

## FLUIDOS SUPERCRÍTICOS EM QUÍMICA ANALÍTICA. I. CROMATOGRAFIA COM FLUIDO SUPERCRÍTICO: CONCEITOS TERMODINÂMICOS

Emanuel Carrilho, Maria Cecília H. Tavares e Fernando M. Lanças\*

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, CP 780, 13560-970 São Carlos - SP

Recebido em 15/6/00; aceito em 22/11/00

**SUPERCRITICAL FLUID IN ANALYTICAL CHEMISTRY. I. SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY: THERMODYNAMIC DEFINITIONS.** Under the chromatographic point of view, the physico-chemical properties of a supercritical fluid are intermediate to those of the gases and liquids. Many times they approach the best features of each one, as for example, the solubilization power of liquids and low viscosity of gases. The thermodynamic definitions and main physico-chemical features of a supercritical fluid will be presented in this article. The use of supercritical fluids in analytical chemistry has been extremely modest in Brazil, even considering the enormous potential of their applications, and their use in several techniques, such as chromatography (SFC) and supercritical fluid extraction (SFE). This article series is intended to discuss the historical evolution, instrumentation features and potential and limitations of the supercritical fluid use in analytical chemistry. A special focus will be centered on chromatography and extraction techniques using supercritical fluids.

Keywords: supercritical fluid; supercritical fluid chromatography; thermodynamic definitions.

### INTRODUÇÃO

Apesar da descoberta do grande poder de solubilização dos fluidos supercríticos ter ocorrido no final do século XIX<sup>1</sup>, seu uso em química, e particularmente em química analítica, somente se verificou quase um século depois, no final do século XX<sup>2</sup>. Ainda assim, o uso de fluidos supercríticos em química analítica tem sido extremamente modesto no Brasil, fato não justificado considerando-se o enorme potencial de aplicação dos mesmos em várias técnicas, destacando-se a cromatografia com fluido supercrítico (SFC, do inglês supercritical fluid chromatography) e a extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês supercritical fluid extraction). Nesta série de artigos pretende-se discutir a evolução histórica, principais características, instrumentação, potencial e limitações do uso de fluidos supercríticos em química analítica, principalmente as técnicas de cromatografia e extração com fluido supercrítico.

Quando um composto é confinado em um espaço determinado, gás e líquido estão em equilíbrio entre si. Aquecendo-se o sistema, as propriedades intrínsecas de ambos convergem para um mesmo ponto até serem idênticas (por exemplo, densidade, viscosidade, índice de refração, condutividade térmica, etc.). Este ponto é denominado ponto crítico<sup>3</sup>, e nele acaba-se a interface gás/líquido, pois a partir deste ponto encontra-se uma única fase supercrítica. Fluido supercrítico é portanto toda substância que se encontrar em condições de pressão e temperatura superiores aos seus parâmetros críticos. Essa região é melhor visualizada no diagrama de fases da Figura 1.

Hannay e Hogarth<sup>1</sup> foram os primeiros a descobrir o grande poder de solvatação dos fluidos supercríticos quando estudaram a solubilidade de cloretos metálicos em etanol supercrítico. Apenas 10 anos após o advento da cromatografia gasosa por James e Martin<sup>4</sup> em 1952, a utilização de fluidos no estado supercrítico foi postulada e demonstrada por Klesper, Corwin e Turner<sup>5</sup>.

Sob o ponto de vista cromatográfico, as propriedades físico-químicas de um fluido supercrítico são intermediárias àquelas dos gases ou dos líquidos e, muitas vezes, se aproximam às melhores características de cada um como, por exemplo, o

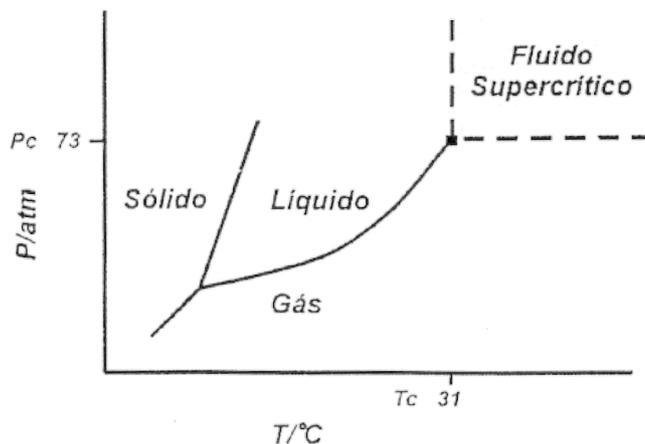


Figura 1. Diagrama pressão / temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição de região supercrítica para o CO<sub>2</sub>; T<sub>c</sub>: temperatura crítica; P<sub>c</sub>: pressão crítica.

alto poder de solvatação de um líquido e a baixa viscosidade de um gás.

As definições termodinâmicas e principais características físico-químicas de um fluido supercrítico serão discutidas a seguir.

### EVOLUÇÃO HISTÓRICA

O desenvolvimento e a consolidação da cromatografia com fluido supercrítico tem sido precedida de vários desenvolvimentos maiores na tecnologia de separação. Em 1952, James e Martin<sup>4</sup> introduziram a cromatografia gás-líquido. Pouco depois, Golay<sup>6</sup> introduziu o uso de colunas de tubo aberto (capilares) em cromatografia gasosa, re-escrevendo algumas equações clássicas em cromatografia. Devido à baixa viscosidade da fase móvel gasosa e à baixa resistência ao fluxo apresentadas pelas colunas tubulares abertas, uma pequena queda de pressão foi observada através de toda extensão da coluna capilar. Então, colunas de grande comprimento puderam ser utilizadas, gerando um elevado número de pratos teóricos, o que passou a permitir a análise de amostras mais complexas.

Desde sua introdução nos anos 50 a cromatografia gasosa (GC, do inglês gas chromatography) teve grande aceitação para análises de compostos orgânicos voláteis. A busca de fases móveis líquidas para análise de compostos não voláteis e polares em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, mais conhecida como HPLC, do inglês high performance liquid chromatography) começou em meados de 1960. Com base nos princípios de partição líquido-líquido descritos por Martin e Synge<sup>7</sup> e na cromatografia de adsorção desenvolvida por Tswett<sup>8</sup>, a HPLC apresenta a vantagem do aumento da força de solvatação na separação de compostos antes não separáveis por GC. Os aspectos básicos em separações envolvendo HPLC podem ser encontrados na obra clássica de Snyder e Kirkland<sup>9</sup>.

