

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUIMICA

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por  
Paulo Afonso da Costa e aprovado pela comissão julgadora

Campinas, 6 de julho de 1990

*Kenneth E. Collins*

Kenneth E. Collins



OTIMIZACAO DAS CONDICÕES DE ENCHIMENTO  
DE COLUNAS DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE  
ALTA EFICIENCIA - CLAE  
TESE DE MESTRADO  
PAULO AFONSO DA COSTA

ORIENTADOR : PROF. DR. KENNETH E. COLLINS

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

" Nenhum trabalho, e sim a  
indolência, é motivo de vergonha "

(Sesiodo)

( Os trabalhos e os dias )

Aos meus Pais

### Agradecimentos

Ao Joãozinho, pelo auxílio prestado na obtenção dos materiais e reagentes.

Ao Walter (Waltinho) pela manufatura dos projetos apresentados, sem o qual, sem seu conhecimento da parte técnica, não seria possível o desenvolvimento do Hardware obtido.

A Fátima pelo auxílio prestado no esclarecimento e uso dos equipamentos utilizados.

A Bel, pela gentileza e assessoria sempre pronta, e que foi imprescindível para a confecção desta tese.

A Ana Marta pelo auxílio prestado na correção desta tese, bem como no melhoramento da sua apresentação.

Ao meu orientador pelas idéias e sugestões, que dadas na hora certa, resultaram no bom encaminhamento deste trabalho.

A Carol H. Collins, pelo esclarecimento das dúvidas.

Aos demais amigos do laboratório, pela companhia, convivência e

*aprendizado.*

*Ao Instituto de Química, pela cessão do laboratório, equipamentos,  
reagentes*

*Aos professores, pelos cursos ministrados, que muito serviram para  
o desenvolvimento deste trabalho*

*A CAPES e CNPq, pelas bolsas de estudo, que me possibilitaram,  
continuar meus estudos*

*A Leda, pelo carinho, apoio, compreensão ..., e muito mais.*

## ÍNDICE

Resumo	
Abstract	
1. Descrição	pg 1
2. Introdução	pg 2 ✓
2.1 Colunas	pg 5 ✓
2.2 Fases Estacionárias	pg 8 ✓
2.3 Fases Móveis	pg 9 ✓
2.4 Interações na Fase Reversa - Aplicações	pg 10
2.5 Enchimento de Colunas	pg 11 ✓
A) Sedimentação de Partículas	pg 12 ✓
B) Aglomeração de Partículas	pg 13 ✓
C) Velocidade de Impacto das Partículas	pg 14 ✓
2.6 Métodos de Enchimento de Colunas Microbore	pg 14
2.7 Métodos de Avaliação de Colunas Microbore	pg 15
2.8 Dispersão Cromatográfica	pg 17
2.8.1 Dispersão na Coluna	pg 19
2.8.2 Dispersão nos Tubos Conectores	pg 20
2.9 Principais Equações	pg 22
2.10 Objetivos	pg 27
3. Parte Experimental e Resultados	pg 29
3.1 Reagentes Utilizados	pg 29
3.1.1 Reagentes e Solventes	pg 29
3.1.2 Fases Estacionárias, Fase Móvel e Solvente de Arraste	pg 29

3.2 Instrumental	pg 30
3.2.1 Recheamento de Colunas	pg 30
3.2.2 Avaliação de Colunas	pg 30
3.2.3 Demais Equipamentos Utilizados	pg 30
3.3 Aperfeiçoamento dos Demais Equipamentos Utilizados	pg 31
3.4 Preparação dos Reagentes Utilizados	pg 31
3.4.1 Preparação da Fase Móvel	pg 31
3.4.2 Preparação da Solução Teste	pg 32
3.5 Sensibilidade do Detector e Velocidade do Papel do Registrador	pg 32
3.6 Métodos de Avaliação das Colunas	pg 33
3.7 Enchimento de Colunas - Ensaio Preliminares	pg 33
3.7.1 Procedimento de Enchimento	pg 33
3.7.2 Seleção do Solvente de Suspensão	pg 34
3.7.3 Variação da Concentração da Suspensão	pg 42
3.7.4 Variação da Temperatura de Enchimento	
A) - 75°C	pg 46
B) - 95°C	pg 50
3.7.5 Mudança da Pressão de Enchimento para 10000psi	pg 50
3.8 Esquema de Trabalho a Partir das Otimizações Feitas	pg 54
3.8.1 Parâmetros Fixos	
: A) Hardware	pg 54
B) Solventes	pg 54
C) Fase Estacionária	pg 54
D) Modificações Propostas	pg 54

<b>3.8.2 Parâmetros Móveis</b>	<b>A) Obtenção das Melhores Variáveis</b>	<b>pg 56</b>
	<b>B) Repetição dos Melhores Resultados</b>	<b>pg 56</b>
	<b>C) Variação da Temperatura Intermediária</b>	<b>pg 56</b>
	<b>D) Repetição dos Melhores Resultados</b>	<b>pg 56</b>
<b>3.9 Resultados Obtidos</b>		<b>pg 57</b>
<b>3.9.1 Enchimento de Colunas a 5000, 10000 e 15000psi</b>		<b>pg 57</b>
<b>3.9.2 Repetição dos Melhores Resultados</b>		<b>pg 62</b>
<b>3.9.3 Enchimento de Colunas Utilizando a Pressão de 5000psi na Temperatura Intermediária</b>		<b>pg 63</b>
<b>3.9.4 Repetição dos Melhores Resultados da Etapa Anterior : ensaio com a Permeabilidade do Filtro da Pós-Coluna</b>		<b>pg 66</b>
<b>3.9.5 Recheamento a Baixa Temperatura</b>		<b>pg 67</b>
<b>4. Discussão</b>		<b>pg 72</b>
<b>5. Conclusão</b>		<b>pg 80</b>
<b>6. Perspectivas Futuras</b>		<b>pg 82</b>
<b>7. Tabelas Complementares</b>		<b>pg 83</b>
<b>8. Bibliografia</b>		<b>pg 91</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

