Ferreira, L.A.F. de Godoy, R.J. Poppi, F. Augusto, *J. Chromatogr. A* 1201 (2008) 176.
- [85] R.A. Shellie, P.J. Marriott, *Analyst* 128 (2003) 879.
- [86] A.M.P. Braga, M.P. Pedroso, F. Augusto, M.A. Silva, *Dry. Technol.* 27 (2009) 248.
- [87] L. Mondello, A. Casilli, P.Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, *Flavour Fragr. J.* 20 (2005) 136.
- [88] M. Adahchour, J. Beens, R.J.J. Vreuls, A.M. Batenburg, U.A.T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 47.