

**FACULDADE DE TECNOLOGIA DE SÃO PAULO**  
**Tecnologia em Materiais**

**Valdomiro de Souza Conceição**

**DETERMINAÇÃO DE TETRANITROMETANO EM RESÍDUOS INDUSTRIAIS  
PELA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA GASOSA COM  
DETECTOR DE MASSAS POR *HEADSPACE***

**São Paulo**  
**2015**

**FACULDADE DE TECNOLOGIA DE SÃO PAULO**  
**Tecnologia em Materiais**

**Valdomiro de Souza Conceição**

**DETERMINAÇÃO DE TETRANITROMETANO EM RESÍDUOS INDUSTRIAIS  
PELA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA GASOSA COM  
DETECTOR DE MASSAS POR *HEADSPACE***

Monografia apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Tecnólogo em Materiais pela Faculdade de Tecnologia de São Paulo.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lilian Satomi Hanamoto**

**São Paulo**  
**2015**

**DETERMINAÇÃO DE TETRANITROMETANO EM RESÍDUOS INDUSTRIAIS  
PELA TÉCNICA DE CROMATOGRÁFIA GASOSA COM  
DETECTOR DE MASSAS POR *HEADSPACE***

**Valdomiro de Souza Conceição**

Monografia apresentada em 21/12/2015

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lilian Satomi Hanamoto

---

Examinador: Prof. Dr. Eduardo dos Santos Tada

---

Examinador: Prof. Dr. Davinson Mariano da Silva

Dedico este trabalho à minha família, principalmente aos meus pais, que me direcionaram e ensinaram os preceitos fundamentais ao ser humano, além de toda ajuda e paciência que tiveram comigo para eu conseguir meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

Fico até emocionado, pois para conseguir trilhar um caminho com êxitos e vitórias, várias pessoas que passaram, e que estão, em minha vida são importantíssimas.

Primeiramente agradeço a Deus por todas as bênçãos e livramentos que me concedeu nesta minha jornada. À minha família, meus agradecimentos, em especial aos meus pais – Roque e Josefina -, que deram todo o suporte e paciência necessários para que eu conquistasse os meus anseios e sonhos.

Fica, também, meu agradecimento em especial à prof<sup>a</sup> Dra. Lilian Satomi Hanamoto com quem aprendi muita coisa, tanto no âmbito pessoal e acadêmico, e que tive a honra e o prazer de receber sua orientação para este trabalho.

Não posso esquecer também a todos os professores que sempre me orientaram e deram acesso ao conhecimento, sem o qual não poderia estar concretizando mais um ciclo em minha vida. Não irei citar nomes, pois graças a Deus, tive muitos professores que foram fundamentais em minha vida, mas saiba que estão todos em meu coração: os professores da pré-escola (EMEI Mario Sette), do ensino fundamental (escola Professor Arnaldo Laurindo), do ensino médio (escola Reverendo Jacques Orlando Caminha D´avila), cursinho pré-vestibular (cursinho da POLI) e principalmente do ensino técnico ( SENAI Fundação Zerrenner) e desta graduação (FATEC-SP), pela ótima formação que me forneceram.

Aproveito também a oportunidade para agradecer a todos meus amigos que me fazem rir, compartilham sonhos, emoções e dão o prazer de fazer companhia a minha pessoa.

Também, quero agradecer, ao laboratório ECOLABOR pela disponibilização dos equipamentos para a realização dos experimentos.

Minha gratidão a todos e um sincero “MUITO OBRIGADO”!!!

Viver e não ter a vergonha de ser feliz.

**Gonzaguinha**

## RESUMO

O tetranitrometano (TNM) é uma substância nociva ao meio ambiente e à saúde humana, altamente explosivo quando impuro e sendo até considerado pela Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer, um agente químico possivelmente cancerígeno para os seres humanos. Devido a esta periculosidade, a caracterização química de resíduos industriais, que normalmente são tratados pelo processo de incineração onde há eliminação de gases para a atmosfera, torna-se fundamental. Este trabalho traz uma abordagem em relação à cromatografia e aos recursos utilizados atualmente acoplados com esta técnica, como o espectrômetro de massas e o processo de pré-tratamento de amostras por *headspace*. Utilizando as técnicas em conjunto, cromatografia gasosa, espectrometria de massas e *headspace* (CG-EM-HS), foi construída uma curva analítica para a determinação de TNM e foram analisadas 10 diferentes alíquotas de amostras de resíduos industriais, sendo 5 fortificações das amostras. A curva analítica para o TNM apresentou uma boa relação linear ( $R^2 = 0,995$ ) entre concentração e resposta analítica a partir de  $25 \text{ mg.kg}^{-1}$  e nas fortificações das amostras, dois resultados apresentaram um grau de recuperação acima de 80% e três amostras fortificadas não apresentaram recuperação. Há vários outros testes, inclusive estatístico - como, por exemplo, repetibilidade -, para que essa metodologia estudada neste trabalho possa ser utilizada no dia-a-dia dos laboratórios analíticos, porém os resultados obtidos sinalizam que é viável um estudo mais aprofundado para que futuramente a técnica CG-EM-HS possa ser utilizada na análise de TNM.

**Palavras-Chave:** Tetranitrometano, Cromatografia, *Headspace*, Espectrometria de Massas.

## PREFÁCIO

O escopo deste trabalho foi proposto e baseado na minha experiência profissional em análises químicas ambiental pela técnica de cromatografia gasosa acoplada com um detector de espectrômetro de massas e com um pré-tratamento e injeção de amostra pela utilização de um *headspace* (análise de CG-EM-HS). Todo o trabalho experimental foi realizado na empresa de análises químicas ECOLABOR.

Com a finalidade de tornar a leitura mais dinâmica e interessante, este trabalho foi dividido em duas partes:

- Parte A: Análise de TNM por CG-EM-HS, que está descrita a proposta e desenvolvimento de uma nova possibilidade de procedimento analítico para detecção de nitrocompostos presente em resíduos sólidos industriais utilizando a análise de CG-EM-HS;
- Parte B: Estudo dos fundamentos das Análises de CG e EM, que apresenta os meus estudos sobre os fundamentos gerais das Análises de Cromatografia e da Espectrometria de Massas.

Em geral, tem se observado que a maioria dos trabalhos de graduação inicia-se como introdução o estudo dos fundamentos teóricos gerais para em seguida descrever a parte relacionada ao trabalho experimental proposto.

Entretanto, como fundamentos teóricos são extensos e ricos em detalhes físico-químicos e analíticos, neste trabalho optei por uma inversão, aonde os fundamentos teóricos são apresentados após o trabalho experimental.

Desejo a todos uma boa leitura.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and lines, positioned at the bottom of the page.

## Sumário

Parte A. Análise de TNM por CG-EM-HS .....	11
1 CONTEXTUALIZAÇÃO DOS OBJETIVOS .....	11
2 INTRODUÇÃO .....	14
2.1 Resíduos Industriais.....	14
2.1.1 Gestão de Resíduos Industriais .....	14
2.1.2 Incineração .....	14
2.2 Tetranitrometano.....	16
2.3 Análise por CG-EM-HS.....	18
3 PARTE EXPERIMENTAL .....	24
3.1 Materiais .....	24
3.2 Preparação de soluções .....	25
3.3 Preparação da amostra padrão de TNM.....	26
3.4 Preparação da curva analítica .....	27
3.5 Preparação das Amostras.....	27
3.6 Preparação das Fortificações de Amostras .....	28
3.7 Condições dos Equipamentos .....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	31
4.1 Seletividade do Método .....	31
4.2 Curva Analítica.....	34
4.3 Análises Quantitativas.....	35
5 CONCLUSÃO .....	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
Parte B: Estudo dos Fundamentos das Análises de Cromatografia e Espectrometria de Massas.....	45
1 CROMATOGRAFIA .....	45
1.1 Aspectos Históricos da Cromatografia .....	47
1.2 Classificações da Cromatografia.....	48
1.3 Forças Intermoleculares.....	54
1.4 Termos Técnicos.....	56
1.5 Identificação de Substâncias .....	58
1.6 Termos de Separações dos Compostos.....	61
1.7 Cromatografia Gasosa.....	67

1.7.1	Técnicas Utilizadas na Cromatografia Gasosa.....	68
1.7.2	Equipamento para Cromatografia Gasosa .....	69
1.7.3	Coluna Cromatográfica.....	72
1.7.4	Sistemas de Detecção .....	74
1.7.5	Sistema de Tratamento de Dados .....	79
1.7.6	Análise Qualitativa .....	80
1.7.7	Análise Quantitativa .....	83
2	ESPECTROMETRIA DE MASSA .....	89
2.1	Métodos de Ionização .....	90
2.1.1	Métodos de Ionização em Fase Gás.....	91
2.1.2	Método de Ionização por Dessorção .....	95
2.1.3	Método de Ionização por Evaporação .....	98
2.2	Analísadores de massas .....	99
2.2.1	Espectrômetros de Massas com Setores Magnéticos.....	100
2.2.2	Espectrômetros de Massas com Quadrupolo .....	101
2.2.3	Espectrômetro de Massas por Captura de Íons .....	102
2.2.4	Espectrômetro de Massas por Tempo de Vôo .....	103
2.2.5	Espectrômetro de Massas com Transformada de Fourier .....	104
2.2.6	Espectrômetro de Massas em Sequência .....	104
2.3	Interpretação dos Espectros de Massa .....	105
3	CONCLUSÃO .....	107
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	108

## Parte A. Análise de TNM por CG-EM-HS

### 1 CONTEXTUALIZAÇÃO DOS OBJETIVOS

A incineração produz gases que, lançados na atmosfera durante o processo, podem ser nocivos e prejudiciais ao meio ambiente e/ou a saúde humana. Desta forma, os órgãos ambientais definem valores máximos de eventuais contaminantes que podem ser lançados ao meio, a fim de preservar as condições mínimas de qualidade em relação ao meio no qual estamos inseridos. Em resíduos industriais, vários compostos precisam ser monitorados, antes de sua incineração, devido a sua alta toxicidade, como por exemplos clorofluorcarbonetos (CFC's) e nitrocompostos.

A Figura 1 apresenta a estrutura química dos CFC's mais comuns. Esses compostos são prejudiciais ao meio ambiente porque atuam na destruição catalítica da camada de ozônio <sup>[1,2]</sup>.

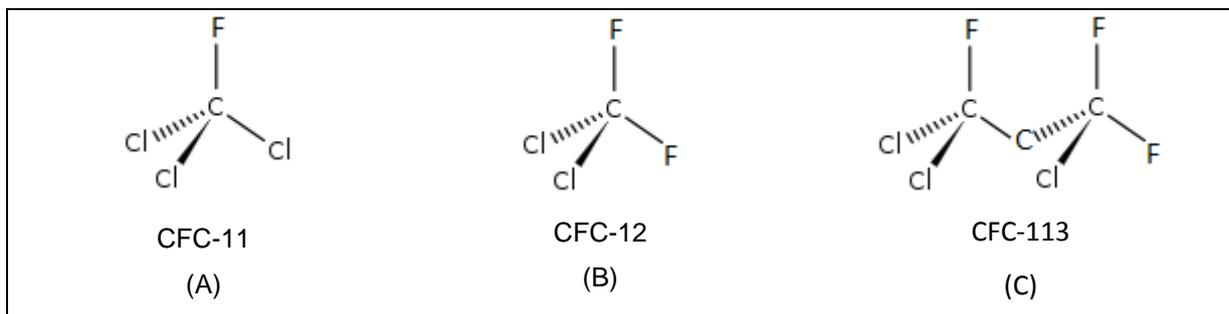
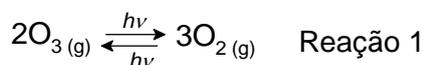


Figura 1. Estruturas químicas de alguns CFC's. Nome químico: (A) triclorofluormetano, (B) diclorodifluormetano e (C) 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoretano <sup>[1,2]</sup>.

A camada de ozônio atua como um filtro da radiação solar diminuindo a intensidade de incidência dos raios ultravioleta na superfície da Terra. As moléculas de ozônio, O<sub>3</sub>, podem absorver os raios ultravioletas,  $h\nu$ , com comprimentos de onda menores que 240 nm e, por um mecanismo de reação radicalar, se transformam em moléculas de oxigênio, que por sua vez também podem absorver mais radiação ultravioleta,  $h\nu$ , e formar moléculas de ozônio <sup>[2]</sup>. Desta forma, ocorre na camada de ozônio um equilíbrio químico que envolve a radiação ultravioleta (Reação 1).



A presença de CFC's na camada de ozônio interfere neste equilíbrio, atuando como catalisadores na reação de transformação das moléculas de O<sub>3</sub> em O<sub>2</sub>, com a necessidade de pouca absorção dos raios ultravioleta (Reação 2) [2]. A tabela 1 apresenta as propriedades físico-químicas do diclorodifluormetano.

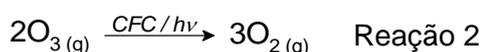


Tabela 1- Propriedades físico-químicas do diclorodifluormetano [3].

Parâmetro	Valor
Abreviação	CFC-12
Fórmula Química	CCl <sub>2</sub> F <sub>2</sub>
Massa Molar (g mol <sup>-1</sup> )	120,91
Ponto de ebulição (°C)	-29,8

O diclorodifluormetano apresenta uma temperatura de ebulição menor que 29 °C negativo. Desta forma, este composto já está na forma gasosa em temperatura positiva, considerando a escala em graus Celsius. Mesmo com esta característica, as análises quantitativas rotineiras dos CFC's mais comuns são realizadas pelo método *US EPA SW 846 (United States Environmental Protection Agency Solid Wast Method 8260C)*, que descreve a análise de compostos orgânicos voláteis (*VOC's – Volatile Organic Compounds*) por cromatografia gasosa acoplada com um detector de espectrometria de massas por *headspace (CG-EM-HS)*, na maioria dos laboratórios de análises ambientais.

Apesar de a metodologia descrever análise para *VOC's*, a *US EPA* indica a determinação de CFC's por este método, pois na técnica utilizada a amostra precisa estar na forma gasosa ou volatilizada no momento de sua injeção no cromatógrafo. A definição sobre cromatografia pode ser visto no item 2.3 da Introdução.

Outro composto que é muito prejudicial ao ser humano, por se muito reativo e até mesmo explosivo, e precisa ser monitorado antes do processo de incineração é o tetranitrometano (TNM). Um dos métodos mais utilizados para a análise deste composto é baseado na metodologia da *NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health Method 3513)*, que utiliza cromatógrafo a gás com detector

termiônico de nitrogênio e fósforo (CG-NPD). O NPD é um detector específico, que responde apenas às substâncias que contem os elementos nitrogênio e/ou fósforo em sua estrutura, sendo desta forma altamente seletivo e proporcionando uma alta sensibilidade para as análises dessas substâncias.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é a determinação de TNM utilizando a metodologia *US EPA SW 846 Method 8620C*, com a finalidade de analisar de uma só vez os CFC's e o tetranitrometano. A possibilidade de num mesmo método de análise determinar diferentes tipos de compostos é muito interessante economicamente em todos os aspectos – como, por exemplo: processo, insumos e quantidade de amostra, entre outros.

Este objetivo é bem audacioso, visto que o TNM líquido é menos volátil que a água, o que o caracteriza como uma substância semi-volátil, porém a metodologia da *US EPA SW 846 Method 8620C* é aplicável para composto que possui ponto de ebulição menor que 200 °C. Sendo, então, a priori, possível a determinação de TNM por este método.

## **2 INTRODUÇÃO**

### **2.1 Resíduos Industriais**

Quando se trata de potencial poluidor, a atividade industrial é uma das fontes mais representativas como causadora de impactos ambientais para o solo, água e ar <sup>[4]</sup>.

Por definição da Associação Brasileira de Normas Técnicas, os resíduos no estado sólido e semi-sólido são produtos gerados pelas atividades de origem industrial, doméstica, hospitalar, comercial, agrícola, de serviços e de varrição. Ficam incluídos nesta definição os lodos provenientes de sistema de tratamento de água, aqueles gerados em equipamentos e instalações de controle de poluição, bem como determinados líquidos cujas particularidades tornem inviável o seu lançamento na rede pública de esgotos ou em bacias hidrográficas e marítimas (NBR 1004:2004) <sup>[5]</sup>.

#### **2.1.1 Gestão de Resíduos Industriais**

A gestão de resíduos industriais deve atender aos seguintes princípios: prevenção da geração de resíduos; minimização dos resíduos gerados; reutilização, reciclagem e recuperação ambientalmente segura de materiais ou de energia dos resíduos ou produtos descartados; tratamento ambientalmente seguro dos resíduos; disposição final ambientalmente segura dos resíduos remanescentes; e recuperação das áreas degradadas pela disposição inadequada dos resíduos <sup>[4]</sup>.

O tratamento de um resíduo sólido, além da redução de volume, tem o propósito de reduzir a “complexidade” do resíduo, transformando-o em material inerte ou biologicamente estável; de aproveitar uma parcela do resíduo através da reciclagem e, desta forma, preservar a saúde pública e o meio ambiente <sup>[4,6]</sup>.

#### **2.1.2 Incineração**

Há várias formas de tratamento e destinação de um resíduo, dependendo da classificação quanto a sua periculosidade em relação à saúde pública e meio

ambiente, como por exemplo, lixão, aterro sanitário, usina de compostagem e reciclagem, incinerador, entre outros [4,7].

A incineração é uma das tecnologias mais eficientes utilizadas para o tratamento dos resíduos sólidos, tanto urbanos como industriais, devido a redução do volume do material incinerado. Porém, apresenta um impacto ambiental com relação a dificuldade no controle dos tipos e quantidades de gases emitidos pelo processo de combustão [7,8]. A Figura 2 apresenta um tipo de incinerador que mostra claramente a saída de gases do processo.

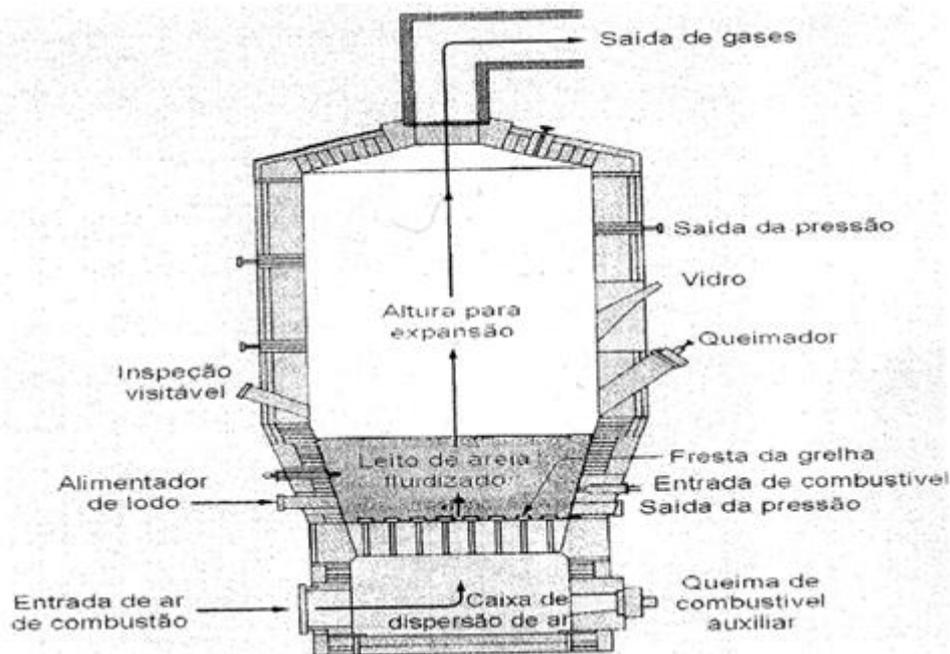


Figura 2. Desenho esquemático de um incinerador [8].

As vantagens da incineração são:

- redução de até 95% do volume inicial e em relação ao peso uma redução de 85% a 90% do valor inicial;
- diminuição do potencial tóxico dos dejetos;
- possibilidade de utilização da energia liberada com a queima [6,7].

Como desvantagem, temos a questão do custo por tonelada tratada, principalmente em razão da utilização de filtros e implementos tecnológicos necessários para controle de poluição atmosférica, e a emissão de poluentes atmosféricos [6,8].

Neste processo ocorre a oxidação do resíduo a alta temperatura, com queima dos gases entre 1.000°C a 1.450°C, no tempo de até quatro segundos <sup>[4,6]</sup>. Deve ocorrer em instalações bem projetadas corretamente operadas, onde aconteça a transformação de materiais e a destruição dos microorganismos dos resíduos sólidos <sup>[4,6,8]</sup>.

O gerenciamento inadequado dos resíduos sólidos pode causar a problemas ambientais, como poluição do solo, poluição da água, poluição do ar e poluição visual, e conseqüentemente atingir a saúde da população <sup>[6]</sup>.

## 2.2 Tetranitrometano

A Figura 3 mostra a estrutura química do tetranitrometano (TNM), cuja fórmula molecular é  $C(NO_2)_4$ . O TNM é um oxidante reativo quando misturado com hidrocarbonetos, compostos alcalinos e materiais metálicos. Esta substância emite odor irritante às vias respiratórias, apresenta efeito lacrimogênio e pode causar queimaduras na pele <sup>[9]</sup>.

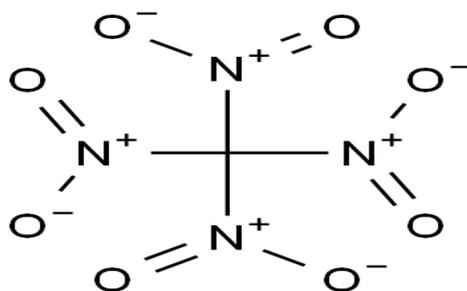


Figura 3. Tetranitrometano <sup>[10]</sup>

Estudos indicam um IDHL (*International Digest of Health Legislation*) de 4ppm e um limite de exposição no ar de 1 ppm para o TNM, pois nos seres humanos, sua inalação causa irritações nos olhos, além de problemas respiratórios <sup>[11,12]</sup>. Já foi confirmado o caráter cancerígeno em animais, com relevância desconhecida para seres humanos, porém a IARC (*International Agency for Research on Cancer*) considera o TNM ser possivelmente cancerígeno para os seres humanos <sup>[11]</sup>. Por este motivo temos que conhecer bem esta substância e evitar a exposição a este contaminante nocivo.

O tetranitrometano (TNM) é um produto químico orgânico altamente explosivo, quando impuro, usado como um oxidante em propulsores de foguete, para aumentar o índice de cetano dos combustíveis de diesel, e como um reagente para detectar ligações duplas em moléculas orgânicas, e, na bioquímica, para a nitração de tirosina em proteínas e peptídeos <sup>[11]</sup>.

Não há evidências da ocorrência natural desta substância <sup>[11]</sup>. O TNM é preparado pelo método de *Chattaway*, que é a nitração do anidrido acético com ácido nítrico anidro, com a formação do ácido acético e gás carbônico como subprodutos, de acordo com a reação 3. O TNM também pode ser formado como uma impureza durante o fabrico de trinitrotolueno (TNT), que é um dos explosivos mais utilizados em aplicações industriais e militares <sup>[9,11]</sup>. As propriedades físico-químicas gerais do TNM estão apresentadas na Tabela 2.

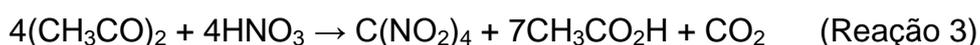


Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do tetranitrometano e da água <sup>[11,13]</sup>.

Parâmetro	Valor	
	Tetranitrometano	Água
Abreviação	TNM	-
Fórmula Química	$\text{C}(\text{NO}_2)_4$	$\text{H}_2\text{O}$
Massa Molar ( $\text{g mol}^{-1}$ )	196,03	18,02
Solubilidade	Insolúvel em água; solúvel em álcool, éter	Substâncias polares
Pressão de vapor (mm Hg a 25 °C)	13	23,8
Densidade do líquido ( $\text{g cm}^{-3}$ a 25 °C)	1,65	0,9970
Ponto de fusão (°C)	13,8	0
Ponto de ebulição (°C)	126	100

O TNM líquido apresenta densidade e temperatura de ebulição maiores que a água e uma pressão de vapor menor, comparado com a mesma. Estes dados

indicam que o TNM líquido apresenta forças intermoleculares mais fortes que a água. A solubilidade do TNM indica que a natureza das forças intermoleculares é do tipo forças de London, características em moléculas volumosas e apolares. O TNM é insolúvel em água devido a sua geometria tetraédrica, como o metano, apesar de possuir 4 grupos nitritos ( $\text{NO}_2$ ). Além disso, a baixa pressão de vapor a 25 °C e a alta temperatura de ebulição mostram que o TNM líquido é um menos volátil que a água, caracterizando-o como um líquido semi-volátil. O ponto de fusão indica que o TNM é um sólido a temperaturas menores que 14 °C.

### **2.3 Análise por *CG-EM-HS***

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo <sup>[14,15]</sup>. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela <sup>[14,15]</sup>. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, devido a diferentes interações, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes <sup>[14, 15,16]</sup>.

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a técnica denominada cromatografia gasosa <sup>[15]</sup>. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) quimicamente inerte em relação à fase estacionária e em relação aos constituintes da mistura analisada <sup>[17]</sup>.

A análise qualitativa e quantitativa é realizada através da comparação entre amostra e um padrão, por meio de um registro gráfico, chamado cromatograma (Figura 4), que com algum tratamento de dados, obtêm-se o tempo de retenção ( $t_r$ ) das substâncias separadas, ou seja, o tempo que o componente em questão ficou tanto na fase estacionária como na fase móvel, até sua detecção; ocasionando, desta forma, a sua separação dos outros componentes da amostra. As intensidades das substâncias separadas são obtidas em forma de picos, cuja área é proporcional à quantidade da substância analisada na amostra <sup>[15]</sup>. Os fundamentos da Técnica de Cromatografia estão descritos na Parte B deste trabalho (pág. 45 a 88).

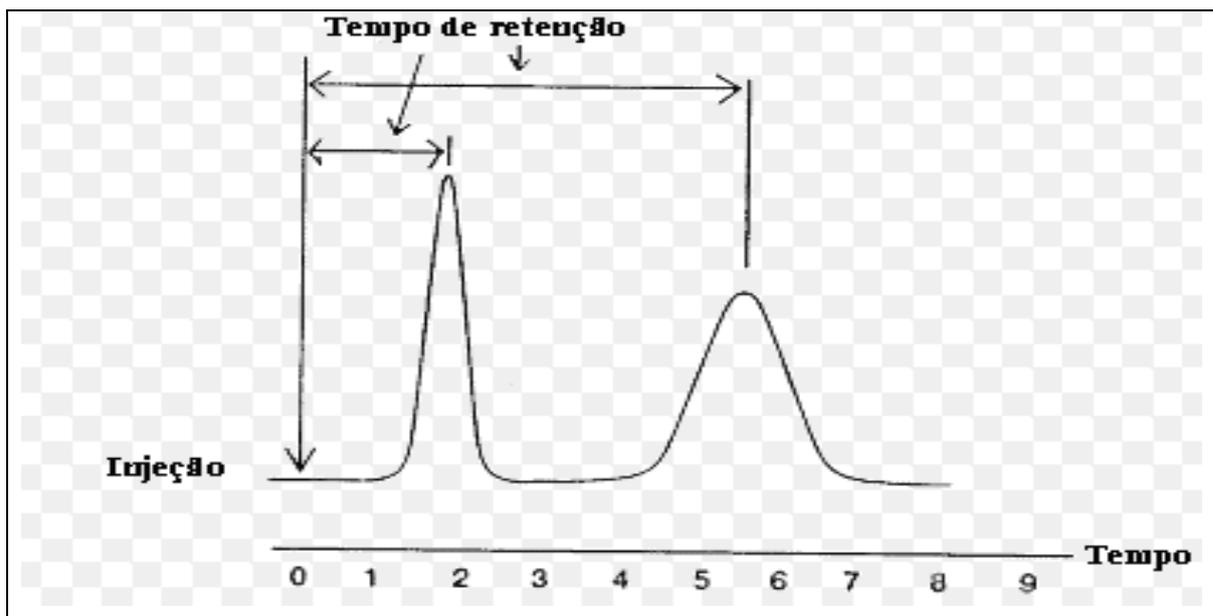


Figura 4. Cromatograma <sup>[18]</sup>.

Entre os métodos modernos de análise e identificação de moléculas orgânicas, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas, por si mesma ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise, como a espectrometria de massas <sup>[15,16]</sup>.

A CG-EM (cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas) consta de um cromatógrafo, usualmente com coluna capilar, uma interface para ligação dos dois sistemas, uma câmara de ionização onde os íons são formados com valores específicos de relação massa-carga ( $m/z$ ), uma câmara (analisador de massas) mantida sob vácuo onde ocorre a separação destes e um sistema para a detecção de íons – que traduz os sinais de fragmentos carregados em sinais elétricos -, acoplado a um sistema de registro com um programa para a interpretação dos dados obtidos <sup>[15,16]</sup>.

O espectrômetro de massas, além de fornecer o espectro de massas das substâncias, também permite gerar “fragmentogramas” que são cromatogramas onde são registrados os sinais de substâncias que contenham o fragmento selecionado, o que aumenta enormemente o poder de “separação” da cromatografia <sup>[19]</sup>.

A técnica é baseada na ionização das moléculas da amostra no estado de vapor, produzindo fragmentos carregados da molécula <sup>[16]</sup>. Podemos verificar na

Figura 5, um esquema do que acontece com uma molécula genérica, na câmara de ionização.

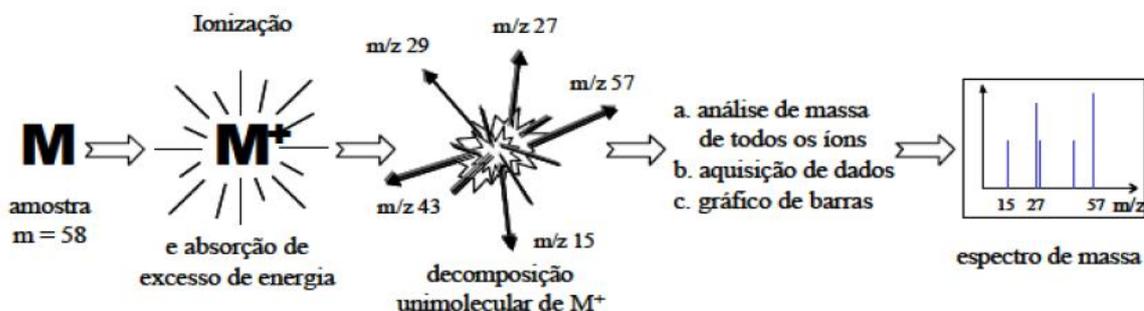


Figura 5. Processo de fragmentação e análise por espectrometria de massas <sup>[16]</sup>.

O processo de fragmentação consiste na ionização da amostra, através de muita energia fornecida à mesma - desta forma um elétron da camada de valência é retirado da substância, formando um cátion (íon molecular). Porém a energia fornecida é de grande magnitude, que ainda é capaz de fazer com que algumas ligações químicas deste íon molecular recém-formado se rompam, formando outros íons. Cada íon formado terá uma  $m/z$  (relação massa/carga), que é a razão entre a massa molar do íon e a carga do próprio. Após este processo de ionização, os íons de carga positiva são separados de acordo com a razão massa/carga, num analisador de massas, através da imposição de um campo elétrico ou magnético <sup>[15,20]</sup>.

Com os dados dos íons detectados, através de um sofisticado *software* de tratamentos de dados, obtêm-se um gráfico de barras (espectro de massas), onde no eixo vertical é fornecido a abundância dos íons (intensidade dos picos) e no eixo horizontal os  $m/z$ . Este gráfico é utilizado para identificar substâncias, pois o espectro de massas é característico, sob mesma condições físico-químicas (temperatura, pressão, energia de ionização), à uma substância, apresentando os mesmos íons com os  $m/z$ , inclusive a proporção de um íon em relação ao outro <sup>[15,20]</sup>. Toda teoria sobre Espectrometria de Massa está descrita na Parte B deste trabalho (pág. 89 a 106).

Como mencionado, para a utilização da técnica CG-EM, as moléculas devem estar no estado de vapor ou gasoso. Para conseguir esta mudança de estado físico, os analitos semi voláteis normalmente são volatizados no processo de injeção da

amostra numa temperatura alta suficiente apenas para a transição de estado sem sua degradação; já para substâncias voláteis (VOC's), como por exemplo, triahalometanos, extrados de café, entre outros, a técnica mais indicado é a de extração gás-líquido, das quais se destacam o pré-tratamento em *headspace* ou em purga e armadilha <sup>[16]</sup>.

- **Técnica de extração por *Headspace***

A técnica de extração gás-líquido *headspace* (Figura 6) é particularmente útil na pré-concentração e análise de compostos orgânicos voláteis <sup>[16,17]</sup>. Nessa técnica, um volume da amostra é adicionado ao frasco de análise, o qual é lacrado, à pressão atmosférica, com um septo de silicone <sup>[16]</sup>. O frasco com a amostra é então, aquecido por um período de tempo programado <sup>[16]</sup>. Durante esse período, o analito irá distribuir-se por duas fases dentro do frasco, a fase líquida e a fase gasosa, até que entrem em equilíbrio <sup>[16]</sup>.