fig. 2.1	Esquema do efeito do fluxo no terminal da coluna	pg 7
fig. 2.2	Relação entre a largura do pico, $w$ , e a constante $\sigma$	pg 18
fig. 2.3	Efeito da parede do tubo no fluxo do solvente	pg 21
fig. 2.4	Gráfico de Van Deemter e as curvas de distribuição	pg 27
fig. 3.1	Reservatório com capacidade volumétrica de 19ml	pg 36
fig. 3.2	Reservatório com capacidade volumétrica de 6ml	pg 37
fig. 3.3	Reservatório com capacidade volumétrica de 27ml	pg 38
fig. 3.4	Funis de saída do reservatório de suspensão	pg 39
fig. 3.5	Esquema da coluna com anilha mais pós-coluna	pg 40
fig. 3.6	Esquema da coluna com rosca mais pós-coluna	pg 41
fig. 3.7	Cromatogramas mostrando o efeito do solvente de suspensão sobre a fase estacionária de $3\mu\text{m}$	pg 43
fig. 3.8	Cromatogramas mostrando o efeito do solvente de suspensão sobre a fase estacionária de $5\mu\text{m}$	pg 44
fig. 3.9	Cromatograma mostrando a influência do volume do reservatório sobre as fases estacionárias	pg 45
fig. 3.10	Esquema da coluna envolta em sua camisa de banho	pg 47
fig. 3.11	Cromatograma da coluna recheada a 5000psi e a $75^{\circ}\text{C}$ com o reservatório de 19ml	pg 49
fig. 3.12	Cromatograma da coluna recheada a 10000psi e a $25^{\circ}\text{C}$ com pré-coluna no reservatório de 27ml	pg 51
fig. 3.13	Cromatograma da coluna recheada a 10000psi	

com pré-coluna e a temperatura de 75 e 95°C	pg 52
fig. 3.14 Curva de Van Deemter dos cromatogramas obtidos nesta primeira fase	pg 53
fig. 3.15 Curvas de Van Deemter das colunas recheadas a 5000psi	pg 59
fig. 3.16 Curva de Van Deemter das colunas recheadas a 10000psi	pg 60
fig. 3.17 Curva de Van Deemter da coluna recheada a 15000psi	pg 61
fig. 3.18 Curva de Van Deemter das colunas recheadas a 5000psi nas temperaturas emtermediárias	pg 65
fig. 3.19 Curva de Van Deemter da repetição da coluna recheada a 5000psi a 35°C e a -15°C	pg 69
fig. 3.20 Tempo de enchimento das colunas contra a temperatura utilizada - reservatório de 27ml	pg 70
fig. 3.21 Perda da eficiência das colunas com o aumento da temperatura	pg 71

### INDICE DAS TABELAS

3.1 Propriedades dos solventes de enchimento	pg 42
3.2 Influência do solvente propulsor no tempo de enchimento das colunas recheadas a 75°C e a 5000psi	pg 48
3.3 Parâmetros cromatográficos obtidos com a coluna recheada a 5000psi e a 75°C	pg 48

3.4	Parâmetros cromatográficos das colunas recheadas a 10000psi a várias temperaturas	pg 51
3.5	Condições de preparo das colunas recheadas a temperatura ambiente	pg 57
3.6	Condições de preparo das colunas recheadas a 75°C	pg 57
3.7	Condições de preparo das colunas recheadas a 95°C	pg 58
3.8	Parâmetros cromatográficos das colunas recheadas a varias temperaturas e pressão	pg 58
3.9	Repetição das condições de preparo da coluna recheada a 5000psi e temperatura ambiente	pg 62
3.10	Parâmetros cromatográficos das colunas recheadas a 5000psi e temperatura ambiente	pg 63
3.11	Tempos de enchimento das colunas recheadas a 5000psi nas tempertaturas intemediárias	pg 64
3.12	Parâmetros cromatográficos das colunas recheadas a 5000psi nas temperaturas intermediárias	pg 64
3.13	Condições de preparo da coluna recheada a 5000psi e a 35°C	pg 67
3.14	Parâmetros cromatográficos da coluna recheada a 5000psi e a 35°C	pg 67
3.15	Condição de preparo da coluna recheada a 5000psi e a -15°C	pg 68
3.16	Parâmetros cromatográficos da coluna recheada a 5000psi e a -15°C	pg 68

## TABELAS COMPLEMENTARES

### 1 - Dados fisico-químicos sobre os solventes utilizados

A) tetracloreto de carbono pg 83

B) álcool metílico pg 84

### 2 - Tabelas complementares sobre as colunas recheadas

inclusão do fator de distribuição de massa (Dm) nas tabelas, bem como a pressão máxima no fluxo ótimo de trabalho.

