

## Diluições em cilindros pressurizados para aplicações biológicas: CO<sub>2</sub> e etileno

Adonai Gimenez Calbo<sup>1</sup>  
Poliana Cristina Spricigo<sup>2</sup>  
Marcos David Ferreira<sup>3</sup>

Cilindros contendo gases pressurizados sob concentrações definidas são muito importantes em estudos de fisiologia e também para a aferição de diferentes tipos de instrumentos. O cromatógrafo a gás, por exemplo, pode ser equipado com detector de condutividade térmica, que em tese pode medir qualquer componente gasoso, com sensibilidade relativamente baixa de algumas partes por milhão, e que tem sido utilizado, por exemplo, para medições de consumo de O<sub>2</sub> e de evolução de CO<sub>2</sub> no processo respiratório. Outro sensor, de aplicação menos geral, porém cerca de 1000 vezes mais sensível é o de ionização de chama, que é utilizado para detectar a separação de cargas elétricas de substâncias que queimam na presença de oxigênio como ocorre com as substâncias orgânicas. O detector de ionização de chama tem sido particularmente importante nos estudos da fisiologia do hormônio vegetal denominado etileno, que influi na organogese das plantas e é denominado de hormônio de amadurecimento. Por operar com linearidade extrema em uma ampla faixa de concentrações, cromatógrafos a gás equipados com estes detectores podem ser calibrados utilizando-se apenas uma concentração de padrão, o que é muito conveniente.

Esta concentração, no entanto, deve ser relativamente elevada, para que este sinal de referência seja medido com boa precisão. Este aspecto torna a aferição do cromatógrafo a gás com amostras de padrão retirado de cilindros pressurizados muito prática e concentrações da ordem 4 mL L<sup>-1</sup> para CO<sub>2</sub>, medido por condutividade térmica, e de 100 L L<sup>-1</sup> para o etileno, medido por ionização de chama podem ser tomados como valores de referência interessantes tendo-se em vista medições de evolução CO<sub>2</sub> produzido na respiração e de evolução de etileno gerado durante o amadurecimento das frutas.

Para análises cromatográficas, via de regra, as misturas são adquiridas de empresas de gases industriais.

Contudo, quando se quer mais flexibilidade de uso, o preparo de misturas gasosas pressurizadas pode ser feito no próprio laboratório, seja para a aferição de instrumentos seja para estudos biológicos envolvendo metabólitos, reguladores de crescimento ou defensivos gasosos.

Os métodos para a produção de misturas de gases podem ser classificados como estáticos quando utilizam contentores aos quais são adicionados quantidades conhecidas de gases ou dinâmicos quando os gases são misturados de maneira contínua (CARDOSO e PITOMBO, 1989). Dentre os métodos de preparação de misturas gases estáticos e sem pressurização, pode-se citar o método descrito por Johnson e Caldas (1984) para misturar CO<sub>2</sub> e ar com vistas a aferir um analisador infravermelho utilizado em estudos de ecofisiologia. Dentre os métodos estáticos que fazem uso de cilindros pressurizados é prático o método de Saltveit e Dilley (1977), que é voltado para o preparo de grandes quantidades de gases que são necessários para se fazer estudos de atmosfera controlada em frutas e hortaliças. Dentre os variados tipos de métodos dinâmicos em biologia são particularmente comuns os usos de misturadores com múltiplas saídas, como o denominado "fluxcentro" (CALBO, 1989), cuja principal aplicação tem sido no preparo de atmosferas controladas com reduzidos níveis de O<sub>2</sub> e/ou com elevadas concentrações de CO<sub>2</sub> aplicadas em estudos que visam aumentar a conservação de frutas e hortaliças.

Tendo em vista facilitar o uso de misturas gasosas úteis para a calibração de detectores de gases; como o de condutividade térmica, o de ionização de chama, o infravermelho e o detector paramagnético; e também para o estudo de diferentes aspectos de biologia, o objetivo deste trabalho é descrever um método estático simples que possibilite flexibilidade na preparação de misturas contendo diluições de CO<sub>2</sub>, de etileno e de outras substâncias em cilindros de alta pressão, baseado em uma adaptação do método descrito por Saltveit e Dilley (1977).