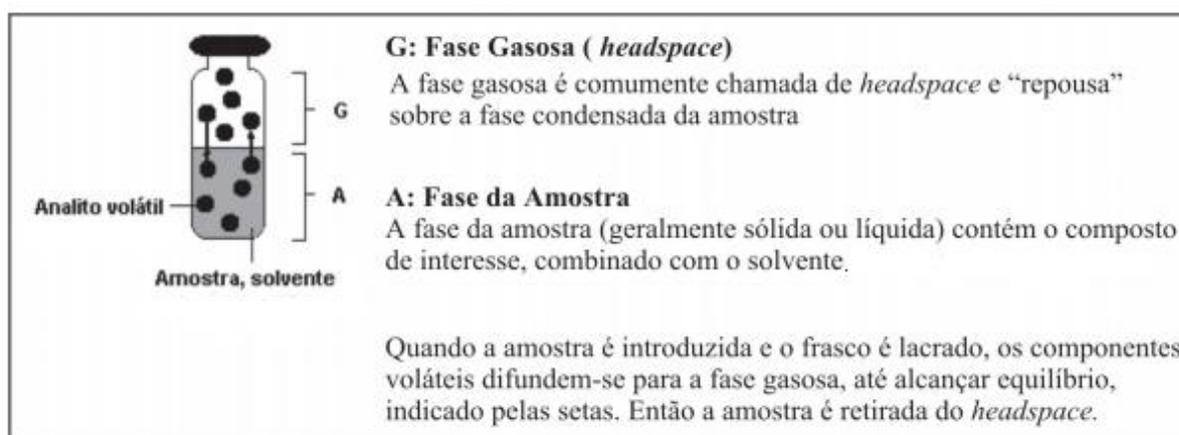


Figura 6. Fases do vial de *Headspace* <sup>[21]</sup>.

Uma vez em equilíbrio, assim como em extrações líquido-líquido, a razão da concentração do analito nas duas fases se tornará constante, e a partição do analito será descrita pela constante de distribuição:

$$K = C_g/C_l$$

onde  $C_g$  é a concentração do analito na fase gasosa, e  $C_l$  é a concentração do analito na fase líquida ou na amostra, e  $K$  é a constante de distribuição do analito entre as duas fases <sup>[16]</sup>. Posteriormente, uma alíquota da fase gasosa é retirada com uma seringa e injetada no cromatógrafo de fase gasosa <sup>[16,21]</sup>.

A principal vantagem da técnica é a eliminação de interferências de compostos não voláteis contidos na matriz durante as análises, e também requer o mínimo de manipulação das amostras sem haver a necessidade do uso de solventes orgânicos, comuns em extrações líquido-líquido e líquido-sólido, que são tóxicos e carcinogênicos <sup>[16,21]</sup>. A técnica ainda permite um alto grau de automação, tornando o procedimento simples e rápido <sup>[16]</sup>.

- **Técnica de extração por Purga e Armadilha**

Na Figura 7 ilustra resumidamente as principais etapas do sistema de purga e armadilha, também muito conhecido pelo meio profissional pelo nome em inglês *purge and trap*. Em geral, a técnica de purga e armadilha provê uma maior sensibilidade em relação à extração via *headspace* <sup>[16]</sup>. Nesse método de extração, a amostra é purgada por um fluxo constante de um gás inerte, o qual carrega os compostos voláteis contidos na amostra até um tubo metálico contendo um material adsorvente (*trap*) <sup>[16]</sup>. Após a etapa de purga, o material adsorvente é conectado à linha de gás de arraste do cromatógrafo de fase gasosa, e é rapidamente aquecido <sup>[16]</sup>. Dessa forma, o analito é levado do material adsorvente, pelo fluxo de gás de arraste, até a coluna cromatográfica <sup>[16]</sup>.

Assim como para a extração via *headspace*, a técnica de purga e armadilha também possibilita um mínimo preparo de amostras e em meio aquoso, descartando o uso de solventes orgânicos <sup>[16]</sup>. Entretanto, o sistema de extração tende a ser mais complexo e caro em relação ao outro método de extração gás-líquido, pois muitos elementos de purga podem causar efeitos adversos nas análises e o funcionamento do sistema requer aparato mais sofisticado <sup>[16]</sup>.

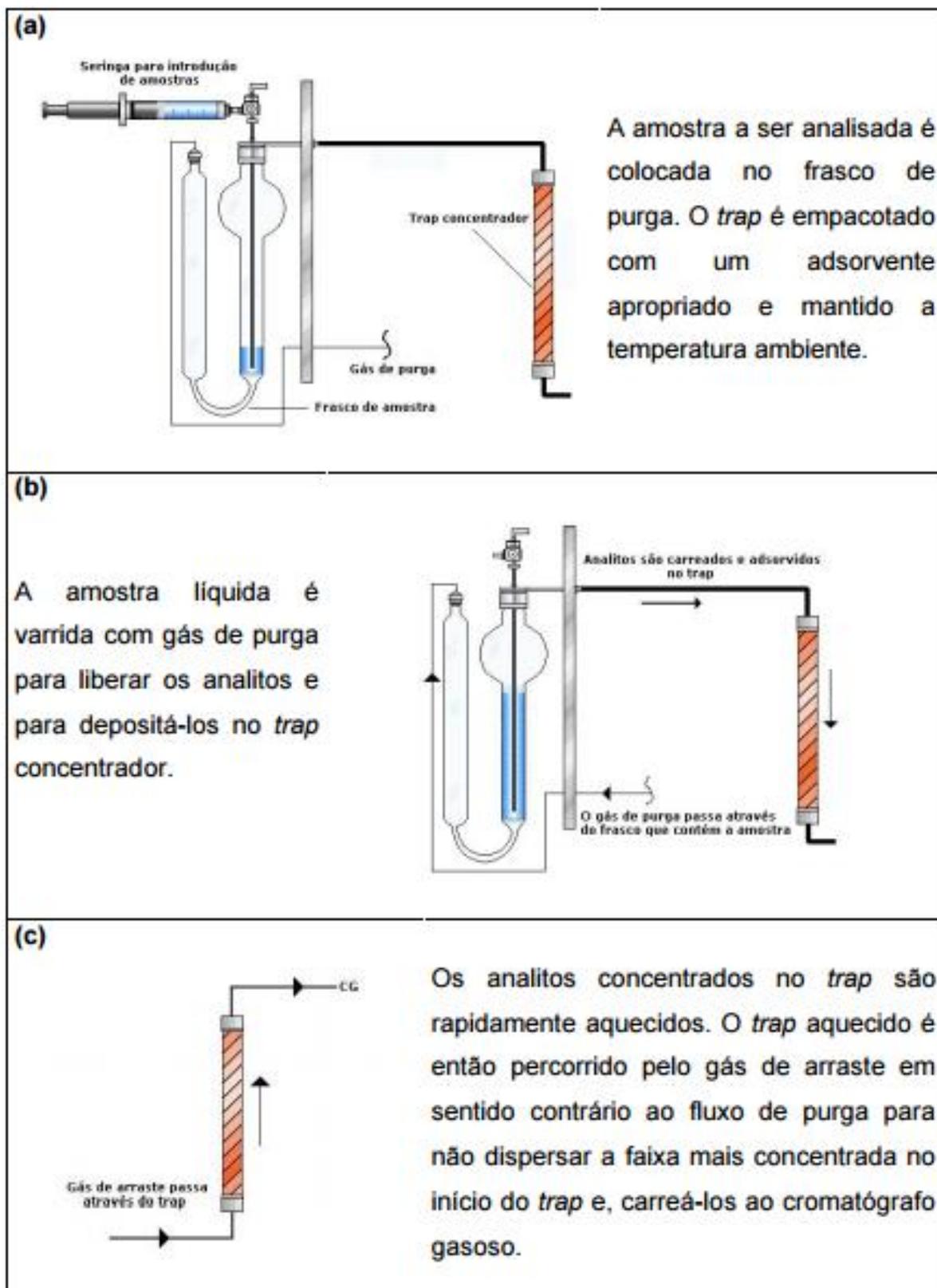


Figura 7. Principais etapas do sistema de purga e armadilha [22].

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

O fluxograma (Figura 8) apresenta as principais etapas conduzidas na parte experimental deste trabalho para a determinação de Tetranitrometano (TNM), através do método *US EPA SW 846 Method 8620C*.

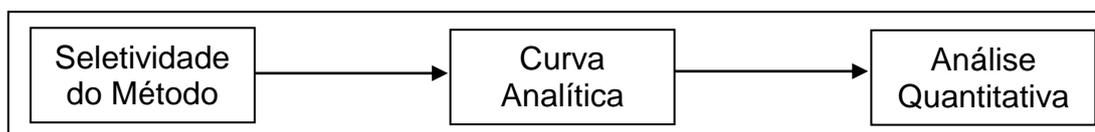


Figura 8. Principais etapas da parte experimental.

A seletividade do método para a determinação de TNM, ou seja, a capacidade do método em fazer com que a substância de interesse seja separada e produza sinal analítico durante o tempo de análise, foi determinada através de uma amostra padrão de TNM. Após esta etapa apresentar resultado satisfatório, portanto ser possível a identificação do composto de interesse, realizou-se o procedimento para a determinação quantitativa de TNM nesta metodologia, com a construção de uma curva analítica. E, por fim, as amostras de resíduos industriais e suas respectivas fortificações, para avaliar possíveis efeitos de matriz (amostra), foram analisadas quantitativamente.

#### 3.1 Materiais

##### Reagentes

- Tetranitrometano 100 mg PA (pureza 99,5%) foi adquirido comercialmente da marca Chem Service (lote:4203500);
- Metanol grau HPLC (pureza >99,8%) foi adquirido comercialmente da marca Qhemis (lote: H153531501);
- Água mineral (marca Crystal, lote: P19.06.15);
- Padrão Interno (PI) M-8260A/B-IS-10X 2000 mg.L<sup>-1</sup>, marca AccuStandard, lote: 214101362;
- Cloreto de sódio (NaCl) PA (pureza 99,8 %), marca Neon, lote: 23154;
- Areia isenta de compostos orgânicos;

### Vidrarias

- Balão volumétrico de 10 mL;
- Micropipeta da marca Transferpette, volumes de 10µL – 100 µL e 100µL – 1000 µL;
- Frasco de *headspace* – vial de 22 mL da marca Uniglas;

### Equipamentos

- Balança analítica;
- Amostrador automático de *headspace* Agilent modelo G1888;
- Cromatógrafo gasoso Agilent 7890A;
- Espectrômetro de Massas Agilent 5975C.

## **3.2 Preparação de soluções**

Para a preparação da amostra padrão de TNM, construção da curva analítica e a realização das fortificações, utilizou-se alíquotas de uma Solução Intermediária de TNM, que foi feita através da diluição de uma Solução de TNM.

### Preparação de Solução de TNM 10000 mg.L<sup>-1</sup>

Dissolveu-se 100 mg do padrão de tetranitrometano num balão volumétrico de 10 mL contendo metanol e completou-se o volume, com metanol, até o traço de aferição.

### Preparação de Solução Intermediária de TNM 250 mg.L<sup>-1</sup>

Utilizando uma micropipeta, adicionou-se uma alíquota de 250 µL da solução de tetranitrometano num balão volumétrico de 10 mL contendo metanol. Completou-se o volume, com metanol, até o traço de aferição.

### Preparação da solução de Padrão Interno (PI) 50 mg.L<sup>-1</sup>

Realizou-se uma diluição do PI 2000 mg.L<sup>-1</sup> num balão volumétrico de 10 mL contendo em metanol. Completou-se o volume, com metanol, até o traço de aferição.

O Padrão Interno é usado para fins quantitativos, que consiste em adicionar uma quantidade conhecida da solução do PI na amostra a ser analisada e relacionar as áreas do(s) analito(s) com o do Padrão Interno <sup>[15]</sup>.

O PI utilizado é uma mistura de 3 substâncias em quantidade em massa iguais. Composição: fluorbenzeno (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>F), clorobenzeno d<sub>5</sub> (C<sub>6</sub>D<sub>5</sub>Cl), 1,4-diclorobenzeno d<sub>4</sub> (C<sub>6</sub>D<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>).

### Preparação de solução modificadora de matriz

Em 500 mL de água mineral, adicionou 180 g de NaCl. Homogeneizou-se a solução até a completa dissolução do sal.

Esta solução é utilizada para melhorar a eficiência da extração de compostos orgânicos apolares, pois o aumento da concentração salina do meio pode resultar em mudanças no vapor, pressão parcial, solubilidade, condutividade térmica, densidade e tensão superficial para um analito <sup>[22,23]</sup>. Estas mudanças, ocorridas pelo efeito conhecido como *salting out*, ocorrem como resultado da variação do sistema de equilíbrio vapor-líquido, favorecendo, no caso da extração gás-líquido (*headspace*), a volatilização dos analitos voláteis <sup>[22,23]</sup>.

### **3.3 Preparação da amostra padrão de TNM**

Num frasco de *headspace* (*vial*), pesou-se 2g de areia e adicionou-se uma alíquota da Solução Intermediária (ver Tabela 3), para obter uma concentração de 4 mg.Kg<sup>-1</sup> de TNM. Neste *vial*, além da alíquota da Solução Intermediária de TNM, adicionou-se 10 mL de solução modificadora de matriz e uma alíquota de 50 µL de Padrão Interno (PI) 50 mg.L<sup>-1</sup>. Imediatamente, lacrou-se o frasco e realizou-se a análise cromatográfica.

Apesar do PI, como mencionado anteriormente, ser utilizado para fins quantitativos, sua adição, na amostra padrão de TNM, justifica-se pela necessidade

de determinar os tempos de retenção, além do tetranitrometano, das substâncias presentes na solução de PI.

### 3.4 Preparação da curva analítica

Foram preparados 5 pontos (padrões) para a construção da curva analítica, na faixa de concentração de 25 mg.Kg<sup>-1</sup> a 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de TNM. Pesou-se 2 gramas de areia para cada ponto e adicionou-se uma alíquota correspondente a concentração desejada de Solução Intermediária de TNM (Tabela 3), num frasco de *headspace* (*vial*). Em cada *vial*, além da alíquota da Solução Intermediária de TNM, adicionou-se 10 mL de solução modificadora de matriz e uma alíquota de 50 µL de Padrão Interno (PI) 50 mg.L<sup>-1</sup>. Imediatamente, lacrou-se os frascos e realizou-se a análise cromatográfica.

Tabela 3 – Volume da Solução Intermediária de TNM.

Concentração de TNM (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Volume (µL) da Solução Intermediária de TNM* <sup>†</sup>
4	32
25	200
30	240
35	280
45	360
50	400

\*O cálculo do volume da Solução Intermediária de TNM é para uma massa final de 2 g;

<sup>†</sup>A unidade da Solução Intermediária de TNM é mg.L<sup>-1</sup>; portanto ao retirar um volume desta solução, uma massa de TNM proporcional ao volume retirado está presente. Essa massa de TNM, adicionada numa massa (areia, por exemplo), nos fornece a unidade mg.Kg<sup>-1</sup>.

### 3.5 Preparação das Amostras

Para a determinação de TNM em amostras, selecionou-se 5 diferentes tipos de resíduos industriais. Em frascos de *headspace* (*vials*) – um *vial* para cada amostra -, pesou-se uma alíquota de 2 g de amostra, adicionou-se 10 mL de solução modificadora de matriz e 50 µL de PI. Imediatamente, lacrou-se os frascos e realizou-se a análise cromatográfica.

Na tabela 4 é apresentada as características das amostras de resíduos industriais utilizadas nas análises.

Tabela 4 – Amostras utilizadas nas análises.

<b>Amostra</b>	<b>Descrição</b>
A1	Resíduo de torta da ETEL (processo)
A2	Solo de escavação/sondagem
A3	Percolado classe I inertizado
A4	Agregado siderúrgico
A5	Semente de sorgo

Com o intuito de simular as diversas fontes de resíduos industriais, foram escolhidas amostras de diversas fontes, desde processos produtivos (siderúrgicas), passando por resíduos de solo que sofreu processo de sondagem, até mesmo resíduo de origem agrícola (sementes). Todos esses tipos de resíduos são frequentemente analisados em laboratórios analíticos de análises químicas, com o intuito de saber se caso estes passarem por um processo de incineração, quais os gases nocivos que poderão ser liberados ao meio ambiente.

### **3.6 Preparação das Fortificações de Amostras**

Para a preparação das fortificações de amostras, pesou-se uma segunda alíquota de 2 g de cada uma das amostras, em frascos de *headspace* (*vials*) – um *vial* para cada fortificação.

Em cada *vial*, após a pesagem da amostra, foi adicionado, com auxílio de uma micropipeta, uma alíquota da solução intermediária de TNM, correspondente a uma concentração de 25 mg.Kg<sup>-1</sup> de TNM (ver Tabela 3). Adicionou-se 10 mL de solução modificadora de matriz e 50 µL de PI. Imediatamente, lacrou-se os frascos e realizou-se a análise cromatográfica.

O procedimento de fortificação (ou enriquecimento, incorporação, dopagem, que são usualmente utilizados para o termo em inglês “*spiking*”), consiste na adição do padrão da substância à amostra, para avaliar possíveis efeitos de matriz na análise [22].

### 3.7 Condições dos Equipamentos

Nas Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9 estão descritos os parâmetros experimentais relacionados com as programações de temperatura e condições de operação do amostrador automático de *headspace*, da coluna cromatográfica, do forno para a vaporização da amostra e do espectrômetro de massas

Tabela 5 - Programação da temperatura do amostrador automático de *headspace*

<b>Parâmetros</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Forno	80
<i>Loop</i>	90
<i>Transfer line</i>	100

Tabela 6 - Condições de operação do amostrador automático de *headspace*

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Equilíbrio	10 min
Pressão	13,5 psi
Tempo de pressurização	0,2 min
Agitação	Alta

Tabela 7 - Condições de operação do cromatógrafo a gás

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b>
Coluna	DB – VRX <sup>Δ</sup>
Comprimento	20 m
Diâmetro interno	0,18 mm
Espessura do filme	1,00 μm
Gás de arraste	Hélio
Pressão do gás de arraste	25,455 psi
Temperatura do Injetor	150°C
Razão do split	50:1
Modo de aquisição	SIM

<sup>Δ</sup> A coluna DB – VRX, possui uma fase estacionária patenteada, porém sabe-se que é uma fase com baixa polaridade <sup>[24]</sup>.

Esta metodologia, a temperatura da coluna (forno do cromatógrafo), durante a análise, não permanece constante (Tabela 8). Essa variação é de extrema importância para melhorar a separação das substâncias e diminuir o tempo de análise, além de melhorar a simetria dos picos <sup>[15]</sup>. Esta programação de temperatura é muito conhecido como rampa de aquecimento.

Tabela 8 - Programação de temperatura usada no forno do cromatógrafo

<b>Razão de aquecimento (°C/min)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo de espera (min)</b>
-	40	3,0
10	100	0
25	225	3,0

A rampa de aquecimento deste método consiste em começar a análise em 40 °C e permanecer nesta temperatura por 3 min. Após este período, ocorre um aquecimento a uma taxa de 10 °C/min e quando a temperatura atinge 100 °C, a taxa de aquecimento é alterada para 25 °C/min até atingir 225 °C. A temperatura de 225 °C permanece por 3 min, até que então o ciclo é retornado ao início para que a análise de outra amostra recomece.

No final da corrida cromatográfica, todos os analitos a serem analisados já foram separados e detectados; porém uma alta temperatura de 225 °C é necessária para garantir que a coluna cromatográfica seja “limpa” de todas as substâncias da amostra que possa ainda estar no sistema.

Tabela 9 - Programação de temperatura espectrômetro de massa

<b>Parâmetro</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
Fonte de íons	230
Quadripolo	150

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Seletividade do Método

A Figura 9 mostra o cromatograma da amostra padrão de TNM obtido pelo software do equipamento de CG-EM

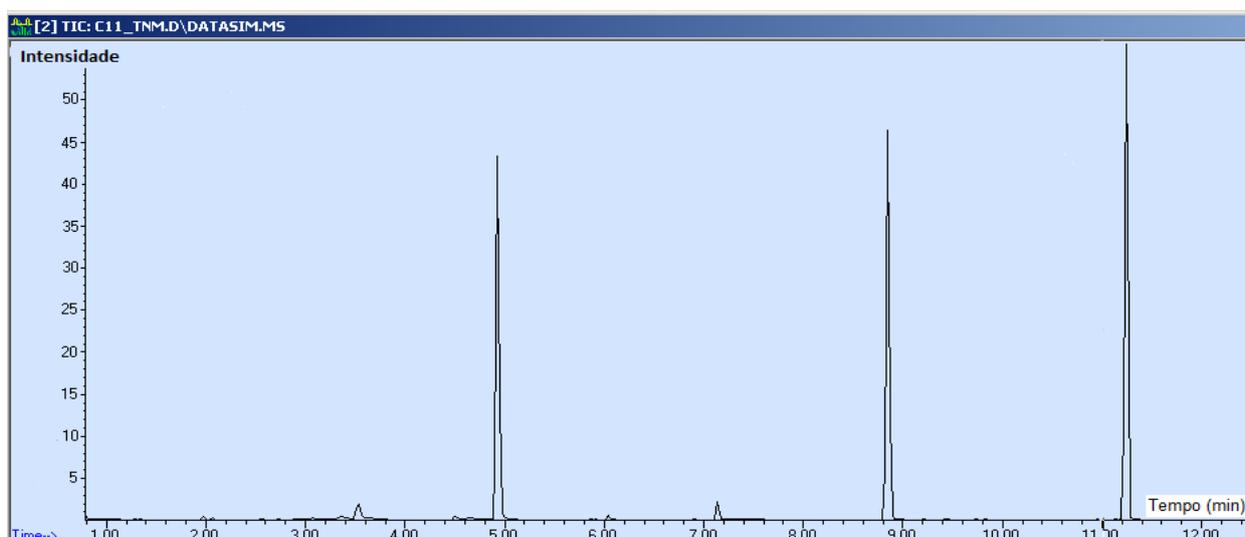


Figura 9. Cromatograma da amostra padrão obtido pelo software do equipamento de CG-EM: gráfico da intensidade em função do tempo.

A intensidade do pico é em função do tempo de retenção. A intensidade e a largura do pico estão relacionadas à quantidade da espécie iônica detectada no detector de massas e o tempo de retenção está relacionado à interação da substância com a fase estacionária da coluna, onde a substância que apresenta maior interação com a fase estacionária é retida por maior tempo na coluna e aparece no cromatograma (gráfico) com um tempo de retenção maior. Observa-se neste cromatograma a presença de 5 picos. A atribuição do tempo de retenção para cada pico está descrita na Tabela 10.

Tabela 10. Dados de tempo de retenção e intensidade (I) obtidos pelo cromatograma da amostra padrão de TNM e temperatura de ebulição, Te, obtida pelo software do CG-MS

<b>Pico</b>	1	2	3	4	5
<b>Tempo de Retenção (min)</b>	2,0	4,9	7,2	8,8	11,2
<b>I (u.a)</b>	2	43,5	2,5	46,6	63
<b>Fragmentos da Substância</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> F	C(NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	C <sub>6</sub> D <sub>5</sub> Cl	C <sub>6</sub> D <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>Te (°C)</b>	40	85,2	126	132	174

Após a análise do espectro de massas dos picos, verificou-se que o pico 1 é o diclorometano; esta é uma contaminação freqüente em laboratórios analíticos, visto que é um solvente muito utilizado na extração de substâncias semi-voláteis. Já os picos 2, 4 e 5 são relativos às substâncias que compõem o Padrão Interno (PI). E o pico 3 é do analito de interesse, tetranitrometano.

Devido à fase estacionária ser de baixa polaridade, verifica-se que os compostos polares eluem primeiro, pois há pouca afinidade química com esta; e outro fator importante a se observar é o ponto de ebulição de cada substância, pois nos compostos que possuem alguma interação química com a fase estacionária da coluna cromatográfica, a dessorção do soluto (retorno à fase móvel), ocorre por volatilidade. Ou seja, devido à programação de temperatura usada no forno (Tabela 8), as substâncias voltam gradativamente à fase móvel, conforme a temperatura do forno atinja o tempo de ebulição da substância, otimizando, desta forma, a separação das substâncias.

A Figura 10 é o espectro de massas do terceiro pico, obtido pelo software do equipamento de CG-EM, que foi detectado na Figura 9.

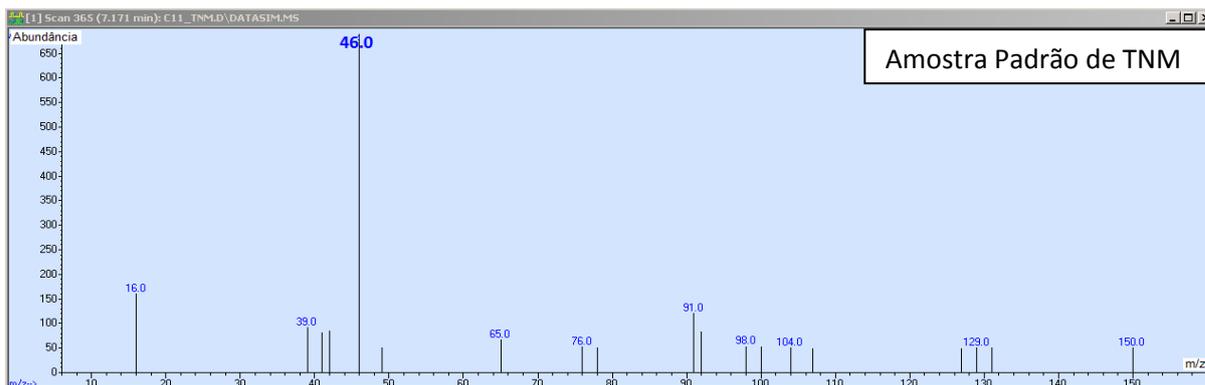


Figura 10. Espectro de massas do terceiro pico, obtido pelo software do equipamento de CG-EM: gráfico da abundância em função de m/z (massa/carga do íon).

Ao comparar o espectro de massas do terceiro pico da amostra padrão de TNM (Figura 10) com o espectro de massas do TNM, obtido pela biblioteca padrão do software (Figura 11), verifica-se que em ambos o íon que possui m/z 46 é o mais abundante, e o segundo mais intenso é o m/z 16.

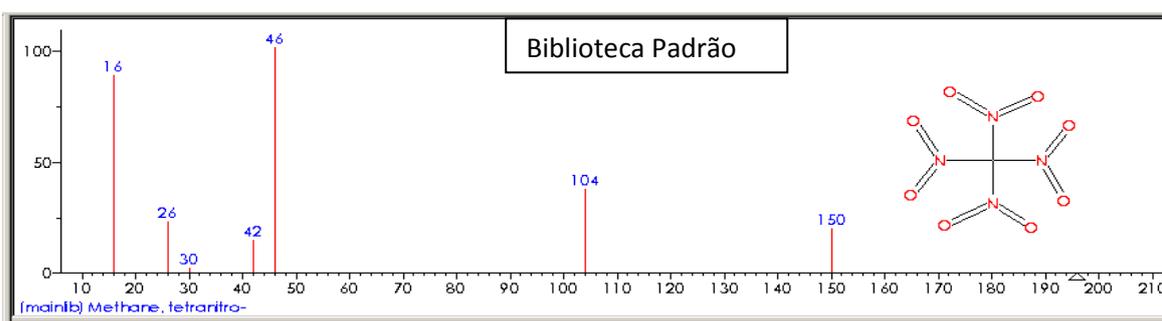


Figura 11. Espectro de massas do TNM, obtido pela biblioteca padrão do software.

A partir destes dados, o software dá uma probabilidade de 26,3% de que o espectro de massas do terceiro pico da amostra padrão de TNM ser do tetranitrometano. Esta relativa baixa probabilidade, justifica-se ao fato de que as proporções de todos os m/z em relação ao m/z 46 da biblioteca padrão (software) serem diferentes da encontrada na amostra padrão de TNM; e principalmente ao fato de que a partir do terceiro íon mais abundante todos têm a mesma intensidade no espectro de massas da amostra padrão de TNM.

A dificuldade encontrada na diferenciação a partir do íon de terceira maior abundância é normal, pois sua intensidade, do terceiro íon mais abundante, é baixa e tem a mesma proporção do ruído (interferência) de íons que há no sistema cromatógrafo – isso acontece, pois o equipamento recebe uma grande quantidade

de amostras e periodicamente é necessário desmontar o equipamento e limpar o analisador de massas, para retirar íons que ficam retidos.

Os picos em m/z (46), (16), (104) são atribuídos aos íons ( $\text{NO}^+$ ,  $\text{O}^+$  e  $\text{C}(\text{NO}_2)_2^+$ ), respectivamente, relacionados a fragmentação da molécula de TNM, de acordo com os dados da biblioteca do *software* do equipamento de espectroscopia de massas, apresentados na Figura 11.

Sendo que na amostra padrão de TNM foi adicionado moléculas de TNM e seu espectro de massas é compatível com o espectro de massas do TNM da biblioteca padrão (*software*), pode-se afirmar que o TNM, nestas condições de análises, possui um tempo de retenção de 7,2 min. Logo todo pico que aparecer neste tempo de retenção e possuir o mesmo espectro de massas foi considerado TNM.

## 4.2 Curva Analítica

A Figura 12 apresenta os dados estatísticos da curva analítica de TNM. Para fins quantitativos de tetranitrometano, utilizou-se o método de padronização interna; portanto, tem-se uma curva (abundância X/abundância PI) x Concentração de X, onde X representa TNM e PI representa Padrão Interno.

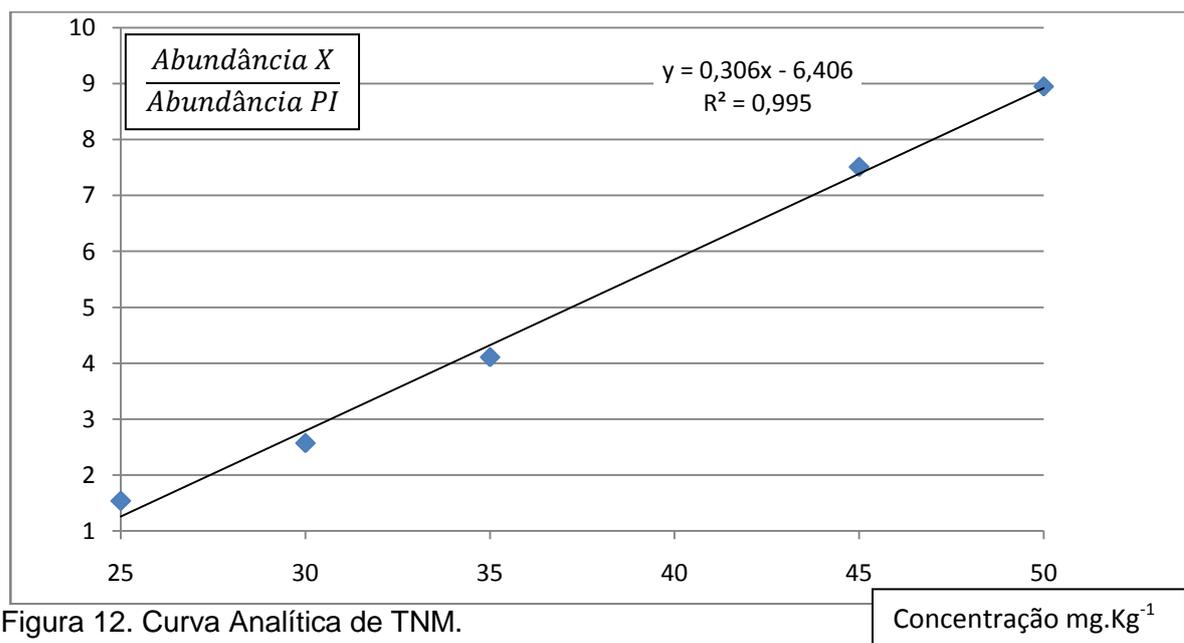


Figura 12. Curva Analítica de TNM.

A utilização do padrão Interno (PI) é indicado para minimizar flutuações (erros), principalmente no processo de injeção e variações instrumentais, como por exemplo, detecção.

Nota-se que a curva analítica do TNM possui uma boa linearidade, ou seja, há uma relação linear entre concentração e resposta analítica ( $R^2 = 0,995$ ), pois quanto mais próximo de 1 for o  $R^2$ , maior a relação entre concentração da substância de interesse e resposta analítica.

Vale salientar a menor concentração da curva é  $25 \text{ mg.Kg}^{-1}$ , que comparado análise pelo detector NPD, utilizando como referência o método da NIOSH (*Method 3513*), encontra-se em alguns métodos analíticos, como menor concentração a ser detectado de  $146 \text{ mg.Kg}^{-1}$ . Ou seja, este método possui uma redução de mais de 5 vezes a menor concentração quantificada.

### 4.3 Análises Quantitativas

- **Amostras**

Todas as 5 amostras analisadas, no tempo retenção corresponde ao TNM, apresentaram um cromatograma e um espectro de massas iguais. A Figura 13 é o cromatograma da amostra A3 e a Figura 14 é o espectro de massas, correspondente ao tempo de retenção do TNM, da amostra A3.