A) testes iniciais - bomba Shandon pg 85

B) testes com a bomba Haskel pg 85

C) repetição dos melhores resultados - temperatura ambiente pg 87

D) obtenção das colunas a temperatura intermediária pg 87

E) repetição do melhor resultado : 35°C e 5000psi pg 88

F) teste com enchimento da coluna a -15°C pg 88

Viscosidade da fase móvel metanol/água pg 89

Queda da pressão com o aumento da temperatura na coluna pg 90

## RESUMO

Em geral, a eficiência das colunas comerciais longas microbore não têm sido ideal. Apesar de muitos grupos terem escrito sobre enchimentos de colunas microbore, utilizando técnicas de suspensão, seus procedimentos e resultados variam enormemente. Estes resultados levam à conclusão de que a técnica utilizada no recheio de colunas longas com partículas de  $3\mu\text{m}$  não funcionam para colunas de 1-2mm de diâmetro interno.

Deste modo, procurou-se estudar os efeitos que os diversos parâmetros têm no enchimento das colunas, tal como a pressão, a temperatura, a viscosidade do solvente de suspensão, a densidade do mesmo, a diluição e a forma do funil de saída do reservatório. Baseados nestes aspectos, procurou-se desenvolver um método que permitisse a obtenção de colunas microbore longas (25 x 0,2cm) com partículas de  $3\mu\text{m}$ .

Otimizando as condições físicas do enchimento, tal como o volume do reservatório, e aperfeiçoando a forma do funil de saída do mesmo, para evitar turbulências de fluxo, verificou-se que com a utilização de suspensões diluídas obteve-se colunas melhores do que aquelas recheadas com suspensões concentradas. A otimização do solvente de suspensão, que mantém as partículas estáveis na mesma pelo espaço de algumas horas, também foi obtido. Com estes parâmetros conseguiu-se colunas com eficiência de 28000 pratos por metro. A seguir, a redução da viscosidade do solvente de suspensão pelo aumento da temperatura da coluna durante o enchimento da mesma foi experimentado, o qual conseguiu-se obter colunas de até 82000 pratos por metro.

Testes com aumento da pressão do enchimento, de 5000psi até 10000psi foram feitos, no qual foi notado a redução da eficiência da coluna, com a diminuição do número de pratos teóricos por metro e aumento da assimetria. Deste modo, a eficiência máxima conseguida a 10000psi de pressão foi de 62000 pratos por metro.

Estes dados levaram às condições otimizadas de enchimento das colunas, e os resultados indicaram como o efeito da compactação da fase estacionária na coluna pode levar a formação de agregados e/ou diminuição dos diversos caminhos possíveis utilizados pela fase móvel, diminuindo deste modo a eficiência da coluna.

## ABSTRACT

In general, long commercial microbore columns do not have high efficiencies. Although many groups have published their procedures for preparing slurry-packed columns, their results have varied enormously. These results indicate that techniques used to pack long (25cm) columns with small ( $3\mu\text{m}$ ) particles do not work well for columns of 1-2mm inside diameters.

Thus, it was our intention to study the effects of various parameters, such as the pressure, temperature, viscosity of the suspension solvent, density of this solvent, concentration of the suspension and form of the reservoir exit funnel, on the packing of small diameter columns. The objective of this was the development of a good method for preparing long microbore columns having high efficiencies. By optimizing the physical conditions of column packing to minimize flow turbulence, it was shown that dilute suspensions produce better columns than more concentrated suspensions. The optimization of suspension solvent and preparation conditions resulted in suspensions which were reasonably stable for several hours. With these parameters controlled, columns were prepared with efficiencies of about 28000 plates per meter. Subsequently, reduction of the suspension viscosity by raising the temperature during the packing operation gave rise to columns of up to 82000 plates per meter.

Experiments involving packing pressures of 5000 and 10000psi showed that less plates per meter and higher assymetry were obtained at the higher pressure. The highest efficiency at 10000psi was 62000 plates per meter.

The results obtained have led to an optimized packing procedure and indicate that compaction of the structure of the packed stationary phase causes aggregation and/or a decrease in the number of flow paths of the mobile phase, which decrease the column efficiency.

## CAPÍTULO I

### DESCRIÇÃO DO PROBLEMA

Enchimentos eficientes de colunas microbore têm causado muitas controvérsias, mas em geral, a qualidade em relação à eficiência na separação das espécies e a estabilidade das colunas comerciais não são ideais.<sup>(1)</sup> Apesar de muitos grupos terem escrito sobre enchimentos eficientes de colunas microbore com técnicas apropriadas de suspensão, seus procedimentos variam enormemente, requerendo, muitas vezes, pressões muito mais altas do que para as colunas convencionais de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Técnicas tais como balanço<sup>(2)</sup> ou não de densidade, estabilização mecânica e química, e enchimento em ambos os sentidos<sup>(2B)</sup> são sugeridas, contudo, poucos métodos resultam em colunas com eficiência alta. Estes resultados levam à conclusão de que as técnicas utilizadas no recheio de colunas longas com partículas de  $3\mu\text{m}$  não podem ser aplicadas para colunas de 1-2mm de diâmetro interno (di).