<sup>1</sup>Engenharia Agrônoma, Ph. D., Pesquisador, Embrapa Instrumentação, Rua XV de novembro, 1452, CEP.: 13560-970, São Carlos, SP. adonai@cnpdia.embrapa.br

<sup>2</sup>Engenharia Agrônoma, Estudante de Mestrado da Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Av. Candido Rondon, 501, CEP.: 13083-875, Campinas, SP. polianaspricigo@yahoo.com.br.

<sup>3</sup>Engenharia Agrônoma, D. Sc., Pesquisador, Embrapa Instrumentação, Rua XV de novembro, 1452, CEP.: 13560-970, São Carlos, SP. marcosferreira@cnpdia.embrapa.br

**Diluição de CO<sub>2</sub> e etileno em cilindros pressurizados**

Em condições isotérmicas, para gases que se comportam como se fossem gases ideais nas condições de preparo, tem-se que:

$$P_T = P_M + P_B \quad \text{equação 1}$$

Onde P<sub>T</sub> é a pressão total no cilindro de diluição, P<sub>M</sub> é a pressão ajustada no manômetro do regulador de pressão no cilindro de diluição, que também pode ser denominado de cilindro de padrão e P<sub>B</sub> é a pressão barométrica local.

Assim, neste cilindro, após a introdução de um pequeno volume V<sub>C</sub> de gás padrão medido na pressão barométrica (P<sub>B</sub>) a concentração do componente misturado (C<sub>C</sub>), em fração molar ou como razão entre os volumes dos componentes, após a adição do gás diluente, N<sub>2</sub>, por exemplo, que eleve a pressão até uma leitura P<sub>M</sub> é representada pela expressão:

$$C_C = V_C P_B / (P_T V_D) \quad \text{equação 2}$$

Onde V<sub>D</sub> é o volume do cilindro de diluição.

Com as equações 1 e 2 calcula-se quanto de um componente deve ser adicionado ao cilindro de diluição com volume conhecido (V<sub>D</sub>) para produzir a concentração especificada a uma dada pressão de ajuste (P<sub>M</sub>). Na Tabela 1 ilustram-se os valores destas variáveis envolvida no preparo de um cilindro com 100 μL L<sup>-1</sup> de etileno e 4,34 mL L<sup>-1</sup> de CO<sub>2</sub>. Conseqüentemente a Tabela 1 pode ser tomada como exemplo para o cálculo e o preparo de outras misturas gasosas, com estes, ou com outros gases.

**Tabela 1:** Concentrações CO<sub>2</sub> e de etileno obtidas em um cilindro de diluição (fig. 1 e 3) com volume V<sub>D</sub> = 7,1 L. Neste exemplo, as equações 1 e 2 são utilizadas sob temperatura ambiente aproximadamente constante e sob uma a pressão barométrica local P<sub>B</sub> de 0,92 kgf cm<sup>-2</sup>.

Gás adicionado para a diluição	Volume V <sub>C</sub> do gás adicionado	Pressão de (P <sub>M</sub> ) ajustada no manômetro	Pressão de N <sub>2</sub> no gás diluído	Pressão total P <sub>T</sub> ou final (eq. 1)	Concentração C <sub>C</sub> do gás diluído (eq. 2)
CO <sub>2</sub>	366 mL	10,00 bar		10,92 bar	4,34 mL L <sup>-1</sup>
etileno	8,43 mL	10,00 bar		10,92 bar	100 μL L <sup>-1</sup>