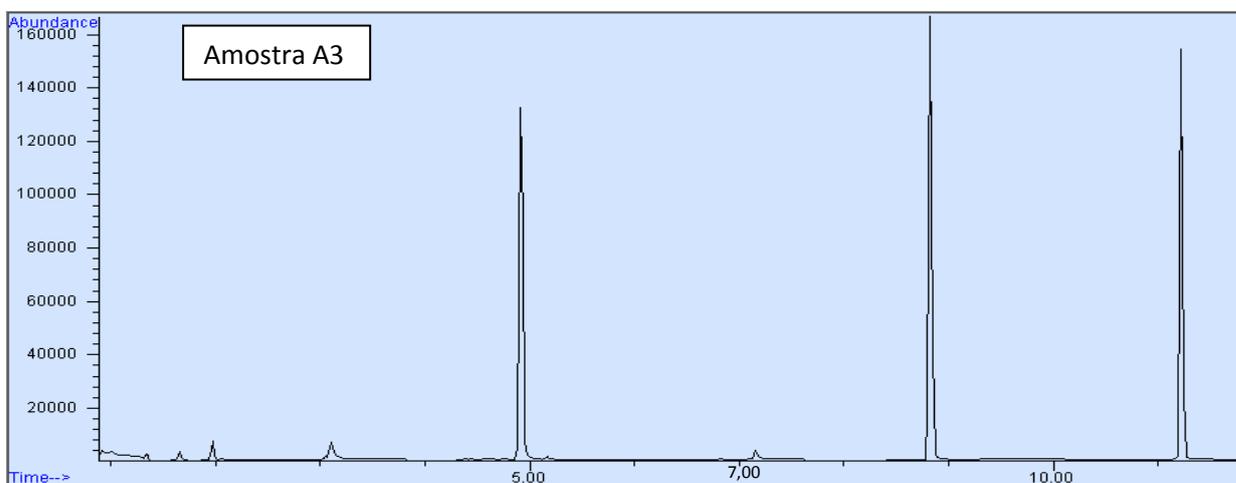


Figura 13. Cromatograma da amostra A3.

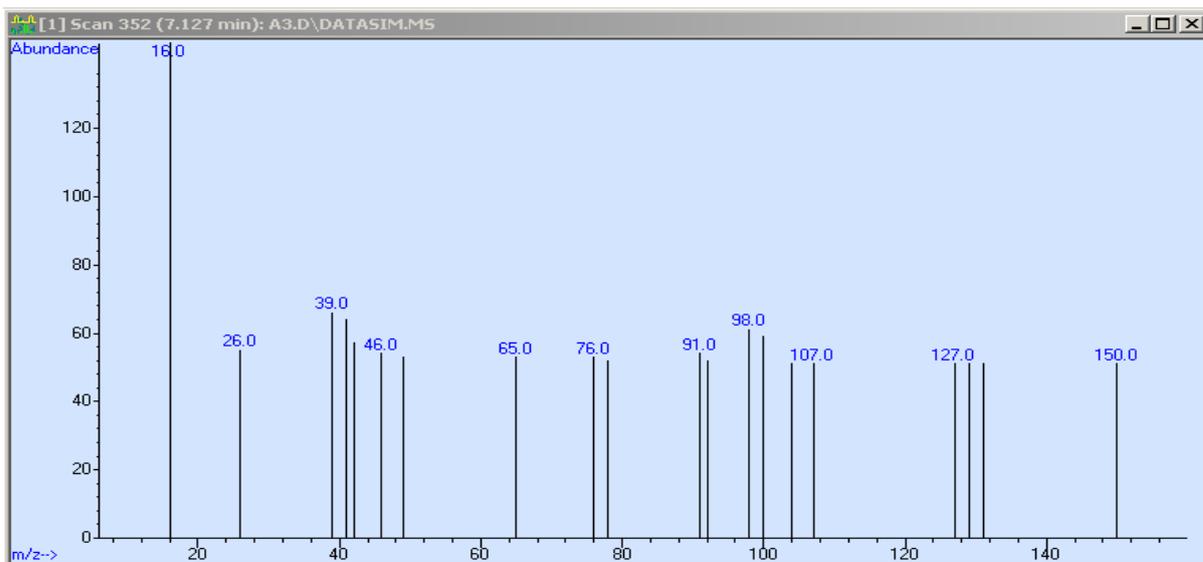


Figura 14. Espectro de massas da amostra A3, correspondente ao tempo de retenção do TNM.

Ao analisar o cromatograma (Figura 13), nota-se um pequeno pico presente próximo a 7,2 min, sendo este o tempo de retenção do TNM. Porém, ao analisar o espectro de massas deste pico (Figura 14), verifica-se apenas um íon intenso, em relação aos outros, de m/z 16 e alguns outros íons de m/z característicos de ruído (interferentes). Aparentemente, os ruídos parecerem intensos, mas essa impressão é ao fato da intensidade do íon de m/z 16 ser baixa também; logo proporcionalmente a este íon, o ruído é intenso.

Sendo que o íon de maior abundância fornecido pelo tetranitrometano é, conforme a biblioteca padrão (software), o m/z 46, conclui-se que na amostra A3 não há concentração de TNM superior ou igual a  $25 \text{ mg.Kg}^{-1}$ .

Conforme mencionado anteriormente, todas as amostras apresentaram o mesmo perfil de cromatograma e de espectro de massas, no tempo de retenção correspondente ao TNM, portanto nenhuma amostra (A1, A2, A4 e A5, além da A3) apresentaram resultados positivos para TNM.

- **Fortificações das Amostras**

A Tabela 11 apresenta todos os resultados das 5 amostras, das fortificações de cada uma das amostras, além do grau de recuperação das fortificações das amostras.

Tabela 11 – Concentração de TNM nas amostras, fortificações de amostras e grau de recuperação das fortificações.

Amostra	Descrição	Concentração de TNM na Amostra (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Concentração de TNM na Fortificação da Amostra (mg.Kg <sup>-1</sup> )	Grau de Recuperação da Fortificação na Amostra (%)
A1	Resíduo de torta da ETEL (processo)	Negativo	20,92	83,68
A2	Solo de escavação/sondagem	Negativo	26,06	95,76
A3	Percolado classe I inertizado	Negativo	Negativo	0
A4	Agregado siderúrgico	Negativo	Negativo	0
A5	Semente de sorgo	Negativo	Negativo	0

Obs.: Nas fortificações das amostras, foi adicionado uma concentração de 25 mg.Kg<sup>-1</sup> de TNM.

A Figura 15 mostra o cromatograma da fortificação da amostra A2; e a Figura 16 mostra o espectro de massas da fortificação da amostra A2, do pico que saiu no tempo de retenção correspondente ao tetranitrometano.

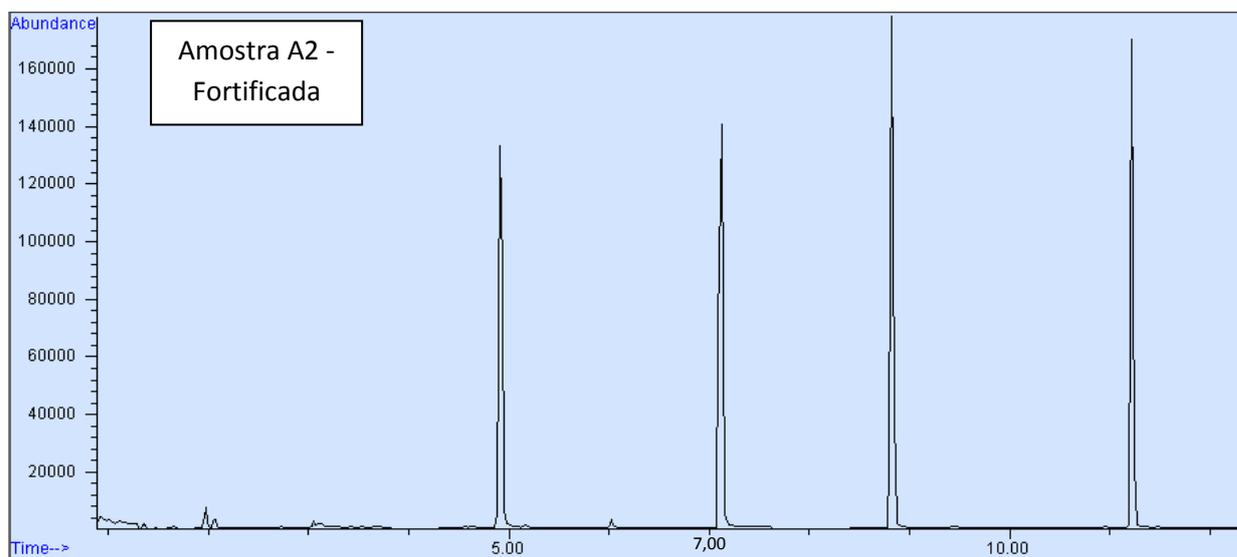


Figura 15. Cromatograma da fortificação da amostra A2.

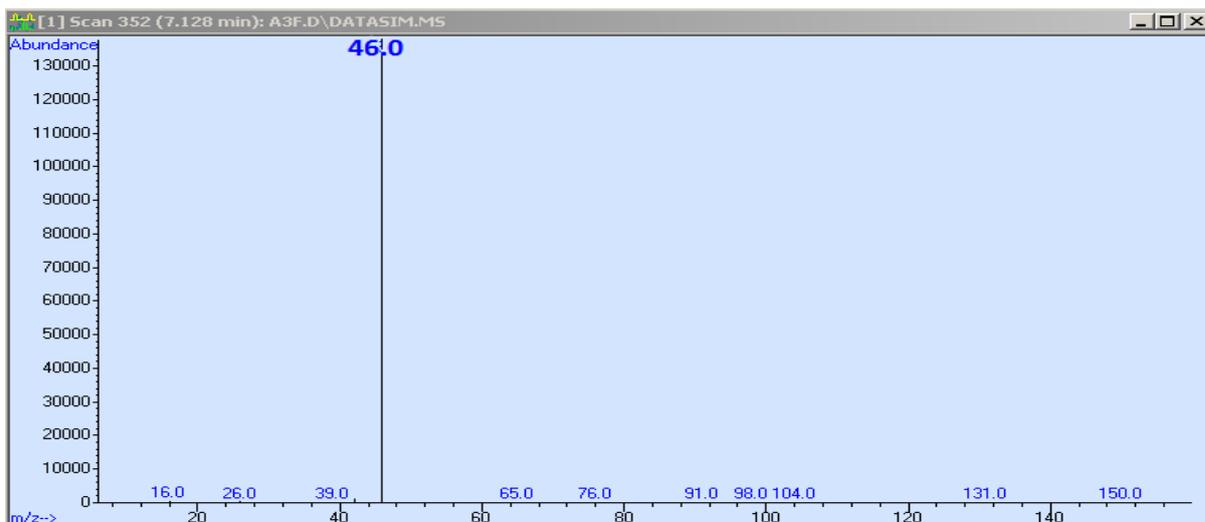


Figura 16. Espectro de massas da fortificação amostra A2, no tempo de retenção correspondente ao TNM.

Observa-se no cromatograma (Figura 15) um pico no tempo de retenção correspondente ao TNM; portanto há uma forte indicação que houve recuperação da fortificação realizada na amostra A2.

Analisando o espectro de massas deste pico (Figura 16), verificamos o íon de maior intensidade  $m/z$  46, correspondente à fragmentação do TNM. Apesar de apenas o íon de maior intensidade aparecer no espectro de massas, não há dúvidas em relação ao composto, haja visto que a amostra A2 sem a fortificação apresentou valor negativo para TNM e seu espectro de massas apenas com íons de interferentes; já a amostra fortificada apresentou um pico no cromatograma no tempo de retenção correspondente ao tetranitrometano e este pico possui o íon correspondente a fragmentação de sua molécula.

Os cromatogramas e espectros de massas das fortificações das amostras A1 e A2 foram semelhantes. Com os dados das áreas dos picos, calculou-se na curva analítica (Figura 12) a concentração de TNM nas fortificações das amostras A1 e A2, obtendo como resultados, respectivamente,  $20,92 \text{ mg.Kg}^{-1}$  e  $26,06 \text{ mg.Kg}^{-1}$ .

Resultados considerados excelentes, visto que normalmente em laboratórios analíticos de análises ambientais, trabalha-se como um erro aceitável de até 20%.

Já as fortificações das amostras A3, A4 e A5 apresentaram um cromatograma e espectro de massas iguais ao da própria amostra sem fortificação. Conclui-se, portanto, que não houve recuperação destas fortificações de amostras, algo

esperado, já que o TNM é extremamente reativo devido às suas ligações de ressonância.

Provavelmente, pelo fato de que a matriz de resíduos industriais é altamente impura, ou seja, um ambiente propício para acontecer alguma reação, as moléculas de tetranitrometano reagiram com algum composto da amostra transformando-as numa outra substância. A possibilidade de perda no processo não se sustenta devido ao fato de que as substâncias que formam a solução do Padrão Interno (PI), saíram perfeitamente, como pode-se ver na Figura 17 que mostra o cromatograma da fortificação da amostra A3 .

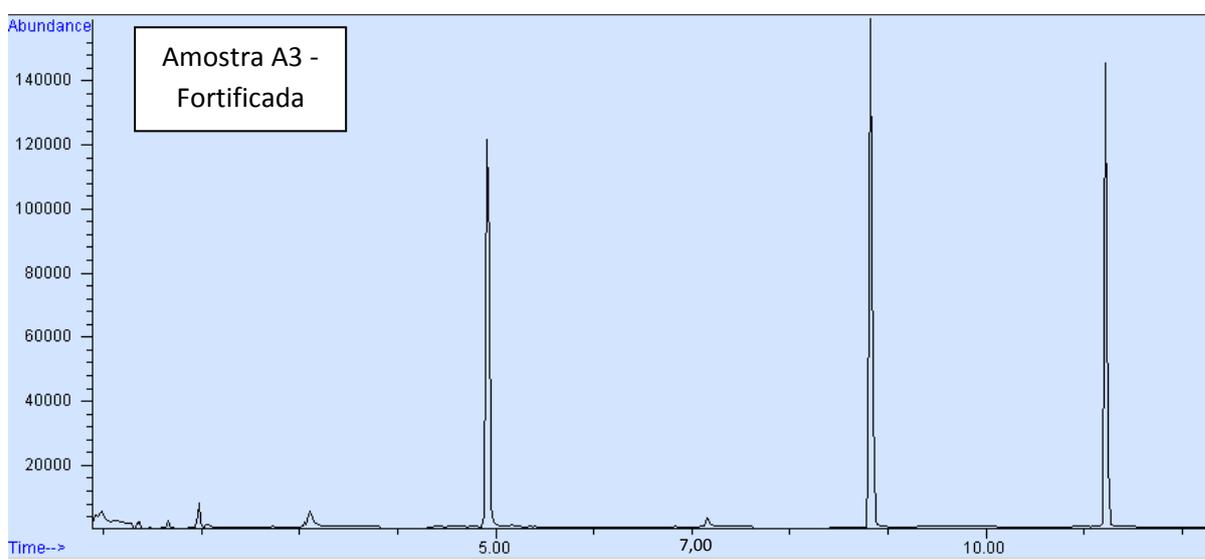


Figura 17. Cromatograma da fortificação da amostra A3.

Este pequeno pico que aparece em 7,1 min, no mesmo tempo de retenção do TNM, é apenas ruído, como podemos verificar através do espectro de massas deste pico (Figura 18), que apresenta como íon mais abundante o  $m/z$  16.

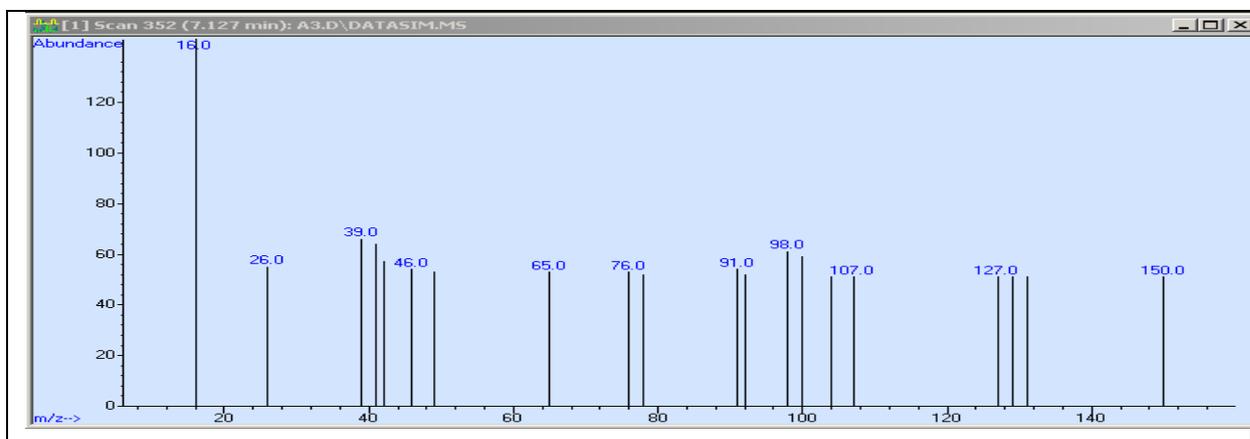


Figura 18. Espectro de massas da fortificação amostra A3, no tempo de retenção correspondente ao TNM.

Portanto, nota-se que quando o meio é inerte ao TNM, sua recuperação em fortificações fica dentro do critério de aceitação. Vale frisar, que este procedimento de fortificações de amostras em resíduos industriais foi aplicado exclusivamente neste trabalho a fim de comprovar a eficiência da metodologia, pois no dia-a-dia dos laboratórios comerciais não é realizado este procedimento em resíduos industriais, devido à alta complexidade da matriz. Há outros controles de qualidade que asseguram a confiabilidade de um método nestes casos, como por exemplo, padrão de controle, padrão de verificação, entre outros.

## 5 CONCLUSÃO

Fica claro com os resultados apresentados neste trabalho que a metodologia US EPA SW 846 *Method* 8620C é viável para a determinação de tetranitrometano, obtendo desta forma, uma economia em todo o aspecto produtivo, tanto em relação a insumos como saúde ocupacional e proteção ambiental.

Apesar de o TNM ser um composto semi-volátil, verificou-se que este método é sensível para o composto de interesse, numa faixa de trabalho linear a partir de 25 mg.Kg<sup>-1</sup>, concentração bem abaixo do que é praticado por alguns métodos que detectam apenas a partir 146 mg.Kg<sup>-1</sup>, além de toda confiabilidade que a técnica de espectrometria de massas traz à análise.

Portanto, abre-se uma grande janela de oportunidade, para que todos os segmentos que necessitem de realizar a determinação de TNM, possa validar esta metodologia em seu escopo de trabalho, baseado na análise por CG-MS-HS. Vale mencionar, que é necessário vários outros testes para a validação deste método, como por exemplo, teste de repetibilidade, robustez, entre outros, porém é um caminho que pode ser trilhado.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Rowland, F.S. *Stratospheric Ozone Depletion by Chlorofluorocarbons (Nobel Lecture) - Encyclopedia of Earth*. Abr. 2007. Disponível em: <http://www.eoearth.org/view/article/156270>. Acesso em: 14 mar 2015
- [2] Fahey, D. W; Hegglin, M. I. *Twenty questions and answers about the ozone layer: 2010 update - Panel Review Meeting for the 2010 Ozone Assessment*. Switzerland. Jun/Jul. 2010. Disponível em: <http://acdbxt.gsfc.nasa.gov/Documents/O3assessments/Docs/WMO2010/Q2QA.pdf>. Acesso em: 29 nov 2015.
- [3] Centers for disease control and prevention. NIOSH. Dichlorodifluoromethane. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/1018.pdf>. Acesso em: 04 jan 2016.
- [4] Nascimento, A. N. Trabalho de Graduação: certificado de aprovação de destinação de resíduos industriais – CADRI: crítica ao instrumento adotado pela CETESB. FATEC-SP. São Paulo, 2009.
- [5] Norma brasileira: ABNT NBR 1004. Resíduos sólidos – classificação. 2ª ed. Rio de Janeiro, 2004.
- [6] Zonzini, D. Trabalho de Graduação: resíduos sólidos domiciliares e os impactos na saúde ambiental. FATEC-SP. São Paulo, 2009.
- [7] Borges, M. C. P. Trabalho de Graduação: sistema de gestão de resíduos industriais, baseado na norma NBR ISSO 14001:2004 - estudo de caso Vulkan do Brasil. FATEC-SP. São Paulo, 2009.
- [8] Silva, L. Z. Trabalho de Graduação: Destinação final dos lodos gerados nas ETES da região metropolitana de São Paulo. FATEC-SP. São Paulo, 2005.

- [9] *Occupational Safety and Health Administration* – OSHA. United States department of Labor. Disponível em: [https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH\\_271300.html](https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_271300.html). Acesso em: 09 dez 2015.
- [10] *Organic syntheses. Working with hazardous chemicals*. Coll. Vol. 3, p.803 (1955); Vol. 21, p.105 (1941).
- [11] EPA. *Acute exposure guideline levels for selected airborne chemicals. The national academies press*. Volume 5. Washington, D.C.2007.
- [12] *Centers for disease control and prevention. NIOSH pocket guide to chemical hazards*. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0605.html>. Acesso em 14 mar 2015.
- [13] Atkins, P; Jones, L. *Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente*. Ed. Bookman. 5ª edição. Porto Alegre, 2012.
- [14] Lopes, A. C; Cavasotto, T. *Caracterização química e físico-química de efluente da indústria de explosivos nitroaromáticos*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.
- [15] Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Editora Unicamp, 1ª reimpressão. Campinas, SP, 2007.
- [16] Leite, R.W. *Validação de um método de extração gás-líquido “headspace” acoplado a um CG-EM para determinação de THM em água potável da região de Maringá*. Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- [17] Ciola, R. *Introdução à cromatografia em fase gasosa*. Ed Edgard Blücher. São Paulo, 1973.

[18] Curso de auto-instrução em prevenção, preparação e resposta para desastres envolvendo produtos químicos. Monitoramento ambiental. Disponível em: <http://www.bvsde.paho.org/tutorial1/p/monimedi/>. Acesso em 10 jan 2016.

[19] Aquino Neto, F. R.; Nunes, D.S. S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Ed Interciência. Rio de Janeiro, 2003.

[20] Silverstein, R. M; Webster, F. X; Kiemle, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed LTC. Rio de Janeiro, 2007.

[21] Restek. A technical guide for static headspace anlysis using GC. Disponível em: <http://www.restek.com/pdfs/59895B.pdf>. Acesso em: 08 dez 2015.

[22] Budziak, D. Dissertação: Desenvolvimento de método para a determinação de trihalometanos em águas de Florianópolis – SC usando *purge & trap* e cromatografia gasosa. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - SC, 2005.

[23] Gaujac, A. Dissertação: Otimização e validação de método para determinação de BTEX em amostras ambientais aquosas empregando microextração em fase sólida e GC-FID. Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, 2006.

[24] Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC. Disponível em: <http://cientificanacional.com.ar/v2/catalogos/Croma%20-%20Columns%20GC%20-%20Catalogo.pdf>. Acesso em: 25 de jan 2016.

## Parte B: Estudo dos Fundamentos das Análises de Cromatografia e Espectrometria de Massas.

Nesta parte é apresentado o estudo dos fundamentos das análises de cromatografia gasosa e da espectrometria de massas, que foi necessário para a melhor compreensão das técnicas analíticas utilizada na análise de tetranitrometano apresentadas na primeira parte deste trabalho.

### 1 CROMATOGRAFIA

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo <sup>[1,2]</sup>. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela <sup>[1,2]</sup>. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta em migrações diferenciais desses componentes <sup>[1,2]</sup>.

Dois bons exemplos didáticos e muito utilizados em experimentos escolares, para a compreensão geral desta técnica, é a cromatografia em papel (ver Figura 1), e a cromatografia em coluna (Figura 2) com fase estacionária sólida <sup>[2,3,4,5]</sup>.

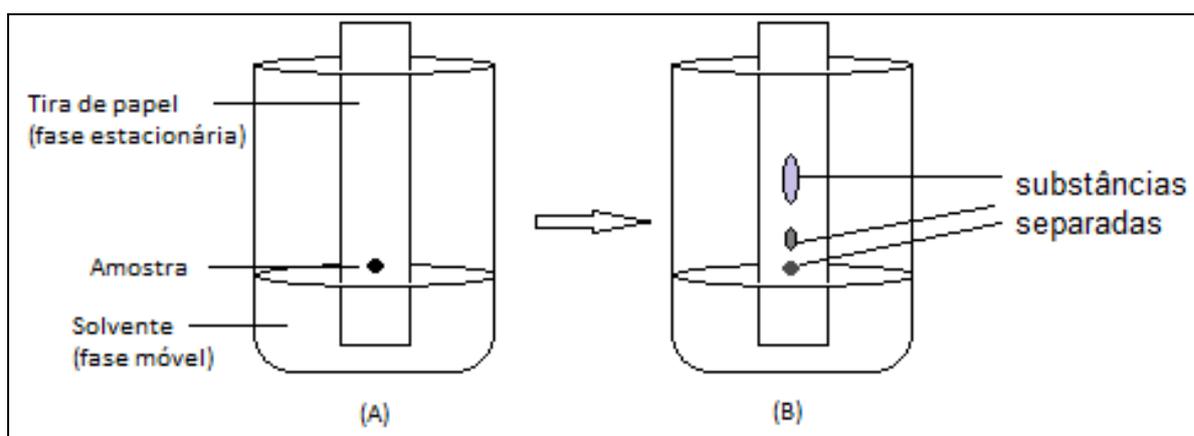


Figura 1. Cromatografia em papel – ilustração esquemática: (a) início do processo – aplicação da amostra, e (b) processo de separação entre as substâncias, causada pela difusão da fase móvel pela capilaridade da fase móvel com o papel e a interação diferencial das substâncias entre a fase móvel e a fase estacionária.

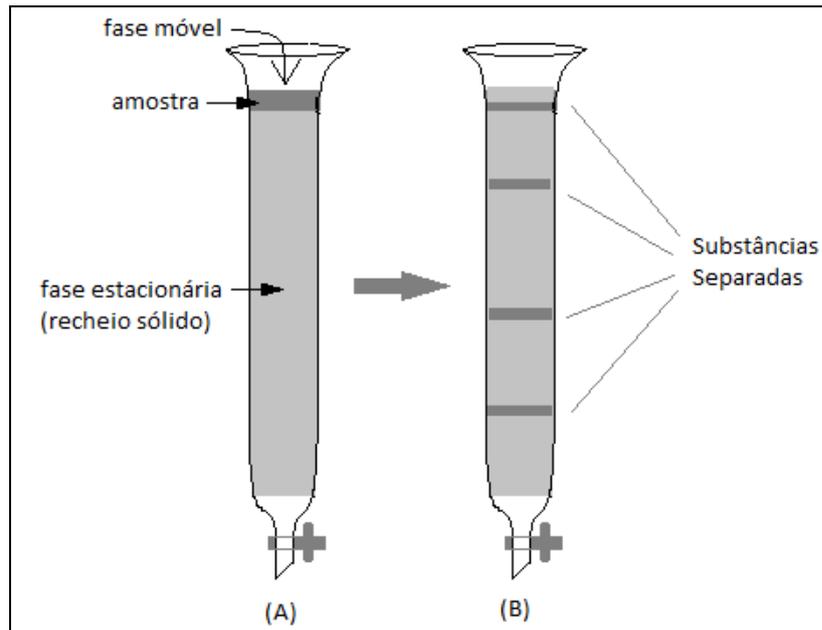


Figura 2. Cromatografia em coluna com fase estacionária sólida – ilustração esquemática: (A) início do processo – aplicação da amostra; e (B) processo de separação entre as substâncias da amostra pelo processo de adsorção diferencial com a fase estacionária.

A Figura 1 mostra esquematicamente o processo de separação das substâncias de uma amostra por cromatografia em papel. Nesta técnica, a separação das substâncias ocorre por um mecanismo de partição, que utiliza dois líquidos, ou misturas de líquidos, um dos líquidos fica suportado sobre papel de filtro, atuando como fase estacionária e o outro líquido atua como fase móvel (eluente) [2,3,4]. A amostra é aplicada no papel e mergulhada na fase móvel [2,3,4]. A fase móvel sobe por capilaridade e arrasta a substância pela qual tem mais afinidade, separando-a das substâncias com maior afinidade pela fase estacionária [2,3,4]. Os componentes que têm capacidade de formar ligações (ou “pontes”) de hidrogênio com a fase estacionária migram mais lentamente através do papel [2,3,4].

A Figura 2 apresenta esquematicamente o processo de separação das substâncias de uma amostra por cromatografia em coluna recheada com fase estacionária sólida, cujo mecanismo de separação é por adsorção diferencial da substância com a fase estacionária [2,5]. Nesta técnica, utiliza-se uma coluna de vidro com uma torneira na extremidade inferior e aberta na parte superior [2,5]. A coluna de vidro é preenchida completamente com uma fase estacionária sólida, por exemplo:

silica gel ou alumina, e embebida por um solvente líquido (fase móvel) <sup>[2,5]</sup>. A amostra é arrastada pela fase móvel pela ação da gravidade e a velocidade de arraste dependerá da polaridade das substâncias que compõem a amostra <sup>[2,5]</sup>.

Entre os métodos de análises químicas utilizados em laboratórios acadêmicos e industriais, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à facilidade com que efetua a separação, a identificação e a quantificação das espécies químicas <sup>[2]</sup>. Para isto são utilizados equipamentos cromatográficos, como mostrado esquematicamente na Figura 3 como exemplo.

A Figura 3 mostra a separação das substâncias em coluna com a fase móvel em fluxo induzido por uma bomba peristáltica <sup>[6]</sup>. Um sistema de injeção de amostra está acoplado na entrada da coluna cromatográfica e na saída da coluna está acoplado um detector que diferencia o tipo de amostra <sup>[6]</sup>. O detector é conectado a um software específico para a aquisição de dados <sup>[6]</sup>.

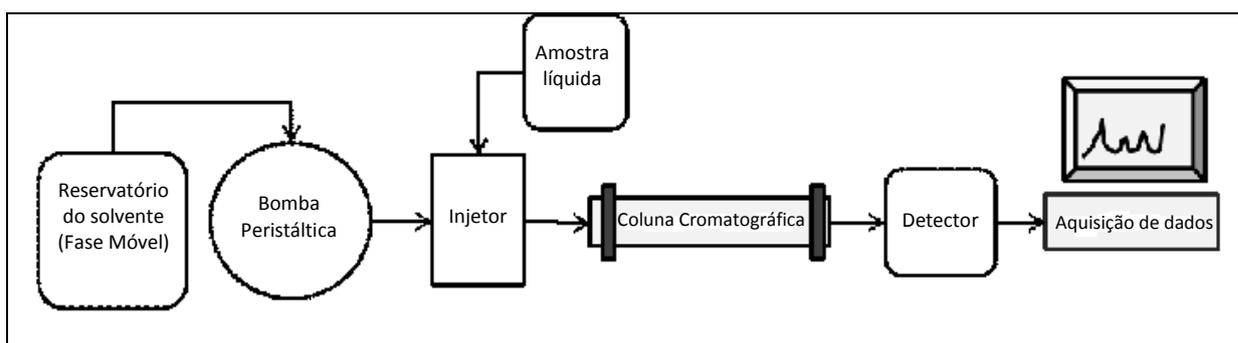


Figura 3. Representação esquemática de um cromatógrafo comercial baseado em cromatografia em coluna.

Atualmente, são fabricados comercialmente cromatógrafos mais modernos e sofisticados, que apresentam a coluna cromatográfica acoplada diretamente a outro tipo de sistema de análise, como por exemplo, um espectrofotômetro ou um espectrômetro de massas <sup>[2]</sup>.

## 1.1 Aspectos Históricos da Cromatografia

Os termos e expressões “cromatografia”, “cromatograma” e “método cromatográfico” são atribuídos ao botânico russo Mikhael Semenovitch Tswett, que sistematizou a técnica no início do século XX <sup>[2]</sup>. Dentre vários trabalhos desenvolvidos no período, dois deles, publicados em 1906, que descrevem suas

experiências na separação dos componentes de extratos de folhas - nas quais usou colunas de vidro recheadas com vários sólidos, finamente divididos, e arrastou os diferentes componentes com éter de petróleo-, são considerados o “marco fundador” da cromatografia, apesar dos registros anteriores a este descrevem experimentos em alguns aspectos similares aos relatados por Tswett <sup>[2,7]</sup>.

O nome deriva das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphe* (escrever), embora ele tenha explicitado que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados <sup>[2]</sup>.

Após os anos de 1930, houve bastantes avanços, em 1941, Martin e Synge publicaram um trabalho importantíssimo no qual descreveram a cromatografia por partição (cromatografia líquido-líquido), aplicaram à cromatografia o conceito já bem conhecido em outros processos de separação, de altura equivalente a um prato, e anteciparam o surgimento de duas técnicas cromatográficas pressurizadas, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência <sup>[2]</sup>. Por este trabalho, receberam em 1952 o Prêmio Nobel <sup>[2]</sup>.