A principal diferença entre cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) provém da dissimilaridade existente na densidade dos gases e líquidos, respectivamente empregados como fase móvel. A baixa densidade dos gases, em contraste com a alta densidade dos líquidos, resulta em um maior coeficiente de difusão, conduzindo a uma maior eficiência e a análises mais rápidas. Por outro lado, os gases possuem poder de solvatação limitado devido a sua baixa densidade, não podendo ser usados em análises de compostos não voláteis<sup>10</sup>.

Admitindo a necessidade de uma fase móvel com características físico-químicas intermediárias entre gases e líquidos, Klesper, Corwin e Turner<sup>5</sup> postularam e demonstraram a praticabilidade do uso de fluido supercrítico como fase móvel. Sie e Rijnders<sup>11-14</sup> desenvolveram extensa pesquisa sobre a nova técnica, onde avaliaram alguns parâmetros cromatográficos em diferentes sistemas.

Em 1981 Lee e Novotny<sup>2</sup> introduziram as colunas capilares em SFC. Isto desenvolveu a técnica de colunas recobertas com filme imobilizado, visto que um dos primeiros problemas encontrados pelos pioneiros foi a extração do filme líquido do suporte estacionário em colunas empacotadas (ou recheadas). Outra vantagem mostrada pelos autores foi a utilização da programação de pressão/densidade em sistemas de colunas de tubo aberto, pois este não apresenta o efeito adverso da queda de pressão observado em colunas empacotadas.

A combinação destes e outros avanços em cromatografia, em conjunto com o aprimoramento da instrumentação e de sistemas de alta pressão, tornaram viável a SFC.

## ASPECTOS TEÓRICOS E TERMODINÂMICOS

As propriedades termodinâmicas de um gás podem ser representadas por uma equação de estado a qual fornece o volume em função da temperatura e da pressão. O comportamento volumétrico real de gases a altas pressões é algo complexo, tornando difícil a obtenção de uma equação que o expresse. A equação de estado de Virial é a que permite uma melhor aproximação desse comportamento real<sup>11</sup>.

$$PV = A + \frac{B'}{V} + \frac{C'}{V^2} + \frac{D'}{V^3} + \dots \quad (1)$$

A equação (1) representa a forma genérica da equação de Virial sendo A seu primeiro coeficiente, B' o segundo coeficiente de Virial e assim por diante, onde cada coeficiente é função da temperatura. Outra maneira de expressar a equação (1) é na forma de uma série positiva de potências de pressão (P), que é mais conveniente para nossos propósitos,

$$PV = A + BP + CP^2 + DP^3 + \dots \quad (2)$$

sendo o termo A a mesma quantidade nas duas equações; o primeiro coeficiente de Virial (A) é justamente o termo correspondente a lei dos gases perfeitos. Assim, a equação [2] pode ser escrita como

$$PV = RT + BP + CP^2 + DP^3 + \dots \quad (3)$$

Em 1907 Berthelot<sup>15</sup> propôs a seguinte equação de estado

$$PV = RT + \left[ \frac{9RT_c}{128P_c} \left( 1 - 6 \frac{T_c}{T} \right) \right] P \quad (4)$$

onde  $P_c$  é a pressão crítica e  $T_c$  a temperatura crítica de um gás. Neste caso, o termo entre colchetes representa o segundo coeficiente de Virial, o termo B na equação (2).

## Continuidade entre as fases gás/líquido: o "Ponto Crítico"

A descoberta do fenômeno do ponto crítico e suas implicações contribuíram muito para o entendimento da relação entre um líquido e o seu vapor. Andrews<sup>16</sup> encontrou que a condensação ordinária de um vapor ou a evaporação de um líquido envolve uma descontinuidade entre as duas fases; todavia é possível passar de líquido a vapor, ou do vapor para o líquido, por um processo no qual a substância permanece perfeitamente homogênea. Assim, se um líquido sob alta pressão é aquecido acima de seu ponto crítico, e a pressão for reduzida isotermicamente até um valor baixo, a substância passará por imperceptíveis etapas do líquido para o vapor.

Na Figura 2 é mostrado um diagrama Pressão/Volume, onde cada curva representa uma isoterma. Na temperatura mais adequada (curva mais distante dos eixos) o gás é praticamente perfeito e a curva aproxima-se de uma hipérbole regular. A medida em que diminui-se a temperatura, os desvios da lei dos gases perfeitos tornam-se cada vez mais pronunciados até alcançar-se o ponto C, no qual a inclinação assume valor zero, uma vez que  $dP/dV = 0$ . Este é o denominado ponto crítico (por exemplo, para o  $\text{CO}_2$   $T_c = 31,3^\circ\text{C}$  e  $P_c = 72,9$  atm). Abaixo deste ponto, são encontradas duas fases capazes de coexistência e duas curvas separadas são determinadas experimentalmente, na mesma temperatura: uma pela mudança do volume do líquido com a pressão e a outra pela mudança do volume do gás com a pressão<sup>3</sup>.

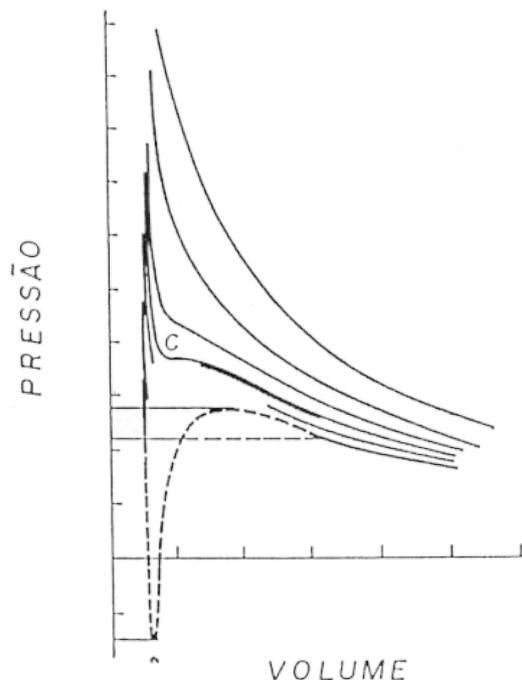


Figura 2. Isotermas de variação do volume molar com a pressão. (adaptado da referência 3).

