



**Cromatógrafo Perkin-Elmer GC Auto System e Integrator
PE Nelson Modelo 1022**



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Agrobiologia

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Francisco Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Chefias da Agrobiologia

Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adj. De Pesq e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo: vanderlei pinto

DOCUMENTO Nº 82

ISSN 0104-6187

Novembro 1998

***Cromatógrafo Perkin-Elmer GC Auto System e Integrator
PE Nelson Modelo 1022***

Instruções básicas de uso em análise de redução de acetileno (ARA)

*Octávio Costa de Oliveira
Bruno José Rodrigues Alves*

Seropédica – RJ

1998

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à

Embrapa..Agrobiologia

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

e-mail: adc@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Robert Michael Boddey

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix
e/ou Sérgio Alexandre Lima

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

OLIVEIRA, O.C. de; ALVES, B.J.R. **Cromatógrafo Perkin-Elmer GC Auto System e Integrator PE Nelson Modelo 1022: Instruções básicas de uso em análise de redução de acetileno (ARA).** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998. 16p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 82).

ISSN: 0104-6187

1. Equipamento . I. Alves, B.J.R., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 631.25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. PRINCÍPIO DA CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) COM DETECTOR DE CHAMA	4
3. O CROMATÓGRAFO PERKIN-ELMER GC AUTO-SYSTEM.....	5
4. INTEGRADOR PE NELSON MODEL 1022.....	6
5. ANALISANDO AMOSTRAS	7
5.1. Calibração.....	9
6. VISUALIZANDO ANÁLISES ANTERIORES.....	10
7. RECALCULANDO AMOSTRAS.....	10
8. DESLIGANDO OS APARELHOS.....	10
9. LEMBRE-SE:	11
10. PROBLEMAS MAIS COMUNS E SUAS SOLUÇÕES.....	13
11. APÊNDICE	14
11.1 OBSERVANDO A SITUAÇÃO DOS PARÂMETROS DO GC.....	14
11.2 CONFIGURAÇÃO ATUAL DOS MÉTODOS.....	14
11.2.1. Cromatógrafo.....	14
11.2.2. Integrador.....	15
11.3. ABREVIACÕES USADAS NO CROMATÓGRAFO.....	15
11.4. DEFINIÇÕES	16
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

Cromatógrafo Perkin-Elmer GC Auto System e Integrator PE Nelson Modelo 1022

Instruções básicas de uso em análise de redução de acetileno (ARA)

Octávio Costa de Oliveira¹

Bruno José Rodrigues Alves²

1. INTRODUÇÃO

A análise da atividade de redução de acetileno (ARA) é uma ferramenta poderosa na detecção e quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas, não só pela sua simplicidade como pelo baixo custo e alta sensibilidade (Hardy et al., 1968). A utilização de acetileno (C₂H₂) como substrato para a enzima nitrogenase resulta na sua redução para etileno (C₂H₄), gases facilmente separados e detectados em um cromatógrafo de gás. A determinação das concentrações destes gases permite quantificar a existência de vazamentos da câmara de incubação e a quantidade de etileno produzido, sendo esta última diretamente proporcional à atividade da nitrogenase.

2. PRINCÍPIO DA CROMATOGRAFIA GASOSA (CG) COM DETECTOR DE CHAMA

A amostra gasosa injetada através de um septo de silicone é arrastada por um fluxo de um gás inerte carreador (nitrogênio) até a coluna de separação (no caso, Porapak N^o), que é mantida em temperatura superior à do ambiente. Dentro da coluna, os gases sofrem retenção de acordo com a maior ou menor afinidade com a coluna (adsorção que ocorre na superfície sólida do adsorvente), sendo assim liberados em tempos diferentes (separados).

Na análise da redução de acetileno, metano é um contaminante comum que é logo liberado. A seguir, são liberados o etileno e o acetileno. O propano, quando

¹ Estudante de Pós-Graduação da UFRRJ, Embrapa *Agrobiologia*

² Pesquisador da Embrapa *Agrobiologia*, Caixa Postal 74505, CEP: 23851-970 Seropédica, RJ

usado como padrão interno (Boddey, 1987), é o último a ser liberado, com um tempo de retenção geralmente superior a 2 minutos.