A cromatografia gás-sólido, também, foi descrita em 1941, por Hesse e colaboradores, que separaram dois ácidos graxos, no vapor a 100 °C, arrastando-os sobre sílica com um gás, dióxido de carbono, enquanto Cremer e Prior foram os primeiros a descrever um cromatógrafo a gás completo, utilizando hidrogênio como gás de arraste, sílica como fase estacionária e um catarômetro como detector <sup>[2]</sup>.

Utilizando o conceito de entrecruzamento, na coluna cromatográfica para separar moléculas biológicas, em processo chamado por Hesse, de cromatografia por permeação em gel <sup>[8]</sup>. Usando este conceito, na área de macromoléculas, separações por tamanho de polímeros, requisitando o uso de solventes orgânicos, foram descritas por Moore em 1964, usando poliestirenos <sup>[2]</sup>.

## 1.2 Classificações da Cromatografia

São vários os critérios usados para a classificação das diferentes modalidades de cromatografia, sendo mais comuns aqueles relacionados à técnica empregada, ao mecanismo de separação envolvido e aos diferentes tipos de fases utilizadas <sup>[2]</sup>.

A forma física do sistema de cromatografia define a técnica geral: a fase estacionária pode ser colocada num tubo cilíndrico ou disposta sobre uma superfície planar [2]. Desta forma, são descritas fisicamente como cromatografia em coluna e cromatografia planar, respectivamente. A Figura 4 mostra as classificações da cromatografia em coluna, segundo as formas físicas mais encontradas [2].

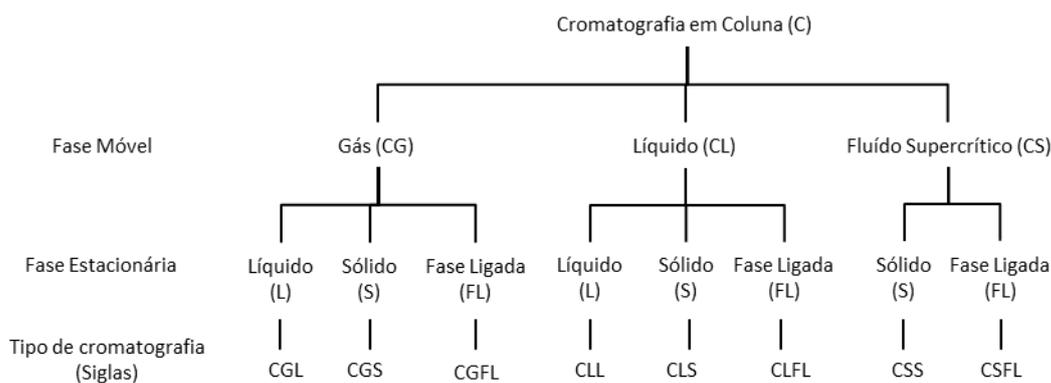


Figura 4. Classificação da cromatografia em coluna pelas formas físicas das fases móveis e estacionárias e as siglas utilizadas para identificar os tipos de cromatografia [2,9].

Na cromatografia em coluna, de acordo com o tamanho do diâmetro interno do tubo, temos colunas preparativas (6-50 mm), analíticas (2-6 mm), com microdiâmetro (1-2 mm) e capilares (<1 mm) [2]. As colunas preparativas e analíticas sempre apresentam a fase estacionária na forma de partículas, e a fase ativa na separação pode ser um sólido ou um líquido, que tanto pode recobrir a superfície do sólido como estar quimicamente ligado a ele [2]. As colunas com microdiâmetro e as colunas capilares também podem ser recheadas com a fase estacionária particulada, ou podem possuir a fase estacionária sob a forma de um filme ou de partículas somente aderidas às paredes do tubo [2].

Considerando o estado físico da fase móvel, distingue-se a cromatografia gasosa, na qual a fase móvel é um gás inerte, a cromatografia líquida, na qual a fase móvel é um líquido que pode interagir com os solutos, participando da separação, e a cromatografia supercrítica, na qual se usa como fase móvel um vapor pressurizado, em temperatura e pressão acima de seu ponto crítico, com as vantagens de ter viscosidade menor que um líquido, mas mantendo as propriedades de interação com os solutos [2].

A cromatografia líquida em coluna divide-se em dois grupos: a cromatografia líquida “clássica”, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, com o fluxo da

fase móvel devido à força da gravidade (por isso, essa técnica é também chamada “cromatografia líquida por força da gravidade”); e a cromatografia líquida que normalmente utiliza colunas metálicas e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão (por isso, é, às vezes, chamada “cromatografia líquida de alta pressão”), que pode empurrar a fase móvel com vazão mais rápida (resultando em outro nome: “cromatografia líquida de alta velocidade”) [2]. A expressão inglesa atribuída a essa modalidade, *high-performance liquid chromatography*, tem sido traduzida literalmente por “cromatografia líquida de alto desempenho” [2]. Porém esta a denominação “cromatografia líquida de alta eficiência”, que é devido à sua característica mais importante, que é a elevada eficiência atingida na separação [2].

O estado físico da fase estacionária pode ser líquido ou sólido. O líquido pode estar simplesmente espalhado sobre um suporte sólido ou imobilizado sobre este [2]. A imobilização pode envolver ligações químicas entre o líquido e o suporte, ou somente entre as cadeias do próprio líquido [2]. Devido às vantagens de volatilidade e solubilidade reduzidas atribuídas às fases estacionárias contendo o líquido ativo na separação quimicamente imobilizado sobre o suporte, é comum considerar-se esta categoria distinta, ou seja, a cromatografia com fase ligada [2]. Justifica-se essa distinção pelo fato de seu mecanismo de separação diferir com frequência dos mecanismos atribuídos às fases estacionárias líquidas ou sólidas [2].

Uma outra classificação baseia-se na polaridade relativa das fases [2]. Em cromatografia gasosa, a fase móvel é inerte e a separação ocorre devido às interações das moléculas da amostra com a fase estacionária, enquanto na cromatografia líquida, tanto planar como em coluna, a polaridade de ambas as fases é importante [2]. Chama-se “cromatografia líquida com fase normal” quando a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel, e “cromatografia com fase reversa” quando se tem o inverso, ou seja, a fase móvel é mais polar e a fase estacionária, mas apolar [2].

O método de introdução da amostra e seu subsequente desenvolvimento constituem um outro tipo de classificação (Figura 5) [2]. A introdução da amostra em uma única aplicação e seu desenvolvimento com uma fase móvel pura, que arrasta a amostra ao longo da coluna, é o método da eluição, o tipo mais encontrado em

cromatografia planar, cromatografia gasosa, cromatografia com fluido supercrítico e nas técnicas cromatográficas com fase móvel líquida usadas em escala analítica [2].

Na cromatografia preparativa, especialmente em nível industrial, usa-se frequentemente o desenvolvimento por deslocamento, no qual os componentes da amostra, uma vez aplicados à coluna, são arrastados ao longo dela, utilizando-se, na fase móvel, um deslocador que é mais atraído pela fase estacionária que qualquer um dos componentes [2]. A substância mais fortemente atraída deslocará, então, os constituintes da mistura e cada um deles deslocará o que tiver menos afinidade com a fase estacionária, de tal maneira que, à saída da coluna, teremos inicialmente o constituinte com menor afinidade química com a fase estacionária e, depois, os outros, na ordem do poder crescente de afinidade química [2,10]. O cromatograma resultante não mostra picos separados, mas bandas dos componentes separados (Figura 5) [2].

Também se encontra em uso industrial a análise frontal, onde a amostra é continuamente aplicada à coluna [2]. Os componentes emergem da coluna na ordem das relativas afinidades, sendo o componente menos retido o único que sai na forma pura (Figura 5) [2,10].

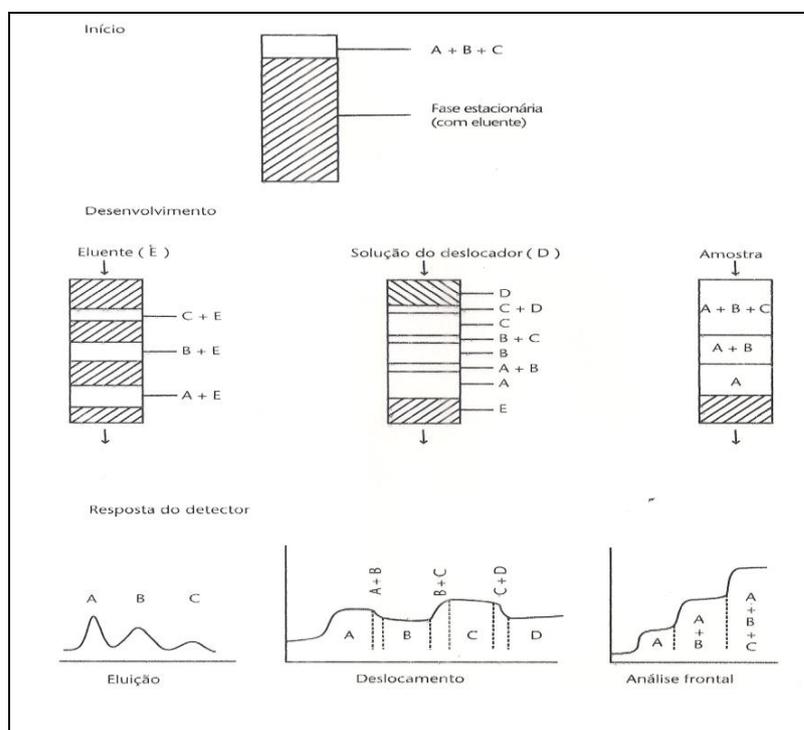


Figura 5. Métodos de desenvolvimento em cromatografia [2].

Entretanto, considera-se que a classificação mais importante em cromatografia baseia-se no mecanismo de separação, que pode dar-se por processos físicos, químicos ou mecânicos [2].

Os processos físicos são de sorção – adsorção ou absorção (partição)-baseados principalmente em atrações dipolares (forças de Van der Waals), ou coulômbicas, incluindo a formação de ligações de hidrogênio [2].

Quando se trata de um sólido, como sílica ou alumínio, como fase estacionária, a adsorção do soluto ocorre na interface entre sólido e a fase móvel, devido à presença de grupos ativos em sua superfície (Figura 6a) [2]. A dessorção do soluto implica seu retorno à fase móvel, por volatilidade (no caso da cromatografia gasosa) ou solubilidade na fase móvel (no caso das cromatografias líquida e com fluido supercrítico) [2]. Esse é o mecanismo mais comumente encontrado em cromatografia em camada delgada (CCD), em cromatografia gás-sólido (CGS), cromatografia líquido-sólido (CLS) e cromatografia supercrítica com fase estacionária sólida (CSS) [2].

Quando a fase estacionária é um líquido, espalhado na superfície de um suporte sólido e inerte, ou nas paredes do tubo cromatográfico, o processo é interfacial; ocorre por absorção ou partição e baseia-se nas diferenças de solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária (Figura 6b) [2]. A volta dos componentes à fase móvel depende de sua volatilidade (fase móvel gasosa) ou de sua solubilidade nessa fase (fase móvel líquida) [2]. Esse mecanismo encontra-se na cromatografia em papel (CP), na cromatografia gás-líquido (CGL) e na cromatografia líquido-líquido (CLL) [2].

Para o processo químico de troca iônica, a fase estacionária é constituída por um suporte, ou matriz, onde são adicionados grupos funcionais ionizáveis [2]. Assim são obtidos os trocadores aniônicos, que têm sítios ativos carregados positivamente, retendo ânions, e os trocadores catiônicos, com sítios carregados negativamente que retém cátions [2]. A fase móvel é geralmente, uma solução iônica com propriedades tamponantes, escolhida de forma a ser compatível com o tipo de trocador utilizado [2]. Dessa maneira, se a fase estacionária, com carga negativa fixa, retém cátions, a fase móvel deve conter cátions capazes de substituí-los preferencialmente por eluição ou por deslocamento; na cromatografia por troca iônica, a fase móvel deve conter ânions para competir, com os ânions presentes na

amostra, pelos sítios carregados positivamente da fase estacionária <sup>[2]</sup>. A Figura 6c indica uma representação do mecanismo de cromatografia por troca iônica (CTI) <sup>[2]</sup>.

Outro processo químico encontrado na cromatografia utiliza grupos com especificidade biológica, quimicamente ligados ao suporte <sup>[2]</sup>. Esses grupos, que podem ser, por exemplo, antígenos, substratos ou lectinas, retiram da fase móvel somente os componentes complementares, os anticorpos, enzimas ou açúcares, respectivamente, deixando passar todas as outras espécies presentes na amostra, como indica a Figura 6d <sup>[2]</sup>. Na cromatografia por bioafinidade (CB), a eluição dos componentes complementares retidos pode ocorrer com a mudança das propriedades da fase móvel, por exemplo a sua acidez, que modifica as propriedades do grupo ligado ao suporte ou do componente complementar retido; os componentes complementares retidos podem também ser removidos por métodos de deslocamento, usando outro composto mais fortemente atraído à fase estacionária <sup>[2]</sup>.

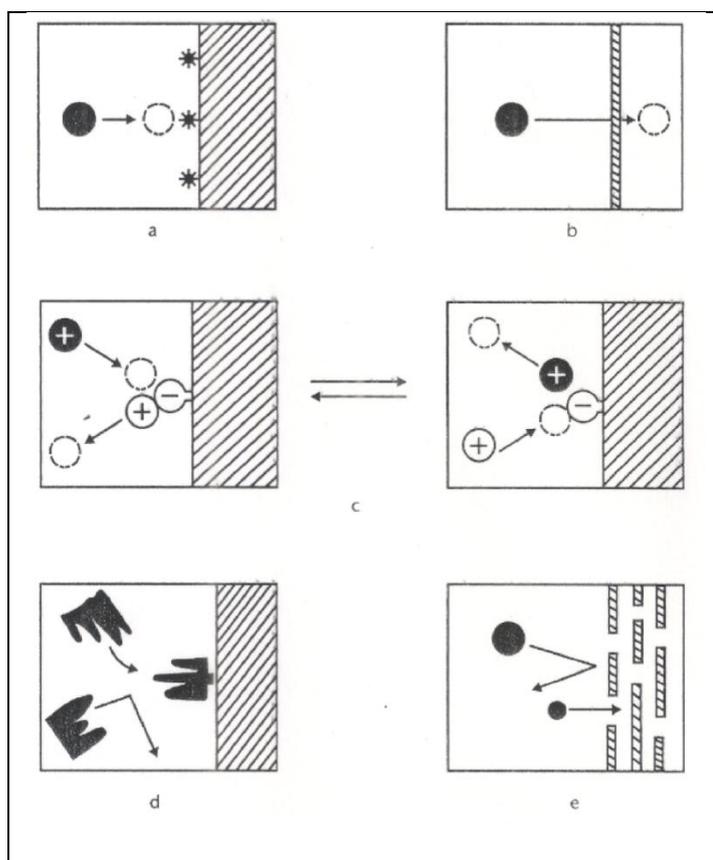


Figura 6. Esquema dos mecanismos cromatográficos de: a) adsorção; b) partição; c) troca iônica; d) bioafinidade; e) exclusão <sup>[2]</sup>.

A cromatografia por exclusão (CE) baseia-se em um processo puramente mecânico, uma vez que não envolve (pelo menos na teoria) forças químicas de interação <sup>[2,7]</sup>. A fase estacionária é uma matriz inerte, com partículas de forma, tamanho e porosidade uniformes <sup>[2]</sup>. As moléculas da amostra são separadas porque as pequenas são capazes de penetrar facilmente em todos os poros da fase estacionária, equilibrando-se com a fase móvel intrasticial e intersticial, enquanto as grandes são excluídas de todos os poros, passando entre os grânulos e acompanhando a fase móvel intersticial, isto é, a fase móvel que fica fora dos poros da fase estacionária, Figura 6e <sup>[2]</sup>. As moléculas com tamanho efetivo intermediário migram com velocidades variáveis para esses dois extremos; possuem penetração seletiva nos poros, entrando em alguns, mas não em todos, e saindo da coluna em ordem relacionada a seu tamanho efetivo <sup>[2]</sup>.

### **1.3 Forças Intermoleculares**

Compreender as forças intermoleculares, que também são chamadas de forças secundárias, é de extrema importância para a cromatografia, pois a separação ocorre devido à interação das moléculas da amostra com a fase estacionária; sendo que na cromatografia líquida, além da interação amostra/fase estacionária, a fase móvel também participa do processo de separação <sup>[2]</sup>.

Todos os mecanismos de separação por processos físicos – sorção ou coulômbiana - e químico de troca iônica dependem fundamentalmente das forças intermoleculares e interiônicas, respectivamente <sup>[2]</sup>. A tabela 1 resume os tipos diferentes de interação intermolecular <sup>[11]</sup>.

Tabela 1 – Forças interiônicas e intermoleculares <sup>[11]</sup>.

<b>Tipo de Interação</b>	<b>Energia de Ligação (kJ.mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Espécies que Interagem</b>
Íon-íon	250	Somente íons
Íon-dipolo	15	Íons e moléculas polares
Dipolo-dipolo	2 0,3	Moléculas polares estacionárias Moléculas polares em rotação
Dipolo-dipolo induzido	2	Pelo menos uma molécula deve ser polar
London (dipolo induzido-dipolo induzido)	2	Todos os tipos de moléculas
Ligação hidrogênio	20	Moléculas que contêm uma ligação N-H, O-H ou F-H; a ligação é um átomo de H compartilhado pelas moléculas.

Quanto maior a energia de ligação, mais forte é a interação. Nas forças dipolo-dipolo a interação ocorre entre elementos com cargas pontuais; em rotação, a distância influenciará na interação e terá apenas uma interação residual <sup>[11]</sup>.

As forças de London explicam as interações entre moléculas não polares <sup>[11]</sup>. À primeira vista, parece não existir um mecanismo de atração entre moléculas não polares, porém, em um determinado instante, as nuvens de elétrons de átomos e moléculas não são uniformes <sup>[11]</sup>. Como resultado, uma região da molécula adquire uma carga parcial negativa instantânea e, a outra região, uma carga parcial positiva instantânea <sup>[11]</sup>. No momento seguinte – na verdade, cerca de  $10^{-16}$  s depois -, as cargas podem se inverter ou estar em outras posições <sup>[11]</sup>. Até mesmo uma molécula não polar pode ter um momento de dipolo instantâneo variável <sup>[11]</sup>.

As interações dipolo-dipolo induzido são fortemente relacionadas com as interações de London, é um mecanismo pelo qual uma molécula polar interage com uma molécula não polar (por exemplo, quando o oxigênio se dissolve na água) <sup>[11]</sup>. Como as interações de London, as interações dipolo-dipolo induzido têm sua origem na capacidade que tem uma molécula de induzir um momento de dipolo em

outra <sup>[11]</sup>. Neste caso, porém, a molécula que induz o momento de dipolo tem um momento de dipolo permanente <sup>[11]</sup>.

As interações dipolo-dipolo em rotação em fase gás, interações de London e as interações dipolo-dipolo induzido são conhecidas coletivamente como interações de van der Waals <sup>[11]</sup>.

As interações de London são “universais”, no sentido de que elas se aplicam a todas as moléculas, independentemente de sua identidade química <sup>[11]</sup>. Do mesmo modo, as interações dipolo-dipolo dependem somente da polaridade das moléculas, não de sua identidade química <sup>[11]</sup>. Existe, no entanto, outra interação intermolecular muito forte que é específica para moléculas que têm certos tipos de átomos <sup>[11]</sup>.

Esta interação chama-se ligação hidrogênio, que é uma atração intermolecular na qual um átomo de hidrogênio ligado a um átomo pequeno e fortemente eletronegativo, mais especificamente N, O ou F, é atraído pelo par isolado de elétrons de outro átomo de N, O ou F <sup>[11]</sup>.

#### **1.4 Termos Técnicos**

A cromatografia tem aplicações qualitativas e quantitativas, obtidas por meio da análise do cromatograma depois de seu desenvolvimento, quer diretamente na superfície planar quer pelo sinal registrado após o eluado de uma coluna passar pelo detector <sup>[2]</sup>.

As Figuras 7 e 8 mostram cromatogramas típicos de cromatografia planar e cromatografia em coluna, respectivamente <sup>[2]</sup>. Nelas também são indicados algumas medidas de distância, importante para cada tipo de cromatograma utilizado <sup>[2]</sup>. Os sinais obtidos no emprego das técnicas cromatográficas pressurizadas (CG, CFSC e CLAE) podem ser registrados por um registrador, um integrador ou um computador equipado com um programa específico para tal finalidade <sup>[2]</sup>. Nos dois últimos casos, a retenção dos picos é dada, usualmente, em unidades de tempo em vez de distância, e alguns dos cálculos podem ser realizados diretamente pelo programa de aquisição de dados <sup>[2]</sup>. Contudo, os cálculos feitos manualmente sempre utilizam as distâncias <sup>[2]</sup>.

Na cromatografia planar, a fase móvel, proveniente de um reservatório, passa através dos pontos de partida da amostra e arrasta os componentes da amostra

durante o processo de desenvolvimento, que é normalmente interrompido antes de a fase móvel atingir o outro lado da superfície planar [2]. Define-se por  $d_r$  a distância percorrida pelos componentes e por  $d_m$  a distância percorrida pela fase móvel (Figura 7) [2].

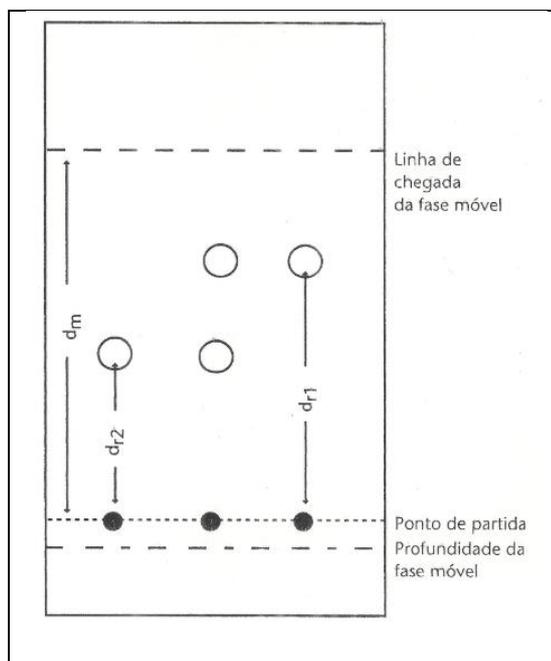


Figura 7. Cromatograma típico desenvolvido por Cromatografia planar [2].

Os mesmos termos se aplicam a um processo cromatográfico realizado em coluna, desde que os componentes permaneçam no tubo cromatográfico sem ser eluídos [2]. Contudo, normalmente a cromatografia em coluna precede com fluxo contínuo da fase móvel, até que todos os componentes tenham saído da coluna e sua presença seja detectada por um detector e indicada graficamente [2]. Alternativamente, o eluato pode ser coletado em frações de volumes idênticos, suas concentrações medidas e o cromatograma construído, considerando-se o número do tubo de cada fração equivalente a uma unidade distância [2].

Nesses cromatogramas (Figura 8), a linha de base representa a passagem da fase móvel apenas através do detector [2]. Quando os componentes da amostra eluem, registram-se os picos cujos perfis são proporcionais às concentrações respectivas [2]. Denomina-se  $d_R$  a distância percorrida pelo papel desde o instante da injeção da amostra no sistema cromatográfico até o máximo do pico traçado, e  $d_M$  a distância desde a injeção até a eluição de um componente que não interage com a

fase estacionária (um composto chamado “não-retido”) [2]. O  $d_M$  representa distância percorrida pelo papel enquanto uma molécula da fase móvel se movimenta do ponto de injeção até o detector [2].

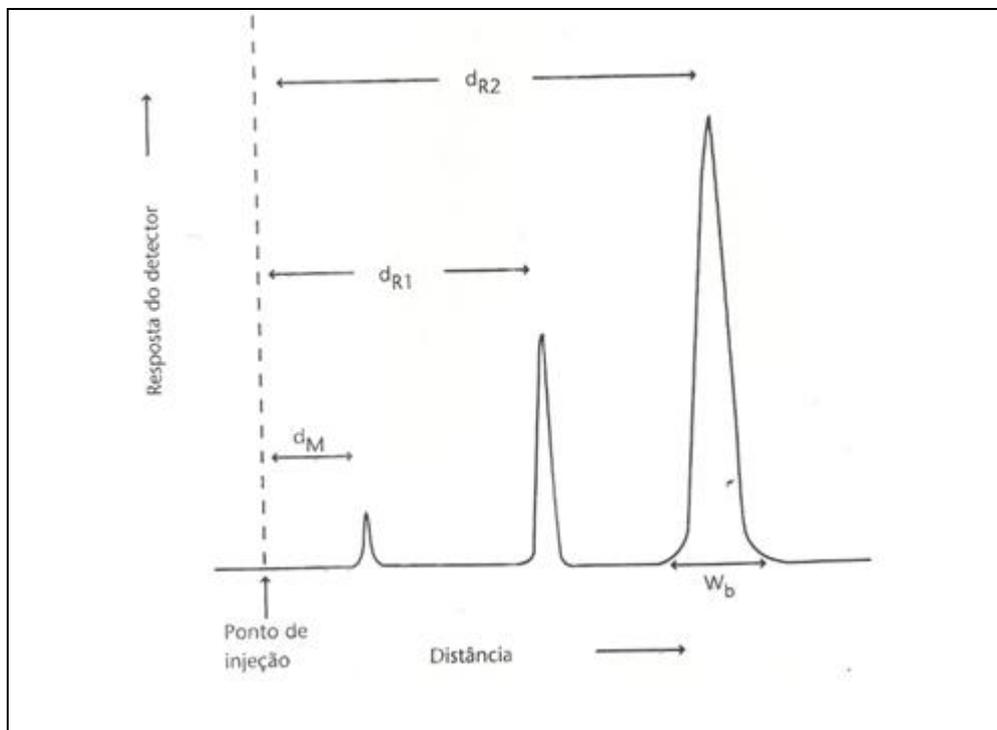


Figura 8. Cromatograma típico obtido por cromatografia em coluna [2].

## 1.5 Identificação de Substâncias

A partir destas informações, pode-se identificar substâncias, utilizando as características da substância analisada, tendo como parâmetro de comparação um padrão [2]. Para a cromatografia em coluna, é mais comum descrever o comportamento cromatográfico utilizando-se tempo ou volume, em vez de distância, e esta última é medida no papel, enquanto o tempo ou o volume podem ser diretamente relacionados com o processo que ocorre na coluna cromatográfica [2]. Por isso, o tempo de retenção, o tempo gasto desde o ato da injeção até a saída do ponto máximo do pico do sistema,  $t_R$ , é a variável impressa pelos dispositivos eletrônicos, frequentemente acoplados a sistemas automatizados de cromatografia [2]. Faltando esse dispositivo, o  $t_R$  é calculado a partir das medidas tomadas do cromatograma:

$$t_R = d_R / f,$$

onde  $f$  é a velocidade do papel no registrador gráfico, em unidades de  $\text{cm min}^{-1}$  ou  $\text{mm s}^{-1}$ , e o  $t_R$ , em unidades de minutos ou segundos, respectivamente [2].

O tempo de retenção engloba todo o tempo que o componente em questão fica no sistema cromatográfico, quer na fase móvel quer na fase estacionária [2]. Quando as moléculas do soluto ficam na fase móvel, elas devem movimentar-se com a mesma velocidade das moléculas da própria fase móvel [2]. Então, a parte do tempo em que as moléculas do soluto estão na fase móvel é igual ao tempo gasto para as moléculas de fase móvel percorrerem a coluna  $t_M$ :

$$t_M = d_M / f.$$

Sendo assim, a parte do tempo em que as moléculas do soluto ficam retidas na fase estacionária é calculada pela diferença:

$$t'_R = t_R - t_M.$$

O  $t'_R$ , tempo que o soluto fica retido na fase estacionária, é chamado “tempo de retenção ajustado” [2].

Similarmente, o volume da fase móvel necessário para eluir um componente,  $V_R$ , é calculado a partir do cromatograma:

$$V_R = t_R F = d_R F / f,$$

onde  $F$  é a vazão da fase móvel em unidades  $\text{mL min}^{-1}$  ou  $\text{mL s}^{-1}$  [2].

Por volume de retenção entende-se o volume de fase móvel, necessário para eluir a substância, do momento da introdução da amostra até o máximo do pico [2]. O volume é uma característica da substância analisada para uma determinada condição (coluna, temperatura), ou seja, é usado para identificação de substâncias [10].

De maneira similar, é calculado o volume requisitado para um componente não-retido sair da coluna:

$$V_M = t_M F = d_M F / f.$$

O  $V_M$ , também chamado “volume morto”, representa o volume da fase móvel nos poros da fase estacionária e nos interstícios entre as partículas para uma coluna recheada, ou nos espaços vazios em colunas contendo apenas a fase estacionária que recobre as paredes <sup>[2]</sup>.

Essas medidas de distância, tempo e volume são usadas diretamente para fins qualitativos, isto é, para a identificação das substâncias contidas na amostra, por comparação dos tempos ou volumes de retenção ajustados <sup>[2]</sup>. Essas medidas são também usadas para calcular os vários valores relacionados à retenção, à separação e à eficiência das separações cromatográficas <sup>[2]</sup>.

O fator de retardamento para cromatografia planar é definido pela razão as distâncias percorridas pelo composto e pela fase móvel:

$$R_F = d_r / d_m.$$

Comparações do valor de  $R_F$  da amostra com o de um padrão são método qualitativo mais usado na cromatografia planar <sup>[2]</sup>.

Na cromatografia em coluna, o fator de retenção,  $k$ , de um componente é determinado pela razão das quantidades das suas moléculas que ficam retidas na fase estacionária,  $n_S$ , ou percorrendo a coluna na fase móvel,  $n_M$  <sup>[2]</sup>. O fator de retenção também é relacionado à razão dos tempos que as moléculas ficam na fase estacionária e na fase móvel <sup>[2]</sup>. Esse termo é calculado por:

$$k = n_S / n_M = (t_R - t_M) / t_M = t'_R / t_M.$$

O tempo de retenção ajustado, e o fator de retenção são característicos da retenção de um dado componente e utilizados para fins qualitativos <sup>[2]</sup>.

Um outro termo, mais confiável para fins de identificação e evitar identificações equivocadas, principalmente em matriz complexas, como por exemplo café solúvel, é o índice de retenção,  $I$ , cujo cálculo requisita um cromatograma com composto padrão (alcanos normais), além do composto a ser identificado:

$$I = 100Z + 100 [ (t'_{R(X)} - t'_{R(Z)}) / (t'_{R(Z+1)} - t'_{R(Z)}) ]$$

onde  $t'_{R(Z)}$  e  $t'_{R(Z+1)}$  são os tempos de retenção ajustados dos alcanos que eluem imediatamente antes e depois do composto X, e Z é o número de átomos de carbonos no alcano apresentando  $t'_{R(Z)}$  [2,12].

O fator de retenção é relacionado à constante de distribuição, K, pelos volumes das fases:

$$K = C_S / C_M = k V_M / V_S = k \beta,$$

onde  $C_S$  e  $C_M$  representam as concentrações do soluto nas fases estacionária e móvel, respectivamente, e  $\beta$  é a razão do volume da fase móvel,  $V_M$ , pelo volume da fase estacionária,  $V_S$  [2]. Os termos de retenção são característicos de um componente [2].

## 1.6 Termos de Separações dos Compostos

Quando se envolve mais de um componente na amostra, também se calculam termos de separação [2].

O fator de separação,  $\alpha$ , é calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que, por sua vez, são relacionados aos tempos de retenção ajustados:

$$\alpha = k_2 / k_1 = t'_{R2} / t'_{R1} .$$

O fator de separação sempre trata de dois picos (ou manchas) adjacentes [2]. Um outro termo, a retenção relativa,  $r_{i,st}$ , envolve a razão de tempos de retenção ajustados do componente i e de um padrão (st), respectivamente [2]. A retenção relativa é também usada para identificação de substâncias e pode ser calculada para quaisquer picos no cromatograma, livre da restrição de serem adjacentes [2].

Uma outra medida da separação de dois componentes consecutivos é a resolução  $R_S$  [2]. A resolução é calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da média das larguras de suas respectivas bases,  $w_b$ , ou das larguras na meia altura,  $w_b$  (Figura9):

$$R_S = 2 (d_{r2} - d_{r1}) / (w_{b2} + w_{b1}) = 1,177 (d_{r2} - d_{r1}) / (w_{h2} + w_{h1}).$$

Para a medida da largura de base, toma-se sempre a distância entre as tangentes traçadas nas laterais do pico <sup>[2]</sup>. Observa-se que a resolução é um termo sem unidades, o que implica a necessidade de utilizar sempre as mesmas unidades para distâncias (tempos) de retenção e para as larguras de base (ou meia altura) <sup>[2]</sup>.