### Efeito da Pressão sobre o Coeficiente de Partição (K).

O coeficiente de partição em cromatografia gás/líquido (K) é definido como sendo a relação entre a quantidade de soluto por unidade de volume de fase estacionária pela quantidade de soluto por unidade de volume da fase móvel, ou seja,

$$K = \frac{C_{fe}}{C_{fm}} \quad (5)$$

onde:  $C_{fe}$  é a concentração do analito na fase estacionária e  $C_{fm}$  é a concentração do analito na fase móvel

A mudança na pressão do fluido de arraste pode alterar este coeficiente de três modos:

- 1) Interação entre moléculas do fluido de arraste e moléculas do soluto,
- 2) Efeito da pressão “mecânica” sobre a fase estacionária,
- 3) Solubilização do fluido de arraste no filme líquido, alterando sua natureza.

A medida do desvio do comportamento de gás perfeito para o sistema binário fluido de arraste/soluto é o segundo coeficiente de virial,  $B_{nm}$ , o qual pode ser descrito como uma função quadrática da composição<sup>11</sup>

$$B_{nm} = (1-y)^2 B_{11} + 2y(1-y) B_{12} + y^2 B_{22} \quad (6)$$

onde  $y$  é a fração molar do componente 2,  $B_{11}$  e  $B_{22}$  (coeficientes de dois gases puros) são funções somente de temperatura e forças entre os pares de moléculas 1,1 e 2,2, e  $B_{12}$  é uma função idêntica para forças entre 1,2. A interação entre gás de arraste e soluto pode ser descrita pelo segundo coeficiente de virial através de  $B_{12}$ .

Para uma fase gasosa não ideal, o relacionamento entre volume ( $V_g$ ), número de moles ( $n_g$ ), pressão (P) e temperatura (T) pode ser escrito como

$$\frac{V_g}{n_g} = \frac{RT}{P} + B_{nm} = \frac{RT}{P} \left( 1 + \frac{P}{RT} B_{nm} \right) \quad (7)$$

Partindo da equação [7], Sie e Rijnders<sup>11</sup>, através de aproximações e rearranjos, chegaram na expressão

$$\ln K_P = \ln K_{P_0} + \frac{P - P_0}{RT} (2B_{12} - V_2) \quad (8)$$

onde  $P_0$  é uma pressão de referência, de escolha arbitrária (por exemplo 1 atm), na qual pode-se considerar o gás como perfeito, P é uma determinada pressão de trabalho e  $V_2$  o volume molar do soluto no líquido. O termo  $B_{12}$  não é disponível experimentalmente, mas pode ser obtido através do princípio da correspondência dos estados, podendo ser escrito<sup>11</sup>

$$\frac{B}{V^*} = \varphi \left( \frac{T}{T^*} \right) \quad (9)$$

onde  $\varphi$  é uma função universal válida para todas as substâncias,  $V^*$  e  $T^*$  são o volume e a pressão característicos para os quais geralmente são adotados os valores críticos. Para uma mistura binária, a equação (9) pode ser escrita como

$$\frac{B_{12}}{V_{12}^*} = \varphi \left( \frac{T}{T_{12}^*} \right) \quad (10)$$

onde  $\varphi$  é a mesma função anterior.

Várias funções tem sido propostas na literatura, sendo duas delas amplamente utilizadas por Sie e Rijnders<sup>11-12</sup>.

$$\frac{B_{12}}{V_{12}^*} = 0,438 - 0,881 \left( \frac{T_{12}^*}{T} \right) - 0,757 \left( \frac{T_{12}^*}{T} \right)^2 \quad (11)$$

e

$$\frac{B_{12}}{V_{12}^*} = 0,461 - 1,158 \left( \frac{T_{12}^*}{T} \right) - 0,503 \left( \frac{T_{12}^*}{T} \right)^3 \quad (12)$$

Utilizando-se portanto de equações estabelecidas, é possível calcular o segundo coeficiente de Virial e estimar com boa precisão o volume de fluido em função da temperatura e pressão.

### PARÂMETROS DE OPERAÇÃO

#### Propriedades de um Fluido Supercrítico

Quando um composto é confinado em um espaço determinado, a fase líquida e o seu vapor coexistem em equilíbrio. Aquecendo-se o sistema, as propriedades intensivas convergem até serem idênticas no ponto crítico (p.ex., densidade, viscosidade, condutividade térmica, índice de refração e outros). O ponto crítico marca a temperatura mais alta de coexistência de duas fases. Novo aquecimento resultará numa fase supercrítica. Na Tabela 1 são listados os parâmetros críticos de alguns fluidos e na Tabela 2 é mostrada uma comparação entre as propriedades físico-químicas de maior interesse cromatográfico, para melhor visualização da potencialidade da técnica<sup>10</sup>.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos de alguns compostos.

| Fluido                  | F.M.                             | Tc (°C) | Pc (atm) | $\rho_c$ (g/mL) |
|-------------------------|----------------------------------|---------|----------|-----------------|
| Dióxido de Carbono      | CO <sub>2</sub>                  | 31,3    | 72,9     | 0,47            |
| Óxido Nitroso           | N <sub>2</sub> O                 | 36,5    | 71,7     | 0,45            |
| n-Pentano               | C <sub>5</sub> H <sub>12</sub>   | 196,6   | 33,3     | 0,23            |
| Hexafluoreto de Enxofre | SF <sub>6</sub>                  | 45,5    | 37,1     | 0,74            |
| Xenônio                 | Xe                               | 16,6    | 58,4     | 1,10            |
| Metanol                 | CH <sub>3</sub> OH               | 240,5   | 78,9     | 0,27            |
| Isopropanol             | C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH | 235,3   | 47,0     | 0,27            |

F.M.= Fórmula Molecular, Tc = Temperatura Crítica, Pc = Pressão Crítica e  $\rho_c$  = Densidade Crítica.