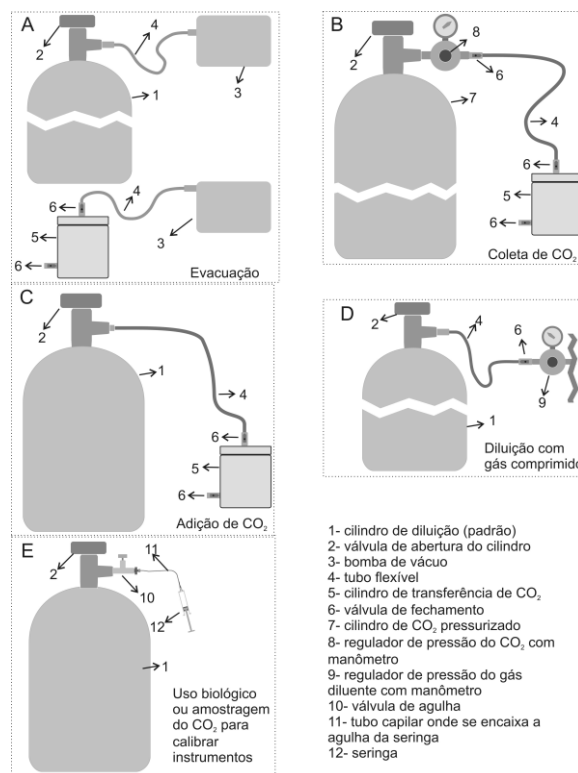
Para a calibração de cromatógrafo a gás os volumes, as concentrações e as pressões sugeridas na Tabela 1 são próximos daqueles que historicamente têm sido utilizados em laboratórios de pós-colheita. Conseqüentemente, o leitor poderá utilizar pequenos cilindros de aço comerciais utilizados para acondicionar O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>, cujo volume, em litros, vem gravado em baixo relevo. O volume nominal dos cilindros disponíveis varia de acordo com o fabricante, varia também a pressão barométrica (P<sub>B</sub>) de acordo com a localização geográfica e altitude de cada laboratório. Os cilindros utilizados nestas diluições devem estar com os seus testes de resistência em dia e adicionalmente devem ser de propriedade do usuário. As pressões de trabalho do exemplo (Tabela 1) são muito menores do que as pressões nominais dos gases que são comercializados nestes cilindros o que garante plena segurança dos procedimentos, de uma maneira inclusive muito mais estrita do que aquela recomendada no método de Saltveit e Dilley (1977).

**Cilindro pressurizado com concentração de CO<sub>2</sub> definida**

**Amostragem de gases de referência para aferição de sensores**

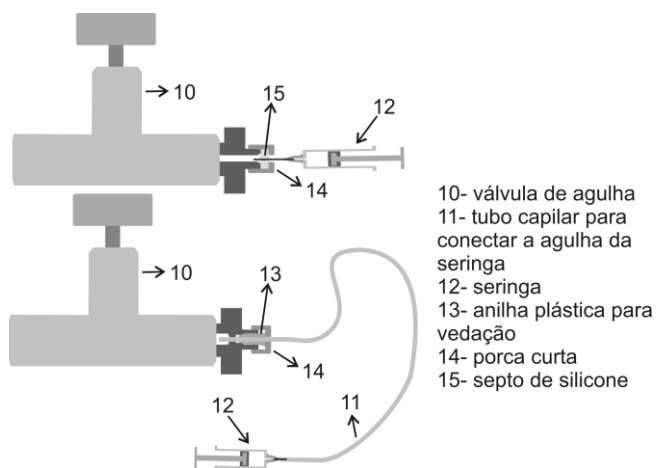
Há alguns procedimentos, variáveis de acordo com a instrumentação utilizada, para a coleta de amostra de gases com concentração conhecida para uso em calibração. Dentre estes o que tem sido mais frequentemente utilizado é a coleta de amostras gasosas em seringa hipodérmica de 1,0 mL, a partir de cilindro com gás diluído, pressurizado e provido de um sistema com válvula de agulha e septo de silicone, ou sistema de válvula de agulha e tubo capilar flexível, conforme é apresentado em vista geral na Figura 1. O detalhamento de como pode ser preso o septo de silicone e o capilar para estas coletas de amostra são o objeto da Figura 2.

Para amostragem do gás neste sistema as válvulas 2 e 10 (Figuras 1 e 2) estão inicialmente fechadas e o procedimento de coleta é iniciado abrindo-se, completamente, a válvula 2, do cilindro, e fechando-a logo em seguida. A coleta da amostra do gás de referência é feita então com uma seringa hipodérmica, enquanto a válvula de agulha (10) é aberta lentamente, de modo a fazer com que a pressão do gás empurre o embolo da seringa progressivamente para trás, até que o volume supere ligeiramente o valor de 1,0 mL. A seringa é, então, retirada, o excesso de gás é expulso enquanto o volume é reduzido para exatamente 1,0mL e na seqüência, rapidamente, se faz injeção deste conteúdo para obter a leitura de referência.



