

PROJETO, CONSTRUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UM CROMATÓGRAFO A GÁS MINIATURIZADO

Resumo

Foi desenvolvido um projeto, descrito neste trabalho, de um cromatógrafo a gás miniaturizado, cujas aplicações não se restringem somente à pesquisa, mas também às análises de campo, treinamento de pessoal, aplicações didáticas, análise em laboratório e acoplamentos com outros instrumentos, entre outras. Neste trabalho são apresentadas as bases fundamentais para o desenvolvimento do projeto, de um injetor destinado a utilização em um minicromatógrafo a gás, o controle de temperatura para a coluna cromatográfica localizada dentro de um miniforno, o desenvolvimento e teste de um minidetector de ionização de chama e a montagem final de cada uma das peças desenvolvidas neste trabalho, além do software utilizado para controle dos parâmetros operacionais e da aquisição e tratamento dos dados cromatográficos.

Palavras-chave: instrumentação, miniaturização, mini G-C, cromatografia gasosa

Vitor Hugo Polisé Paccés,
Igor Renato Bertoni Olivares e
Fernando M. Lanças*

Universidade de São Paulo,
Instituto de Química de
São Carlos

* Autor para correspondência:
Cx. Postal 780
CEP 13560-970
São Carlos. SP
E-mail: flancas@iqsc.usp.br

Summary

It was developed a miniaturized gas chromatograph, whose applications are not limit only to research, but also includes field analysis, personnel training, didactic applications, laboratory analysis, among others. This work presents the fundamental bases for the development of this project, including a injector to be used in the mini gas chromatograph, the temperature control is discussed for the chromatographic column located inside of the mini oven, the development and test of a mini flame ionization detector (FID) and the final assembly is presented of each one of pieces developed in this work. In addition a software was developed to control the mini-GC as well as for data acquisition and treatment.

Keywords: instrumentation, miniaturization, mini-GC, gas chromatography

Evolução da Cromatografia

Basicamente, os dois principais problemas encontrados pela química analítica na determinação de quantidades pequenas de analitos são a precisão e a exatidão, principalmente quando tal necessidade está relacionada a uma matriz complexa. Neste caso, consideram-se os métodos cromatográficos como sendo a melhor alternativa para a separação e a identificação destes analitos. (1)

A cromatografia como ciência é considerada como havendo sido iniciada com um botânico russo, Michael Tswett. Em março de 1903, Tswett trabalhou com a separação de pigmentos de plantas relatando um método de separação no qual a extração de tais pigmentos consistia na passagem de um solvente através de um tubo contendo o extrato das plantas de interesse. O extrato localizava-se no topo da mesma e, em seu interior, havia um material pulverizado (carbonato de cálcio). O resultado obtido foi a separação dos pigmen-

tos em várias bandas. Ele denominou, assim, este método como sendo cromatografia, palavra essa derivada do grego ("kroma"+"graphia", o registro da cor).(2)

Em seu trabalho ("Adsorptionsanalyse und chromatografische Methode. Anwendungen auf die Chemie des Chlorophylls" – Análise da Adsorção e o Método Cromatográfico. Aplicações da Química da Clorofila), Tswett descreve o cromatograma (diferentes zonas dentro da coluna), e o seu desenvolvimento, utilizando diferentes solventes. Determinou a existência de diferentes zonas de coloração amarela (carotenóides) e sempre encontrou duas zonas verdes (Clorofila A e B). Seu maior competidor no estudo da clorofila, Willstätter, professor de química orgânica em Munich, obteve apenas uma zona por cristalização fracionada. Baseado somente no método clássico de purificação, Willstätter argumentou sobre a decomposição da clorofila durante o processo de ad-

sorção. Atualmente sabemos que Tswett estava certo sobre a existência de duas zonas distintas, as quais representavam, respectivamente, as duas formas diferentes de clorofila conhecidas. No entanto, o veredicto de Willstätter contribuiu para que a cromatografia fosse esquecida por cerca de 25 anos. (3)

Após este período, um pequeno avanço se deu com o conceito de eluição na cromatografia, o qual foi descrito em detalhes por Steiger e Reichstein, que utilizaram uma série de eluentes para eluir os componentes, subsequentemente evaporando-os e executando a análise quantitativa das frações individuais. (3)

Um avanço importante na área, porém, deu-se somente em 1941 por Martin e Synge, dois bioquímicos que estavam tentando melhorar a separação de aminoácidos. Desse modo, desenvolveram os fundamentos modernos da cromatografia líquida. O sistema cromatográfico desenvolvido utilizava um líquido sobre um suporte inerte, como fase estacionária, e um segundo líquido, como fase móvel.