**Tabela 2.** Propriedades físicas de gás, líquido e fluido supercrítico.

| Propriedade           | Unidades             | Gás               | Líquido    | Fluido Supercrítico |
|-----------------------|----------------------|-------------------|------------|---------------------|
| Densidade ( $\rho$ )  | g/mL                 | $10^{-4}/10^{-3}$ | $\cong 1$  | 0,2/0,9             |
| Difusibilidade (D)    | cm <sup>2</sup> /sec | $10^{-2}/1$       | $<10^{-5}$ | $10^{-4}/10^{-3}$   |
| Viscosidade( $\eta$ ) | poise                | $\cong 10^{-4}$   | $10^{-2}$  | $10^{-4}/10^{-3}$   |

A densidade de um fluido supercrítico é maior que a dos gases e muito próxima a dos líquidos. Existe um relacionamento direto entre a densidade de um fluido supercrítico e seu poder de solvatação a qual, devido à sua alta compressibilidade, é extremamente dependente da pressão. Por exemplo a variação de 1 mmHg é suficiente, sob certas condições, para causar um aumento de 10% na densidade<sup>17</sup>. Consequentemente, a programação de pressão é uma ferramenta importantíssima para auxiliar na separação de misturas complexas. A viscosidade do

fluido supercrítico é muito similar a dos gases; com isso a queda de pressão através da coluna é diminuída em relação à observada em LC. Os coeficientes de difusão dos solutos são maiores em fluidos supercríticos que nos líquidos, porém é menor que nos gases. Então, a transferência de massa é mais rápida em fluidos supercríticos que em fases móveis líquidas. Isto significa uma maior eficiência por unidade de tempo, velocidade linear ótima mais rápida ( $\mu_{ot}$ ), e tempos de análises menores em SFC que em LC.

Qualquer composto termicamente estável pode ser submetido às suas condições supercríticas e, portanto, servir como fase móvel. Na prática, são feitas outras considerações tais como poder de solvatação, seletividade, estabilidade térmica do solvente e do soluto nas condições supercríticas, além de problemas mecânicos com o aumento demasiado da pressão. Por exemplo, o uso de álcool como eluente sobre uma fase estacionária de sílica pode causar uma desidratação parcial do mesmo, resultando na olefina correspondente<sup>18</sup>.

### Solubilidade do Solute na Fase Móvel

As primeiras pesquisas com SFC, ainda sob o título de Cromatografia Gasosa de Alta Pressão, surgiram com a separação de quelatos metálicos por GC, que na maioria dos casos eram termicamente instáveis e apresentavam baixa volatilidade nos sistemas disponíveis. Klesper et al.<sup>5</sup> mostraram que porfirinatos de níquel podiam ser separados em sistemas de alta pressão utilizando diferentes gases freons como fase móvel; cada gás apresentou suas próprias condições de separação.

Karayannis et al.<sup>19</sup> compararam a baixa volatilidade de alguns quelatos metálicos em sistema convencional de GC e, posteriormente, mostraram a eluição dos mesmos em sistema de alta pressão em termos de retenção relativa dos compostos. Este trabalho confirmou as conclusões do trabalho anterior<sup>5</sup> onde os efeitos obtidos sobre a volatilidade foram causados pela ação do solvente e não somente pela pressão, pois muitos gases altamente pressurizados não conseguiram obter a volatilização alcançada pelo diclorodifluorocarbono.

Baseados nos parâmetros de solubilidade de Hildebrand ( $\delta$ ), Giddings et al.<sup>20</sup> descreveram o poder de solvatação de gases sob alta pressão (e não volatilização de espécies como descrito por Klesper) mostrando que  $\delta$ , a principal variável do "efeito de estado", é proporcional à densidade do fluido:

$$\delta = 1,25 P_c^{1/2} [\rho_r / \rho_{r(liq.)}] \quad (13)$$

onde  $\delta$  está em cal cm<sup>-3</sup>,  $P_c$  em atm, e  $\rho_{r(liq.)}$ , a densidade reduzida dos líquidos. O "efeito de estado" pode ser identificado pelo termo  $[\rho_r / \rho_{r(liq.)}]$  enquanto que o fator  $1,25 P_c^{1/2}$  pode ser associado ao "efeito químico". Giddings et al.<sup>20</sup> mostraram ainda alguns valores de pressão nos quais vários compostos de elevada massa molecular não apresentavam migração na coluna até que se atingisse determinada "pressão limite".

Para se ter uma idéia de como a densidade influencia no poder de solvatação (ou o  $\delta$ ), o CO<sub>2</sub>, o qual em condições normais de T e P é um gás apolar, sob altas pressões apresenta um  $\delta$  igual ao da piridina, que é dos mais elevados entre os solventes líquidos.

Na Figura 3 é mostrado o efeito da pressão e da temperatura de um fluido supercrítico sobre a solubilidade. Nota-se que à baixas pressões, a solubilidade diminui com o aumento da temperatura.

### Seletividade

A seletividade em SFC é o parâmetro cromatográfico que permite as maiores possibilidades de alteração para que seja possível a eluição e separação das espécies a serem analisadas. Alguns itens que podem modificar a seletividade são: fase móvel, fase estacionária, temperatura, pressão de trabalho,

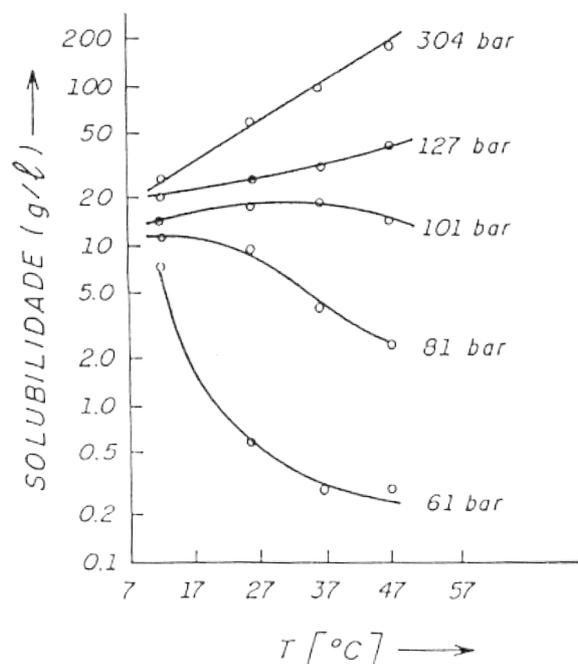


Figura 3. Solubilidade de naftaleno em etileno supercrítico (1 atm = 1,013 bar). (adaptado da referência 22)

programação de pressão durante a eluição, e adição de modificadores tanto de modo programado como isocrático.