## CAPÍTULO 2

### INTRODUÇÃO

A descoberta da cromatografia em seus termos modernos é geralmente atribuída a Tswett, que em 1903 foi o primeiro a demonstrar como os compostos poderiam ser separados por eluição através de uma coluna recheada com adsorventes. Ocorreu um pequeno avanço na prática e teoria da cromatografia até 1941 quando Martín e Synge<sup>(4)</sup> publicaram seu trabalho clássico descrevendo o desenvolvimento da cromatografia de partição ou cromatografia líquido-líquido onde destacavam as razões diferentes de migração das substâncias entre a fase móvel e a fase estacionária líquida retida nos interstícios porosos do suporte. Neste trabalho eles mostraram os fundamentos da cromatografia, desenvolvendo o conceito de altura equivalente de um prato teórico - AEPT (HETP do inglês) o qual foi universalmente aceito como medida da eficiência de uma coluna cromatográfica. Também demonstraram que o tempo de eluição estava diretamente ligado com o raio de partição das substâncias entre as duas fases na coluna. Foram os primeiros a mostrar que para análises rápidas em Cromatografia Líquida, se requer o uso de pequenas partículas e alta pressão nos diferentes segmentos da coluna.

As colunas modernas de CLAE (HPLC) são geralmente recheadas pela técnica de alta pressão utilizando o método de

suspensão. Verzele<sup>(5)</sup> e Dewaele concluíram que :

1 - para a produção de boas colunas recheadas com partículas  $\leq 10\mu\text{m}$ , as partículas de forma esférica são as preferidas.

2 - para colunas recheadas com partículas  $\geq 10\mu\text{m}$ , as partículas de forma irregular são preferidas.

3 - partículas pequenas ( 5 a 3  $\mu\text{m}$  ) são mais difíceis de recheiar, eficientemente, as colunas, e altas pressões são necessárias para tal.

4 - para partículas menores que  $10\mu\text{m}$  um solvente de suspensão de baixa viscosidade é preferido .

5 - a concentração da suspensão não parece ser crítica.

6 - diferentes métodos de enchimento são necessários para diferentes colunas.

Para colunas do tipo Microbore existe a concordância de que a dificuldade de recheiar a coluna cresce com o aumento do comprimento da mesma. Porém, existe a vantagem de que com colunas microbore, a concatenação<sup>(19,20,20)</sup> das colunas fornece um aumento linear de sua eficiência, o que não se dá com as colunas clássicas ( $d_i=4,6\text{mm}$  ou mais) cuja eficiência cresce até certo ponto, estacionando depois, apesar do aumento do número de colunas concatenadas.

Gluckman et al<sup>(6)</sup> descreveram os efeitos da densidade da suspensão, tempo de enchimento e pressão no desempenho de colunas recheadas. Notaram que, para colunas microbore recheadas com partículas de 5 $\mu$ m, a reprodutibilidade é boa, embora a estabilidade das mesmas não seja. Ao contrário, a reprodutibilidade das colunas recheadas com partículas de 3 $\mu$ m é ruim, porém apresentam uma boa estabilidade.

Menet et al<sup>(27)</sup> estudaram os efeitos na razão de fluxo de uma coluna 1m x 1mm di a diferentes velocidades, e notaram que o valor da altura equivalente de um prato teórico aumenta com o aumento da temperatura, reduzindo a eficiência da coluna, concluindo que o aumento da difusão molecular axial é responsável por este fenômeno, pelo aumento da velocidade da transferência de massa.

Mc Nair e Bowermaster<sup>(50)</sup> fizeram experimentos com colunas microbore com diâmetro interno de 1mm e compararam estas com as colunas convencionais, com respeito a velocidade da análise, eficiência e sensibilidade. Utilizando aquecimento nas colunas microbore durante as análises, observaram que estas se comparavam em rapidez de análise, às colunas convencionais, bem como notaram um aumento da sensibilidade da coluna e de sua faixa de análise de compostos. Seguindo esta mesma linha, Warren e Bidlingmayer<sup>(51)</sup> estudaram a eficiência de varios tipos de colunas com o uso de programação de temperatura, utilizando-se das curvas de Van Deemter<sup>(45)</sup> para analisarem suas eficiências, concluindo que

a eficiência das colunas não melhora com o aumento da temperatura.

## 2.1 Colunas

As colunas de CLAE podem ser construídas de diversos materiais tais como aço inoxidável, vidro e sílica fundida.

Colunas com vidro inserido em seu interior podem ter diversas aplicações. Ishii<sup>(46)</sup> et al relacionaram os efeitos do material de confecção das colunas com a sua eficiência, concluindo que em micro-colunas este efeito é maior do que em colunas convencionais. Empregando vidro e tubo de sílica fundida, para micro-colunas, conseguiram excelentes resultados na separação de compostos aromáticos, em análises rápidas. Takeuchi e Ishu<sup>(47)</sup> também aplicaram esta técnica conseguindo separações excelentes de compostos aromáticos, com colunas de 3-10 cm x 0,12mm di , e concluíram que a coluna de vidro pyrex fornece eficiências melhores que as de outros materiais utilizados. Seguindo esta mesma linha, Konishi et al<sup>(48)</sup> fizeram testes com colunas de vidro recheadas do tipo capilar, avaliando as técnicas de enchimento com diversos tipos de solventes e o tempo gasto na análise das misturas-testes.

Tubos de metal, polido internamente, são muito utilizados para se recheiar colunas, embora apresentem a desvantagem das suas paredes internas necessitarem de um polimento excelente tal como um espelho brilhante, devido a mesma exercer influência

sobre a fluidez da fase móvel, afetando a eficiência da coluna. Porém, estas colunas apresentam a vantagem de resistirem a pressões altas de enchimento e de análise, o que não ocorre com as colunas de vidro. Pode-se prever a eficiência de uma coluna utilizando parâmetros tais como tamanho das partículas, e com isso, otimizar as dimensões da coluna, e algumas vezes melhorar a configuração instrumental.