Após a liberação, a amostra sofre combustão (mantida pelo hidrogênio e ar) e é então ionizada. A quantidade de íons formada é detectada por um Detector de Ionização de Chama (FID - Flame Ionization Detector). A concentração de cada gás é proporcional ao número de íons formados. O FID detecta a corrente elétrica gerada e a envia ao integrador através de cabos, após retificação e ampliação. O aparelho então está pronto para receber a próxima amostra.

3. O CROMATÓGRAFO PERKIN-ELMER GC AUTO-SYSTEM

Atualmente, a EMBRAPA Agrobiologia conta com dois modelos de cromatógrafos: Um Perkin Elmer antigo e o GC Auto System. O cromatógrafo Auto-System é um sistema automatizado que controla os vários parâmetros que influenciam na análise: tempo, temperatura da câmara de injeção, temperatura da câmara da coluna, tipo de coluna, fluxo de carreador, atenuação do pico e tempo de atenuação, etc. Todos estes parâmetros são armazenados em arquivos chamados METHODS (MÉTODOS). O aparelho pode armazenar até 5 métodos (Method 1,2,3,4 e 5), cada um com regulagens diferentes. Cada método é recomendado conforme a coluna e detectores utilizados, tempos de retenção, concentração esperada e separação de picos.

A determinação dos parâmetros ideais para cada análise é feita utilizando-se padrões dos elementos a serem analisados, buscando-se a otimização da análise, o que significa a melhor separação e integração dos picos, no menor tempo possível, com o menor consumo de gases e de energia. Para isso, devemos testar várias concentrações, tempos, temperaturas e fluxos, o que é bastante trabalhoso. Por isso, não devemos modificar os métodos sem autorização do responsável pelo aparelho. Qualquer parâmetro que seja modificado influencia outros. Além disso, as concentrações de gases de interesse nas amostras, calculadas pelo programa do integrador, só estarão corretas se usarmos os mesmos valores de temperatura,

fluxo, etc. utilizados com as amostras-padrões durante a calibração. O METHOD 1 foi ajustado para análise de redução de acetileno, usando-se detector de ionização de chama; os demais não foram ajustados.

O cromatógrafo para ser utilizado não necessita de nenhuma regulagem quando o método estiver correto para a análise para a qual foi desenvolvido e o aparelho funcionando normalmente. Só alteramos o fluxo de gases no aparelho para acender a chama, retornando ao fluxo normal após acendê-la.

Os principais problemas no uso do aparelho são a agulha utilizada para injeção e o septo. Se a agulha for muito curta, parte da amostra poderá ficar retida na câmara de injeção; se for muito grossa, a vida útil do septo diminui bastante. Além disso, deve-se usar a mesma agulha usada na calibração, pois existe um espaço vazio na parte plástica de cada agulha que pode reter gás da amostra. Se a quantidade de gás da amostra nesse espaço for muito diferente da quantidade de gás retida quando da calibração, a eficiência de injeção será diferente ao da calibração e os cálculos serão incorretos. O septo quando deixa escapar gás causa vários erros de análise (vide item 8).

4. INTEGRADOR PE NELSON MODEL 1022

Acoplado ao cromatógrafo temos um integrador digital marca PE Nelson modelo 1022. O integrador recebe o sinal do cromatógrafo e o converte em gráfico, calculando então a área sob o pico ou a sua altura e comparando-a com a curva padrão usada na calibração, calculando-se então a concentração de cada gás de interesse contido na amostra. O sinal máximo aceito pelo aparelho é de 1 Volt (1000 mV); se a atenuação do cromatógrafo não for suficiente para reduzir o sinal para menos de 1V, a amostra será perdida, pois ao atingir esse valor forma-se um platô no gráfico em vez de uma forma de sino (curva normal) e a quantificação da área é subestimada. Nesse caso, a amostra deverá ser diluída ou a atenuação modificada. A atenuação atual no Método 1 é suficiente para

concentrações de etileno de até 120 nmol/ml, o que é satisfatória de uma maneira geral.