Um dos estudos mais detalhados sobre a seletividade com diferentes combinações de fase móvel/estacionária foi feito por Sie e Rijnders<sup>11-14</sup>, onde foi observada a alteração da sequência de eluição de alguns compostos em função destes parâmetros.

Com a adição de modificadores de fase móvel, pode-se conseguir mudar totalmente as características do fluido supercrítico, e os novos parâmetros críticos podem ser determinados, com boa aproximação, por

$$T_c = \chi_a T_a + \chi_b T_b \quad (14)$$

$$P_c = \chi_a P_a + \chi_b P_b \quad (15)$$

Onde  $\chi_a$  e  $\chi_b$  são frações molares,  $T_a$  e  $T_b$  suas temperaturas críticas e  $P_a$  e  $P_b$  suas pressões críticas<sup>21</sup>, dos solventes a e b, respectivamente.

### Razão de Fluxo

Em um sistema de HPLC normal costuma-se controlar o fluxo da fase móvel tornando a pressão do sistema uma variável dependente. Em SFC invertem-se estes parâmetros. Com o controle da pressão o fluxo varia proporcionalmente afetando a separação de diferentes maneiras. Schmitz e Klesper<sup>22</sup> afirmaram que a fluxos baixos ( $\leq 1,0$  mL/min), a função de resolução,  $Q$ , era praticamente constante e a fluxos maiores decrescia rapidamente.

Gouw e Jentoft<sup>18,23</sup> citaram uma observação feita por Giddings<sup>24</sup> onde o mínimo da curva de van Deemter, a qual relaciona a altura equivalente a um prato (AEP ou H) em função da velocidade linear média,  $\mu$ , era muito próximo ao valor

$$\mu_{ot} = \frac{D_M}{dp} \quad (16)$$

sendo  $\mu_{ot}$  = velocidade linear ótima;  $D_M$  = coeficiente de difusão;  $dp$  = diâmetro médio do material de empacotamento (recheio)

Neste estudo<sup>23</sup>, compararam-se diferentes tamanhos de partículas, avaliando-se a variação H e a queda de pressão ( $\Delta P$ ) através da coluna em função do fluxo. A queda de pressão é um efeito indesejável em qualquer modalidade de cromatografia, ainda mais em SFC onde a base da separação cromatográfica está no controle da pressão. Se o aumento de pressão causa uma melhor solvatação, pode causar também uma grande queda de pressão através da coluna e, com isso, diminuir a densidade. O aumento da pressão aumenta a velocidade linear a qual, por sua vez, faz com que H aumente (perda de resolução)<sup>25</sup>.

Procurando sanar o problema da queda de pressão com o aumento do fluxo, Hirata e Nakata<sup>26</sup> apresentaram um bom sistema dotado de duas bombas de pressurização, uma antes e outra depois do sistema injetor/coluna/detector. Neste sistema foi possível uma programação de pressão sem aumento do fluxo ou da queda de pressão.

### Temperatura

O efeito da influência da temperatura sobre o comportamento cromatográfico pode ser analisado sob duas condições: uma a pressão constante e outra sob densidade constante. À densidade constante, a dependência do fator de retenção (k) com a temperatura pode ser calculada por uma equação termodinâmica (equação de Van't Hoff)<sup>27</sup>.

$$\left( \frac{d \ln k}{d 1/T} \right)_p = - \frac{\Delta H_T^0}{R} \quad (17)$$

onde  $\Delta H_T^0$  é a entalpia para transição do soluto entre a fase móvel e estacionária, e R é a constante dos gases.

À pressão constante, a influência da temperatura não pode ser tratada de uma maneira tão simples. Em um de seus trabalhos, Sie e Rjinders<sup>13</sup> fizeram uma extensa investigação sobre este assunto. Para a maioria dos solventes, partindo-se da temperatura ambiente, observa-se um decréscimo de k com o aumento de temperatura, devido ao aumento da solubilidade do soluto. Depois da passagem da temperatura crítica, ocorre um aumento considerável de k. Esse aumento é mais pronunciado para pressões próximas ao ponto crítico e para compostos de elevada massa molecular. A pressões mais elevadas, a curva passa por um máximo, a partir do qual retorna aos níveis observados em temperaturas menores. Qualitativamente isto pode ser explicado pelo aumento do volume livre da fase móvel a qual leva uma redução na solubilidade e um desvio na partição em favor da fase estacionária<sup>28</sup>. Com aumento da temperatura, a pressão de vapor e a solubilidade do soluto aumentam e a concentração na fase estacionária decresce, sendo transferida para a fase móvel (reduzindo, assim, o valor de k). A combinação destes efeitos pode levar a situações curiosas como mostrado na Figura 4, onde uma mudança na ordem de eluição foi observada. Esse tipo de comportamento pode ser explorado para resolução de problemas analíticos, mas a dependência de pressão/temperatura/densidade estão totalmente relacionadas entre si, e a escolha na faixa de operação é crítica, como pode ser visto na Figura 5.

Como mencionado, gráficos de fator de retenção (k) contra temperatura em SFC são caracteristicamente formados com um pronunciado máximo acima da temperatura crítica. A variação de  $\log(k)$  com  $1/T$  para uma série homóloga é mostrada na Figura 6, onde a distância entre as curvas em determinado valor de  $1/T$  representa a seletividade ( $\alpha$ ), e mostra que uma pequena variação na seletividade entre homólogos é possível com uma pequena mudança na temperatura<sup>29</sup>. Para compostos diferentes o cruzamento de curvas é possível e demonstra uma reversão na ordem de eluição (como ilustrado na Figura 4).