**Figura 1:** Procedimento para preparo de cilindro de alta pressão contendo CO<sub>2</sub> diluído. A) evacuação do cilindro de transferência de CO<sub>2</sub> e evacuação do cilindro de diluição, com bomba de vácuo; B) enchimento do cilindro de transferência com CO<sub>2</sub> a partir de um cilindro de CO<sub>2</sub> sob alta pressão; C) adição de CO<sub>2</sub> ao cilindro de diluição previamente evacuado; D) diluição do CO<sub>2</sub> adicionado mediante adição de gás inerte (N<sub>2</sub>) até a pressão de 10 kgf.cm<sup>-2</sup> ao cilindro de diluição; E) coleta de uma amostra do padrão com seringa hipodérmica de 1 mL.

O procedimento ilustrado trata da preparação de um cilindro contendo CO<sub>2</sub>. A preparação pode ser feita com facilidade, porém para se evitar erros há também que se tomar alguns cuidados adicionais: a) após acoplar a válvula 10 ao cilindro, no primeiro uso, o ar contido entre as válvulas 2 e 10 (Figura 1) precisa ser substituído pela mistura de referência e para isto, começando, com as válvulas 2 e 10 fechadas, abre-se completamente a válvula 2, do cilindro de diluição, que é fechada logo na seqüência, e depois abre-se a válvula 2 para deixar o gás escapar pelo tubo capilar. No sistema de septo, afrouxa-se a porca que prende o septo para se fazer esta despressurização. b) Nas coletas o gás contido na primeira amostra deve ser descartado, visto que a entrada de ar entre a válvula 10 e o septo ou entre a válvula 10 e o capilar ocorre com relativa rapidez. c) Após as coletas de amostra deve-se fechar bem as válvulas 2 e 10. Um cilindro com gases de referência de 7,1 L litros e com pressão inicial de 10 bar, contendo concentrações conhecidas de CO<sub>2</sub> e de etileno, como as ilustradas na Tabela 1, possibilita a coleta de centenas de amostras, o que pode representar uma duração de alguns anos.



**Figura 2:-** Detalhe do sistema com válvula septo e anilha plástica no topo e do sistema de válvula e tubo capilar para coleta de amostras de gás diluído na base.

Cilindros com pequenas pressões contendo concentrações conhecidas de CO<sub>2</sub> e etileno, como ilustrado na Tabela 1, podem ser preparados no laboratório. Para isto basta que se tenha disponibilidade dos cilindros, das válvulas e das conexões ilustradas nas Figuras 1 e 4. O procedimento detalhado abaixo de fato é muito simples e em poucas palavras envolve a evacuação do cilindro de diluição, a adição de um volume conhecido de CO<sub>2</sub> e de etileno ao cilindro e a diluição destes gases, que é feita mediante a adição N<sub>2</sub> ao cilindro de diluição até uma pressão especificada.

De uma forma detalhada o procedimento começa com a evacuação do cilindro de transferência de CO<sub>2</sub> e à evacuação do cilindro de diluição, com bomba de vácuo (Figura 1). Para isto, conecta-se o cilindro de diluição à bomba a vácuo e aplica-se vácuo para a retirada dos gases contidos no cilindro de diluição e repete-se o mesmo procedimento de evacuação no cilindro de transferência.

A seguir adiciona-se CO<sub>2</sub> ao cilindro de transferência a partir de um cilindro com CO<sub>2</sub> puro. Para isto, o cilindro de

transferência, sob vácuo, é conectado a um cilindro de CO<sub>2</sub> comercial (Figura 1) com auxílio de uma válvula de ajuste de pressão de duplo estágio com manômetro. Abre-se a válvula do cilindro de CO<sub>2</sub> e, na válvula de duplo estágio, aumenta-se a pressão até 3 kgf.cm<sup>-2</sup>. Feita esta regulagem, abre-se a válvula do cilindro de transferência, a pressão reduz-se no início, e por isto precisa-se esperar até que a pressão de CO<sub>2</sub> suba e volte para o valor regulado de 3 kgf.cm<sup>-2</sup>. A válvula do cilindro de CO<sub>2</sub> é então fechada, para na seqüência o cilindro de transferência ser aberto, durante alguns instantes, para que deste modo a pressão do CO<sub>2</sub> no seu interior seja diminuída para o valor da pressão barométrica local.