O integrador que está acoplado ao cromatógrafo também possui uma série de parâmetros que são utilizados para a integração, calibração, entrada e saída de dados. Estas informações também são armazenadas em arquivos denominados Métodos; porém, os métodos aqui têm nome, enquanto que no cromatógrafo os Métodos têm números. O Método atualmente em uso é o BAIXOETI. Nele estão guardados os nomes dos arquivos usados na calibração, bem como seus valores de concentrações calculados. Não modifique o método, exceto o nome do analisador e da amostra quando necessário!

Após a quantificação, o integrador armazena o resultado da análise em um arquivo DOS com extensão .D01 e imprime o resultado. Cada análise gera um arquivo. O programa não permite gravar em disquete; por isso, o analisador deve criar um diretório com o seu nome sob o diretório C:\CHROM\ para armazenar suas análises, p.ex., C:\CHROM\JOAO\. Ao final das análises, deve copiar os arquivos para disquete se desejar e apagá-los do disco rígido. As cinco primeiras letras do nome do arquivo devem ser fornecidas pelo analisador, que podem ser suas iniciais. As 3 últimas letras do nome são automaticamente acrescentadas pelo contador do programa. Ex.: JOAO_001.D01. O 001 foi colocado pelo programa; a próxima análise será gravada no arquivo JOAO_002.D01, e assim até o número 099. Após isso, deve-se trocar as 5 letras iniciais do arquivo, ou aparecerá uma mensagem de erro dizendo que a capacidade de gravar foi extrapolada. A criação/deleção de arquivos e diretórios pode ser feita através da opção Directory existente em vários menus, ou ainda através do XTGold após dar boot no computador com o disquete dentro dele. Após copiar os arquivos para disquete, apague os arquivos no drive C:.

5. ANALISANDO AMOSTRAS

1. Ligar o regulador de voltagem da impressora/computador-integrador
2. Ligar a cromatógrafo (tecla ON/OFF na frente do cromatógrafo)

3. *Abrir os registros dos gases nos cilindros: N₂, H₂ e ar N₂. Verificar no registro de cada cilindro se a pressão é de 40 psi ou mais.*

No cromatógrafo:

4. *O método a ser usado no cromatógrafo é o METHOD 1. Pressionar a tecla AutoZero no aparelho. O valor deve ser em torno de 0 mV.*
5. *Ligar a chama: feche o botão de ar, reduza o fluxo de N₂ (no GC ou no cilindro) e abra o de H₂ totalmente. Deixe passar o H₂ puro por pelo menos 30 segundos. Pressione o acendedor sobre o suporte e gire o botão de ar até ouvir um 'POP'. A voltagem do AUTO ZERO (A/Z) deve subir para $\pm 1,5$ mV quando aceso. Abra totalmente o botão de ar. Regule o fluxo de N₂ e espere estabilizar. Após isso, tecele Status Escape até que a mensagem READY apareça..*

No computador (integrador):

6. *Verifique no canto inferior direito da tela se o método em uso é BAIXOETI. Caso contrário, ative-o no menu Instruments-Method Setup.*
7. *Com o mouse, entre no menu Instruments - Method Setup. Selecione o método BAIXOETI. Entre o seu nome, o diretório onde serão gravados seus arquivos (use o seu nome. Ex: C:\JOAO\), as iniciais dos nomes dos seus arquivos.*
8. *Se suas amostras são diluídas, entre o fator de diluição no campo "Dilution factor". Os campos "Sample amount" e "Standard amount" são usados na calibração. Os valores-padrão para os três campos é 1.0000e+0.*
9. *Selecione o menu Activate e selecione Activate Method. Todas as informações armazenadas serão usadas para todas as suas amostras. Se no entanto quiser abandonar as modificações, selecione o menu File e depois a opção Quit. Novamente selecione Quit na janela aberta.*
10. *Na janela inicial entre a identificação da amostra. Nessa janela você pode entrar também o tempo de análise, a quantidade de amostra ou padrão e o fator de diluição para esta amostra apenas.*

11. A mensagem *READY* no canto superior direito do monitor indica que o integrador está pronto para análise. Esse sinal vem do cromatógrafo; se o cromatógrafo estiver com problemas, a mensagem *NOT READY* aparece no cromatógrafo e no integrador.