Kirkland<sup>(7,8,9)</sup>, em muitos de seus trabalhos, utilizou partículas de 30µm em colunas de 2,1mm de di com 0,5 ou 1m de comprimento, e encontrou dificuldades para recheá-las e obter colunas com alta eficiência, porém, com colunas de 8 e 11mm de di, de Stefano e Beachell<sup>(10)</sup> obtiveram colunas estáveis, com eficiências mais altas do que com as de 2,1mm de di. Eles mostraram que isto devia-se provavelmente ao resultado do chamado "diâmetro infinito". Quando uma injeção cuidadosa da amostra em um ponto no centro da coluna resulta em uma banda de solutos percorrendo a coluna toda sem tocar as paredes da mesma, esta se deve mais à baixa dispersão radial do soluto dentro da coluna.<sup>(29)</sup> Esta teoria é chamada de efeito do diâmetro infinito, o qual se pode prever com a equação de Knox e Parcher<sup>(41)</sup> que é a seguinte :

$$L dp / di^2 < 0,4 \quad (1)$$

onde L = comprimento da coluna

dp = diâmetro da partícula

di = diâmetro interno da coluna

A utilização de filtros, nos terminais da coluna, ajuda a obter um espalhamento da amostra por toda a secção reta da coluna, minimizando, ou até mesmo evitando o efeito da parede da coluna. Porém, somente a utilização do filtro seria inútil sem uma configuração adequada que una a entrada da coluna com o injetor. A utilização de terminais de diâmetro infinito permitem a eliminação quase total deste efeito, como mostrado na figura 2.1

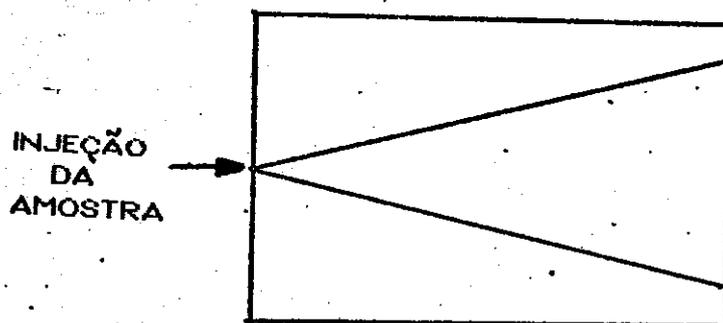


Figura 2.1 - Esquema do efeito do fluxo no terminal da coluna com diâmetro infinito. A injeção da amostra no centro do terminal fará com que as moléculas nunca se aproximem das paredes do tubo, melhorando a forma do pico (ref. 24)

## 2.2 Fases Estacionárias (FE)

Recentemente houve um grande avanço no sentido de melhorar a qualidade das fases estacionárias, principalmente em relação à redução do tamanho das partículas<sup>(13)</sup> e ao estreitamento da faixa de distribuição do tamanho das mesmas.<sup>(14,15)</sup>

A sílica gel é o mais importante adsorvente utilizado em cromatografia líquido-sólido<sup>(16)</sup>, CLS, ou em cromatografia líquida por adsorção. É também o material básico, ou suporte sólido, mais empregado na preparação de fases estacionárias quimicamente ligadas, FEQL, utilizadas na cromatografia líquida-líquida, CLL, sendo que o preço da fase estacionária aumenta com a redução do diâmetro da partícula e de sua faixa de distribuição de tamanho.

As primeiras FEQL foram preparadas por esterificação da superfície ativa da sílica gel (grupos silanóis) com alcoóis ou fenilisocianatos. Os produtos obtidos por remoção contínua da água apresentavam estrutura monomérica com ligações tipo  $\text{≡Si-O-R}$ . Embora possuíssem uma rápida transferência de massa e boa seletividade, eram facilmente hidrolizáveis. Outras técnicas surgiram, produzindo estruturas do tipo  $\text{≡Si-R}$  ou  $\text{≡Si-N}$  $\begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{R} \end{matrix}$ , mais estáveis hidroliticamente, porém envolviam muitas etapas de preparação, cujo controle devia ser rigoroso, e sem o qual poderiam resultar em um baixo recobrimento dos silanóis livres da sílica gel, além dos resíduos provenientes dos reagentes organometálicos utilizados.

As FEQL disponíveis no mercado são do tipo siloxano  $\text{ESi-O-Si-R}$ , preparadas através da reação dos grupos silanóis da superfície da sílica gel com organoclorosilanos ou organoalcóxissilanos.

O controle do recobrimento da superfície pelo modificador orgânico é importante, pois dele dependem as características da FEQL que se deseja, podendo o recobrimento variar entre 10 e 60%. Conforme a natureza do grupo ligado à superfície da sílica, têm-se fases com diferentes polaridades e seletividade. Os grupos modificadores orgânicos mais usados são: etil, hexil, octil, octadecil, fenil, cloropropil, aminopropil e cianopropil. As fases estacionárias polares são empregadas com solventes de polaridades menores ou apolares, surgindo daí a denominação de fase normal, FN, para esta técnica. As fases apolares do tipo octilsilano, C-8 ou octadecilsilano, C-18 ou ODS, são empregadas com fases móveis polares, originando daí a técnica da cromatografia de fase reversa, ou , FR.