Em 1952, Martin e James demonstraram a ocorrência da separação de ácidos carboxílicos voláteis e aminas, usando um gás como fase móvel. Iniciaram, assim, a definição de partição em cromatografia.

A eficiência e o poder de separação de uma coluna foram drasticamente alterados quando Golay propôs as colunas do tipo *open tubular*, também denominadas colunas capilares devido ao pequeno diâmetro quando comparadas às convencionais para a cromatografia gasosa utilizadas na época. (4)

Desde então, a eficiência esteve relacionada com o tipo da coluna (colunas empacotadas ou capilares) e diâmetro interno, tendendo sempre a diminuição desse diâmetro, preferindo-se as colunas tipo *open tubular*.

Assim, de uma maneira mais completa, um cromatógrafo pode ser estruturado como visto na Figura 1.

Este conjunto, denominado cromatógrafo, o qual aparenta ser um sistema simples, na realidade origina um aparelho relativamente complexo, grande e cuja mobilidade se torna

restrita, dificultando ou mesmo impossibilitando análises *in loco*. Além disso, devido às atuais configurações e dimensões do aparelho, é requerida uma grande quantidade de fase móvel, amostra, e em alguns casos modificadores químicos.

Ocorrendo a diminuição de todos ou parte dos sistemas envolvidos em um cromatógrafo, conseqüentemente poderiam ser reduzidos os volumes de amostra e da fase móvel requerida, criando assim, um sistema mais flexível com relação a sua utilização.

Outro tópico a ser levado em consideração é o avanço tecnológico de componentes para este fim e a miniaturização dos mesmos, além da redução das placas e circuitos eletrônicos para controle e aquisição de dados.

Apesar deste fato e das conhecidas vantagens advindas da miniaturização, os sistemas comercialmente disponíveis e aceitos são similares aos existentes há 30 anos, sem avanços notáveis nesta área. Os fornos dos cromatógrafos possuem dimensões compatíveis com as primeiras colunas empacotadas e não com as atuais colunas capilares de sílica, as quais são extremamente flexíveis e adaptáveis podendo, assim, assumir uma configuração menor e, conseqüentemente, ocupando um menor espaço físico e possibilitando a diminuição dos fornos dos cromatógrafos em questão.

Para corroborar com esta linha de pensamento, a miniaturização atualmente se estende também para a área de processamento da amostra compatibilizando, assim, ainda mais a idéia de se utilizar um sistema analítico completo em campo. Este sistema é envolvido desde o processo de extração e clean-up da amostra, passando por um sistema miniaturizado para a separação e identificação dos analitos, finalizando com o tratamento dos dados e impressão dos resultados obtidos.

Cenário Atual em Cromatografia

No âmbito comercial, os cromatógrafos disponíveis no mercado na sua maioria possuem características físicas (principalmente relacionadas à dimensão dos mesmos) que são