No cromatógrafo:

12. Injete 0,5ml da amostra no cromatógrafo e tecele *RUN*. Use agulhas de tamanho médio e as mais finas possível.

13. Ao final da análise, o resultado é impresso e você pode digitar o nome da próxima amostra no integrador. Aguarde a mensagem *READY* para injetar novamente.

No integrador:

14. Se você deseja analisar mais de 100 amostras, você devera trocar o nome inicial dos arquivos após a centésima amostra.

5.1. Calibração

A calibração é feita diluindo-se o padrão de etileno (atualmente de 3047 ppm) em várias concentrações. Os arquivos resultantes são utilizados na tabela de calibração junto com os valores esperados e utilizados em uma regressão linear. O programa do integrador permite calibrações com uma só concentração (*single-point*) ou regressões de primeira, segunda ou terceira ordem, passando ou não pela origem. Estes parâmetros estão armazenados no Método e só devem ser alterados por pessoas autorizadas. Enquanto as condições de análise permanecerem inalteradas (*fluxo, temperatura, tempo, coluna, detector, gases a serem separados*) não há a necessidade de recalibrar o aparelho.

6. VISUALIZANDO ANÁLISES ANTERIORES

A opção View do menu Chromatograms permite visualizar os gráficos armazenados em arquivos de análises. Selecione o arquivo a ser visualizado nesta opção. Você pode modificar escalas e outras opções, mas essas modificações não são gravadas no arquivo. Para obter informações sobre os picos, selecione a opção Peak data no menu Display. Selecione Description (nome da amostra), Peak name e retention time. Ao clicar o mouse sobre um pico, as informações sobre ele aparecerão no centro da tela.

Para comparar dois cromatogramas, selecione Split screen para dividir a tela ao meio horizontalmente. Selecione os arquivos da primeira e da segunda janela. Ao comparar os picos, verifique se os mesmos estão na mesma escala.

7. RECALCULANDO AMOSTRAS

Se você possui amostras que foram lidas e que deseja recalculá-las após ter havido modificações no método, como calibrações, quantificação, etc., você pode usar a opção Plot/Recalculate do menu Chromatograms. Esta opção lê os dados originais do seu arquivo (área, picos) e os recalcula usando os dados do método ativo, que foi modificado após a análise, criando um novo arquivo. Basta selecionar o(s) arquivo(s) original(is) no campo File da janela aberta nesta opção e depois selecionar a opção Go no menu Options. Imediatamente o arquivo é recalculado e impresso.

8. DESLIGANDO OS APARELHOS

Feche os registros de ar e H₂. Deixe passar somente N₂ por ±1 minuto, para evitar condensação de vapor de água no detector. Feche o registro de N₂ e desligue o cromatógrafo. Desligue o regulador de voltagem do computador/impressora.

9. LEMBRE-SE:

- *Nunca deixe passar somente o fluxo de hidrogênio por muito tempo. Pode danificar o detector ou causar explosão. O fluxo de H₂ deve ser acompanhado dos fluxos de N₂ e ar.*
- *JAMAIS ALTERE OUTROS PARÂMETROS DO MÉTODO (Menu Method-Modify active) OU CALIBRE O MÉTODO (Method-Calibrate Active). Os resultados e cálculos poderão ser errôneos!*
- *JAMAIS ALTERE AS REGULAGENS DE FLUXO DE GASES E TEMPERATURAS NOS MÉTODOS! A calibração correta depende destes valores fixos. Qualquer alteração será necessária nova calibração.*
- *Não pressione nenhuma tecla do cromatógrafo a não ser as seguintes: AUTO ZERO (para verificar se há chama), STATUS ESCAPE (para abandonar AUTO ZERO ou outra função mostrada) e RUN (para iniciar a análise). TODAS AS OUTRAS TECLAS SÃO PARA AJUSTE DO APARELHO!*
- *Caso haja pouco etileno na sua amostra, o gráfico pode não mostrar o pico devido à escala usada, mas a integração é feita sem problemas.*
- *Se você observar que o pico atingiu um platô (ficou com o topo achatado em 1000 mV), dilua a sua amostra pela metade e reanalise entrando com o fator de diluição 2 no campo "Dilution factor".*
- *Se você observar valores muito baixos de etileno após analisar várias amostras ou se o tempo de retenção aumentar durante uma sessão de análise, verifique se o septo está muito gasto. Deve durar 100 amostras em média.*
- *Não use agulhas curtas (que acompanham seringas de insulina).*
- *Antes de iniciar as análises, verifique se existem septos de reserva.*
- *Se quiser copiar arquivos de análises fora do programa do integrador, saia do programa (Opção Quit do menu File), insira o disquete identificado "XTGold MS-DOS" no drive e dê boot (ctr+alt+del). Automaticamente entra o programa XTGOLD. Retire o disquete e coloque o seu para copiar do c:\ para a:\. Após*