### 2.3 Fases Móveis (FM)

As fases móveis (FM) empregadas com as FEQL-FR em geral, são soluções aquosas de solventes orgânicos de média a alta polaridade. Os solventes mais utilizados são o Metanol, MeOH, e Acetonitrila, ACN. Tetrahydrofurano, THF, também é empregado, embora seja menos polar e mais caro que os anteriores.

A proporção de água nestas misturas varia conforme a seletividade e a resolução desejadas, podendo ocasionar, até uma inversão na ordem de eluição de uma mistura.<sup>(17)</sup> Além disso, estas misturas apresentam a vantagem de serem baratas, pouco tóxicas, de simples manuseio, versáteis e com ampla aplicação, podendo ser utilizadas em eluição por gradiente.

#### 2.4 Interações na Fase Reversa - Aplicações

A retenção, na cromatografia líquida de fase reversa, ocorre devido às interações nas regiões hidrofóbicas da estrutura do soluto com a fase estacionária<sup>(12,18,19)</sup>, tornando a técnica adequada à separação dos componentes de séries homólogas e oligoméricas<sup>(12)</sup>. Como a fase móvel é polar e geralmente contém água, o método é adequado para a separação de compostos insolúveis em solventes orgânicos, além de ser possível separar compostos com diferentes polaridades mediante o emprego de eluição por gradiente. Ao contrário da retenção, que é função do caráter hidrofóbico da amostra, a seletividade,  $\alpha$ , depende de interações específicas do soluto com a fase móvel<sup>(20)</sup> e pode ser ajustada variando-se a força<sup>(21,22)</sup> da FM. Assim, se uma coluna apresenta inicialmente uma baixa resolução, uma mudança na composição da FM, por mínima que seja (ex : 70:30 para 68:32)<sup>(17)</sup> pode fornecer um aumento da seletividade e separar completamente os picos<sup>(17,29,24)</sup>.

## 2.5 Enchimento de Colunas

Há alguns anos atrás, poucas pessoas arriscavam recheiar suas próprias colunas, devido ao aspecto misterioso que envolvia o procedimento do enchimento. Atualmente, graças à grande quantidade de artigos publicados sobre o enchimento de colunas, muitas pessoas tentam fabricar as suas próprias colunas, embora aprendam que não basta seguir o procedimento dos artigos. A técnica tem que estar aliada à criatividade, e o enchimento da coluna tem que ser encarado como arte.

Os primeiros métodos de enchimento de colunas por via úmida, para micropartículas à base de sílica, com diâmetro menor que  $10\mu\text{m}$ , foram publicados no início dos anos 70<sup>(25,26)</sup>. Nesta época, as partículas eram irregulares com grande faixa de variação de diâmetro ocasionando muitas vezes, o entupimento dos filtros das colunas, inutilizando deste modo as mesmas. Atualmente, graças ao aprimoramento das técnicas de síntese e preparação, as partículas possuem uma faixa relativamente estreita de diâmetro, que dispensa a separação posterior.

Para que a coluna apresente um bom desempenho, as seguintes propriedades devem ser observadas<sup>(40)</sup>:

- 1) o recheio deve ser denso e ordenado de modo a proporcionar uma alta estabilidade.
- 2) os espaços intersticiais entre as partículas compactadas devem ter uma dimensão uniforme, de modo a dar um

perfil homogêneo de fluxo.

3) locais de densidade de recheio desiguais, ao longo e através do eixo da coluna, devem ser rigorosamente evitados.

A idéia original de empregar suspensões de partículas em um líquido apropriado era o de prevenir a formação de agregados. Sabe-se que as partículas de 5 e 3 $\mu$ m têm uma grande área superficial ( $>1m^2/g$ ) de modo que, as forças de adesão entre as partículas adjacentes, faz com que as mesmas se agregem, e os aglomerados sejam formados<sup>(2,49)</sup> se não se usar um solvente apropriado. A técnica de suspensão foi introduzida para que as partículas ficassem suspensas homogeneamente no líquido, de modo a evitar que houvesse a formação de pontes partículas-partículas, e sua posterior sedimentação, causada pela dispersão das forças atrativas entre elas.<sup>(49)</sup> Um pré-requisito básico para utilizar uma suspensão de partículas é a de que ela deve molhar a superfície da sílica, de modo a evitar que haja a formação de bolhas de ar em sua superfície, e conseqüente formação de aglomerados.

Para recheiar uma coluna, é necessário ter em mente portanto os seguintes aspectos :

#### A) Sedimentação das Partículas

A velocidade de sedimentação das partículas numa

suspensão,  $V_s$ , é dada pela equação de Stokes<sup>(26)</sup>

$$V_s = \frac{d_p^2 g (\rho_p - \rho_L)}{18 \eta} \quad (\text{cm/s}) \quad (2)$$

onde :

$d_p$  = diâmetro das partículas em  $\mu\text{m}$

$g$  = gravidade ( $\text{cm/s}^2$ )

$\rho_p$  = densidade da partícula ( $\text{g/cm}^3$ )

$\rho_L$  = densidade do líquido ( $\text{g/cm}^3$ )

$\eta$  = viscosidade do líquido (poise)

A equação sugere que para um enchimento rápido e eficiente da coluna, o solvente deve ter baixa viscosidade e alta densidade. A baixa viscosidade tem por objetivo fazer com que o fluxo de solvente de suspensão seja rápido, permitindo um tempo de recheio curto, e evitar que a pressão de recheio não seja muito alta. A densidade alta evita que as partículas sedimentem rapidamente, sendo por este motivo que o iodeto de metila é o solvente preferido para ser usado nas suspensões<sup>(27)</sup>.