O volume V<sub>c</sub> de CO<sub>2</sub> puro, contido na pressão barométrica local (P<sub>B</sub>), é então transferido para o cilindro de diluição (Figura 1), previamente evacuado. Para isto, conecta-se o cilindro de transferência ao cilindro de diluição e abrem-se as válvulas nos dois cilindros, por um curto intervalo de tempo (minutos). O equilíbrio de pressão ocorre rapidamente e faz com que a maior parte do CO<sub>2</sub> contido no cilindro de transferência movimente-se para o cilindro de diluição, cujo volume é muito maior (Tabela 1). A válvula do cilindro de diluição é fechada, e na seqüência a válvula do cilindro de transferência é aberta para o ar e fechada novamente. Proceder-se, então, a uma segunda transferência, o que assegura que a maior parte do CO<sub>2</sub> ainda remanescente no cilindro de transferência seja também transferida, juntamente com o ar adicionado. Fechando-se a válvula do cilindro de diluição conclui-se a adição do componente gasoso principal.

A concentração final de CO<sub>2</sub> é então ajustada mediante a diluição com gás inerte, N<sub>2</sub>, por exemplo, que é adicionado até uma pressão especificada. Esta operação é feita após conectar-se o cilindro de diluição ao regulador de pressão de duplo estágio e com manômetro de um cilindro de N<sub>2</sub> (Figura 1). Para isto, primeiro abre-se a válvula do cilindro de N<sub>2</sub> e aumenta-se a pressão no manômetro do cilindro de gás inerte, por exemplo, até 10 kgf.cm<sup>-2</sup> (P<sub>M</sub>) e a seguir abre-se a válvula do cilindro de diluição. Verifica-se um decréscimo inicial da pressão, que paulatinamente volta para o valor ajustado (P<sub>M</sub>). Os cilindros são então fechados e desconectados.

Logo após este procedimento os gases no cilindro de diluição ainda não estão perfeitamente misturados, apesar da turbulência provocada pela adição do N<sub>2</sub> ao cilindro. Por isto, antes de adicionar a conexão de amostragem de gases ao cilindro de diluição (Figuras 1 e 2) é necessário esperar pelo menos 24 horas, até que a difusão somada às movimentações internas do gás, causadas por pequenas variações térmicas, completem a necessária homogeneização da mistura gasosa.

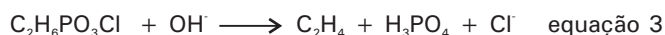
#### **Cilindro pressurizado com concentração de etileno definida**

O etileno é um hormônio vegetal gasoso que atua em concentrações reduzidas e frequentemente inferiores a 1 μL L<sup>-1</sup>. Assim, para a preparação de diluições de etileno para aplicações biológicas ou para a aferição de instrumentos é necessário um diminuto volume deste gás puro. Estas pequenas quantidades de etileno puro para serem adicionadas a um cilindro de diluição podem ser liberadas com auxílio de um pequeno reator químico, no

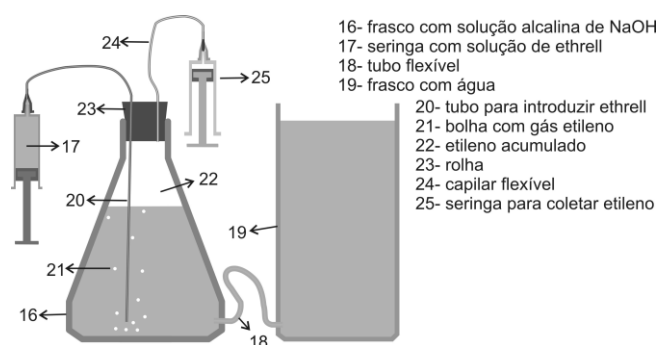
qual o ácido 2-cloroetilfosfônico é decomposto em meio alcalino, conforme é ilustrado na Figura 3. A forma mais simples de obter o ácido 2-cloroetilfosfônico é através do produto comercial denominado ethrel, que possui o nome comum ethephon (CUNHA, 2005) e é utilizado como regulador de crescimento e acelerador de amadurecimento em várias culturas.