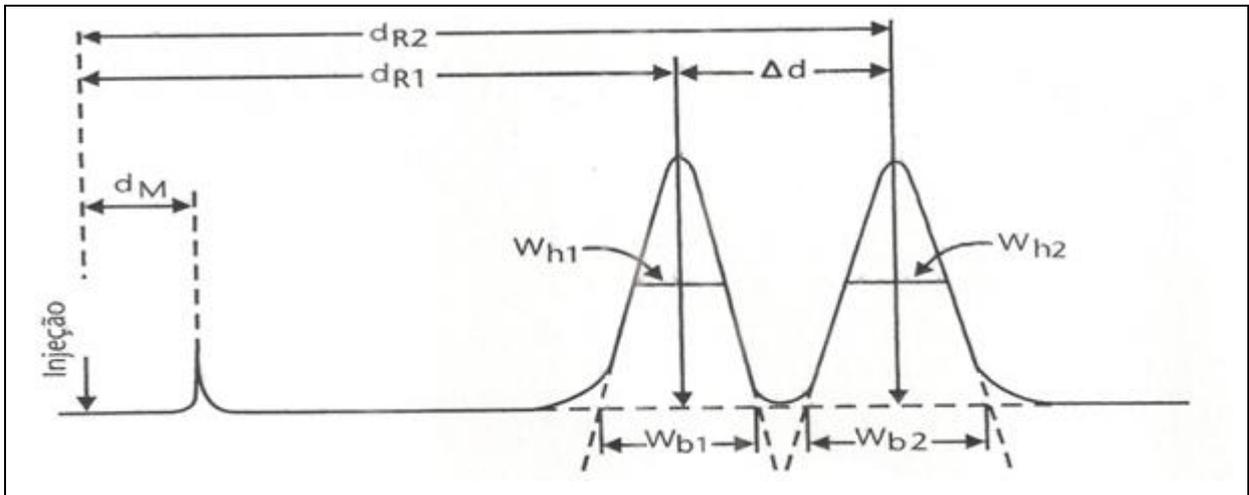


Figura 9. Medidas relacionadas à determinação da resolução <sup>[2]</sup>.

Quando  $R_s = 1$ , os dois picos são razoavelmente separados, com somente 2% de superposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais <sup>[2]</sup>. Maiores valores de resolução indicam melhor separação:  $R_s = 1,25$  é suficiente para fins qualitativos e  $R_s = 1,5$  indica separação completa <sup>[2]</sup>. A Figura 10 mostra as separações de dois compostos, presentes em diferentes quantidades, em valores de resolução de 0,8, 1,0 e 1,25 <sup>[2]</sup>.

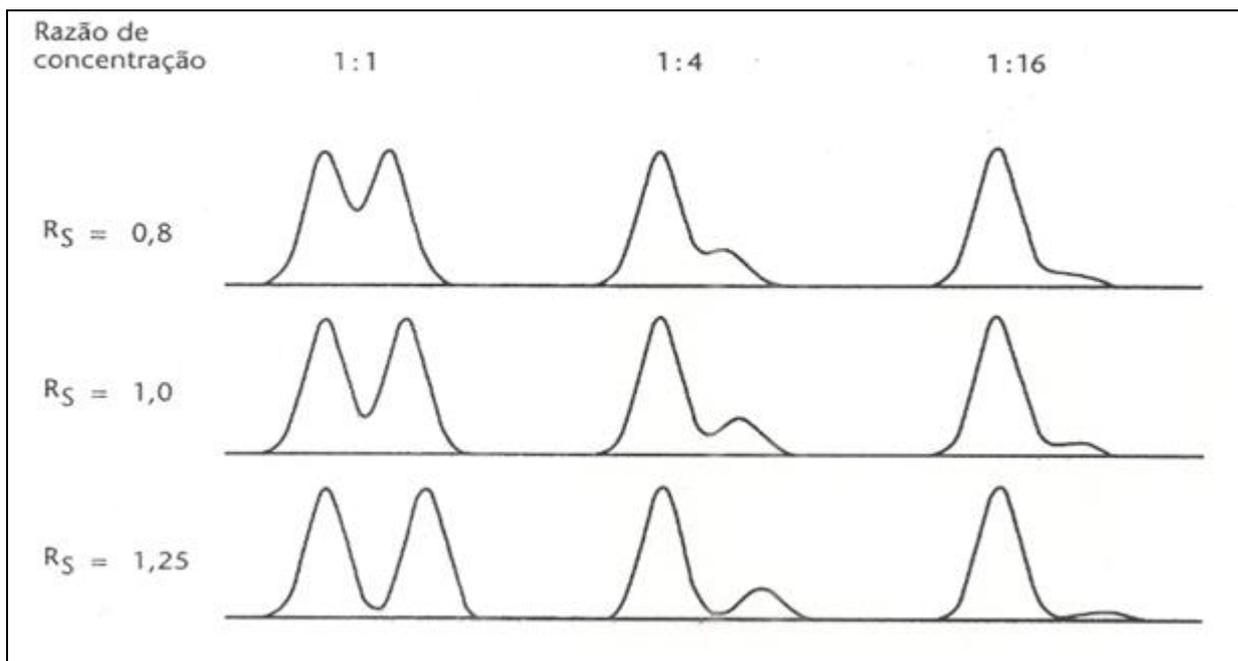


Figura 10. Separação em função da resolução de dois componentes presentes em diferentes concentrações <sup>[2]</sup>.

Quando as razões de concentrações são 1:1 e 4:1, ambos os picos são distinguíveis, mesmo com uma resolução de 0,8; mas, quando a razão de alturas é 16:1, o segundo pico não pode mais ser identificado <sup>[2]</sup>.

A eficiência representada por um cromatograma é medida em termos de números de pratos gerados <sup>[2]</sup>. Um prato pode ser considerado equivalente a uma etapa de equilíbrio entre as duas fases, análogo aos pratos da teoria de destilação <sup>[2]</sup>. Quando maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência (picos mais estreitos) e, portanto, melhor a separação <sup>[2]</sup>. O número de pratos,  $N$ , é calculado usando-se as medidas do cromatograma:

$$N = 16 d_R^2 / w_b^2 = 5,545 (d_R / w_h)^2.$$

O emprego da largura do pico em meia altura ( $w_h$ ) é usada para picos mal resolvidos e outras situações que dificultam a medida do pico em sua base <sup>[2]</sup>.

Sendo a eficiência mais bem relacionada ao tempo que o soluto que o soluto permanece retido na fase estacionária e não ao tempo total requisitado pela corrida, o número de pratos efetivos,  $N_{\text{eff}}$ , pode ser calculado usando-se o tempo de retenção ajustado:

$$N_{\text{eff}} = 16 t'_R{}^2 / w_b{}^2 = 5,545 (t'_R / w_h)^2.$$

Este representa a eficiência da coluna, e maneira isolada do restante do sistema, evitando assim influências do volume morto no injetor e detector [2]. Lembre-se de que a medida da largura da base ou a largura do pico na meia altura, nesse caso, deve também ser tomada em unidades de tempo, e o número de pratos é um número puro, sem unidades [2].

Uma vez que o termo “prato teórico” foi originalmente empregado para expressar a eficiência de um processo de contato líquido-vapor em uma coluna de destilação, quanto maior o número de pratos (N) mais eficiente é considerada a coluna [7].

O número de pratos obtidos pode ser afetado por vários fatores, incluindo as condições de análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto e, principalmente, o comprimento da coluna, fato que torna difícil uma comparação do número de pratos entre diferentes colunas [2]. Por essa razão, a avaliação comparativa entre colunas é feita usando-se a medida da altura equivalente a um prato, que corresponde à razão entre o comprimento da coluna, L, e o número de pratos, eliminando a influência dos diferentes comprimentos da coluna [2]. O valor da altura equivalente a um prato, H, é obtido:

$$H = L / N,$$

enquanto a altura a um prato efetivo,  $H_{\text{eff}}$ , é calculada:

$$H_{\text{eff}} = L / N_{\text{eff}}.$$

Quando as colunas contêm partículas de diferentes tamanhos ou quando estão em uso colunas capilares com diferentes diâmetros internos, a comparação do desempenho pode ser realizada pela altura reduzida do prato, h:

$$h = H / d_p \text{ ou } H / d_c,$$

onde  $d_p$  é o tamanho médio das partículas do recheio e  $d_c$  é o diâmetro interno da coluna capilar [2].

Apesar de poder ser instrutivo visualizar uma coluna cromatográfica como uma série de estágios ou pratos, como se fossem funis de separação, a teoria dos pratos não é muito útil em cromatografia, uma vez que as colunas cromatográficas não possuem pratos [7]. Apesar desta limitação, sua contribuição foi muito importante para o desenvolvimento da teoria da cromatografia na década de 1940, e o termo ainda é bastante utilizado até o presente, mesmo com as críticas de muitos pesquisadores da área [7].

Uma outra propriedade importante de uma coluna cromatográfica é a simetria dos picos [2]. E distorções frontais ou posteriores (caudas) induzem à superposição dos picos [2].

Dois termos são utilizados para medir a simetria dos picos, o fator de assimetria,  $A_s$ , calculado a 10% da altura do pico; e o fator de alargamento,  $TF$ , calculado a 5% de sua altura (ver Figura 11):

$$A_s = b/a$$

$$TF = (a + b) / 2a.$$

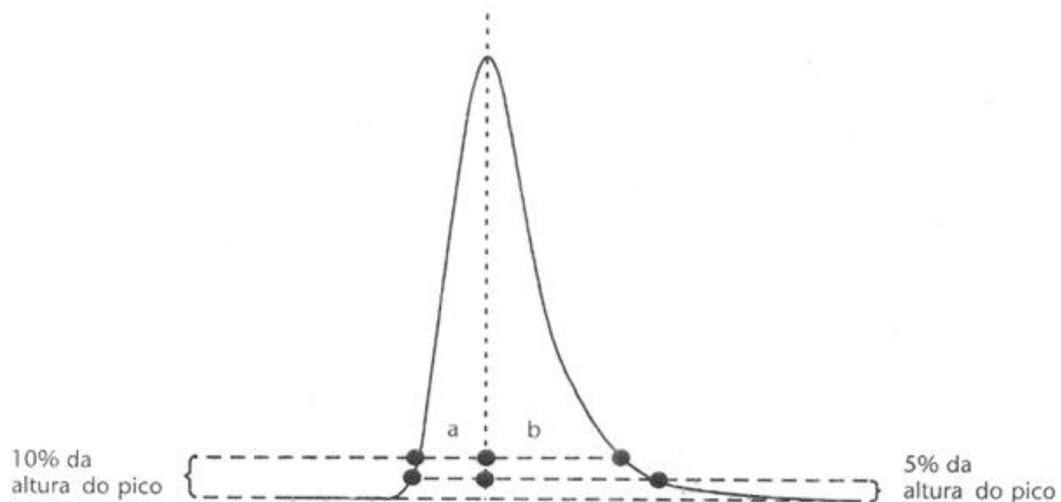


Figura 11. Medidas relacionadas ao cálculo de fator de assimetria e fator de alargamento [2].

Dado que a finalidade mais importante de qualquer separação cromatográfica é resolver os componentes da amostra, devem-se considerar os parâmetros experimentais que influenciam a resolução [2]. A Figura 12 mostra três cromatogramas, destacando as contribuições de eficiência e seletividade

da coluna na resolução [2]. Assim, má eficiência e má seletividade resultam em má resolução, Figura 12a, pois bandas largas e pouco separadas tendem a sobrepor-se [2]. Quando a seletividade é boa, pode-se compensar a má eficiência, Figura 12b, obtendo boa resolução [2]. O ideal é boa resolução conquistada com boa eficiência e boa seletividade, Figura 12c [2].

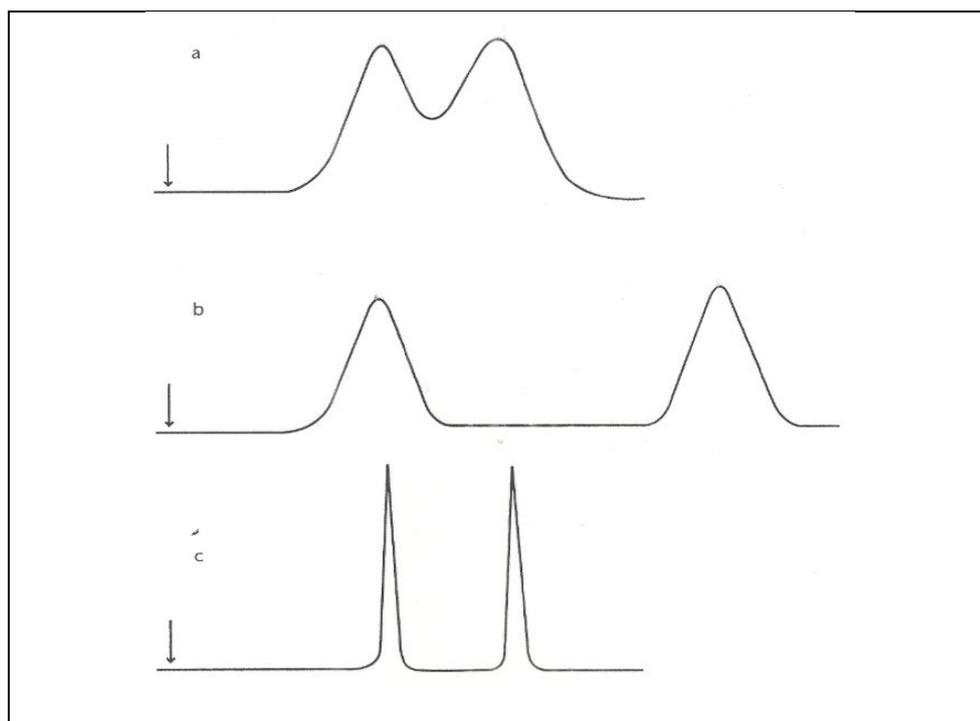


Figura 12. Cromatogramas ilustrando a relação entre resolução, seletividade e eficiência [13].

A otimização da resolução está relacionada com os parâmetros experimentais na equação geral da resolução:

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left[ \frac{k_2}{k_2+1} \right] \left[ \frac{\alpha-1}{\alpha} \right]$$

que representa termos relacionados à eficiência, representada pelo número de pratos,  $N$ , à distribuição dentro da coluna, representada pelo fator de retenção,  $k$ , e a seletividade, representada pelo fator de separação,  $\alpha$  [13]. Mudanças nesses três termos geram mudanças na resolução e, conseqüentemente, na separação [2].

A equação geral de resolução pode ser rearranjada, permitindo o calcula do número de pratos requeridos para uma determinada separação [2].

$$N_{\text{req}} = 16 (R_s)^2 \left[ \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right]^2 \left[ \frac{k_2 + 1}{k_2} \right]^2$$

Esse número é útil na determinação do comprimento da coluna necessário para conseguir uma boa separação [2].

## 1.7 Cromatografia Gasosa

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando-se a técnica denominada cromatografia gasosa [2]. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gasosa) quimicamente inerte em relação à fase estacionária e em relação aos constituintes da mistura analisada [10].

A amostra, por meio de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária [2]. O uso de temperaturas convenientes no local de injeção da amostra e na coluna possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes [2]. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação dessas substâncias [2].

A cromatografia gasosa é uma técnica com poder de resolução excelente, tornando possível, muitas vezes, a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra [2]. O uso bastante acentuado da cromatografia gasosa se deve também aos baixos limites de detecção que podem ser conseguidos [2]. Dependendo do tipo da substância a ser analisada e do detector empregado, consegue-se detectar cerca de  $10^{-12}$  g ou até menos [2]. Essa característica faz que haja necessidade de apenas pequenas quantidades de amostra, o que, em certos casos, é um fator crítico e limita a utilização de outras técnicas [2]. É importante salientar ainda que a cromatografia gasosa é excelente como técnica quantitativa, sendo possível a obtenção de resultados quantitativos em concentrações que variam de picogramas a miligramas [2].

Se, de um lado, a cromatografia gasosa apresenta todas essas vantagens, de outro, apresenta alguns inconvenientes [2]. Essa técnica pode ser empregada na análise de substâncias voláteis e estáveis termicamente; caso contrário, há

necessidade de se formar um derivado com essas características, o que nem sempre é viável <sup>[2]</sup>. A análise cromatográfica, isoladamente é rápida, podendo ser efetuada em minutos, ou até mesmo segundos <sup>[2]</sup>. No entanto, na maioria das vezes há necessidade de etapas de preparação da amostra, antes que ela possa ser analisada, para que não haja interferências durante a análise e contaminação da coluna cromatográfica <sup>[2]</sup>. Às vezes, essa etapa de preparação é longa e complexa, aumentando em muito o tempo e o custo da análise <sup>[2]</sup>. Além disso, a cromatografia gasosa não é uma técnica qualitativa eficiente, necessitando, muitas vezes, de técnicas auxiliares para a identificação segura das substâncias presentes na amostra <sup>[2]</sup>. Outro fator negativo refere-se à dificuldade de utilização da cromatografia gasosa como técnica preparativa <sup>[2]</sup>. Nesse caso, é necessário utilizar colunas recheadas com maior diâmetro interno, para possibilitar separações na faixa de microgramas a miligramas <sup>[2]</sup>.

### **1.7.1 Técnicas Utilizadas na Cromatografia Gasosa**

A técnica de desenvolvimento usada em cromatografia gasosa é a eluição <sup>[2]</sup>. Uma corrente de gás passa continuamente pela coluna e, quando a amostra vaporizada é introduzida rapidamente nessa corrente de gás, ela é arrastada através da coluna <sup>[2]</sup>. As substâncias presentes na amostra, depois de separadas, chegam ao detector, que gera um sinal para um sistema de registro e tratamento dos dados <sup>[2]</sup>

Em um cromatograma ideal, os picos apresentam-se separados e simétricos; na prática, pode haver sobreposição parcial devido a uma separação deficiente na coluna, ou a presença de picos com assimetria frontal ou caudas <sup>[2]</sup>. A assimetria frontal está, frequentemente, relacionada com um excesso de amostra injetada ou com o uso de colunas em uma temperatura abaixo do ideal para uma determinada análise <sup>[2]</sup>. As caudas aparecem devido às falhas na técnica de injeção da amostra, ou devido à adsorção excessiva na fase estacionária ou suporte <sup>[2]</sup>.

A cromatografia gasosa pode ser realizada empregando-se colunas recheadas ou capilares <sup>[2]</sup>. As colunas recheadas são constituídas por tubos de vidro, aço inox, ou, mais raramente, cobre, com diâmetros internos de 1 a 4 mm e recheadas com uma fase sólida ou líquida, nesse último caso, dispersa em um

suporte sólido <sup>[2]</sup>. As colunas capilares são preparadas com capilares de sílica fundida de diâmetro interno de 0,10 a 0,75 mm, com fase estacionária espalhada, ou imobilizada na parede interna do capilar <sup>[2]</sup>.

Na cromatografia gás-sólido, a fase estacionária é um sólido com uma grande área superficial e a separação baseia-se em mecanismos de adsorção das substâncias nesse sólido <sup>[2]</sup>. A cromatografia gás-sólido é usada principalmente na análise de gases permanentes e compostos apolares de massa molar baixa <sup>[2]</sup>.

Na cromatografia gás-líquido, a fase estacionária é um líquido pouco volátil, espalhado ou imobilizado a um suporte sólido ou às paredes das colunas capilares <sup>[2]</sup>. A separação baseia-se em mecanismos de partição das substâncias entre a fase líquida e a fase gasosa <sup>[2]</sup>.

### 1.7.2 Equipamento para Cromatografia Gasosa

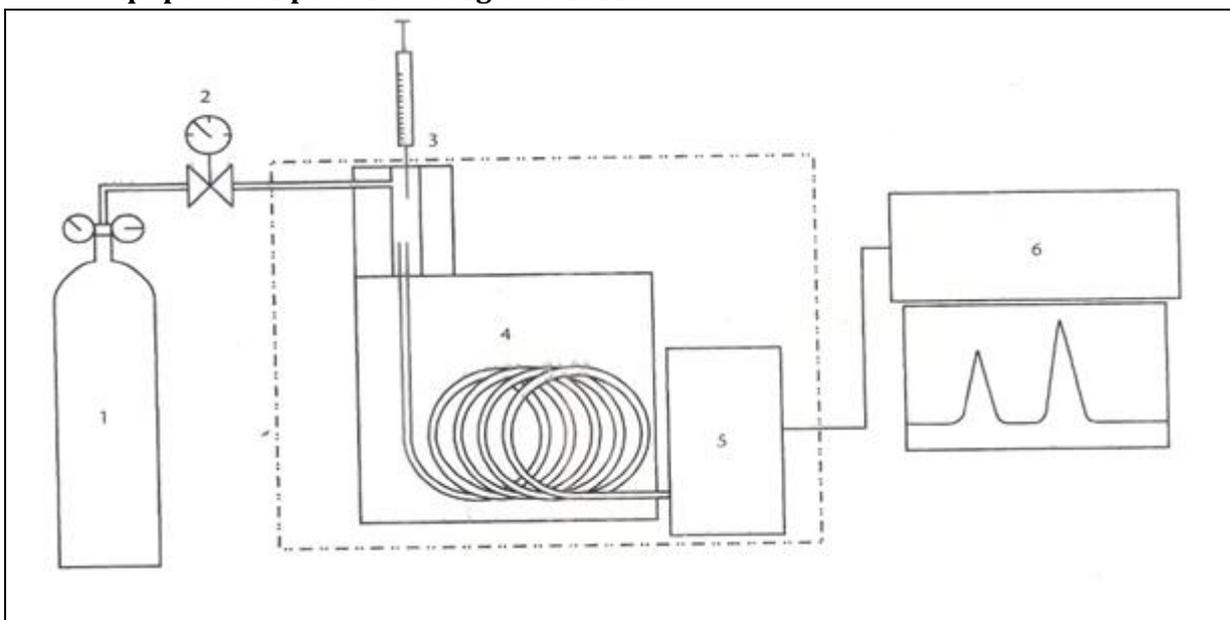


Figura 13. Esquema de cromatógrafo a gás: 1: fonte do gás de arraste; 2: controlador da vazão e regulador de pressão; 3: sistema de injeção da amostra; 4: coluna cromatográfica; 5: sistema de detecção; 6: sistema de registro e tratamento dos dados <sup>[2]</sup>.

O esquema básico de um cromatógrafo a gás mostrado na Figura 13, onde as temperaturas dos componentes delimitados pela linha tracejada são controladas individualmente <sup>[2]</sup>.

### **1.7.2.1 Fonte do gás de arraste**

A fase móvel, sendo gasosa, torna possível um equilíbrio rápido entre ela e a fase estacionária, fazendo da cromatografia gasosa um sistema altamente eficiente [2]. Um cilindro contendo o gás sob alta pressão serve como fonte do gás de arraste (fase móvel), que levará as substâncias presentes na amostra para fora da coluna, quando elas não estiverem interagindo com a fase estacionária [2]. Os gases mais usados como fase móvel são nitrogênio, hélio, hidrogênio e argônio [2]. O gás de arraste não deve interagir com o recheio da coluna, deve ser barato, disponível e compatível com o detector usado [2].

O gás de arraste deve também apresentar alta pureza (> 99,999%), sendo aconselhável o uso de filtros contendo sílica gel ou peneira molecular, entre o cilindro e o instrumento, para eliminar traços de água e hidrocarbonetos [2]. A eliminação de O<sub>2</sub> é mais difícil; no entanto, existem filtros especiais com essa finalidade, disponíveis comercialmente [2]. A presença de impurezas no gás de arraste não afeta a separação cromatográfica de maneira significativa, mas sim a estabilidade e resposta dos detectores [2]. A magnitude desse problema aumenta com limites de detecção mais baixos [2]. Quando se utiliza a programação de temperatura, a pureza do gás de arraste também é crítica; as impurezas podem ficar retidas no topo da coluna e, com o aumento da temperatura, são eluídas junto com as demais substâncias da amostra [2].

### **1.7.2.2 Controladores de vazão e de pressão**

O controle da vazão do gás de arraste é efetuado por reguladores de pressão e/ou controladores de fluxo [2]. Os reguladores de pressão efetuam uma constrição manual do fluxo de gás para manter constante a pressão na entrada do sistema cromatográfico [2]. Quando a temperatura da coluna e a pressão na saída desta, ou do detector, são mantidas constantes, esse tipo de regulador é eficiente [2]. Com a mudança da temperatura durante a análise (programação de temperatura), ou quando se deseja adaptar um sistema na saída da coluna ou detector com a finalidade de coleta de efluente (fins preparativos), a pressão na entrada é mantida

constante, mas a vazão é alterada <sup>[2]</sup>. Nesses casos, há necessidade de controladores de fluxo para se obter repetibilidade nos tempos de retenção <sup>[2]</sup>.

### 1.7.2.3 Sistema de injeção da amostra

O sistema de injeção deve ser aquecido em uma temperatura suficiente para que ocorra a vaporização total das amostras (20-50 °C acima da temperatura da coluna), mas cuidados devem ser tomados para evitar a decomposição dos compostos analisados <sup>[2]</sup>.

A injeção de gases é comumente feita através de uma seringa ou microseringas <sup>[2]</sup>. Estes dispositivos são construídos de modo a evitar vazamentos <sup>[2]</sup>. A repetibilidade nas injeções é de  $\pm 1\%$  <sup>[13]</sup>. O septo, construído de silicone e/ou PTFE (politetrafluoretileno), pode apresentar dois tipos de problemas: vazamentos, devido a injeções repetidas, o que faz que haja a necessidade de trocas periódicas deste, e sangria, causando instabilidades na linha de base e aparecimento de picos fantasmas, quando se utiliza a programação programada <sup>[2]</sup>.

A Figura 14 mostra um desenho esquemático das principais partes dos detectores mais utilizados na cromatografia gasosa.

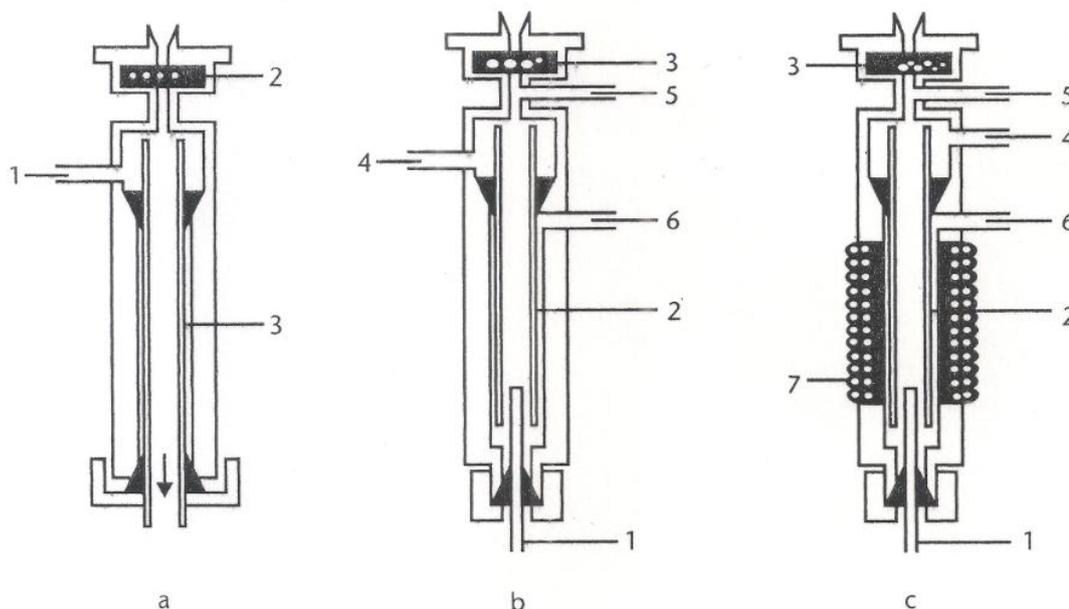


Figura 14. Esquema de injetores. a) Injetor para colunas recheadas: 1: entrada do gás de arraste; 2: septo; 3: tubo de vidro ou parte superior da coluna cromatográfica. b) Injetor com divisor/sem divisor para colunas capilares: 1: coluna cromatográfica; 2: tubo de vidro; 3: septo; 4: entrada do gás de arraste; 5: purga do septo; 6: divisor. c) Injetor com temperatura programada para colunas capilares: 1: coluna cromatográfica; 2: tubo de vidro; 3: septo; 4: entrada para gás de arraste; 5: purga do septo; 6: divisor; 7: dispositivo para aquecimento <sup>[2]</sup>.

O tubo de vidro possui a finalidade de criar um ambiente inerte no injetor, de tal forma que a mostra não entre em contato com a superfície metálica <sup>[2]</sup>. Uma válvula especial, através da qual o fluxo de gás de arraste é dividido entre a coluna a coluna e o ambiente externo, possibilita a injeção em dois modos <sup>[2]</sup>. No modo com divisor, a válvula permanece aberta durante todo o processo de injeção e até mesmo durante toda a análise, de tal forma que apenas uma fração da amostra injetada é introduzida na coluna cromatográfica <sup>[2]</sup>. Devido a isso, essa técnica de injeção é adequada apenas quando os compostos de interesse estão presentes em altas concentrações <sup>[2]</sup>. A fração injetada pode ser variada mudando-se a razão do divisor <sup>[2]</sup>.

O modo sem divisor é necessário para a análise de traços, já que, nesse caso, uma maior quantidade de amostra precisa ser introduzida na coluna <sup>[2]</sup>. A válvula do divisor permanece fechada durante a injeção, possibilitando a total transferência da amostra para a coluna <sup>[2]</sup>. Após um determinado tempo, a válvula é aberta para purgar traços remanescentes da amostra volatilizada, principalmente o solvente <sup>[2]</sup>.

Já a injeção por meio de vaporização com temperatura programada emprega o mesmo tipo de injetor com divisor/sem divisor, exceto que a sua temperatura pode ser aumentada ou diminuída rapidamente <sup>[2]</sup>.

### **1.7.3 Coluna Cromatográfica**

A coluna cromatográfica, que é considerado o coração do CG, é um tubo longo, contendo a fase estacionária <sup>[2,13]</sup>. Esse tubo pode ser de cobre, aço inoxidável, alumínio, vidro, sílica fundida, PTFE etc <sup>[2]</sup>. Idealmente, o material de construção da coluna não deve interagir com o recheio, nem com as substâncias presentes na amostra <sup>[2]</sup>.

As colunas podem ser classificadas em recheadas (analíticas e preparativas) e tubular aberta (microdiâmetro e capilares) (Figura 15) <sup>[2,13]</sup>.

O formato da coluna varia de acordo com o aparelho, geralmente, são em espiral, para que ocupem um espaço menor <sup>[2]</sup>. O comprimento da coluna e seu diâmetro interno dependem dos propósitos da análise, em escala analítica ou preparativa <sup>[2]</sup>.

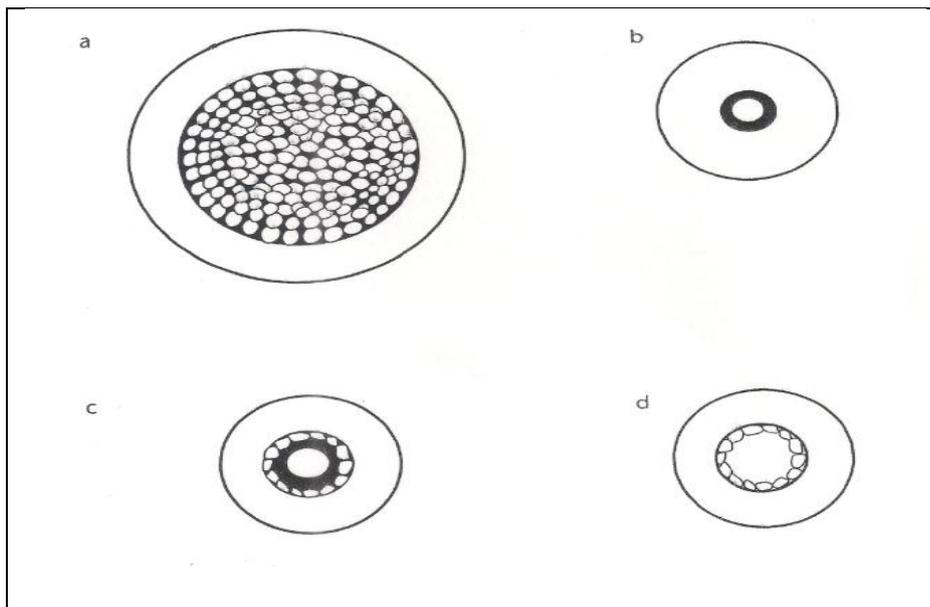


Figura 15. Tipos de coluna para cromatografia gasosa. a) coluna recheada analítica; b) coluna capilar com parede recoberta; c) coluna capilar com suporte recoberto; d) coluna capilar com camada porosa <sup>[2]</sup>.

Antes da utilização da coluna, há necessidade de uma etapa de condicionamento para retirar o restante do solvente utilizado no preparo da fase estacionária e outras impurezas voláteis <sup>[2]</sup>. A coluna é colocada no cromatógrafo com a saída para o detector desligada <sup>[2]</sup>. Com o gás de arraste passando pela coluna, sua temperatura é aumentada lentamente, até 20 °C acima da temperatura máxima em que a coluna será utilizada <sup>[2]</sup>. O tempo de condicionamento depende da natureza da fase estacionária, variando entre horas e dias <sup>[2]</sup>.