## B ) Aglomeração de Partículas

A área superficial das partículas aumenta com a diminuição de seu tamanho. Shelly e Edkins<sup>(2)</sup> estudaram os efeitos reológicos das suspensões, dividindo-as em floculadas e não floculadas. A principal conclusão que chegaram é que as suspensões floculadas são causadas pelas cargas eletrostáticas geradas durante o enchimento das colunas. Solventes contendo hidroxila (-OH) podem provocar cargas negativas na superfície da sílica.

causando aglomerações. É importante então, durante o recheio de colunas com partículas de 3 $\mu$ m, utilizarmos solventes apolares que dificultem a formação de cargas e conseqüentemente aglomeração das partículas, o que impediria a sedimentação das mesmas no leito da coluna, causando a redução de sua eficiência.

### C ) Velocidade de Impacto das Partículas

Durante o enchimento da coluna, as partículas de sílica são forçadas pelo solvente de arraste para o interior da coluna. Muito embora não haja um compromisso entre a concentração e a velocidade de enchimento,<sup>(28)</sup> cada partícula deve ter tempo suficiente para se alojar no leito da coluna antes que outra se choque com ela, o que poderia ocasionar aglomerados, vazios ou canais no leito da mesma. Por essa razão, a suspensão deve ter a viscosidade mais baixa possível,<sup>(27)</sup> aliada com uma alta diluição da suspensão.

### 2.6 Métodos de Enchimento de Colunas Microbore

Diversos métodos de enchimento de colunas têm sido sugeridos, entre os quais se destacam o balanço de densidade<sup>(2)</sup>, alta viscosidade<sup>(30,34)</sup> e suspensões diluídas<sup>(32)</sup>. Para enchimentos com fase reversa, têm sido empregados solventes que variam de álcoois<sup>(33,34)</sup> a solventes halogenados e ácidos orgânicos.<sup>(35)</sup> A concentração da suspensão varia nos diversos métodos de 5 a 30% m/v e o sentido do enchimento sugere que seja

primeiramente contra a gravidade (coluna para cima) e depois a favor da gravidade (coluna para baixo), bem como a utilização de pressão constante<sup>(28,94,96)</sup> e velocidade de fluxo constante.<sup>(27,90,95)</sup>

## 2.7 Métodos de Avaliação de Colunas Microbore

Existem diferentes métodos para a avaliação de colunas microbore, os quais se referem ao desempenho da coluna frente a solutos ditos "ideais". O desempenho da coluna depende do tipo de separação em que ela será empregada, e não pode ser expresso por um único número, enquanto a eficiência dá uma indicação da qualidade do recheio da coluna, através de medidas das contribuições cinéticas do espalhamento de banda<sup>(54)</sup>. Os efeitos extra-colunas, que contribuem para o alargamento da banda, ou mesmo os fatores termodinâmicos, na prática, não são considerados nos cálculos da eficiência da coluna. Assim, o valor do número de pratos teóricos, denominado eficiência  $n$ , na verdade, expressa apenas o desempenho cinético das colunas. Como os solutos escolhidos são considerados ideais, já que apenas o desempenho cinético tem interesse, estes não devem interagir com a FM e a FE da coluna, apresentando portanto um comportamento termodinâmico ideal.

Devido às considerações de que o pico resultante do espalhamento da banda deve apresentar um perfil de distribuição Gaussiano de concentração entre a FM e a FE, o cálculo do número

de pratos teóricos baseia-se no modelo Gaussiano. Assim, a eficiência  $n$  é convencionalmente definida por :

$$n = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad (3)$$

onde  $t_R$  é o tempo de retenção do componente e  $\sigma$  é a variância para medida do pico nas mesmas unidades de tempo de  $t_R$ . Diferentes larguras do pico podem ser relacionadas com a variância de acordo com a relação :

$$W^2 = g \sigma^2$$

onde  $W$  = largura do pico na região de interesse , e  
 $g$  = constante que depende da altura  $h$  do pico em que a largura é medida. Pode-se então escrever :

$$n = \frac{g t_R^2}{W^2} \quad (4)$$

Esta é a equação básica utilizada nos diversos métodos empregados no cálculo da eficiência da coluna.

Para se calcular a eficiência das colunas se destacam os seguintes métodos :

Largura à meia altura

Simulação da Forma de um Pico Gaussiano

Momentos

Simulação da Forma de um Pico Gaussiano

Modificado

O método da meia altura consiste em tomar a largura a 50% da altura do pico ( $W_{1/2}$  a = 5,545). Este método está

sujeito a menos erros devido à facilidade na determinação da posição de medida.

O método do Momento consiste na determinação de momentos estatísticos e exige o uso de microcomputadores e técnicas de aquisição de dados.

O método de simulação da forma Gaussiana Modificada exponencialmente é baseado na assimetria, que utiliza aproximações do método do Momento.

Estes métodos foram rigorosamente avaliados por Colmsjö e Ericsson<sup>(37)</sup>, que chegaram à conclusão de que o melhor método para avaliação de picos de um cromatograma, em termos de precisão e exatidão é o método da largura à meia altura.