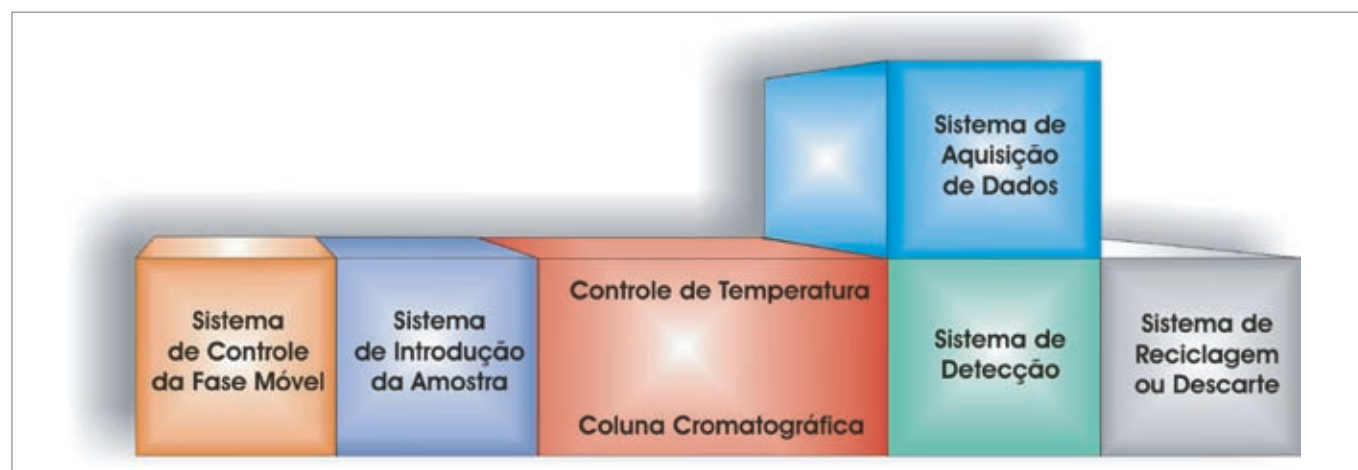


Figura 1. Esquema genérico de um cromatógrafo automatizado

comuns aos produzidos anos atrás. Isto pode ser observado analisando-se as especificações técnicas dos cromatógrafos disponíveis on-line no site de diferentes fabricantes.

Em contrapartida, existem inúmeras pesquisas destinadas a construção de cromatógrafos miniaturizados em microchips.

A proposta do equipamento construído é um cromatógrafo nacional de dimensões reduzidas, intermediárias entre as versões disponíveis comercialmente e os cromatógrafos em microchip. Para sua operação adequada foi desenvolvido um software, inteiramente em Português.

Objetivos Globais

Apresentados os princípios relativos à problemática sugerida são estabelecidos os seguintes objetivos globais:

- Construção de um cromatógrafo miniaturizado, com apelo nacional possuindo características dimensionais intermediárias entre os tradicionalmente disponíveis comercialmente e cromatógrafos em microchips.
- Avaliação de cada parte do cromatógrafo construído.

Introdução da Amostra

A introdução de amostras líquidas em cromatografia a gás tem sido um problema desde o início da utilização desta técnica em laboratórios de rotina, especialmente em cromatografia gasosa capilar, onde são colocadas quantidades extraordinariamente pequenas no dispositivo de introdução da amostra. Tal quantidade de amostra extremamente pequena deve ser introduzida com precisão e rapidamente, de maneira reprodutível, e no menor volume de gás possível. Este “plug” de gás deve ser transferido para a coluna sem qualquer perda por degradação, adsorção ou discriminação. É evidente que isto só pode ser alcançado empregando-se dispositivos muito sofisticados. Para análise rotineira de amostras líquidas, as principais técnicas de injeção disponíveis são: *split*, *splitless* e *on-column*, com ou sem Programação de Temperatura na Vaporização (PTV).

A análise cromatográfica propriamente dita, começa com a introdução da amostra na coluna. Com o desenvolvimento da cromatografia gasosa capilar, surgiram muitos problemas práticos relativos à técnica de injeção. Por exemplo, a técnica *on-column*, freqüentemente utilizada com colunas empacotadas, não é passível de utilização, com colunas capilares de pequenos diâmetros (e mais eficientes). Geralmente são limitadas a colunas de diâmetro interno até 0,32mm.

Algumas exigências gerais a serem preenchidas por uma boa técnica de injeção são:

- Deve ser possível obter a eficiência de separação ótima da coluna.
- Deve permitir injeções precisas e reprodutíveis de pequenas quantidades representativas de amostras.
- Não deve induzir nenhuma mudança na composição de

amostra. Não deve exibir discriminação baseado em diferenças do ponto de ebulição, polaridade, concentração ou estabilidade térmica/catalítica.

- Deve ser aplicável tanto na análise de traço, quanto para amostras não diluídas.