Durante a análise, a temperatura da coluna pode permanecer constante (cromatografia gasosa isotérmica), ou sofrer uma variação, linear ou não (cromatografia gasosa com temperatura programada) <sup>[2]</sup>. A programação da temperatura é significativamente importante em cromatografia gasosa, já que melhora a separação e diminui o tempo de análise <sup>[2]</sup>. Ela consiste em começar a análise com a coluna em uma temperatura mais baixa, para que solutos de baixo ponto de ebulição possam eluir como picos separados <sup>[2]</sup>. Durante a análise, a temperatura da coluna é aumentada com o objetivo de se diminuir a retenção de substâncias de maior ponto de ebulição <sup>[2]</sup>. Além das vantagens citadas, a programação de temperatura faz que haja uma maior simetria nos picos e uma melhor detectabilidade para aqueles picos com tempos de retenção excessivamente longos sob condições isotérmicas <sup>[2]</sup>. A programação de temperatura é bastante útil

quando a amostra é composta de substâncias com uma grande diferença em seus pontos de ebulição <sup>[2]</sup>.

O controle de temperatura da coluna, tanto nas análises isotérmicas quanto nas programações de temperatura, deve ser rigoroso e ter repetibilidade, para que não haja alterações no tempo de retenção durante as análises <sup>[2]</sup>.

#### 1.7.4 Sistemas de Detecção

As substâncias presentes na amostra passam através da coluna, onde são separadas, e chegam ao sistema de detecção <sup>[2]</sup>. A seguir serão indicadas algumas características importantes dos detectores <sup>[2]</sup>. Na prática, nem todas essas características podem ser atendidas; então, escolhe-se o detector que melhor se adapta ao tipo de análise a ser realizada <sup>[2]</sup>.

a) Seletividade – Os detectores podem responder a todas as substâncias, geralmente medindo a variação da composição do gás de arraste que sai da coluna, e, neste caso, são ditos “de resposta universal” <sup>[2]</sup>. Detectores seletivos respondem a apenas uma classe de substâncias e têm maior detectabilidade que os universais <sup>[2]</sup>. Existem também os detectores específicos, que respondem a um (ou a poucos) elemento(s), independentemente das substâncias que os contêm <sup>[2]</sup>.

b) Sensibilidade – A sensibilidade é definida como a mudança na resposta do detector em função da quantidade detectada <sup>[2]</sup>. Os detectores são classificados em duas categorias, de acordo com seu princípio de operação <sup>[2]</sup>. Os detectores cuja resposta é independente da vazão da fase móvel são ditos sensíveis à velocidade de fluxo de massa <sup>[2]</sup>. Nesses detectores, a sensibilidade é definida como a razão da área do pico pela massa injetada <sup>[2]</sup>. Nos detectores sensíveis à concentração, a resposta varia em função da vazão da fase móvel <sup>[2]</sup>. Nesse caso, a sensibilidade é definida como o produto da área do pico pela vazão da fase móvel dividido pela massa da amostra <sup>[2]</sup>. A medida de sensibilidade é utilizada como termo de comparação entre detectores de mesma categoria <sup>[2]</sup>. Para esse tipo de comparação, são empregados a mesma coluna, amostra e, obviamente, os mesmos valores no eletrômetro/amplificador e atenuação <sup>[2]</sup>.

c) Ruído – Estes são as deflexões da linha de base nem certo período de tempo, conforme Figura 16, representando efeitos eletrônicos do sistema de detecção <sup>[2]</sup>. Esse ruído pode ser estático, quando representa a instabilidade do detector isolado do cromatógrafo, e/ou dinâmico, observado em condições normais de operação. Idealmente, ambos os valores devem ser próximos <sup>[2]</sup>.

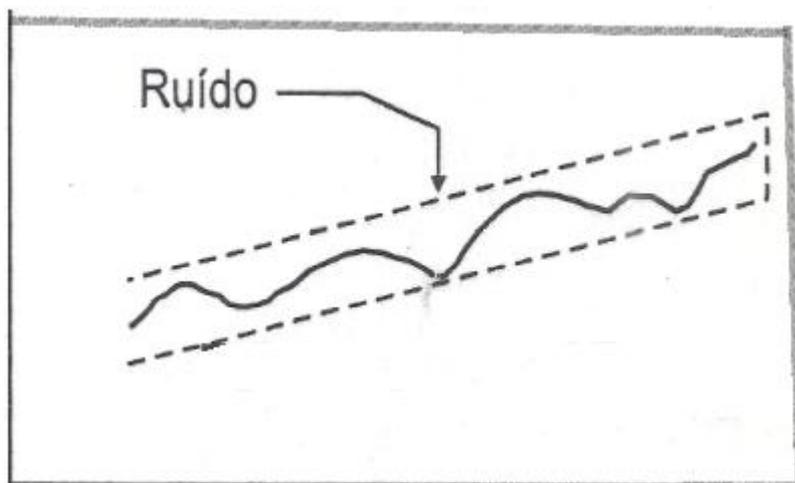


Figura 16. Medida do ruído de um detector cromatográfico <sup>[7]</sup>.

d) Quantidade mínima detectável – Alguns detectores conseguem detectar quantidades de uma substância na faixa de picogramas ( $10^{-12}$  g), ou menos, enquanto outros detectam apenas  $10^{-8}$  g <sup>[2]</sup>. O nível de ruído do detector determina essa quantidade mínima detectável, definida como a quantidade de amostra que gera uma resposta três vezes maior que o nível do ruído <sup>[2]</sup>. A quantidade mínima detectável é dependente de parâmetros relacionados com a coluna e pode ser usada para comparar detectores quanto à sua resposta quantitativa <sup>[2]</sup>.

e) Faixa linear – Uma análise quantitativa depende da relação entre a concentração e resposta do detector, ou seja, intensidade do sinal gerado para uma determinada quantidade de amostra <sup>[2]</sup>. Faixa linear é definida como a razão entre a maior e a menor concentração da amostra, onde a resposta do detector é linear (desvio de 5%) <sup>[2,7]</sup>, conforme Figura 17. O detector deve responder de maneira linear a uma grande faixa de concentração da substância presente na amostra <sup>[2]</sup>.

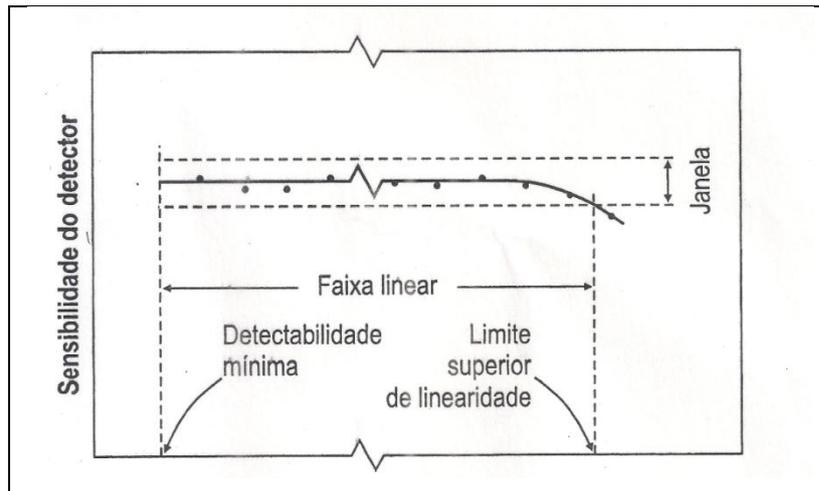


Figura 17. Linearidade de um detector cromatográfico [7].

f) Outras características – Os detectores devem ser, quando possível, insensíveis a alteração de vazão e de temperatura e, também, resistentes às condições de trabalho [2]

A seguir, serão discutidos alguns dos detectores mais usados em cromatografia gasosa para determinações quantitativas [2].

#### 1.7.4.1 Detector por condutividade térmica

São detectores de resposta universal, sensíveis à concentração [2]. Seu funcionamento baseia-se no princípio de que um corpo quente perde calor a uma velocidade que depende da composição dos gases que o circundam [2]. Assim, a velocidade de perda do calor pode ser usada como uma medida de composição do gás [2]. A Figura 18 mostra um esquema do detector por condutividade térmica [2].

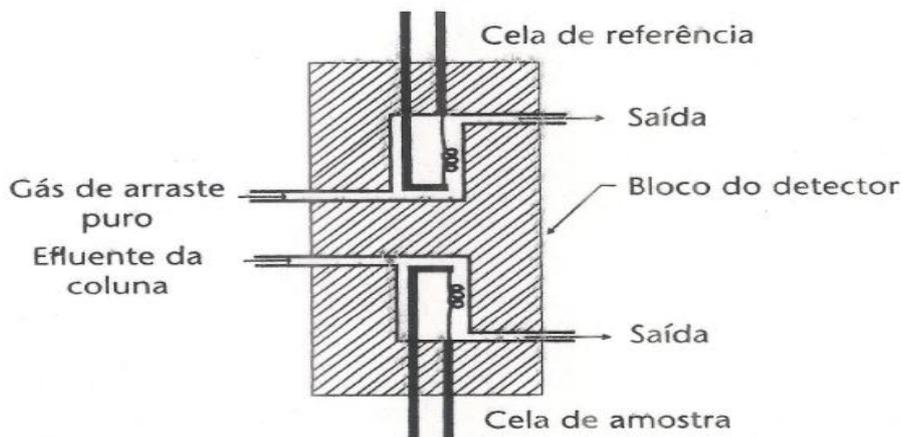


Figura 18. Esquema de um detector por condutividade térmica [2].

#### 1.7.4.2 *Detector por ionização em chama*

Esse detector é bastante popular devido aos seus níveis de detectabilidade e resposta quase universal, apesar de responder a propriedades do soluto; é sensível ao fluxo de massa, passando por ele em um determinado tempo <sup>[2]</sup>. Quando moléculas da amostra presentes no gás de arraste chegam ao detector, elas são queimadas na chama produzida pela combustão de ar e hidrogênio, ocorrendo a formação de íons, que são coletados por um eletrodo <sup>[2]</sup>. A corrente gerada é convertida em voltagem, amplificada e captada pelo registrador (Figura 19) <sup>[2]</sup>.

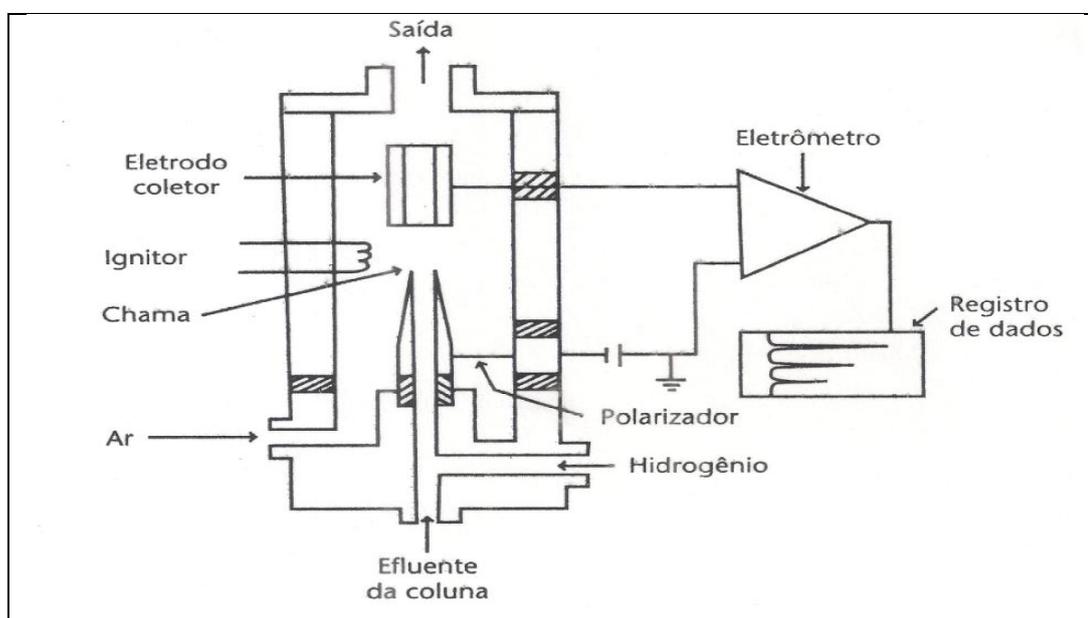


Figura 19. Esquema de um detector por ionização de chama <sup>[2]</sup>.

A eficiência do detector depende, também, da razão das vazões dos gases que alimentam a chama <sup>[2]</sup>. Em geral, boa detectabilidade e estabilidade são obtidas usando a proporção de 1:1:10 para o gás de arraste, hidrogênio e ar comprimido, respectivamente <sup>[2]</sup>.

#### 1.7.4.3 *Detector por captura de elétrons*

Esse detector é seletivo, respondendo muito bem a compostos orgânicos halogenados, aldeídos conjugados, nitrilas, nitratos, e organometálicos <sup>[2]</sup>.

Quando o gás de arraste ( $N_2$ ) passa pelo detector, é ionizado por partículas beta emitidas por uma fonte de  $^{63}Ni$ , produzindo elétrons, que se multiplicam dentro do detector <sup>[2]</sup>. Os elétrons produzidos nesse processo são coletados em um determinado ânodo, gerando uma corrente que é amplificada por um eletrômetro, resultando na linha de base <sup>[2]</sup>. Moléculas eluindo da coluna, capazes de capturar elétrons, diminuem essa corrente, gerando um sinal proporcional a sua concentração (Figura 20) <sup>[2]</sup>.

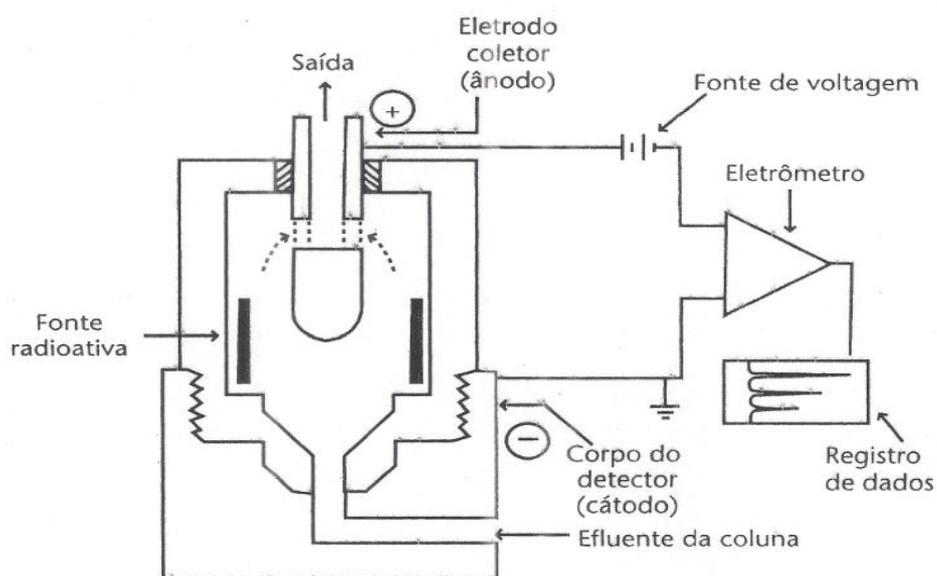


Figura 20. Esquema de um detector por captura de elétrons <sup>[2]</sup>.

#### 1.7.4.4 Detector termiônico

Também são conhecidos como NPD (detector de fósforo e nitrogênio). Nesses detectores, existe uma pérola de sal de metal alcalino (brometo de célio ou sulfato de rubídio), eletricamente aquecida e colocada entre o queimador e o eletrodo coletor <sup>[2]</sup>. A fonte é mantida num potencial negativo para evitar a perda dos íons do metal alcalino e para anular a resposta do detector no modo de ionização de chama <sup>[2]</sup>. Na região da pérola, existe uma chama, ou um plasma, suportados pelo fluxo de ar e hidrogênio <sup>[2]</sup>. A ação catalítica do metal alcalino em compostos contendo nitrogênio ou fósforo forma íons com carga negativa, que são coletados no ânodo (eletrodo coletor) para produzir uma corrente <sup>[2]</sup>. A Figura 21 mostra um esquema do detector termiônico <sup>[2]</sup>.

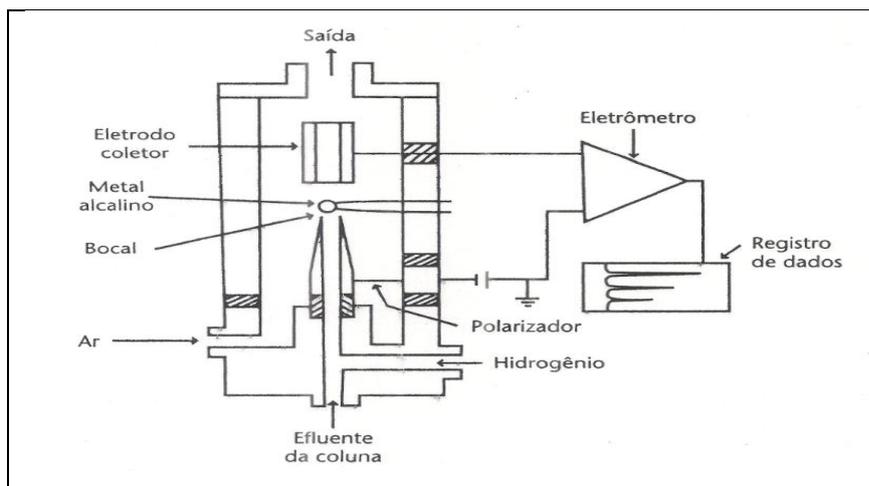


Figura 21. Esquema de um detector termiônico [2].

#### 1.7.4.5 Detector de massas

Embora bem mais caro, o detector de massas está se tornando o mais popular devido à sua eficiência na análise de misturas complexas [14]. Além de fornecer o espectro de massas das substâncias, também permite gerar “fragmentogramas” que são cromatogramas onde são registrados os sinais de substâncias que contenham o fragmento selecionado [14]. Isto permite a Resolução “virtual” de misturas, quando as substâncias que coeluem apresentam fragmentos diferentes, o que aumenta enormemente o poder de “separação” da cromatografia [14].

#### 1.7.5 Sistema de Tratamento de Dados

O sinal gerado pelo detector, quando a amostra passa por ele após eluir da coluna, é registrado graficamente [2]. Anteriormente, empregavam-se registradores potenciométricos [2]. Atualmente, o processamento dos sinais é feito em integradores ou microcomputadores acoplados ao detector [2]. Esses sistemas fornecem os cromatogramas, registram os tempos de retenção e as áreas, ou alturas, de cada pico e efetuam os cálculos de concentração [2]. Os microcomputadores apropriadamente programados podem fornecer também outros dados calculados a partir do cromatograma como número de pratos, resolução etc [2].

### 1.7.6 Análise Qualitativa

A cromatografia gasosa é uma técnica que permite a separação das substâncias presentes na amostra, podendo ser usada também para sua identificação <sup>[2]</sup>.

A identificação pode ser feita comparando-se o tempo de retenção de um padrão com o da amostra. Se um composto conhecido possui o mesmo tempo de retenção que um dado composto na amostra, pode tratar-se da mesma substância <sup>[2]</sup>. Isso não é conclusivo, porque dois compostos podem ter o mesmo tempo de retenção em determinadas condições da análise <sup>[2]</sup>. O tempo de retenção pode ser corrigido para eliminar a influência do tempo em que a substância fica na fase móvel; então, compara-se o tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) <sup>[2]</sup>.

Se esses dados de retenção forem obtidos empregando-se duas ou mais colunas e/ou detectores diferentes, especialmente os detectores seletivos ou específicos, haverá, evidentemente, maior certeza quanto aos resultados <sup>[2]</sup>.

Quando a quantidade de amostra injetada é suficientemente grande, é possível coletar a amostra na saída do detector ou na saída da coluna, quando o detector não destrói a amostra <sup>[2]</sup>. Os compostos são coletados resfriando-se o tubo por onde passa o gás eluente com um banho de gelo seco ou nitrogênio líquido, e depois identificados, usando-se técnicas auxiliares, como espectrofotometria no infravermelho (IV), visível e ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear (RMN) ou espectrometria de massas (EM) <sup>[2]</sup>. Ver no capítulo 2 teoria de EM.

O uso de equipamentos como espectrofotômetro no infravermelho, ou o espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo a gás (CG-IV e CG-EM, respectivamente), permite a identificação positiva de quase todos os compostos, mas os equipamentos têm preços elevados, o que limita suas aplicações <sup>[2]</sup>.

A espectrofotometria no infravermelho com transformada de Fourier, quando acoplada ao cromatógrafo a gás, auxilia na identificação da amostra por comparação de seus espectros de infravermelho aos de um padrão <sup>[2]</sup>. Embora existam alguns equipamentos disponíveis comercialmente, essa técnica ainda condizente com aplicações que envolvam análises no nível de traços <sup>[2]</sup>.

A CG-EM consta de um cromatógrafo, usualmente com coluna capilar, uma interface para ligação dos dois sistemas, uma câmara de ionização onde os íons são formados, uma câmara mantida sob vácuo onde ocorre a separação destes e um

sistema para a detecção de íons, acoplado a um sistema de registro com um programa para a interpretação dos dados obtidos (Figura 22) <sup>[2]</sup>.

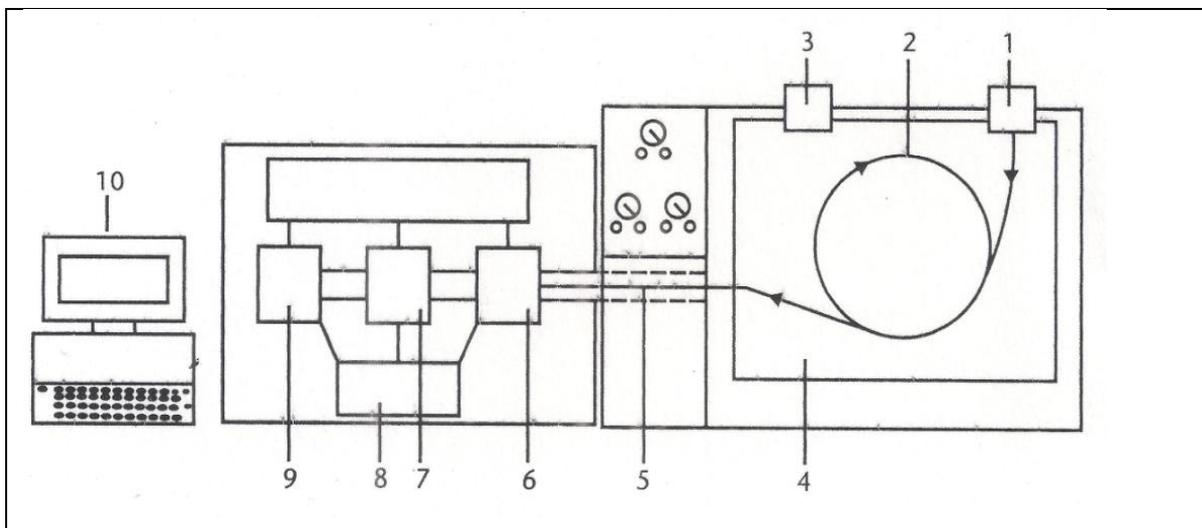


Figura 22. Esquema de um equipamento CG-EM. 1: injetor; 2: coluna; 3: detector convencional (opcional); 4: forno; 5: interface; 6: câmara de ionização; 7: analisador de massas; 8: sistema de vácuo; 9: sistema para detecção; 10: sistema para controle do equipamento, registro e tratamento de dados <sup>[2]</sup>.

A ionização das moléculas da amostra acontece na câmara de ionização e é feita principalmente por impacto eletrônico ou ionização química <sup>[2]</sup>. A câmara de ionização é aquecida para evitar a condensação da amostra e mantida sob vácuo para que os íons formados não colidam com outras moléculas neutras que não foram neutralizadas <sup>[2]</sup>.

No método do impacto eletrônico, um fluxo de elétrons com energia de ionização específica é produzida por um filamento de tungstênio ou rênio aquecido <sup>[2]</sup>. Esses elétrons com energia de, geralmente, 70 eV colidem com as moléculas da amostra, provocando a ionização, bem como a fragmentação delas <sup>[2]</sup>.

Às vezes, o íon molecular formado é instável sob as condições de impacto eletrônico e, nesse caso, emprega-se a ionização química <sup>[2]</sup>. A ionização química é produzida por reações íon-molécula, entre a molécula neutra da amostra e íons provenientes de reagentes presentes na câmara de ionização <sup>[2]</sup>. Na verdade, esses reagentes, como metano, formam íons devido ao impacto eletrônico, e esses íons formados colidem com a amostra <sup>[2]</sup>. Para favorecer esse tipo de mecanismo, a concentração do reagente é suficientemente maior que o da amostra, de modo que

praticamente apenas as moléculas do reagente são ionizadas por impacto eletrônico [2].

Quando formados, os íons deixam a câmara de ionização e entram em um outro compartimento (analisador de massas), onde são separados de acordo com a razão massa/carga, através da imposição de um campo elétrico ou magnético externo [2].

Depois de separados, os íons são detectados e um sistema sofisticado processa os dados obtidos, fornecendo informações qualitativas e quantitativas [2].

As informações qualitativas são obtidas através da interpretação dos espectros de massas (Figura 23) [2]. Esse espectro de massas é característico da substância (principalmente quando obtido em condições de impacto eletrônico) e pode ser comparado a espectros de massas de padrões analisados simultaneamente, ou provenientes de bibliotecas armazenadas no computador [2].

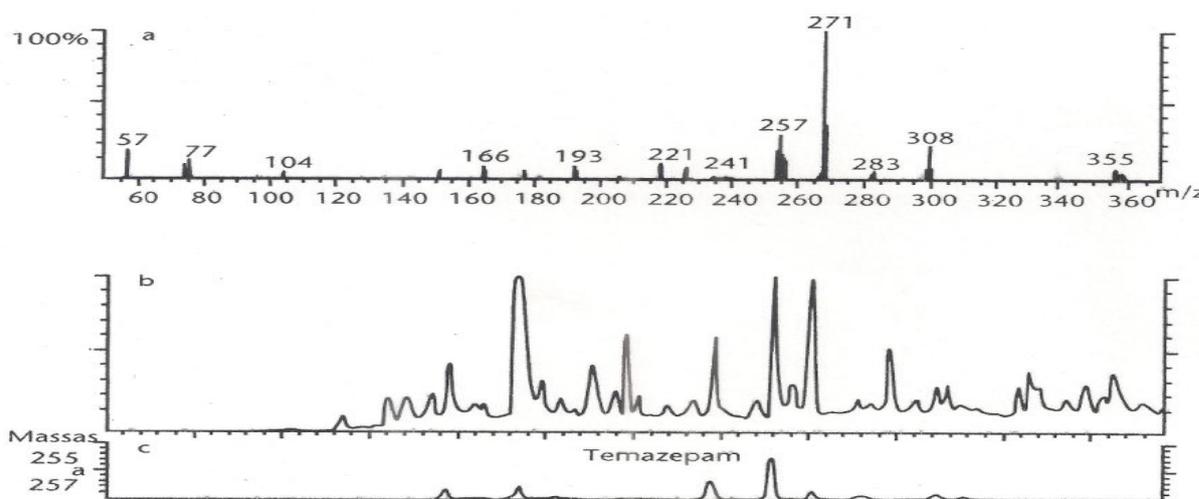


Figura 23. Espectro de massas do temazepam (a) e cromatogramas (b e c) obtidos de uma análise típica por CG-EM [13].

O sistema de tratamento de dados também constrói cromatogramas convencionais a partir dos dados obtidos, e esses cromatogramas são usados para a quantificação [2]. Quando os compostos presentes na amostra já foram identificados e se deseja proceder à quantificação de um ou mais desses compostos, a análise normalmente é feita no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM – *Selected Ion Monitoring*) [2]. Nesse caso, apenas fragmentos específicos de um ou mais compostos serão selecionados pelo analisador de massas e serão detectados, o que torna a técnica extremamente seletiva [2].

Caso queira determinar uma grande gama de composto, utiliza-se o modo de varredura de íons (*Full Scan*), onde todos os fragmentos, dentro de uma faixa pré-estabelecida, serão selecionados pelo analisador de massas e serão detectados.

### 1.7.7 Análise Quantitativa

Após a obtenção do cromatograma, faz-se a integração dos sinais, que tem por finalidade transformar a intensidade do sinal emitido pelo detector em uma medida relacionada com a quantidade da substância analisada na amostra <sup>[2]</sup>. A integração dos sinais pode ser feita usando-se métodos manuais ou eletrônicos <sup>[2]</sup>. As medidas manuais incluem:

a) Altura do pico – Esse método não é muito usado porque sofre muita influência de variações instrumentais; não deve ser usado quando os picos são assimétricos ou muito largos <sup>[13]</sup>. Traça-se uma perpendicular à linha de base, passando pela inflexão máxima do pico; a medida desde a linha de base até esse ponto de inflexão máxima corresponde à altura do pico (Figura 24a) <sup>[2]</sup>;

b) Área do pico – Pode-se calcular a área do pico traçando-se tangentes nos dois lados do pico (Figura 24b); a intersecção de ambas as tangentes com a linha de base fornece um triângulo cuja área pode ser calculada pela fórmula:

$$A = \frac{1}{2} ( a w_b )$$

onde: A = área do pico;

a = altura do pico;

w<sub>b</sub> = largura do pico na linha de base <sup>[13]</sup>.

A área também pode ser calculada usando-se a largura na meia altura, isto é, formando um triângulo na metade superior do pico (Figura 24c) <sup>[2]</sup>. Nesse caso, a área é calculada:

$$A = a w_h$$

onde w<sub>h</sub> é a largura do pico em meia-altura <sup>[2]</sup>.

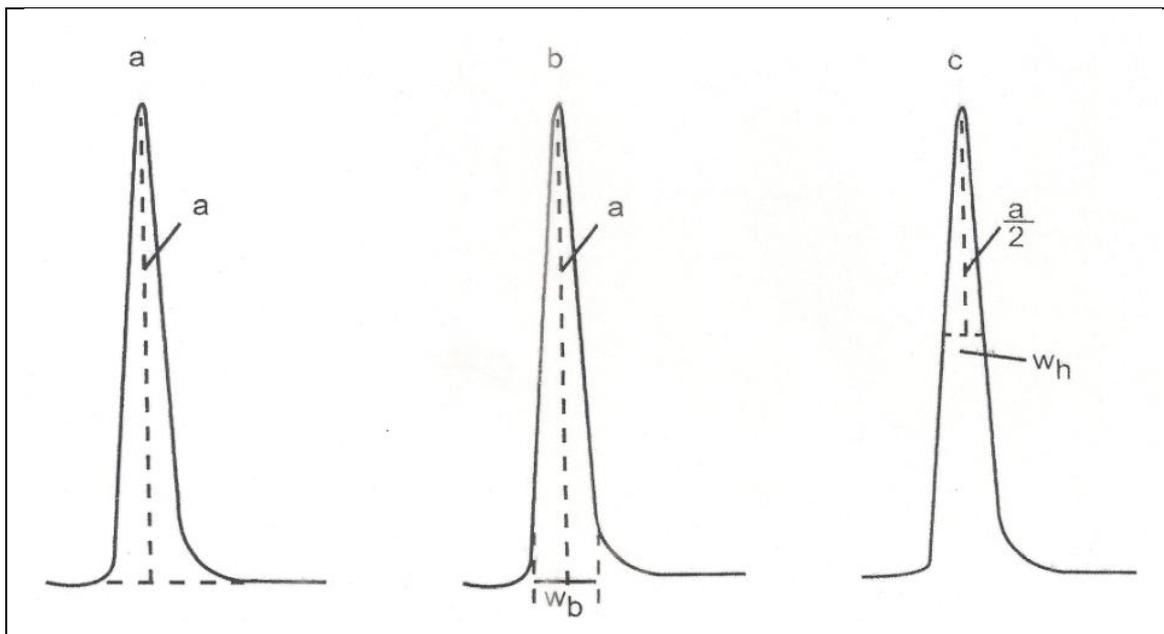


Figura 24. Métodos para a medida manual dos sinais fornecidos pelo sistema de registros dos cromatogramas; a: altura do pico, b: área do pico; c: área na meia-altura <sup>[2]</sup>.

c) Pesagem de papel – A integração também pode ser feita pesando-se o pedaço de papel delimitado pelo pico, que é o método manual de preferência para picos assimétricos <sup>[2]</sup>.

Esses métodos, por serem manuais, são mais demorados e sujeitos a erros <sup>[2]</sup>. Dessa forma, a integração dos sinais, atualmente, faz-se empregando sistemas eletrônicos como integradores e microcomputadores, obtendo-se tempos de retenção, áreas e alturas dos picos <sup>[2]</sup>.