Chester e Innis<sup>30</sup> explicaram termodinamicamente a variação de  $\log(k)$  com  $1/T$  em SFC. Na Figura 7, a região de inclinação positiva corresponde a um comportamento tipo

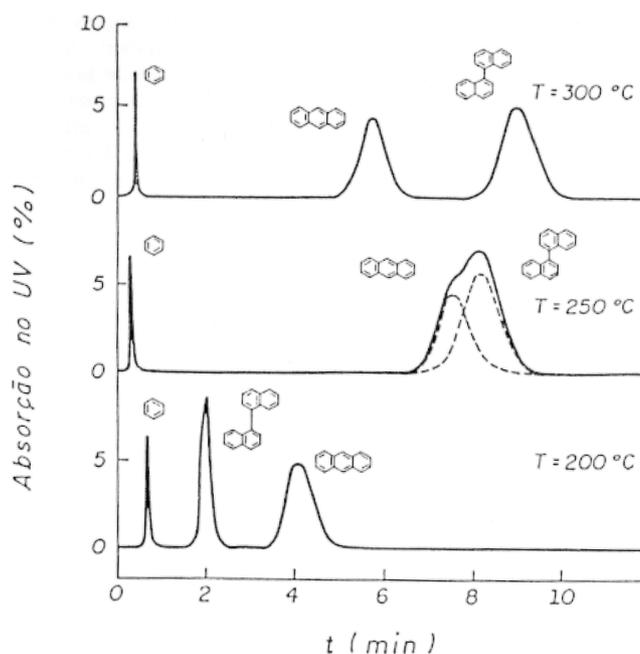


Figura 4. Efeito da temperatura na separação de antraceno e binaftila. Eluente: pentano, Pressão: 40 atm; Coluna: alumina (adaptado da referência 11)

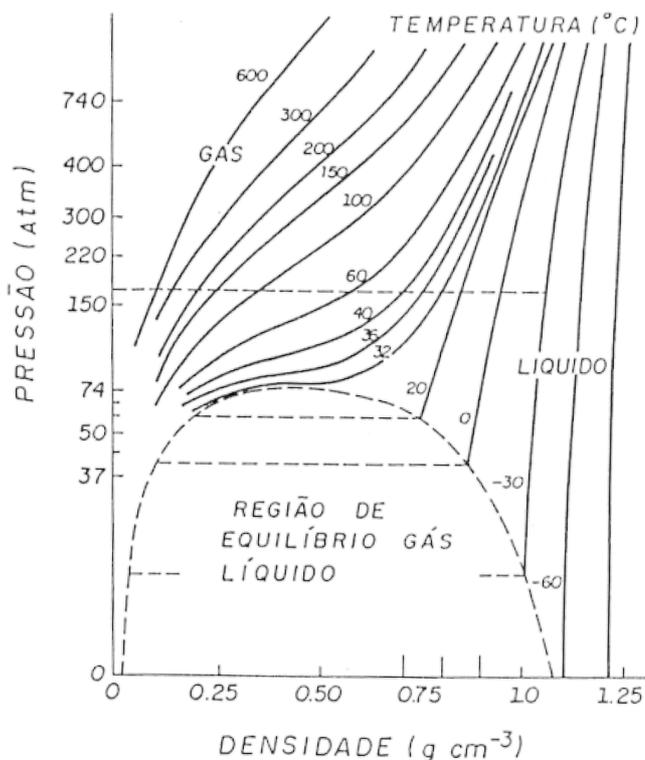


Figura 5. Dependência da densidade de  $\text{CO}_2$  com a pressão e a temperatura. (adaptado da referência 20).

cromatografia gasosa, enquanto que a região de inclinação negativa tem como mecanismo predominante o do tipo cromatografia líquida; a passagem pelo máximo indica uma combinação dos mecanismos. Essa combinação pode ser dada pela expressão:

$$\log(k) = \frac{-0,43\Delta H_s}{RT} - \log\beta + \frac{0,43\Delta H_m}{RT} \quad (18)$$

onde  $\Delta H_s$  e  $\Delta H_m$  são, respectivamente, o calor molar parcial de solução do soluto na fase estacionária e fase móvel,  $\Delta H_m$  é função da densidade da fase móvel e  $\beta$  é a razão de fases da coluna. A interpretação da equação (18) pode levar a concluir-se que a entalpia muda na remoção do soluto da fase estacionária para a fase móvel sob condições de cromatografia gasosa (vaporização), sendo reduzida pela entalpia de solvatação através da fase móvel.

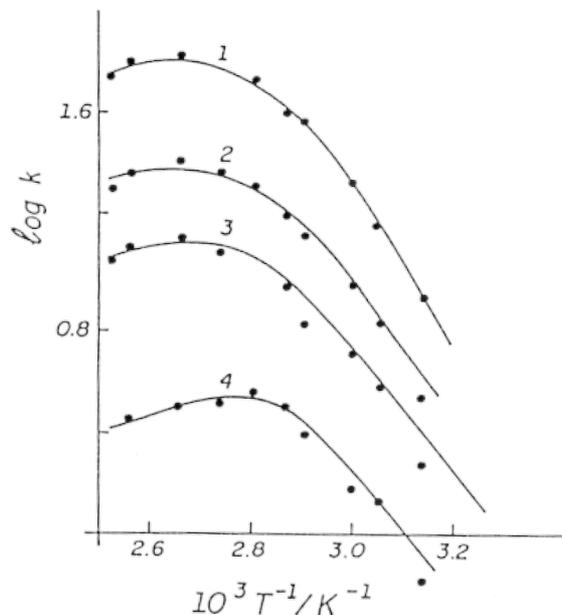


Figura 6. Variação logarítmica de  $k$  contra o recíproco da temperatura absoluta sob pressão constante de  $\text{CO}_2$ . 1: pireno; 2: fenantreno; 3: fluoreno; 4: naftaleno, coluna: 25 cm octadecilsilano (adaptado da referência 29)