Construção do injetor

O injetor construído neste projeto possui como característica principal um tamanho reduzido capaz de comportar um liner de tamanho e material convencionais, disponível comercialmente. Este liner recebe duas cintas, capazes de suportarem as altas temperaturas, as quais estarão presentes no interior do injetor. A outra função destas cintas é a vedação da área interna do injetor onde será colocado o liner, forçando todos os fluidos a serem carregados para o interior da coluna através deste liner e somente por ele.

Para garantir o regime turbulento no interior do injetor, a entrada de gás de arraste é colocada perpendicularmente ao liner e à frente deste. Este regime turbulento é auxiliado, ainda, pela geometria interna do liner.

A correta vedação do injetor é mantida graças à câmara construída para a colocação de um septo. Esta câmara foi projetada para comportar septos de tamanho convencional, também disponíveis comercialmente.

Outra peculiaridade do injetor desenvolvido está relacionada à opção de executar os modos *split* e *splitless* de injeção, os quais são os mais utilizados com colunas capilares. Para tal, foi introduzida no injetor uma segunda câmara com um pórtico de saída conectado a uma válvula para o controle do fluxo garantindo-se, assim, a proporcionalidade do *split/splitless*. Esta saída para a linha de *split* localiza-se logo após o liner e antecede a entrada para a coluna cromatográfica.

O esquema mostrando as partes envolvidas na confecção do injetor é apresentado na Figura 2.

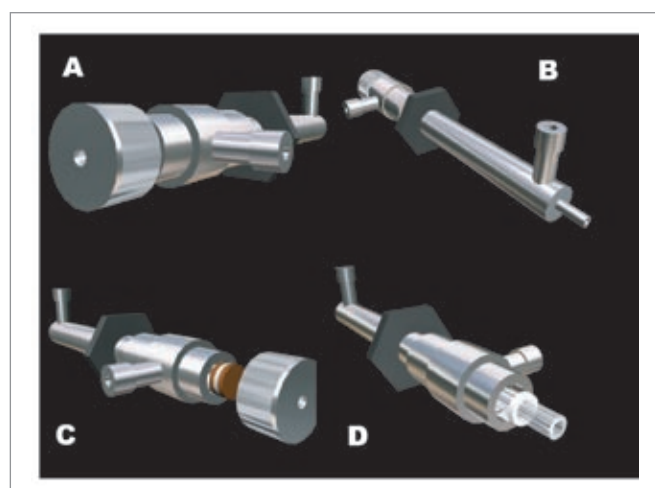


Figura 2. Injetor construído para a utilização com o cromatógrafo miniaturizado, com detalhes da localização do septo e liner. **A.** Visão frontal. **B.** Visão lateral. **C.** Visão lateral mostrando o compartimento do septo. **D.** Visão lateral mostrando a colocação do liner

Com a finalidade do injetor possuir um módulo de programação de temperatura (PTV), foi adicionada uma rotina independente para controle de temperatura. Foram utilizadas duas válvulas solenóides com ajuste fino para o controle dos fluxos; uma conectada à parte frontal do injetor (responsável por fornecer a fase móvel para a corrida cromatográfica) e outra na extremidade oposta (responsável por controlar a saída de fluidos pela saída de split).

Controle de Temperatura

O foco principal para a miniaturização de um cromatógrafo a gás é o controle de temperatura, uma vez que este é um dos mais importantes parâmetros utilizados para a correta configuração de uma análise cromatográfica.

O uso de controle de temperatura para o aumento da solubilidade da amostra, melhora na eficiência da coluna, assim como permite a redução da pressão e dos tempos de separação.

Nota-se que a programação de temperatura permite uma grande redução do tempo de análise de uma mistura complexa quando comparado a uma análise cromatográfica efetuada no modo isotérmico.

O controle de temperatura baseou-se inicialmente na construção de um aparato com dimensões reduzidas, desenvolvido para acomodar uma coluna cromatográfica padrão (coluna capilar de 25 metros de comprimento).

Tal aparato foi construído em alumínio para que seu peso influenciasse o menos possível no equipamento final. Além de servir como sistema base para controle de temperatura, uma nova funcionalidade foi adicionada: a de fornecer sustentação à coluna cromatográfica, a qual é mecanicamente frágil por ser constituída de sílica fundida.