Para fins quantitativos, as medidas obtidas na integração são relacionadas com a concentração de uma dada substância na amostra, através de vários métodos:

a) Normalização – Esse método requer que todas as substâncias presentes na amostra sejam eluídas, e que a resposta do detector seja idêntica para todas <sup>[2]</sup>. Consiste em comparar a área obtida no cromatograma com a porcentagem de composição da amostra <sup>[2]</sup>.

$$\% A = \frac{100 (\text{área}A)}{(\text{área}total)}$$

Nesse método, assume-se que a área total dos picos é proporcional à massa da mistura e que a área de cada pico é proporcional à massa de constituinte que o produziu <sup>[10]</sup>.

A porcentagem em mols será, então, dada dividindo a “área A” pela pelo peso molecular de A; e a “área total” dividida pelo peso molecular total dos compostos analisados <sup>[10]</sup>.

b) Fator de resposta – Se o detector não responde de maneira similar para todas as substâncias presentes na amostra, é necessário corrigir a equação de normalização, usando-se o chamado fator de resposta,  $f_A$ , que é determinado injetando-se uma mistura de concentração conhecida das substâncias conhecidas, cujos fatores deseja-se determinar, e a seguir, relaciona-se a porcentagem conhecida e observada para cada composto <sup>[2]</sup>. Assim, por exemplo:

$$f_A = \frac{\% \text{ A conhecida}}{\% \text{ A observada}}$$

Para se calcular a porcentagem da substância presente na amostra, basta multiplicar a área obtida pelo fator de resposta e dividir pelo somatório de todas as áreas multiplicadas pelos respectivos fatores de resposta <sup>[2]</sup>. Similar a padronização, esse cálculo só é válido se todos os componentes da mistura produzirem picos no cromatograma <sup>[2]</sup>. Além disso, o fator de resposta requer disponibilidade de todos os compostos para que ele possa ser determinado <sup>[2]</sup>. Felizmente, para alguns compostos, existem compilações na literatura indicando estimativas desses fatores <sup>[2]</sup>.

c) Calibração externa – Esse método compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas dessa mesma substância em soluções-padrão de concentração conhecidas <sup>[2]</sup>. Preparam-se várias soluções da substância a ser quantificada em diversas concentrações; obtém-se o cromatograma correspondente a cada uma delas; em um gráfico, relacionam-se as áreas obtidas com as concentrações <sup>[2]</sup>. Utilizando-se esse gráfico, ou a equação linear a ele relacionada, pode-se calcular a concentração dessa substância na amostra (Figura 25) <sup>[2]</sup>. Esse método é sensível a erros de injeção das soluções-padrão e das

amostras, bem como a erros relacionados com a preparação dos padrões [2]. Em uso rotineiro, a curva analítica, ou parte dela, deve ser refeita a cada dia em que a substância seja determinada, devido a possíveis variações no comportamento do cromatógrafo [2].

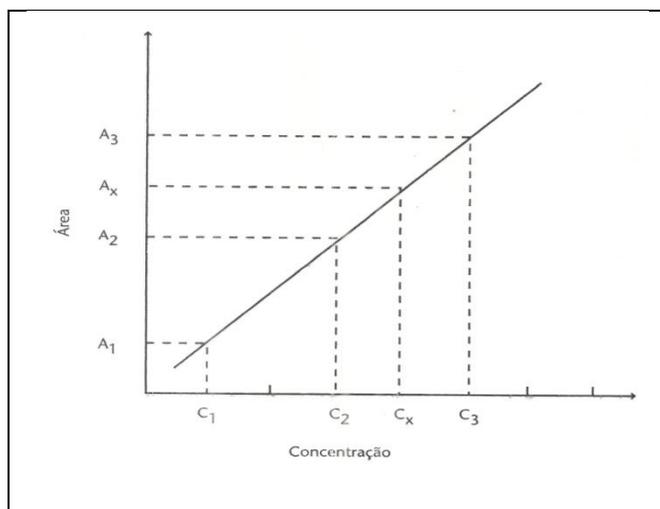


Figura 25. Método de calibração externa para o cálculo da composição da amostra [2].

d) Padronização interna – Esse método consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância (padrão interno) na amostra a ser analisada e relacionar as duas áreas obtidas [2].

Idealmente, a substância usada como padrão interno deve ser similar à substância a ser quantificada, ou seja, possuir estrutura química semelhante ao composto a ser quantificado; não fazer parte da amostra; ser disponível em elevado grau de pureza; ser adicionado em concentrações similares ao composto analisado; ter concentração e tempo de retenção próximos a essa substância, mas, quando cromatografada, ficar separada das demais substâncias presentes na amostra [5,7].

O método consiste na preparação das soluções-padrão de concentrações conhecidas da substância a ser quantificada, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida do padrão interno selecionado [2]. Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão das áreas (área da substância a ser quantificada dividida pela área do padrão interno) à concentração da substância a ser determinada (Figura 26) [2]. A amostra também é analisada após

a adição da mesma quantidade conhecida do padrão interno <sup>[2]</sup>. Por meio da razão de áreas obtidas no cromatograma, tem-se a concentração da substância na amostra, utilizando-se a curva analítica ou a equação linear obtidas anteriormente <sup>[2]</sup>. Esse método é menos sensível a erros de injeção, variações instrumentais etc <sup>[2]</sup>. É o melhor método para análise quantitativa, embora seja o mais trabalhoso <sup>[2]</sup>.

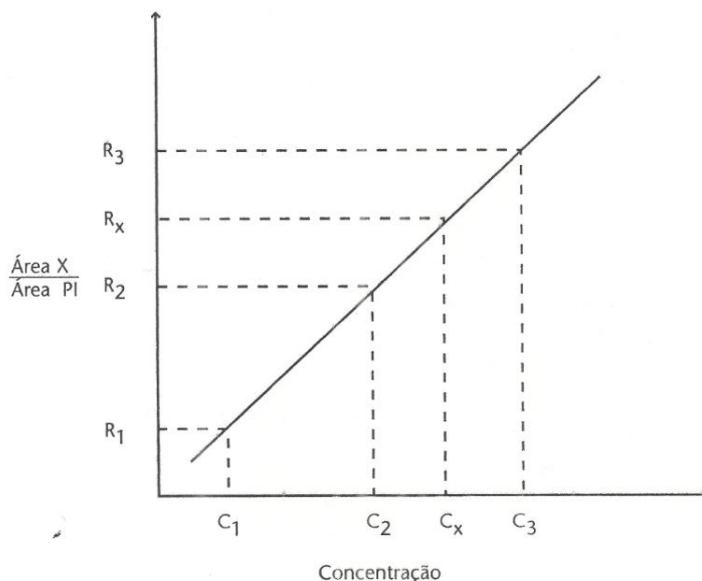


Figura 26. Método de padronização interna para o cálculo da composição da amostra <sup>[13]</sup>.

e) Extrapolação linear por adição de analito – Esse método consta na adição de quantidades conhecidas da substância que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra <sup>[2]</sup>. Após obtenção dos cromatogramas, constrói-se um gráfico relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas <sup>[2]</sup>. O ponto em que a reta corta o eixo das coordenadas corresponde à área do pico da substância a ser determinada, sem nenhuma adição do analito <sup>[2]</sup>. A extrapolação da reta define, no eixo das abscissas, a concentração da substância na amostra analisada (Figura 27) <sup>[2]</sup>. O método da adição do analito é especialmente importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações da matriz são significativas e quando houver dificuldade de se encontrar um padrão interno adequado <sup>[2]</sup>.

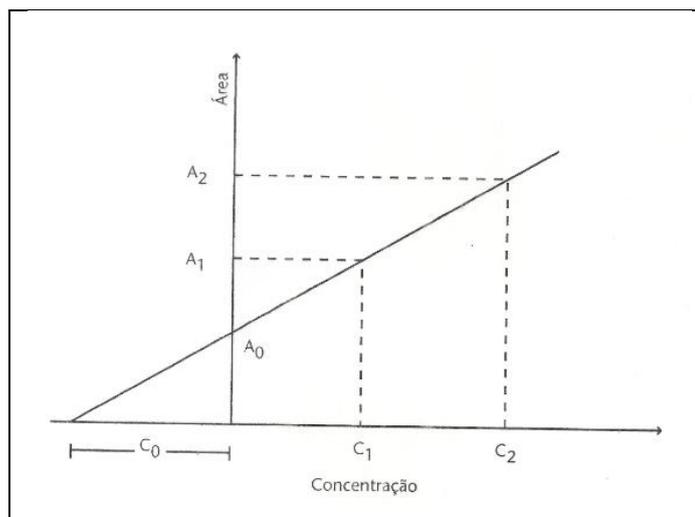


Figura 27. Método da adição do analito para o cálculo de composição da amostra [2].

Exceto o método de normalização, todos os outros requerem a disponibilidade de compostos puros para a construção dos gráficos [2].

Vários trabalhos podem ser encontrados na literatura cromatográfica discutindo aplicações, vantagens e limitações dos métodos de cálculo acima descrito [7]. Não existe um método universal e ideal para a quantificação [7]. A escolha depende de muitos fatores, entre os quais, a natureza da matriz, a disponibilidade de padrões analíticos em elevado grau de pureza, os custos (usualmente, o padrão interno é relativamente caro, especialmente se deuterado), a exigência dos órgãos reguladores (na área de saúde, usualmente o emprego de padrão interno é exigido; na área ambiental, o uso de padrão interno é, usualmente, aceito) [7]. Portanto, a escolha do protocolo a ser empregado dependerá das necessidades da análise [7].

## 2 ESPECTROMETRIA DE MASSA

Um espectrômetro de massa é um instrumento que separa rapidamente íons em movimento, com base em suas razões massas-carga,  $m/z$  [15,16]. De maneira geral, um composto é ionizado (método de ionização), os íons são separados na base da razão massa/carga (método de separação dos íons) e o número de íons que correspondem a cada “unidade” de massa/carga é registrado na forma de um espectro [15]. Na técnica muito usada do impacto de elétrons (EI), por exemplo, o espectrômetro de massas bombardeia com um feixe de elétrons de alta energia moléculas que estão na fase vapor e registra o espectro dos íons positivos, depois de separados na base da razão massa/carga ( $m/z$ ) [15].

A Figura 28 mostra, a título de ilustração, o espectro de massa EI da benzamida registrado como um gráfico da abundância dos íons (intensidade dos picos, na vertical) conta  $m/z$  [15]. O pico dos íons positivo em  $m/z$  121 corresponde à molécula intacta (M) com menos um elétron, removido pelo impacto do feixe de elétrons [15]. Ele é chamado de íon molecular  $M^+$  [15]. A decomposição do íon molecular, que tem energia em excesso, leva a uma série de fragmentos iônicos, alguns dos quais são explicados na Figura 28 [15].

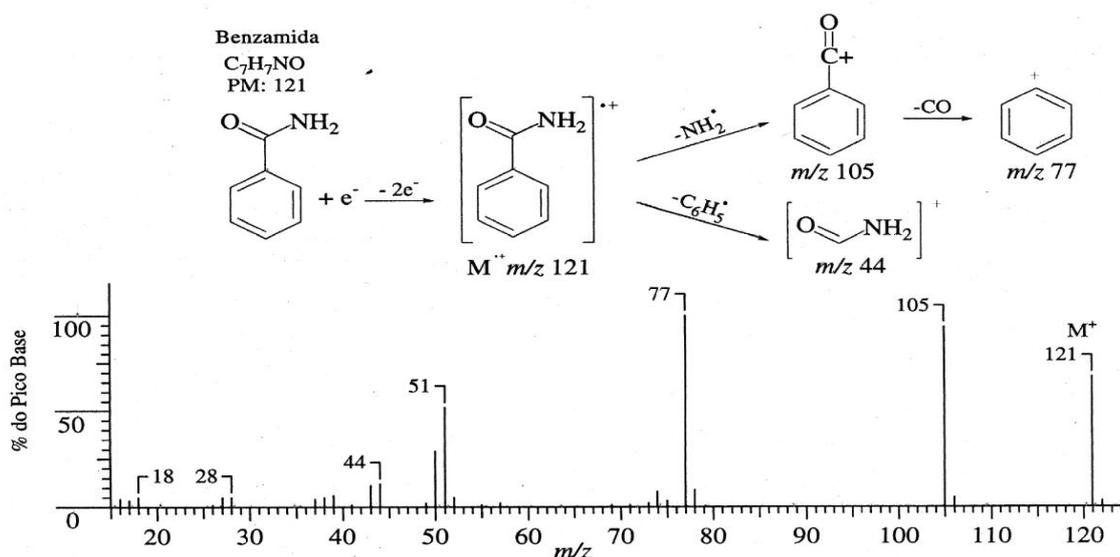


Figura 28. Espectro de massas EI da benzamida [15].

O acoplamento de um espectrômetro de massas a algum tipo de análise cromatográfica, como um cromatógrafo a gás (CG-EM) ou um cromatógrafo líquido (CL-EM), é comum [15]. Os espectrômetros de massas são muito úteis na análise de compostos cujo espectro de massas é conhecido e na análise de compostos de

estrutura completamente desconhecida <sup>[15]</sup>. No caso de compostos conhecidos, uma busca computadorizada compara o espectro de massas do composto em questão com uma biblioteca de espectros de massas <sup>[15]</sup>. A coincidência dos espectros de massas é uma evidência convincente da identificação que é, muitas vezes, aceita em procedimentos legais <sup>[15]</sup>. No caso de compostos desconhecidos, o íon molecular, a sequência de fragmentos e evidências de outros tipos de espectrometria (por exemplo, IR e RMN) podem levar a identificação da estrutura química do composto <sup>[15]</sup>.

## 2.1 Métodos de Ionização

Conforme a forma de geração de íons, as fontes de íons são classificadas como fontes duras ou fontes moles <sup>[16]</sup>. As fontes duras dão às moléculas do analito energia suficiente para deixá-las em um estado de energia altamente excitado <sup>[16]</sup>. A relaxação então envolve a quebra de ligações, produzindo íons secundários que têm razões massa/carga menores que a do íon molecular <sup>[16]</sup>. As fontes moles causam pouca fragmentação <sup>[16]</sup>. Conseqüentemente, o espectro de massa resultante frequentemente consiste do íon molecular e uns poucos, se tanto, picos <sup>[16]</sup>. A Figura 29 ilustra a aparência do espectro de fonte dura e a Figura 30 o espectro de fonte mole <sup>[16]</sup>.

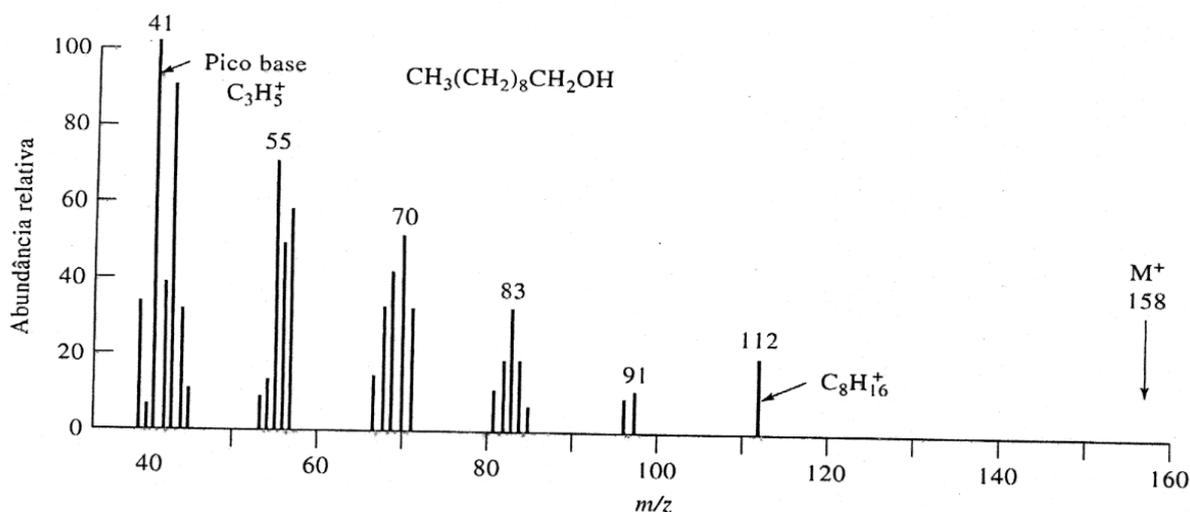


Figura 29. Espectro de massas de 1-decanol obtido com fonte dura <sup>[15]</sup>.

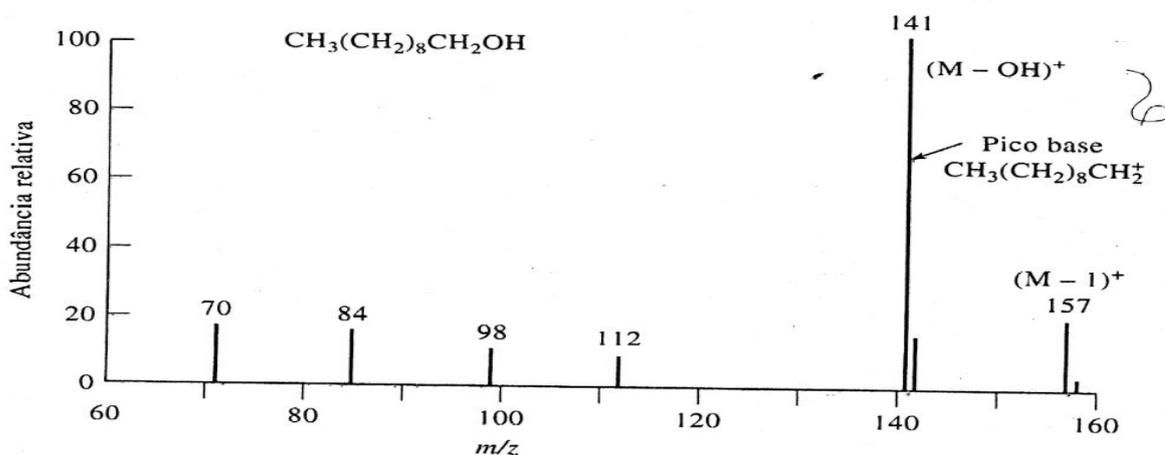


Figura 30. Espectro de massas de 1-decanol obtido com fonte mole <sup>[15]</sup>.

Os espectros de ambas as fontes são úteis para análises <sup>[16]</sup>. Os vários picos em um espectro de fonte dura fornecem informações úteis sobre os tipos de grupos funcionais e, portanto, informação estrutural não-ambígua sobre os analitos <sup>[16]</sup>. Os espectros de fontes moles são úteis porque fornecem informação exata sobre a massa molecular da molécula do analito ou de moléculas <sup>[16]</sup>.

Os três métodos de ionização mais comuns são: fase de gás, dessorção e ionização por evaporação <sup>[16]</sup>.

### 2.1.1 Métodos de Ionização em Fase Gás

Este tipo de ionização é aplicado a compostos que têm pressão de vapor da ordem de  $10^{-6}$  torr em uma temperatura na qual o composto é estável <sup>[15]</sup>. Este critério aplica-se a um grande número de moléculas orgânicas não-iônicas com  $PM < 1000$  <sup>[15]</sup>.

#### 2.1.1.1 Ionização por Impacto de Elétrons

O método do impacto de elétrons (EI) é a técnica mais usada de geração de íons para a espectrometria de massas <sup>[15]</sup>. As moléculas de amostra são bombardeadas na fase gás com elétrons de alta energia (geralmente 70 eV), que removem um elétron da molécula de amostra para produzir um cátion-radical, conhecido como íon molecular <sup>[15]</sup>. Como o potencial de ionização dos compostos orgânicos típicos é, geralmente, menor do que 15 eV, os elétrons que estão bombardeando as moléculas-alvo acrescentam energia da ordem de 50 eV (ou

mais) ao íon molecular recém-criado <sup>[15]</sup>. Essa energia é dissipada, em parte, pela quebra de ligações covalentes, que têm energias de ligação entre 3 e 10 eV <sup>[15]</sup>.

A quebra das ligações é normalmente extensiva e, o que é muito importante, muito reproduzível, o que torna característica do composto <sup>[15]</sup>. Além disso, o processo de fragmentação também é “previsível”, o que permite o aproveitamento do grande potencial de elucidação de estruturas que têm a espectrometria de massas <sup>[15]</sup>. Com frequência, a energia adicionada ao íon molecular é tão grande que leva a um espectro de massas em que não é possível reconhecer o fragmento do íon molecular <sup>[15]</sup>. A redução da voltagem de ionização é uma estratégia muito utilizada para obter o íon molecular <sup>[15]</sup>. A estratégia tem sucesso porque a fragmentação é fortemente reduzida <sup>[15]</sup>. A desvantagem dessa estratégia é que o espectro muda e não pode ser comparado com os das bibliotecas de espectros “padronizados” <sup>[15]</sup>.

### **2.1.1.2 Ionização Química**

Um outro modo de evitar a um grau elevado de fragmentação em que não se observa o íon molecular é utilizar a técnica de ionização química (CI) <sup>[15]</sup>. No método CI, as moléculas de amostra (na fase gás) não são submetidas ao bombardeio com elétrons de alta energia <sup>[15]</sup>. Um gás reagente (usualmente metano, propano isobutano, amônia, porém outros também são usados) é introduzido na fonte e ionizado, cada um produz um espectro diferente para determinado analito <sup>[15,16]</sup>.

As moléculas de amostra, sob pressão relativamente alta, colidem com moléculas ionizadas do gás reagente ( $\text{CH}_5^+$ ,  $\text{C}_4\text{H}_9^+$ , etc.) na fonte CI e sofrem ionização secundária por transferência de próton para produzir íons  $[\text{M}+1]^+$ , por adição eletrofílica para produzir íons  $[\text{M}+15]^+$ ,  $[\text{M}+24]^+$ ,  $[\text{M}+43]^+$ , ou  $[\text{M}+18]^+$ , (com íons  $\text{NH}_4^+$ ) ou por troca de carga (raro) para produzir íons  $[\text{M}]^+$  <sup>[15]</sup>. Os espectros de ionização química têm, às vezes, picos  $[\text{M}-1]^+$ , importantes devido a abstenção de hidreto <sup>[15]</sup>. Os íons produzidos dessa maneira são espécies com número ímpar de elétrons <sup>[15]</sup>.

A quantidade do gás reagente é mantido na região de ionização em uma quantidade tal que a razão de concentração reagente/amostra é de  $10^3$  a  $10^4$  <sup>[16]</sup>.

Devido a essa grande diferença de concentração, o feixe de elétrons reage quase exclusivamente com as moléculas do reagente <sup>[16]</sup>.

Os excesso de energia transferido para as moléculas de amostra durante a fase de ionização é pequeno, geralmente menos de 5 eV, logo o grau de fragmentação é muito menor <sup>[15]</sup>. Isso tem várias consequências importantes, e a mais útil delas é a grande abundância de íons moleculares e a maior sensibilidade porque a corrente iônica total está concentrada em poucos íons <sup>[15]</sup>. Entretanto, tem-se menos informação sobre a estrutura <sup>[15]</sup>. Os íons quasimoleculares são usualmente muito estáveis e facilmente detectados <sup>[15]</sup>. Com frequência, observam-se um ou dois fragmentos iônicos e, às vezes, nenhum <sup>[15]</sup>.

O espectro de massas EI da 3,4-dimetóxi-acetofenona (Figura 31), por exemplo, mostra, além do pico do íon molecular em m/z 180, numerosos picos de fragmentação na faixa m/z 15-167, incluindo o pico base em m/z 165 e picos importantes em m/z 137 e m/z 77 <sup>[15]</sup>.

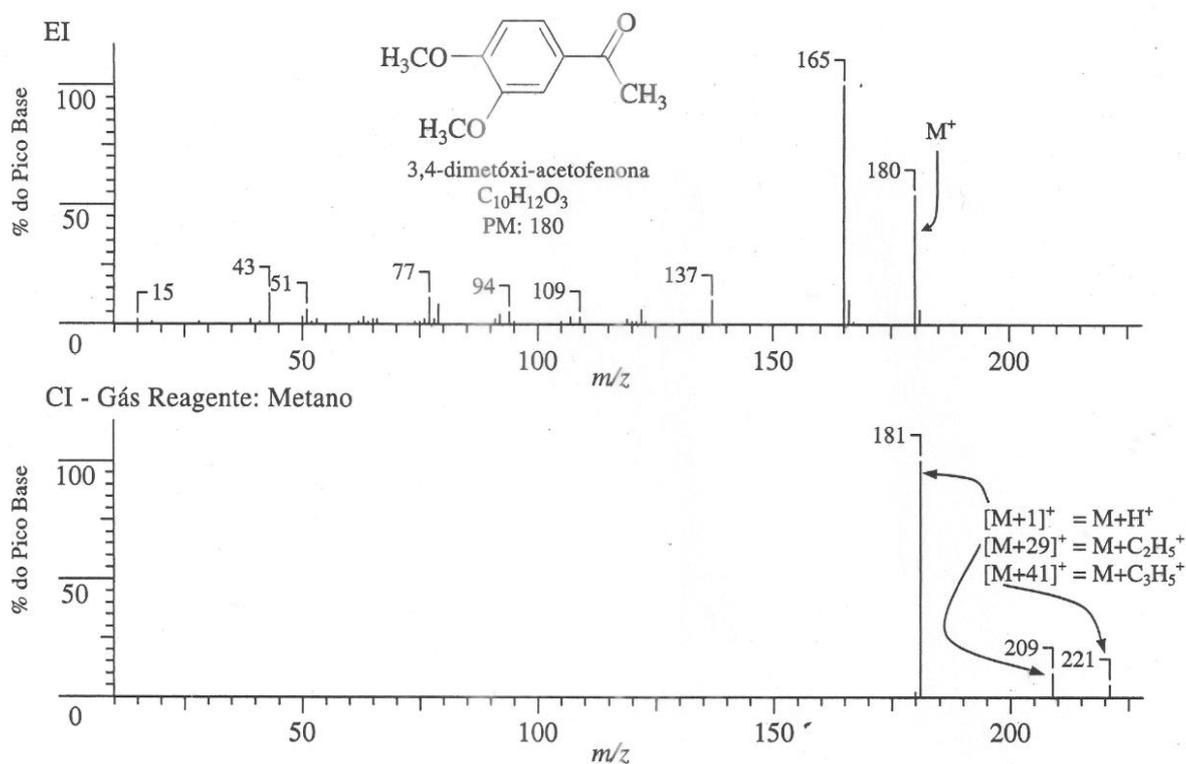
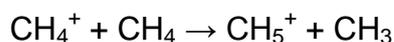
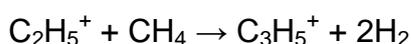
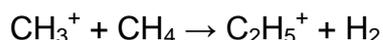


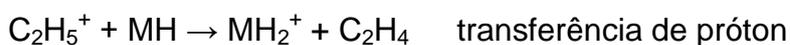
Figura 31. Espectros de massas EI e CI da 3,4-dimetóxi-acetofenona <sup>[15]</sup>.

O espectro de massas CI (metano, CH<sub>4</sub>, como gás reagente) mostra o íon quasimolecular ([M+1]<sup>+</sup>, m/z 181) como pico base (100%), e os únicos outros picos com baixa intensidade são o pico do íon molecular m/z 180, m/z 209 ([M+29]<sup>+</sup>, ou

$M+C_2H_5^+$ ), e  $m/z$  221 ( $[M+41]^+$ , ou  $M+C_3H_5^+$ )<sup>[15]</sup>. Esses dois últimos picos são o resultado da adição eletrofílica de carbocátions e são muito úteis na identificação do íon molecular<sup>[15]</sup>. O excesso de gás carreador (metano) é ionizado por impacto de elétrons e forma os íons primários  $CH_4^+$ ,  $CH_3^+CH_2^+$ <sup>[15,16]</sup>. Os dois primeiros predominam e representam cerca de 90% dos produtos de reação<sup>[16]</sup>. Esses íons reagem com o excesso de metano para dar íons secundários<sup>[15,16]</sup>.



Geralmente, colisões entre a molécula da amostra MH e  $CH_5^+$  ou  $C_2H_5^+$  são altamente reativas e envolvem transferência de próton ou hidreto<sup>[16]</sup>. Por exemplo,



Observe que as reações de transferência de próton produzem o íon  $[M+1]^+$ , enquanto que as transferências de hidreto produzem um íon com massa uma unidade menor que o analito, ou o íon  $[M-1]^+$ <sup>[16]</sup>. Com alguns compostos, um pico  $[M+29]^+$  também é produzido, por transferência de um íon  $C_2H_5^+$  para o analito<sup>[16]</sup>.

O conteúdo de energia dos vários íons secundários (provenientes de metano, isobutano e amônia, respectivamente) decresce na ordem  $CH_5^+ > t-C_4H_9^+ > NH_4^+$ <sup>[15]</sup>. Assim, a escolha do gás carreador permite controlar a tendência que tem o íon  $[M+1]^+$  produzido por CI de se fragmentar<sup>[15]</sup>.

A espectrometria de massas com ionização química não é útil para a comparação de picos (manualmente ou por computador) nem é particularmente útil

para a elucidação de estruturas <sup>[15]</sup>. Seu principal uso é a detecção dos íons moleculares e, portanto, a determinação dos pesos moleculares <sup>[15]</sup>.

### **2.1.2 Método de Ionização por Dessorção**

Os métodos de ionização por dessorção são técnicas em que as moléculas de amostra passam diretamente de uma fase condensada para a fase vapor na forma de íons <sup>[15]</sup>. Seu uso mais comum é com compostos pesados, não-voláteis ou iônicos, e instáveis termicamente <sup>[15,16]</sup>. Existem algumas desvantagens importantes <sup>[15]</sup>. Os métodos de dessorção, em geral, não utilizam eficientemente a amostra disponível <sup>[15]</sup>. Com frequência, a informação obtida é limitada <sup>[15]</sup>. No caso de substâncias desconhecidas, seu uso principal é a determinação do peso molecular e, em alguns casos, a obtenção de massa exata <sup>[15]</sup>. Entretanto, mesmo quando o objetivo é esse, eles devem ser usados com cuidado, porque o íon molecular ou o íon quasimolecular podem não ser muito claros <sup>[15]</sup>.

#### **2.1.2.1 Ionização por Dessorção de Campo**

No método de dessorção de campo (FD), a amostra é colocada em um metal emissor em cuja superfície existem agulhas de carbono microscópicas <sup>[15]</sup>. As agulhas ativam a superfície, que é mantida na voltagem de aceleração e funciona como o anodo <sup>[15]</sup>. Gradientes de voltagem muito altos na ponta das agulhas removem um elétron da amostra, e o cátion resultante é repelido para longe do emissor <sup>[15]</sup>. Os íons gerados dessa maneira têm muito pouca energia em excesso e, portanto, ocorre pouca fragmentação <sup>[15]</sup>. Em outras palavras, o íon molecular é usualmente o único íon que tem intensidade apreciável <sup>[15]</sup>. Por exemplo, no caso do colest-5-eno-3,16,22,26-tetrol os espectros EI e CI não mostram o pico molecular do esteróide <sup>[15]</sup>. Entretanto, o espectro de massas FD (Figura 32) mostra predominantemente o íon molecular com praticamente nenhuma fragmentação <sup>[15]</sup>.

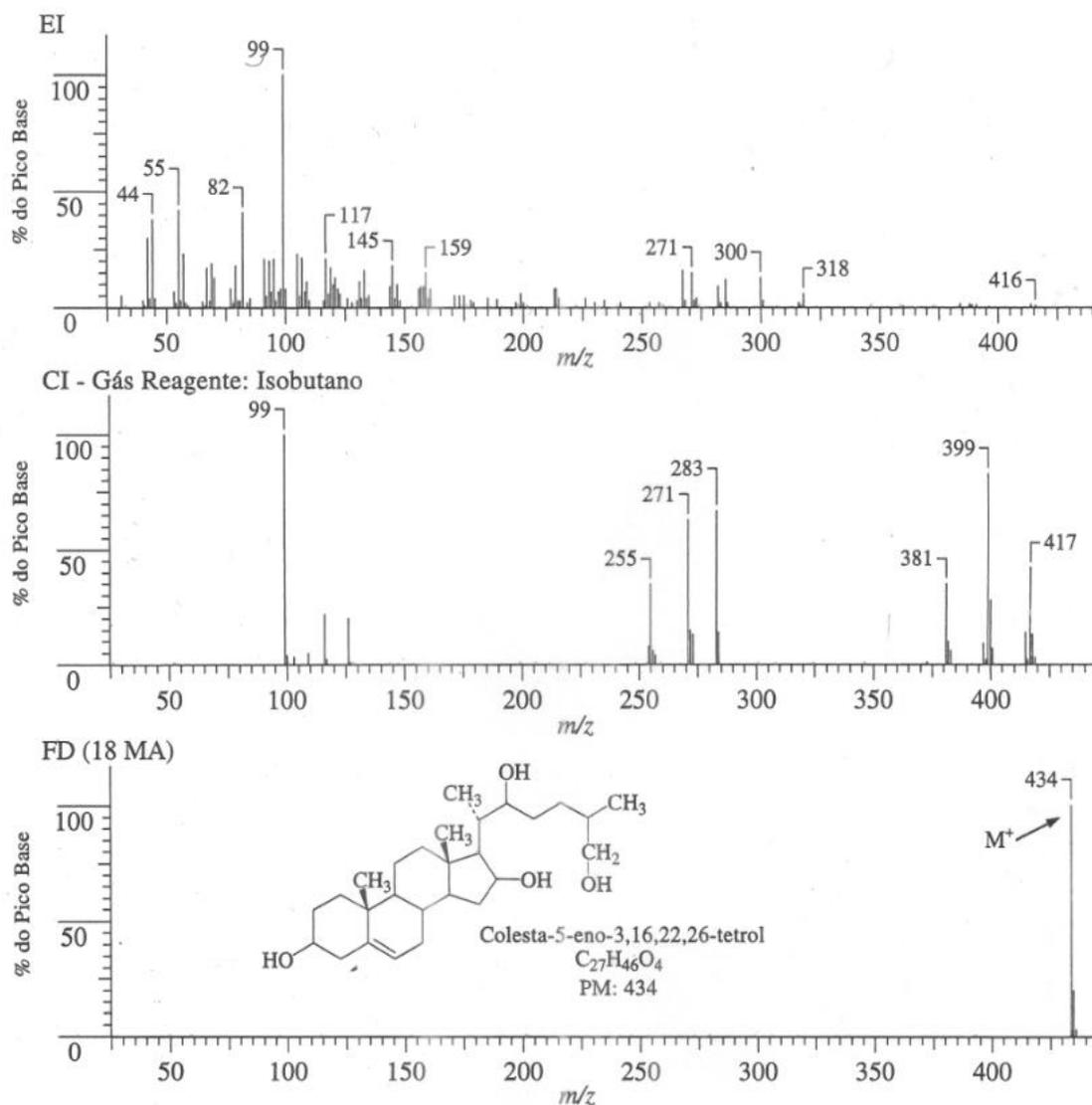


Figura 32. Espectros de massas por impacto de elétrons (EI), ionização química (CI) e dessorção de campo (FD) do colesta-5-eno-3,16,22,26-tetrol <sup>[15]</sup>.