O reator ilustrado na Figura 3 foi preparado ligando-se um erlenmeyer de 250 mL e um frasco de vidro de 500 mL por meio de um tubo de silicone firmemente inserido nos orifícios, que foram perfurados na base de cada um destes recipientes.

A rolha encaixada no erlenmeyer contém um primeiro tubo capilar plástico que se estende até o fundo e um segundo tubo capilar plástico que foi cortado ao nível da base da rolha. O primeiro capilar é utilizado para a introdução do ethrel no reator (que já deverá estar previamente cheio com solução concentrada de NaOH), com uma seringa de 10 mL, enquanto o segundo tubo é utilizado para a retirada do gás etileno com uma seringa de volume apropriado, tipicamente de 10 mL. A decomposição do ácido 2-cloroetilfosfônico ocorre com a formação de ácido fosfórico, etileno e cloreto (equação 3).



Esta decomposição do ácido 2-cloroetilfosfônico em meio alcalino causa uma lenta evolução de etileno, razão pela qual esta reação é útil para aplicações agrônômicas do hormônio etileno no campo, mediante a aplicação do ethrel como um regulador de crescimento. O ácido 2-cloroetilfosfônico é uma substância estável em meio ácido, sob pH menor que 4, mas que se decompõem, lentamente, na planta, ou em solução, sempre que expostas a meios com pH mais elevado.



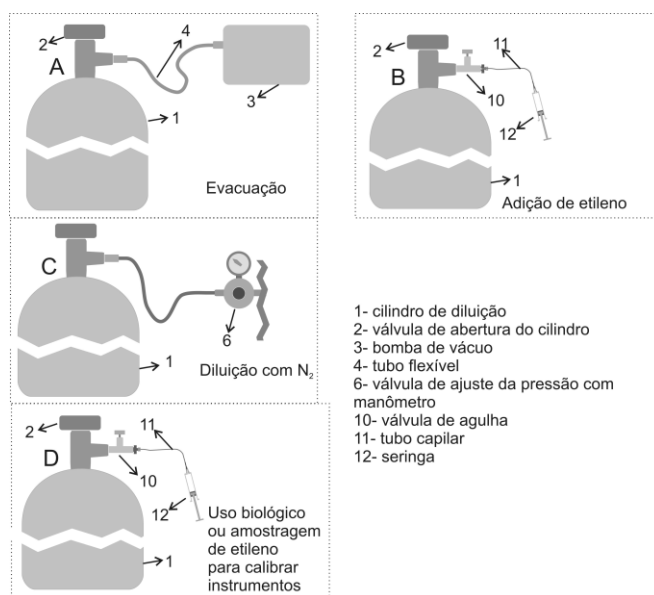
**Figura 3:** Produção do gás etileno a partir da degradação do ethephon (ácido 2-cloroetilfosfônico) em meio alcalino.

Para a liberação de etileno, o reator da Figura 3 é colocado no interior de uma bandeja plástica, adiciona-se cerca de 20 gramas de hidróxido de sódio em pastilhas ao erlenmeyer (1), adiciona-se água ao frasco (4), até que o erlenmeyer (1) esteja praticamente cheio. A seguir, fecha-se firmemente o erlenmeyer com a rolha (8), tendo-se o cuidado de não deixar bolhas de ar no topo. Para maior segurança adiciona-se um pouco mais de água no frasco (4) para que o etileno produzido seja mantido sempre sob pressão positiva. Na seqüência, com a seringa (2) aplica-se lentamente cerca de 10 mL de ethrel ao erlenmeyer (1). Dentro de um intervalo de tempo, 10 a 30 minutos, o etileno, formado como pequenas bolhas, se acumulará no

topo do erlenmeyer em quantidade que deve ser bem maior do que aquela que será coletada com a seringa (2), para ser introduzida no cilindro de diluição.