Com um sistema em escalas reduzidas e apresentando um peso relativamente pequeno, fica evidente a sua portabilidade e, assim sendo, uma maior facilidade para transportá-lo para campo, executando análises “in-loco”.

As dimensões do aparato podem ser observadas através da Figura 3.

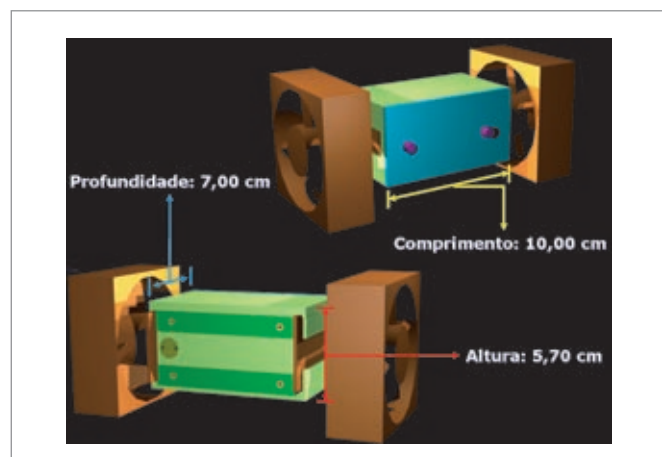


Figura 3. Dimensões do forno construído

Para o resfriamento do conjunto, foram adicionados ao sistema dois ventiladores. Estes são semelhantes aos utilizados em fontes elétricas para gabinetes de computadores. Os mesmos foram dispostos de maneira a forçarem o fluxo de ar em uma determinada direção agilizando, ainda mais, o resfriamento do forno. Este conjunto é controlado via software, o qual foi desenvolvido em Visual Basic, totalmente em português, para uso específico no minicromatógrafo. A tela de status do cromatógrafo (controle de temperatura e sensores) é vista na Figura 4.

Foi constatado que o algoritmo criado para o controle de temperatura é capaz de atender, de maneira adequada, os fins para os quais foi projetado.

O resultado mais importante deste projeto é, sem dúvida, o forno desenvolvido e seus acessórios como os componentes eletrônicos acoplados e, inclusive, o sistema de resfriamento (Figura 5).



Figura 4. Tela de Status do equipamento

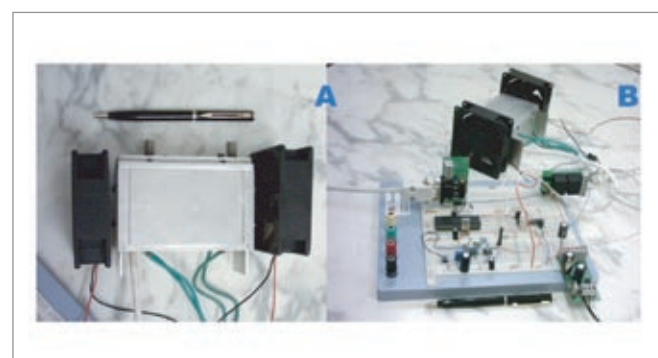


Figura 5. Fotos do forno cromatográfico, placa de controle e demais componentes. **A.** Vista superior do forno e sistema de resfriamento comparado com o tamanho de uma caneta. **B.** Vista geral do equipamento desenvolvido com ênfase no tamanho do sistema eletrônico, montado sobre um “protoboard”

Detector

Quando, em 1955-1956, os primeiros cromatógrafos a gás foram disponibilizados nos Estados Unidos, os mesmos utilizavam detectores de condutividade térmica. Tais detectores eram robustos, confiáveis e fáceis de serem utilizados. No entanto possuíam duas limitações principais:

- A primeira era relativa a restrição de uso. O hélio deveria, necessariamente, ser utilizado como gás de arraste (a fim de se obter um melhor desempenho); naquela época, o hélio estava praticamente indisponível fora dos Estados Unidos e, mesmo se conseguissem tal produto, o preço era extremamente elevado.
- A segunda limitação estava relacionada à sua sensibilidade ruim. Mesmo com a utilização de hélio, a sensibilidade era insuficiente para análise de amostras envolvendo compostos em baixas concentrações.