usar o XTGOLD, retire o disquete e dê boot novamente para voltar ao programa do integrador.

- *Não deixe mais de 200 arquivos em cada sub-diretório. Copie seus arquivos para disquete imediatamente após a análise se quiser, mas apague sempre seus arquivos de análise do drive C:.*
- *A mensagem “Too many files” significa que você deve mudar de diretório ou apagar alguns arquivos do diretório em uso.*

10. PROBLEMAS MAIS COMUNS E SUAS SOLUÇÕES

PROBLEMA	CAUSAS POSSÍVEIS	SOLUÇÕES
1. Chama não acende	Fluxo inadequado de gases	<ul style="list-style-type: none"> • Feche o fluxo de ar, reduza o fluxo de N₂ e abra o de H₂ totalmente. Deixe passar o H₂ puro por ±30 segundos. Posicione o acendedor sobre o suporte até ouvir um “POP”. Abra totalmente o ar e ajuste o fluxo de N₂. A função AUTOZERO com a chama acesa deve ser ± 1,5 mV. • Verifique se há gás nos cilindros, e se seus registros estão abertos (pressão > 40 psi).
2. AUTOZERO marca 0 mV	Chama apagada	<ul style="list-style-type: none"> • Acender a chama.
3. Não aparecem picos	<p>Chama apagada</p> <p>Amostra sem gás</p> <p>Amostra perdida durante a injeção</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Acender a chama • Se A/Z=1.5 mV, a chama está acesa. Analise uma amostra padrão e verifique o aparecimento de picos. • Pressão do carreador muito alta ou erro de injeção. Ao injetar a amostra, você não deve ouvir som de gás saindo. Mantenha a seringa pressionada por 2 segundos após ter pressionado a tecla RUN. Verifique se a pressão do carreador está de acordo com o método. • Verifique as condições do septo.
4. Não aparecem picos na tela do integrador, mas os resultados calculados são impressos normalmente	Escala incorreta do gráfico no integrador	<ul style="list-style-type: none"> • No integrador, ajuste a escala usando as teclas F6 e F7. O valor máximo de Y deve ser 1000mV.
5. Tempo de análise aumenta	<p>Septo vazando gás</p> <p>Coluna saturada</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Trocar o septo. • Aquecer a coluna a 120°C por 15 min ou trocar o recheio
6. Marcador de pressão do gás carreador indica pressão menor do que a mostrada ao pressionarmos a tecla CARRIER GAS	<p>Septo vazando gás</p> <p>Cilindro de nitrogênio vazio</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Trocar o septo • Verifique se a pressão na cabeça do cilindro é superior a 40 psi. Se não, regule a pressão ou troque o cilindro.
7. Nenhuma análise é efetuada após pressionar a tecla RUN	Parâmetros do GC não estão OK.	<ul style="list-style-type: none"> • Verifique a mensagem da tela do GC. NOT READY significa que um ou mais parâmetros estão fora da especificação. Use as teclas de parâmetros para identificar qual parâmetro está incorreto.

11. APÊNDICE

11.1 OBSERVANDO A SITUAÇÃO DOS PARÂMETROS DO GC

As teclas brancas do aparelho são as teclas de parâmetros. Ao pressioná-las, o aparelho mostrar na tela a situação do parâmetro (pressão, temperatura, voltagem, etc.). Elas não modificam o método, e servem apenas para consulta.