### 2.1.2.2 Bombardeio por Átomos Rápidos

A técnica do bombardeio por átomos rápidos (FAB) usa átomos de xenônio ou argônio de alta energia (6-10 keV) para bombardear amostras dissolvidas em um líquido de baixa pressão de vapor (por exemplo, glicerol) <sup>[15]</sup>. A matriz protege a amostra de danos excessivos provocados pela radiação <sup>[15]</sup>. Um método semelhante, a espectrometria de massas por ionização secundária de líquidos (LSIMS), utiliza íons de césio, de maior energia (10-30 keV) <sup>[15]</sup>.

Nos dois métodos, formam-se íons positivos (por adição de cátion [M+1]<sup>+</sup> ou [M+23, Na]<sup>+</sup>) e íons negativos (por desprotonação [M-1]<sup>-</sup>) <sup>[15]</sup>. A técnica FAB é usada

principalmente com moléculas pesadas pouco voláteis, particularmente na determinação do peso molecular <sup>[15]</sup>. Em muitas classes de compostos, o restante do espectro é de pouca utilidade, em parte porque muitos dos picos de massa menor podem ser provenientes da matriz <sup>[15]</sup>. Entretanto, no caso de algumas classes de compostos formados por “unidades de construção”, como os polissacarídeos e peptídeos, alguma informação estrutural pode ser obtida porque a fragmentação ocorre preferencialmente nas ligações glicosídicas e peptídicas, respectivamente, o que constitui um método de sequenciamento dessas classes de compostos <sup>[15]</sup>.

O limite superior das massas no caso da ionização FAB (e LSIMS) está entre 10 e 20 kDa, porém a técnica FAB é mais útil quando a massa é inferior a 6 kDa <sup>[15]</sup>. O grande problema do uso da técnica FAB é que o espectro mostra sempre um alto nível de íons gerados pela matriz, o que limita a sensibilidade e pode esconder fragmentos iônicos importantes da amostra <sup>[15]</sup>.

### **2.1.2.3 Bombardeio por Dessorção com Plasma**

A ionização por dessorção com plasma é uma técnica muito especializada, usada quase exclusivamente com analisadores de massas por tempo de voo <sup>[15]</sup>. Os produtos de fissão do califórnio 252 (<sup>252</sup>Cf), com energias da ordem de 80 a 100 MeV, são usados para bombardear e ionizar a amostra <sup>[15]</sup>. A decomposição de (<sup>252</sup>Cf), a cada evento, duas partículas movem em direções diferentes <sup>[15]</sup>. Uma das partículas atinge um detector e marca um tempo inicial <sup>[15]</sup>. A outra atinge a matriz que contém amostra e ejeta alguns íons em um espectrômetro de tempo de voo (TOF-EM) <sup>[15]</sup>. Os íons da amostra são liberados com mais frequência na forma de espécies protonadas, com carga simples, duplas ou tripla <sup>[15]</sup>. Esses íons têm energias muito baixas, e, em consequência, observam-se muito raramente fragmentos úteis para a análise da estrutura molecular e não se podem obter informações sobre o sequenciamento de polissacarídeos e polipeptídeos <sup>[15]</sup>. A técnica é útil para compostos com peso molecular até cerca de 45 kDa <sup>[15]</sup>.

#### **2.1.2.4 Dessorção/Ionização com Laser**

Pode-se usar um feixe pulsado de laser para ionizar amostras para a espectrometria de massas <sup>[15]</sup>. Como o método é pulsado, ele deve ser usado com um espectrômetro por tempo de voo ou por transformações de Fourier <sup>[15]</sup>. Dois tipos de laser são de uso comum: o laser de CO<sub>2</sub>, que emite radiação no infravermelho distante, e o laser de neodímio/ítrio-alumínio (Nd/YAG), que emite radiação na região do ultravioleta, em 266 nm <sup>[15]</sup>. Sem o recurso à matriz, o método limita-se a moléculas de peso molecular baixo (< 2 kDa) <sup>[15]</sup>.

#### **2.1.3 Método de Ionização por Evaporação**

Existem dois métodos importantes com que íons ou, menos frequentemente, moléculas neutras em solução (que contêm, muitas vezes, o ácido fórmico) perdem as moléculas de solvente com ionização simultânea, deixando íons para a análise das massas <sup>[15]</sup>.

##### **2.1.3.1 Espectrometria de Massas por Nebulização Térmica**

No método por nebulização térmica, introduz-se a solução da amostra no espectrômetro de massas através de um tubo capilar aquecido <sup>[15]</sup>. O tubo nebuliza e vaporiza parcialmente o solvente, formando uma corrente de pequenas gotas que entram na fonte de íons <sup>[15]</sup>. Após a evaporação completa do solvente, os íons da amostra podem ser analisados <sup>[15]</sup>. Esse método pode ser usado com altas velocidades de fluxo e tampões <sup>[15]</sup>. Foi um dos primeiros métodos de interfaceamento dos espectrômetros de massas com a cromatografia líquida com água <sup>[15]</sup>.

##### **2.1.3.2 Espectrometria de Massas por Nebulização com Elétrons**

A Figura 33 mostra o esquema de uma fonte de íons por nebulização de elétrons (ES), que opera em pressões próximas da atmosfera <sup>[15]</sup>. Por isso, o método é também chamado de ionização à pressão atmosférica ou API <sup>[15]</sup>. A amostra em

solução (usualmente um solvente polar volátil) entra na fonte de íons através de um tubo capilar de aço inoxidável envolvido por um fluxo coaxial de nitrogênio (o gás nebulizador) <sup>[15]</sup>. A extremidade do capilar é mantida em um potencial elevado em relação a um contra-eletrodo <sup>[15]</sup>. A diferença de potencial produz um gradiente de campo da ordem de 5 Kv/cm <sup>[15]</sup>. Quando a solução deixa o tubo capilar, forma-se um aerossol de gotículas carregadas <sup>[15]</sup>. O fluxo do gás nebulizador arrasta o efluente para o espectrômetro de massas <sup>[15]</sup>.

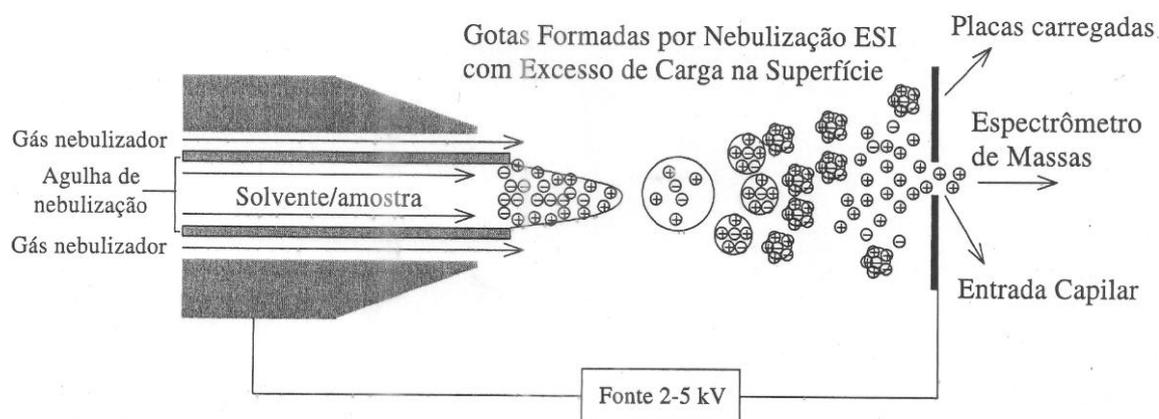


Figura 33. Diagrama esquemático da evaporação do solvente para formar íons isolados em um instrumento de nebulização com elétrons <sup>[15]</sup>.

Com a evaporação do solvente, as gotículas do aerossol diminuem de volume, concentrando, dessa forma, os íons carregados da amostra <sup>[15]</sup>. Quando a repulsão eletrostática dos íons da amostra atinge um ponto crítico, a gotícula sofre a chamada “explosão coulômbica”, que libera os íons para a fase vapor <sup>[15]</sup>. Já na fase vapor, os íons são focalizados através de um certo número de orifícios e passam para o espectrômetro de massas <sup>[15]</sup>.

## 2.2 Analisadores de massas

O analisador de massas separa a mistura de íons formados durante a etapa de ionização segundo seu  $m/z$  para gerar um espectro <sup>[15]</sup>.

A capacidade de um espectrômetro de massa em diferenciar massas é normalmente designada em termos da sua resolução,  $R$ , que é definida como

$$R = m/\Delta m$$

onde  $\Delta m$  é a diferença de massa entre dois picos adjacentes que conseguem ser separados (resolvidos) e  $m$  é a massa nominal do primeiro pico (a massa média de dois picos è às vezes usada) <sup>[16]</sup>. Considera-se que dois picos estão resolvidos se a altura do vale entre eles é menor que uma fração determinada de suas alturas (frequentemente 10%) <sup>[16]</sup>. Assim, um espectrômetro com resolução de 4000 resolveria picos que aparecem em  $m/z$  400,1 e 400,1 (ou 40,00 e 40,01) <sup>[16]</sup>.

A resolução exigida em um espectrômetro de massa depende muito de sua aplicação <sup>[16]</sup>. Por exemplo, a discriminação entre íons de mesma massa nominal, como  $C_2H_4^+$ ,  $CH_2N^+$ ,  $N_2^+$  e  $CO^+$  (todos com massa nominal de 28 Da, mas com massas exatas 28,0313; 28,0187; 28,0061 e 27,9949 Da, respectivamente), requer um instrumento com uma resolução de vários milhares <sup>[16]</sup>. Por outro lado, íons de massa molecular pequena diferindo por uma unidade de massa ou mais, como  $NH_3^+$  ( $m = 17$ ) e  $CH_4^+$  ( $m = 16$ ), por exemplo, podem ser distinguidos com um instrumento tendo resolução menor que 50 <sup>[16]</sup>. Espectrômetros comerciais disponíveis têm resolução de aproximadamente 500 a 500 mil <sup>[16]</sup>.

Os mais importantes analisadores de massas são:

### 2.2.1 Espectrômetros de Massas com Setores Magnéticos

Os espectrômetros de massas com setores magnéticos usam um campo magnético para desviar íons em movimento para uma trajetória curva <sup>[15]</sup>. A separação dos íons baseia-se na razão massa/carga, e os íons mais leves desviam mais do que os pesados <sup>[15]</sup>.

Quando um íon, de carga  $z$  com a voltagem  $V$ , acelerado entra no campo magnético ( $B$ ), a energia cinética é dada por

$$E = zeV = mv^2/2$$

onde  $v$  é a velocidade do íon após a aceleração e  $e$  é a carga do elétron ( $e = 1,60 \times 10^{-19}$  C) <sup>[15,16]</sup>.

A trajetória descrita por íons de massa e carga representa um equilíbrio entre duas forças que agem sobre eles <sup>[16]</sup>. A força magnética,  $F_M$ , que modifica a trajetória do íon em uma direção ortogonal à original, é dada pela relação

$$F_M = Bzev,$$

A força centrípeta,  $F_C$ , que faz com que o íon passa a movimentar-se em uma trajetória circular de raio  $r$ , é dada por

$$F_C = mv^2/r$$

Para que um íon chegue no detector,  $F_M$  e  $F_C$  precisam ser iguais. Igualando as duas forças temos

$$Bzev = mv^2/r$$

Isolando  $v$  e substituindo na equação da energia cinética temos:

$$m/z = B^2r^2e/2V.$$

Como o raio do instrumento é fixo, o campo magnético varia para colocar os íons sequencialmente no foco <sup>[15]</sup>. Como essas equações mostram, os instrumentos com setor magnético separam os íons pelo momento, o produto da massa pela velocidade, e não pela massa apenas <sup>[15]</sup>. Assim, íons de mesma massa e energias diferentes chegam ao foco em pontos diferentes <sup>[15]</sup>.

### 2.2.2 Espectrômetros de Massas com Quadrupolo

O analisador de massas com quadrupolo é muito menor e mais barato do que um espectrômetro de massas com setor magnético <sup>[15]</sup>. Um arranjo de quadrupolo (Figura 34) é formado por quatro tubos cilíndricos (ou de seção hiperbólica), ou seja, hastes metálicas, exatamente retas e paralelas, de comprimento entre 100 mm e 200 mm, montados segundo os vértices de um quadrado <sup>[15,16]</sup>.

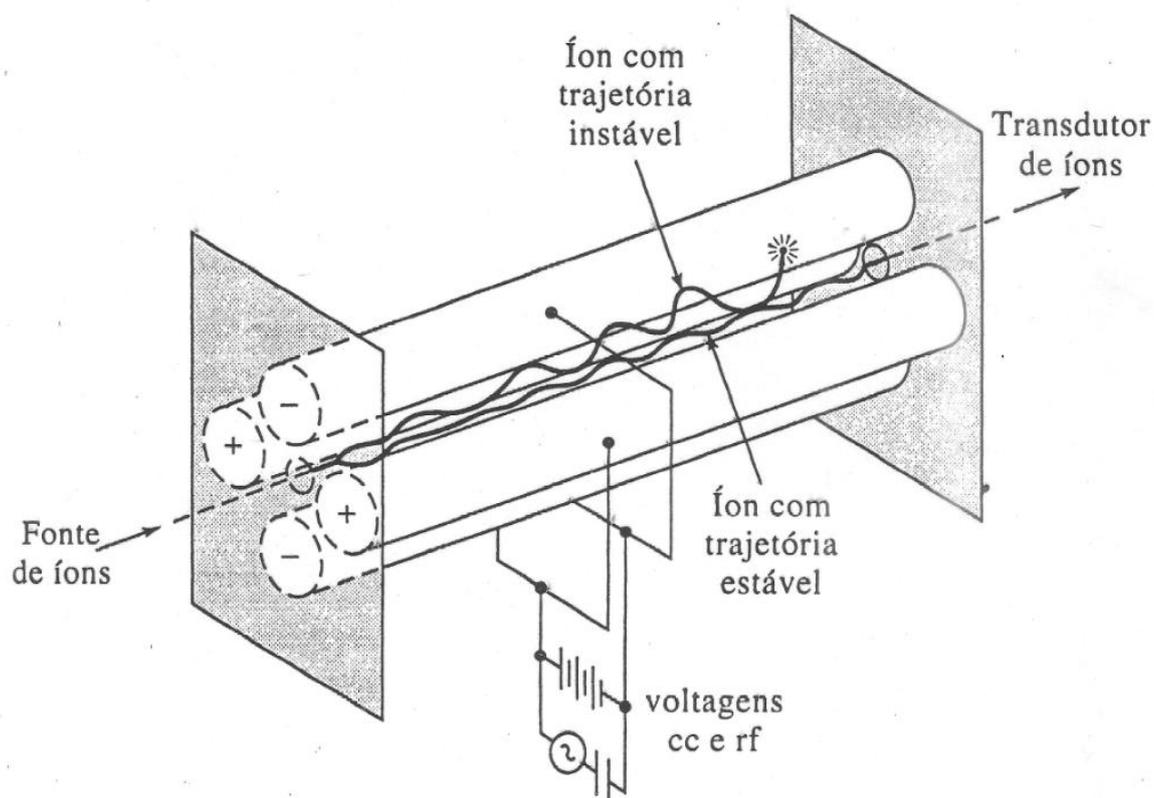


Figura 34. Espectrômetro de massa quadripolar <sup>[17]</sup>.

Uma corrente contínua modificada por uma voltagem de radiofrequência é aplicada nos tubos <sup>[15]</sup>. Os íons entram em um “túnel” formado pelos quatro cilindros do quadropolo no centro do quadrado em uma das extremidades dos tubos e passam pelo eixo <sup>[15]</sup>. Para cada combinação determinada de corrente contínua e voltagem-modificada aplicada na frequência apropriada, somente íons com um certo valor de  $m/z$  possuem uma trajetória estável e são capazes de atravessar o quadropolo até o fim e chegar ao detector <sup>[15]</sup>. Os demais íons, com valores diferentes de  $m/z$ , têm oscilações erráticas e colidem com um dos tubos ou saem do quadropolo <sup>[15]</sup>.

### 2.2.3 Espectrômetro de Massas por Captura de Íons

A espectrometria de massas por captura de íons (armadilha de íons) é considerada, às vezes, uma variação do quadropolo porque a aparência e a operação do dois são semelhantes, mas ao contrário do quadropolo, que age meramente como um filtro de massas, ela pode “prender” íons formados por tempos relativamente longos por campos magnéticos e/ou elétricos <sup>[15,16]</sup>. O uso mais

simples dos íons presos é liberá-los em sequência para um detector, com produção de um espectro de massas convencional <sup>[15]</sup>.

A armadilha de íons é formada, em geral, por três eletrodos, um eletrodo em forma de anel com uma superfície interna hiperbólica e dois eletrodos tampões hiperbólicos em cada extremidade (Figura 35) <sup>[15]</sup>.

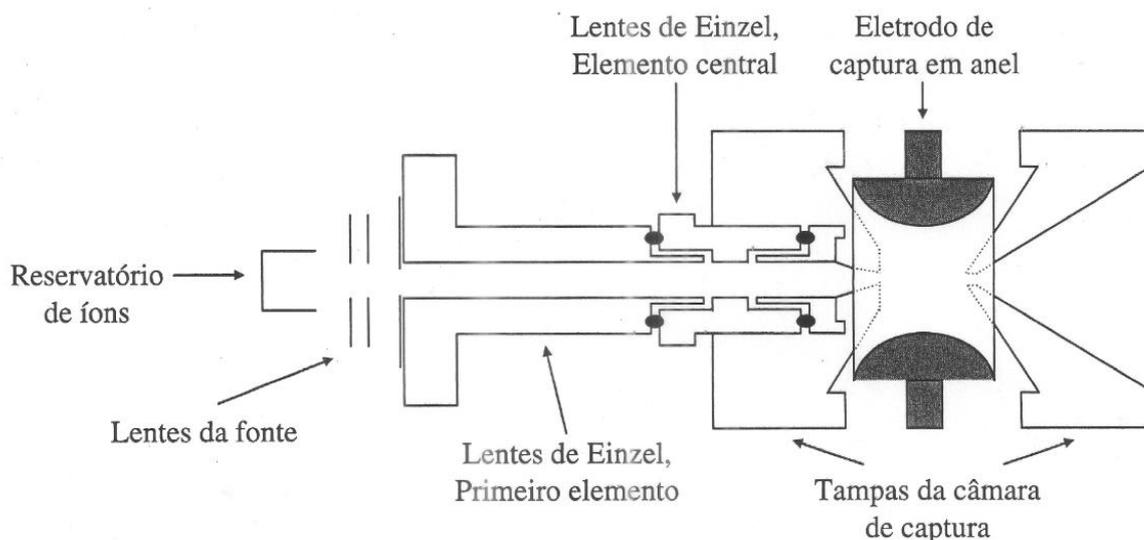


Figura 35. Seção transversal de uma câmara de captura de íons <sup>[15]</sup>.

O eletrodo em anel é operado com um campo de radiofrequência em forma de senóide, e os eletrodos tampões em dois modos: potencial da terra, com corrente contínua ou com corrente alternada <sup>[15]</sup>.

#### 2.2.4 Espectrômetro de Massas por Tempo de Vôo

Os íons são acelerados por um potencial ( $V$ ) e passam por um tubo até o detector <sup>[15]</sup>. Se todos os íons que entram no tubo tiverem a mesma energia, dada por  $zeV = mv^2/2$ , então íons de massas diferentes terão velocidades diferentes:  $v = (2zeV/m)^{1/2}$  <sup>[15]</sup>. Se o comprimento do tubo é  $L$ , o tempo de vida de um íon é dado por  $t = (L^2m/2zeV)^{1/2}$ , que permite o cálculo da massa de um determinado íon <sup>[15]</sup>.

### 2.2.5 Espectrômetro de Massas com Transformada de Fourier

Nesta técnica, a relação sinal-ruído é melhor, velocidades maiores e sensibilidade e resolução melhores <sup>[16]</sup>.

Os íons são mantidos em uma célula sob um potencial elétrico de captura e um campo magnético intenso (sistema de captura de íons) <sup>[15,16]</sup>. No interior da célula, cada íon orbita em uma direção perpendicular à do campo magnético, com uma frequência proporcional ao  $m/z$  do íon <sup>[15]</sup>. Um pulso de radiofrequência aplicado à célula faz com que todas as frequências cicloidais entrem em ressonância simultaneamente para dar um interferograma, que é um espectro no domínio do tempo, sofre uma transformada de Fourier para um espectro no domínio da frequência, que dá o espectro  $m/z$  convencional <sup>[15]</sup>.

### 2.2.6 Espectrômetro de Massas em Sequência

Também chamado de MS-MS (“MS ao quadrado”), com certas armadilhas de íons é possível conseguir MS à  $n$ -ésima potência ( $MS^{(n)}$ ), com  $n = 2$  a  $9$  <sup>[15]</sup>.

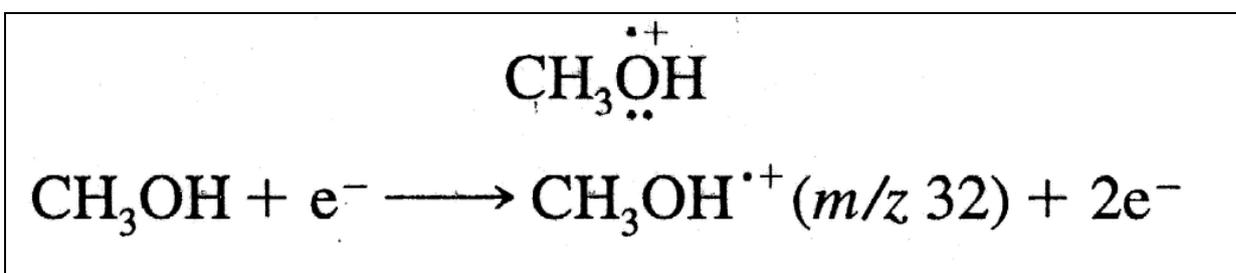
Neste método, o primeiro espectrômetro serve para isolar os íons moleculares dos vários componentes de uma mistura <sup>[16]</sup>. Esses íons são então introduzidos um de cada vez em um segundo espectrômetro de massa, no qual são fragmentados para dar uma série de espectros de massa, um para cada íon molecular produzido no primeiro espectrômetro <sup>[16]</sup>.

O primeiro espectrômetro, em um instrumento sequencial, normalmente está equipado com uma fonte de ionização mole (frequentemente uma fonte de ionização química), de modo que seu produto é formado principalmente de íons moleculares ou íons moleculares protonados <sup>[16]</sup>. Esses íons passam então à fonte de íons do segundo espectrômetro, que, comumente, consiste de uma câmara de colisão livre de campo, através do qual é bombeado hélio <sup>[16]</sup>. Colisões entre os íons precursores em alta velocidade e átomos de hélio causam fragmentação dos primeiros, para produzir numerosos íons secundários <sup>[16]</sup>.

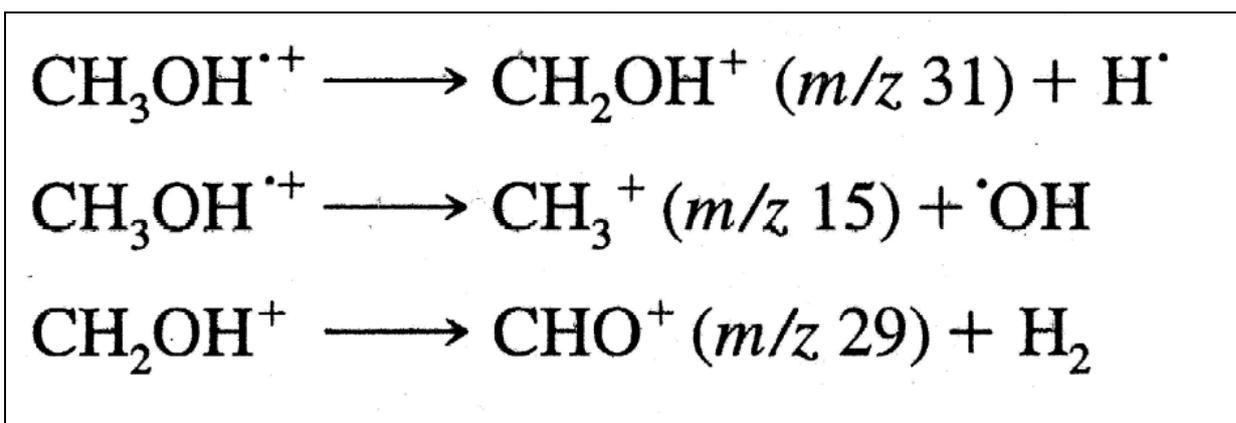
Em misturas complexas, essa técnica fornece evidência inequívoca da presença de um composto, além de informações estruturais <sup>[16]</sup>.

### 2.3 Interpretação dos Espectros de Massa

O evento mais simples que ocorre é a remoção de um elétron da molécula na fase de gás, com formação do íon molecular, um cátion-radical <sup>[15]</sup>. Assim, por exemplo, o metanol forma um íon molecular no qual o ponto representa o elétron desemparelhado remanescente, como se pode ver no esquema a seguir <sup>[15]</sup>. Quando a carga pode ser localizada em um determinado átomo, ela é representada sobre o átomo <sup>[15]</sup>.



Muitos desses íons moleculares desintegram-se em  $10^{-10}$  a  $10^{-3}$  s, para dar, no caso mais simples, um fragmento de carga positiva e um radical <sup>[15]</sup>. Formam-se, então, muitos fragmentos iônicos que podem ser decompostos em fragmentos menores <sup>[15]</sup>. O esquema abaixo mostra exemplos de possíveis quebras no caso do metanol <sup>[15]</sup>.



Se alguns dos íons moleculares permanecerem intactos durante um tempo suficientemente longo para alcançar o detector, observa-se um pico correspondente ao íon molecular <sup>[15]</sup>. É importante identificar o pico do íon molecular porque ele fornece o peso molecular do composto <sup>[15]</sup>.

Um espectro de massas é um gráfico que apresenta as massas dos fragmentos positivos (incluindo o íon molecular) nas suas concentrações relativas <sup>[15]</sup>. O pico mais intenso no espectro, chamado de pico base, tem arbitrariamente a intensidade 100% <sup>[15]</sup>. As intensidades (altura do sinal x fator de sensibilidade) dos demais picos, incluindo o pico principal, aparecem na forma de percentagens do pico base <sup>[15]</sup>.

Para o reconhecimento do íon molecular, normalmente, a melhor solução é obter um espectro de ionização química da amostra, pois nos espectros obtidos através das fontes duras, há picos que aparecem em massas maiores que a do íon molecular <sup>[15,16]</sup>. Esses picos são atribuídos a íons com a mesma fórmula química, mas composições isotópicas diferentes <sup>[16]</sup>.

Colisões íon-molécula podem produzir picos em massas maiores que a do íon molecular <sup>[16]</sup>. Em pressões normais da amostra, no entanto, a única reação importante desse tipo é aquela em que a colisão transfere um átomo de hidrogênio ao íon, para produzir um íon molecular protonado; resulta então um pico intensificado  $(M+1)^+$  <sup>[16]</sup>. Essa transferência é uma reação de segunda ordem e a quantidade do produto depende fortemente das concentrações dos reagentes <sup>[16]</sup>. Consequentemente, a altura de um pico  $(M+1)^+$  devido a essa reação cresce muito mais rapidamente com a pressão do que as alturas dos outros picos; assim, a detecção dessa reação é comumente possível <sup>[16]</sup>.

### 3 CONCLUSÃO

Fica evidente, após a apresentação deste estudo, o quanto a técnica cromatográfica é essencial para as análises instrumentais. Não é por acaso, que estimativas chegam a apontar que mais de 70% de todas as análises na química analítica nas mais diversas áreas são feitas por esta técnica.

São inúmeros os ambientes analíticos que se utilizam desta técnica físico-química de separação, desde laboratórios ambientes e alimentícios, para a determinação de traços de contaminantes, passando por laboratórios biológicos e clínicos, na detecção de antígenos, até laboratórios que possuem a finalidade de purificar substâncias. Pois, a técnica cromatográfica não serve apenas para a separação de misturas, mas também para a purificação de compostos, o que é muito utilizado na indústria farmacêutica.

E ao se acoplar o espectrômetro de massas (EM) com a cromatografia, há um ganho significativo na detecção e quantificação das substâncias, visto que na técnica cromatográfica com detectores convencionais, como por exemplo, NPD, ECD, FID entre outros é necessário um outro método para confirmação dos resultados positivos; já com a utilização do EM, como os fragmentos das substâncias são característicos, esta técnica já é suficiente por si mesma. E devido à fragmentação característica das moléculas, muitos compostos cuja identificação seria errônea pela técnica cromatográfica isolada, tornam-se confiável através do espectro de massas.

Portanto, a técnica cromatográfica acoplada à espectrometria de massas é um ganho magnífico para a análise instrumental analítica, oferecendo resultados confiáveis para a determinação de substâncias em misturas complexas.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Lopes, A. C; Cavasotto, T. Caracterização química e físico-química de efluente da indústria de explosivos nitroaromáticos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2011.

[2] Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. Fundamentos de cromatografia. Editora Unicamp, 1ª reimpressão. Campinas, SP, 2007.

[3] Ribeiro, N.M.; Nunes, C.R. Química Nova na Escola, **29**, AGO, 2008. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc29/08-EEQ-0707.pdf>. Acesso em: 30 nov 2015.

[4] Degani, A.L.G.; Cass, Q.B.; Vieira, P.C. Química Nova na Escola, **7**, MAI, 1998. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/atual.pdf>. Acesso em: 30 nov 2015.

[5] Celeghini, R.M.S.; Ferreira, L.H. Química Nova na Escola, **7**, MAI, 1998. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc07/exper4.pdf>. Acesso em: 02 dez 2015.

[6] Laboratoryinfo.com. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications*. Disponível em: <http://laboratoryinfo.com/hplc/>. Acesso em 08 dez 2015.

[7] Lanças, F. M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. Editora átomo, 2009.

[8] Leite, R.W. Validação de um método de extração gás-líquido “*headspace*” acoplado a um CG-EM para determinação de THM em água potável da região de Maringá. Universidade Estadual de Maringá, 2009.

[9] Meire, Gramile. Cromatografia gasosa. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/GramileMeira/cromatografia-gasosa>. Acesso em: 16 mar 2015.

- [10] Ciola, R. Introdução à cromatografia em fase gasosa. Ed Edgard Blücher. São Paulo, 1973.
- [11] Atkins, P; Jones, L. Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente. Ed. Bookman. 5ª edição. Porto Alegre, 2012.
- [12] Viegas, M. C; Bassoli, D. GI. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. São Paulo. Quím. Nova, vol 30 nº 8, 2007.
- [13] Stashenko, E; Martínez, J. R. *Gas chromatography-mass spectrometry. Intech*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/57492>. Acesso em: 06 out 2015.
- [14] Aquino Neto, F. R; Nunes, D. S. S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro. Ed Interciência, 2003.
- [15] Silverstein, R. M; Webster, F. X; Kiemle, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Ed LTC. Rio de Janeiro, 2007.
- [16] Skoog, D. A; Holler, F. J; Nieman, T. A. Princípios de análise instrumental. Ed Bookman. 5ª edição. Porto Alegre, 2002.
- [17] Ewing, G. W. Métodos instrumentais de análise química. Ed. Edgard Blücher, Ed da Universidade de São Paulo. V2. 1972.