Em 1958, dois detectores de ionização foram introduzidos e mudaram completamente a situação: o Detector de Ionização de Argônio e o Detector de Ionização de Chama.

Porém, em poucos anos o Detector de Ionização do Argônio foi substituído pelo Detector de Ionização de Chama, o qual não necessitava de uma fonte radioativa, além de possuir melhor faixa de linearidade. Ao mesmo tempo, uma modificação no Detector de Ionização de Argônio, deu origem ao então denominado Detector de Captura de Elétrons (ECD).

O Detector de Ionização de Chama, devido a sua sensibilidade elevada, resposta previsível e faixa linear estendida, rapidamente transformou-se no detector mais amplamente utilizado em Cromatografia Gasosa, incluído em quase todo cromatógrafo a gás produzido.

Hoje existem poucos cromatógrafo a gás sem um detector de ionização de chama. Nos primeiros 15 anos de sua existência, mais de 60 000 detectores foram manufaturados sob a licença do ICI.

O detector escolhido e construído para o minicromatógrafo foi, neste projeto, um detector de ionização de chama (FID), baseado em um projeto anterior desenvolvido no Laboratório de Cromatografia.

Este detector é totalmente modular, sendo composto por diversas partes, incluindo: Base, Misturador de Gases, "Jet", Queimador e Coletor. A coluna cromatográfica é conectada à base do detector através de um pequeno orifício.

Usualmente é utilizado o hidrogênio como gás de arraste; no entanto o fluxo é muito baixo nas colunas capilares; assim, são fornecidas entradas para gases "make-up", responsáveis por atingir o fluxo ideal para este detector. Os mesmos são fornecidos diretamente ao misturador de gases, localizado logo acima da entrada do detector.

O coletor é responsável pela captura dos íons formados na queima dos gases. É fornecida para o coletor uma carga positiva (corrente contínua) e a carcaça do detector recebe uma carga negativa. Este procedimento força os íons formados a serem atraídos para o coletor transferindo, assim, a

alteração da corrente através do cabo mencionado anteriormente, para esta última ser registrada.

Uma vez montado, o mesmo é conectado ao forno contendo a coluna cromatográfica.

Valores obtidos diretamente do aparelho são tratados através do programa desenvolvido, o qual pode ser integrado com outros programas criados anteriormente pelos autores deste trabalho.

Como resultado principal desta etapa do projeto, obteve-se um detector robusto, capaz de atender as características necessárias para a correta operação em conjunto com as demais partes do cromatógrafo.

Trata-se de um dispositivo compatível com o tamanho reduzido do cromatógrafo. (Figura 6).

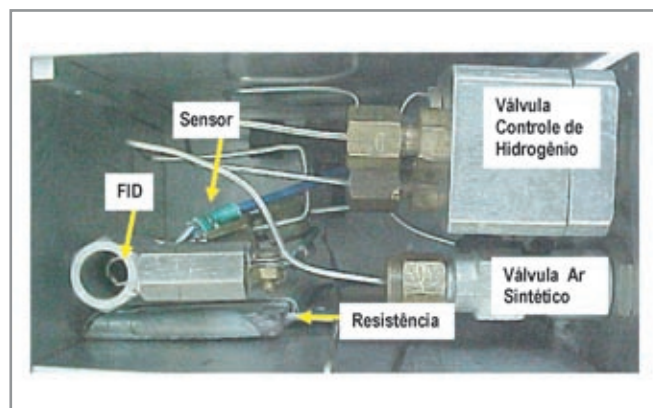


Figura 6. Instalação do detector criado (Vista Superior)

Para se verificar a resposta apenas do detector, foram utilizadas inserções diretas de compostos no mesmo, com o auxílio de uma microsseringa.

Assim, obteve-se, também utilizando a maior amplificação eletrônica possível, o cromatograma representativo ilustrado na Figura 7, através de sucessivas inserções diretas de metanol no detector.

É importante observar a imediata resposta do detector quando da queima do metanol, o que resulta num sinal o qual estoura a máxima voltagem estabelecida (5000 mV), devido a alta concentração do composto. Mesmo assim, injetando-se elevadas concentrações com a intenção de saturar o sinal, o retorno do mesmo à linha de base é imediato, estabilizando-a quase que momentaneamente.