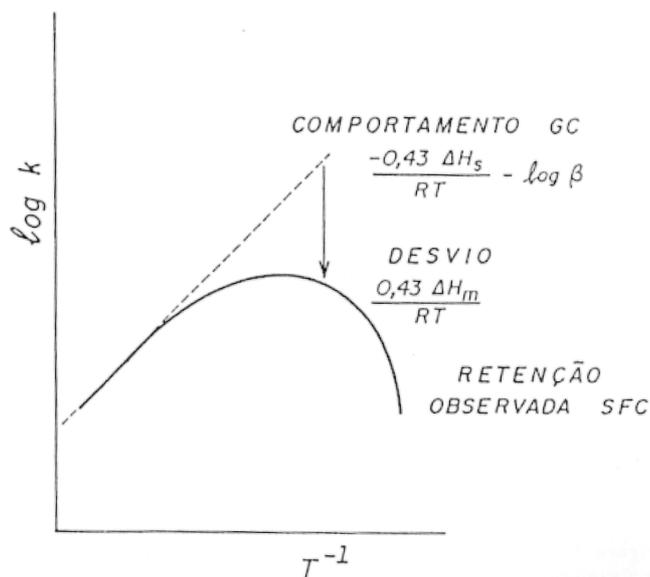


Figura 7. Modelo do comportamento de retenção observado em SFC. (adaptado da referência 30)

### Pressão/Densidade

O controle da pressão em SFC é o mais importante parâmetro operacional pois como já foi afirmado, a densidade do fluido é extremamente influenciada pela mesma, acarretan-

do uma possível alteração na eluição. Vários trabalhos foram escritos sobre o efeito da pressão na eluição<sup>11,31-33</sup>. Sie et al.<sup>9</sup> estudaram a dependência do fator de retenção com a pressão pela equação (8). Observaram que para quase todos os sistemas estudados,  $\log(k)$  varia linearmente com a pressão até um valor próximo a  $P_c$ , a partir do qual o decréscimo de  $\log(k)$  é muito mais acentuado. Mostrou-se também um curioso cruzamento das isoterms justamente neste ponto de maior inflexão: temperaturas menores diminuem a volatilidade dos solutos fazendo com que tenham um maior  $k$  a baixas pressões; acima da pressão crítica uma temperatura menor causa uma eluição mais rápida devido ao aumento da densidade.

Jentoft e Gouw<sup>31</sup> mostraram o efeito da programação da pressão sobre algumas amostras de grande faixa de massa molecular, incluindo oligômeros de poliestireno e uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares. Numa eluição isobárica, o coroneno eluiu em 75 minutos enquanto que com programação de pressão ele eluiu em 25 minutos.

No diagrama Densidade-Pressão (Figura 5), nas proximidades da região supercrítica, a densidade não varia linearmente com a pressão. Consequentemente, uma programação linear de pressão acarretaria em uma eluição assimétrica em relação ao espaçamento numa série homóloga. Procurando contornar este efeito, Campbell e Lee<sup>34</sup> desenvolveram um software onde fazia-se o controle da densidade, levando em consideração o número de termos da série homóloga.

A eluição de uma série homóloga é descrita pela equação

$$\ln(k) = A + B_0 n - m n \rho \quad (19)$$

onde  $A$ ,  $B_0$  e  $m$  são constantes,  $n$  é o número da unidade monomérica a ser eluída e  $\rho$  a densidade da fase móvel. Derivando-se a equação (19) e escrevendo em termos de tempo de retenção, obtém-se

$$\rho = \rho_a - \frac{K}{t + t'} \quad (20)$$

sendo  $K$  uma nova constante dependente da razão de programação de densidade,  $t$  é o tempo,  $t'$  é o tempo de referência, ( $K$  e  $t'$  determinam o espaçamento e retenção dos componentes), e  $\rho_a$  densidade de coeluição dos monômeros, e pode ser calculado pela relação

$$\ln(\alpha) = B_0 - m \rho \quad (21)$$

Portanto, através do gráfico de  $\ln(\alpha)$  por  $\rho$ , obtém-se  $\rho_a$  quando  $\alpha = 1$ .

A programação de densidade durante uma corrida analítica em SFC é tão comum e eficiente quanto a programação de temperatura em cromatografia gasosa (GC) ou gradiente de eluição em cromatografia líquida (LC). O aumento da pressão acarreta um aumento de densidade e, por conseqüência, todos os efeitos acima citados. Entretanto, aumenta-se também a viscosidade do eluente e, com isso, a queda de pressão torna-se mais pronunciada. Este efeito é observado principalmente em colunas empacotadas (recheadas) com partículas de diâmetro inferior a 40  $\mu\text{m}$ , provocando diminuição na densidade no fim da coluna.

### Fase Móvel

Em SFC a variedade de fases móveis é grande (vide Tabela 1), permitindo a escolha do solvente que melhor preencha os requisitos para determinada amostra. A análise de substratos termolábeis deve ser feita com um eluente de baixa temperatura crítica como o  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  ou trifluorometano. Como foi visto na equação (13), a magnitude de  $P_c$  é proporcional a força do solvente ou vice-versa. Geralmente, os compostos mais

polares possuem maiores  $P_c$ , como por exemplo a amônia. O pentano no estado supercrítico apresenta um  $\delta$  muito próximo ao do pentano líquido<sup>20</sup>, enquanto que o  $\text{CO}_2$  supercrítico possui um  $\delta$  muito mais elevado, sendo superado apenas pelo metanol supercrítico.

A compatibilidade dos eluentes com detectores para cromatografia com fluido supercrítico é outro importante parâmetro a ser analisado. Detectores por ionização em chama são incompatíveis com pentano ou qualquer outro solvente orgânico, sendo preferido o uso de  $\text{CO}_2$  ou  $\text{N}_2\text{O}$ . Detectores espectrofotométricos aceitam um maior número de eluentes pois a maioria não absorve em baixos comprimentos de onda (detector de UV é o mais comum), como o pentano,  $\text{CO}_2$ , metanol entre outros, mas a necessidade de uma cela em fluxo de alta pressão faz com que os eluentes de menor  $P_c$  sejam os escolhidos. Para espectrômetro de massas, são preferíveis os fluidos de menor massa molecular como o  $\text{CO}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}$ . Para detecção na região do infravermelho praticamente só o xenônio é usado, mas o  $\text{CO}_2$  pode ser utilizado sob determinadas condições supercríticas<sup>35</sup>.