A formação lenta do etileno a partir do ethrel torna o reator aqui descrito seguro, visto que prove tempo para que a água retorne para o frasco (4), lentamente, em condição de quase equilíbrio, conforme o etileno é produzido. Adicionalmente, o ácido 2-cloroetilfosfônico tem baixa toxicidade e o gás etileno, aqui produzido em quantidades diminutas, é inócuo para o homem. O etileno em concentrações da ordem de 12% possui efeito anestésico, que atualmente não é aproveitado pelo fato de que o etileno é explosivo quando misturado com o ar em proporções superiores a 13%. O reator aqui descrito é muito similar aquele que foi utilizado por Johnson e Caldas (1984) para produzir CO<sub>2</sub> aplicando bicarbonato a uma solução de ácido sulfúrico, um sistema no qual a formação de gás ocorre de maneira usualmente mais rápida do que a evolução de etileno a partir do ethephon em meio alcalino, aqui descrita.

O procedimento de diluição do etileno é ainda mais simples do que aquele já descrito para a diluição do CO<sub>2</sub> e por esta razão a descrição adicional é apenas aquela contida na Figura 4, onde os principais passos podem ser seguidos com facilidade. A ilustração desta diluição (Figura 4) serve não apenas para o etileno, mas também para outros gases como o brometo de metila, a fosfina e o 1-MCP dentre outras substâncias com interessantes aplicações biológicas, quando aplicadas em concentrações da ordem de algumas partes por milhão, em volume. Estes e alguns outros gases com relevante ação biológica podem ser preparados em reatores químicos simples assemelhados ao reator descrito a seguir para a liberação do etileno puro.



**Figura 4:** Procedimento para preparo de cilindro de alta pressão contendo etileno diluído. A) evacuação do cilindro de diluição com bomba de vácuo. B) adição de etileno ao cilindro de diluição sob vácuo com auxílio de uma seringa de volume especificado; C) diluição do etileno adicionado mediante adição de gás inerte (N<sub>2</sub>) até uma leitura 10 kgf.cm<sup>-2</sup> de pressão no cilindro de diluição; D) amostragem com seringa hipodérmica de 1 mL.



A partir dos métodos descritos acima é possível preparar com facilidade cilindros de gases diluídos em laboratório, de forma segura e com concentrações conhecidas do gás de interesse para calibração de sensores e utilização em pesquisas. Desta forma, viabilizando a utilização de concentrações diferentes daquelas oferecidas comercialmente.

### Referências

CALBO, A. G. Adaptação de um fluxcentro para estudo de trocas gasosas e um método de aferição de capilares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 24, n. 6, p. 164-179, 1989.

CARDOSO, A. A.; PITOMBO, L. R. M. Alguns métodos para preparação de misturas padrões de gases e vapores. **Química Nova**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 148-154, 1989.

CUNHA, G. A. Applied aspects of pineapple flowering. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 4, p. 499-516, 2005.

JOHNSON, C. E.; CALDAS, L. S. A simple and accurate method for infrared gas analyzer calibration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 35, n. 156, p. 1083-1086, 1984.

SALTVEIT, M. E. JUNIOR.; DILLEY, D. R. Simple procedure for preparing dilute concentrations of ethylene in air or oxygen in high pressure cylinders. **HortScience**, Alexandria, v. 12, n. 3, p. 252-253, 1977.

### Comunicado Técnico, 113

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:  
**Embrapa Instrumentação**  
 Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741  
 CEP 13560-970 - São Carlos-SP  
**Fone:** 16 2107 2800 - **Fax:** 16 2107 2902  
**e-mail:** sac@cnpdia.embrapa.br  
<http://www.cnpdia.embrapa.br>  
**1a. edição**  
 1a. impressão 2010: tiragem 300

Ministério da  
 Agricultura, Pecuária  
 e Abastecimento



### Comitê de Publicações

**Presidente:** João de Mendonça Naimé  
**Membros:** Débora Marcondes Bastos Pereira Milori,  
 Sandra Protter Gouvea  
 Washington Luiz de Barros Melo  
 Valéria de Fátima Cardoso

**Membro Suplente:** Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

### Expediente

**Supervisor editorial:** Dr. Victor Bertucci Neto  
**Normalização bibliográfica:** Valéria de Fátima Cardoso  
**Tratamento das ilustrações:** Adonai G. Calbo  
**Editoração eletrônica:** Camila Fernanda Borges