Por se tratar de uma resposta rápida, é possível comprovar que a aquisição realizada não é afetada pelo processamento dos dados ao longo de uma corrida cromatográfica.

O detector construído, bem como, as demais partes que o constituem, sejam elas hardware ou software, são comprovadamente compatíveis com o projeto elaborado. Os resultados alcançados satisfazem as necessidades e, portanto, podem ser incluídos num cenário maior: a análise cromatográfica de diferentes analitos.

O minicromatógrafo desenvolvido está sendo aprimorado a partir das aplicações diversas às quais está sendo submetido. Os resultados práticos possibilitarão uma maior adequação de seus vários componentes de forma a atender o mais amplo universo possível das análises efetuadas através da cromatografia gasosa.

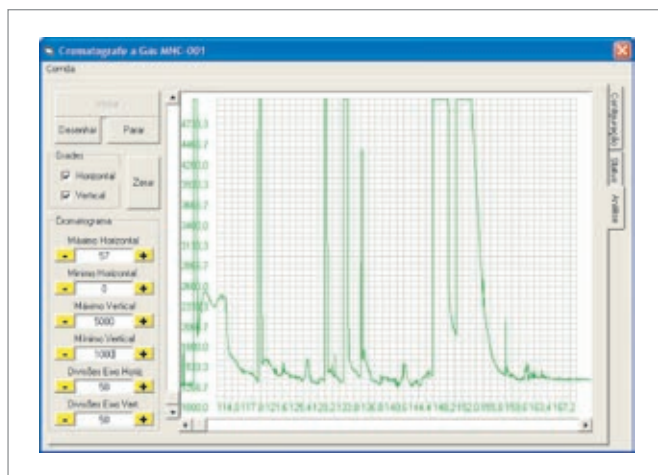


Figura 7. Resposta obtida através da aquisição de dados provenientes do detector pelo programa criado quando da inserção direta de diferentes concentrações de metanol no FID

Referências

1. LANÇAS, FM. *The Role of the Separation Sciences in the 21st Century*, **J. Braz. Chem. Soc.**, 14, 2, 183-197. 2003
2. SMITH, RM. **Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry**, John Wiley & Son Ltd., 1988, 402 p.
3. Engelhardt, H. *One Century of Liquid Chromatography. From Tswett's Columns To Modern High Speed And High Performance Separations*. **J. Chromatogr. B.** 800, 2004.
4. GOLAY, MJE. *Theory And Practice Of Gas-Liquid Partition With Coated Capillaries*, **Gas Chromatography**, 1957.
5. CHIEM, N; SHULTZ, LL; ANDERSON, P; SKINNER, C; HARRISON, D. *Room Temperature Bonding Of Micromachined Glass Devices For Capillary Electrophoresis*. **J. Chromatogr. B.** 63. 2000.
6. HASHIMOTO, M; KAZUHIKO, T; RIICHIRO, N; KAZUO, K; AKIHIRO, A. *Microchip Capillary Electrophoresis Using On-Line Chemiluminescence Detection*. **J. Chromatogr. A.** 867. 2000.
7. JIANG, G; ATTIYA, S; OCVIRK, G; LEE, W; HARRISON, DJ. *Red Diode Laser Induced Fluorescence Detection with a Confocal Microscope on a Microchip For Capillary Electrophoresis*. **J. Chromatogr. B.** 14. 2000.
8. ALTRIA, KD. *Overview of Capillary Electrophoresis and Capillary Electrochromatography*. **J. Chromatogr. A.** 856. 2000.
9. SOPER, SA; FORD, SM; XU, Y; QI, S; McWHORTER, S; LASSITER, S; PATTERSON, D; BRUCH, R. *Nanoliter-Scale Sample Preparation Methods Directly Coupled to Polymethylmethacrylate-Based Microchips and Gel-Filled Capillaries for the Analysis of Oligonucleotides*. **J. Chromatogr. A.** 853. 1999.
10. FANG, Q; WANG, FR; WANG, SL; LIU, SS; XU, SK; FANG, ZL. *Sequential Injection Sample Introduction Microfluidic-Chip Based Capillary Electrophoresis System*. **Anal. Chim. Acta.** 390. 1999.