- *OVEN TEMP* - Temperatura do forno da coluna.
- *TIME* - Tempo de análise.
- *RATE* - Taxa de mudança de temperatura (oC/min) quando o método possui temperaturas diferente ao longo da análise.
- *INJ TEMP* - temperatura na câmara de injeção.
- *CARRIER GAS* - Fluxo de gás carreador.
- *VALVE* - Regulagens das válvulas (não usado)
- *DET TEMP* - Temperatura do detector.
- *RANGE* - Regulagem do detector.
- *OUTPUT* - Saída do detector.
- *ATTEN* - Atenuação.
- *AUTO ZERO* - Eliminador de sinal de ruído.
- *EVENTS* - Mostra todos os parâmetros sequencialmente.

11.2 CONFIGURAÇÃO ATUAL DOS MÉTODOS

11.2.1. Cromatógrafo

A configuração abaixo é a que foi ajustada em julho/1998 para as condições da coluna de Porapak N que estava instalada na época. Caso seja colocada outra coluna, estes valores devem ser ajustados novamente.

Tempo (min)	Evento	Valor	Descrição
0.10	Atenuação 1	16	Atenuação para etileno
1.10	Range 1	20	Mudança de escala de atenuação
1.12	Atenuação 1	64	Atenuação para acetileno

Este método utilizado com o método do integrador BAIXOETI serve para amostras de 0 a 124 nmol/ml de etileno e 10% de acetileno.

As atenuações utilizadas foram selecionadas de modo a não permitir que o sinal do cromatógrafo ultrapasse 1000 mV nas concentrações de etileno e acetileno normalmente encontradas nas amostras de experimentos. Os valores de atenuação do sinal encontram-se na tabela abaixo.

Tabela de atenuação

Atenn. GC	Range	Atenuação de Sinal
16	1	$5,3 \times 10^3$ Etileno
16	20	$1,1 \times 10^5$
64	1	$2,1 \times 10^4$
64	20	$4,5 \times 10^5$ Acetileno

11.2.2. Integrador

Quantificação do pico por integração da área projetada na linha base, calibração com padrão externo por regressão linear com 6 pontos de concentração e 2 repetições para etileno e 1 ponto (10% v/v) para acetileno com 2 repetições. Tolerância de 50%, menor pico 2.5-6.5. Calibração de 2,16 a 124 nmol/ml. Máx. conc. de etileno para pico < 1V de 100 nmol/ml aprox. Picos desconhecidos não são quantificados e relatados

11.3. ABREVIÇÕES USADAS NO CROMATÓGRAFO

Equil - Equilíbrio. A temperatura atingiu o valor determinado pelo método e está constante.

FID - Flame Ionization Detector - Detector de Ionização de Chama.

Inj - Temperatura do injetor.

Ovn - Oven. Forno da coluna.

Pres - Pressão do gás.

Psi - Libras por polegada quadrada (unidade de pressão).

Det - Temperatura do detector.

Gas - Pressão/fluxo do gás carreador (nitrogênio).

A/Z - Auto Zero.

11.4. DEFINIÇÕES

- a) *Method* - Conjunto de parâmetros que controlam o cromatógrafo.
- b) *Range* - Amplificação do sinal de saída em um FID.
- c) *Ready* - Indica que o aparelho está pronto para análise. Todas as condições do método foram atingidas.
- d) *Run* - Tempo do início da injeção da amostra até o fim do programa de análise.
- e) *Timed Events* - Eventos que ocorrem durante uma análise, programado na tabela de eventos.
- f) *Tempo de retenção* - Intervalo de tempo do ponto de injeção até o aparecimento do pico máximo no CG.
- g) *Carreador* - Gás inerte que transporta a amostra do injetor até a coluna do detector.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BODDEY, R.M. *Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. CRC Critical Reviews in Plant Sciences, Boca Raton, v.6, n.3, p.209-266, 1987*

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D., JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. *The acetylene – ethylene assay for N₂ fixation: Laboratory and field evaluation. Plant and Physiology, Rockville, v.43, p.1185-1207, 1968.*