A resolução oferecida por hidrocarbonetos supercríticos é maior para os de menor massa e  $T_c$ , tais como o etano e o propano. Entretanto, o pentano pode apresentar tempos de análises muito menores com razoável eficiência<sup>36</sup>.

Adicionalmente aos critérios instrumentais para a escolha de um fluido supercrítico como fase móvel, devem ser explorados outros aspectos como, por exemplo, a capacidade de formar misturas de fluidos permitindo, assim, a utilização de gradiente de fase móvel similar aos empregados em cromatografia líquida. Fica evidente, portanto, que as possibilidades de manipulação da seletividade da separação em SFC são inúmeras.

No próximo artigo desta série, será discutida a instrumentação comumente empregada em Cromatografia com Fluido Supercrítico, tanto comercial quanto adaptada em laboratório<sup>37,38</sup>. Na terceira parte deste tema, serão apresentadas algumas aplicações da SFC desenvolvidas no Laboratório de Cromatografia (CROMA) do IQSC/USP<sup>39,40</sup>.

## REFERÊNCIAS

- Hannay, J. B.; Hogarth, J.; *Proc. Roy. Soc. (London)*, **1879**, 29, 324.
- Novotny, M.; Springston, S. R.; Peaden, P. A.; Fjeldsted, J. C.; Lee, M. L.; *Anal. Chem.* **1981**, 53, 407A.
- Lewis, G. N.; Randall, M.; *Thermodynamics*, McGraw-Hill, New York, 1961, p.184.
- James, A. T.; Martin, A. J. P.; *Biochem. J.* **1952**, 50, 679.
- Klesper, E.; Corwin, A. H.; Turner, D. A.; *J. Org.Chem.* **1962**, 27, 700.
- Golay, M. J. E. In *Gas Chromatography*; Coates, V. J.; Noebels, H. J.; Fagerson, I. S., Ed.; Academic Press, New York, 1958; p.1.
- Martin, A. J. P.; Synge, R. L. M.; *Biochem. J.* **1941**, 35, 1358.
- Tswett, M. S.; *Ber. Deut. Bot. Ges.* **1906**, 24, 313 e 384.
- Snyder, L. R.; Kirkland J. J.; *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, John Wiley, New York, E.U.A., 1979.
- Later, D. W.; Richter, B. E.; Andersen, M. R.; *LC.GC* **1986**, 4, 992.
- Sie, S. T.; van Beersun, W.; Rijnders, G. W. A.; *Sep. Sci.* **1966**, 1, 459.
- Sie, S. T.; Rijnders, G. W. A.; *Sep. Sci.* **1967**, 2, 699.
- Sie, S. T.; Rijnders, G. W. A.; *Sep. Sci.* **1967**, 2, 729.
- Sie, S. T.; Rijnders, G. W. A.; *Sep. Sci.* **1967**, 2, 755.
- Berthelot, D.; *Trav. Mem. Burl Intern. Poids Mesures* n13, 1907.
- Andrews, T.; *Phil. Mag.* **1870**, 39,150.
- Gouw, T. H.; Altgelt K. H. (Editor), *Chromatography in Petroleum Analysis*, Chromatographic Science Series 11, Marcel Dekker, New York, 1979, cap.13.
- Gouw, T. H.; Jentoft, R. E.; *J. Chromatogr.* **1972**, 68, 303.
- Karayannis, N. M.; Corwin, A. H.; Baker, E. W.; Klesper, E.; Walter, J. A.; *Anal. Chem.* **1968**, 40, 1736.
- Giddings, J. C.; Myers, M. N.; McLaren, L.; Keller, R. A.; *Science* **1968**, 162, 67.
- Peaden, P. A.; Lee, M. L.; *J. Liq. Chromatogr.* **1982**, 5, 179.
- Schmitz, F. P.; Klesper, E.; *J. Chromatogr.* **1987**, 388, 3.
- Gouw, T. H.; Jentoft, R. E.; *Adv. Chromatogr.* **1975**, 13, 1.
- Giddings, J. C.; *Dynamics of Chromatography*, v. 1, Marcel Dekker, New York, 1965.
- Schwartz, H. E.; Barthel, P. J.; Moring, S. E.; Lauer, H. H.; *LC-GC* **1987**, 5, 490.
- Hirata, Y; Nakata, F.; *Chromatographia* **1986**, 21, 627.
- Yonker, C. R.; Smith, R. D.; *J. Chromatogr.* **1986**, 351, 211.
- Kohler, U.; Biermanns, P.; Klesper, E.; *J Chromatogr.* **1994**, 32, 461.
- Smith, R. M. (Editor); *Supercritical Fluid Chromatography*, RSC Chromatography Monographs, The Royal Society of Chemistry, London, UK, 1988, Cap. 2.
- Chester, T. L.; Innis, D. P.; *J. High Resolut. Chromatogr.* **1985**, 8, 561.
- Jentoft, R. E.; Gouw, T. H.; *J. Chromatogr. Sci.* **1970**, 8, 138.
- Fjeldsted, J. C.; Jackson, W. P.; Peaden, P. A.; Lee, M. L.; *J. Chromatogr. Sci.* **1983**, 21, 222.
- Yonker, C. R.; Smith, R. D.; *Anal. Chem.* **1987**, 59, 727.
- Campbell, R. M.; Lee, M. L.; *Anal. Chem.* **1986**, 58, 2247.
- Shafer, K. H.; Griffiths, P. R.; *Anal.Chem.* **1983**, 55, 1939.
- Schmitz, F. P.; Leyendecker, D.; Klesper, E.; *Ber. Bunsenges Phys. Chem.* **1984**, 88, 912.
- Carrilho, E., *Dissertação de Mestrado*, IQSC/USP, São Carlos, 1988.
- Tavares, M. C. H., *Tese de Doutorado*, IQSC/USP, São Carlos, 1999.
- Tavares, M. C. H.; Lanças, F. M.; Vilegas, J. H. Y.; Celeghini, R. M. S.; Passos, M.; Fontana, J. D.; XXIII International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Itália, 2000, CD-Rom.
- Tavares, M. C. H.; Vilegas, J. H. Y.; Lanças, F. M.; *Phytochem. Anal.* **2000**, 11, 1.