## 2.8 Dispersão Cromatográfica<sup>(38,39)</sup>

A largura dos picos que emergem da coluna são proporcionais às dimensões da coluna; colunas estreitas, tipo microbore de di  $\leq 2\text{mm}$  produzem picos estreitos. Do mesmo modo, os picos alargados dependem das dimensões do tubo. Scott e Kucera<sup>(38)</sup> estudaram os efeitos que diversos diâmetros de colunas microbore têm sobre a eficiência, e a relação que existe entre o tamanho da micro-cela e o alargamento da banda cromatográfica, chegando à conclusão de que para colunas de diâmetro  $\leq 2\text{mm}$  as celas de  $1\mu\text{L}$  respondem com uma maior eficiência, e as colunas clássicas, de di  $\geq 4,6\text{mm}$  têm sua maior eficiência com celas de

3 $\mu$ L. Deste modo, a dispersão cromatográfica seria minimizada juntamente com os efeitos que a largura da coluna tem sobre a banda cromatográfica.

A dispersão pode ser quantitativamente descrita de diversos modos, sendo que dois são os principais: o primeiro utiliza a largura do pico, ou da banda,  $W$ , a qual contém quatro unidades de desvio padrão,  $4\sigma$ , conforme mostra a figura 2.2. As unidades utilizadas podem ser microlitros, segundos ou milímetros. Para um pico Gaussiano,  $4\sigma$  é a largura do pico quando as tangentes cruzam a linha de base. O termo largura de banda instrumental se refere à contribuição que um componente extra-coluna faz à largura de  $4\sigma$  do pico; uma unidade de desvio padrão,  $\sigma$ , é a quarta parte da largura da banda.

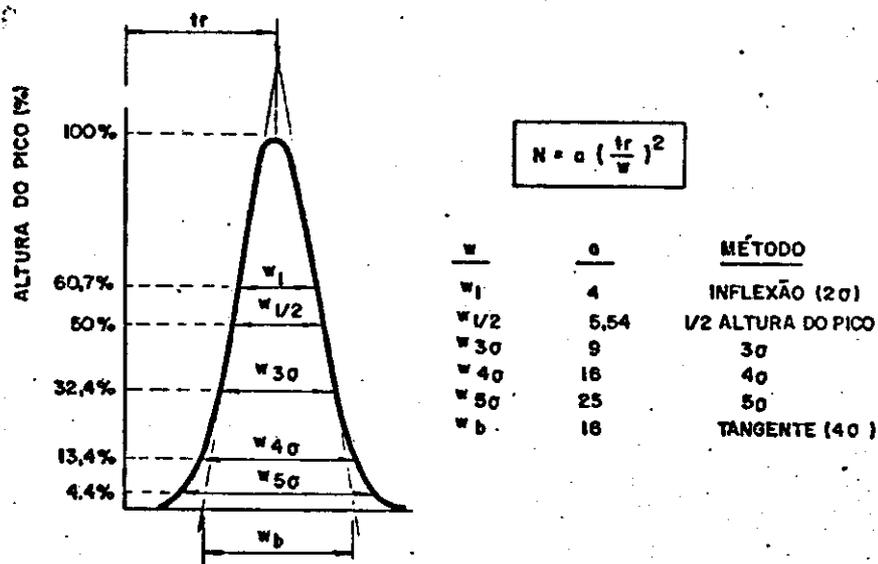


fig 2.2 - Relação entre a largura do pico,  $W$ , e a constante  $\sigma$ , para diferentes alturas do pico de forma gaussiana utilizadas no cálculo de  $n$  (ref. 12)

O segundo modo utiliza a largura do pico como variância, a raiz quadrada do desvio padrão  $\sigma^2$ . Suas unidades são  $\mu\text{L}^2$ ,  $\text{s}^2$  e  $\text{mm}^2$ . A variância é útil na descrição do pico, porque é aplicada a um pico com alguma forma, e permite cálculos tais como alargamento do pico do cromatograma, desde que a dispersão causada por uma série de componentes conectados seja simplesmente a soma das variâncias individuais.

### 2.8.1 Dispersão na coluna

A variância no pico é causada pela dispersão da amostra na coluna e pode ser prevista pela utilização da seguinte equação<sup>(38)</sup>:

$$\sigma^2 = V_0^2 (1 + k') / n \quad (5)$$

onde a variância  $\sigma^2$ , tem como unidade  $\mu\text{L}^2$  e :

$V_0$  = volume da fase móvel na coluna em  $\mu\text{L}$  ou volume que corresponde ao componente não retido

$k'$  = fator de capacidade do pico ( Dm agora)

$n$  = número de pratos teóricos da coluna.

Se o volume da fase móvel  $V_0$ , ou o número de pratos da coluna não são conhecidos, a variância pode ser estimada através dos fatores geométricos, a saber<sup>(38)</sup>:

$$\sigma^2 = 1,85 \cdot 10^{-3} d_c L_c d_p (1 + k')^2 \varepsilon^2 \quad (6)$$

onde

$d_c$  = diâmetro da coluna em mm

$L_c$  = comprimento da coluna em mm

$d_p$  = diâmetro da partícula em  $\mu\text{m}$

$\varepsilon$  = porosidade da coluna

Quanto ao valor de  $\epsilon$ , existem algumas divergências. Freebairn e Knox <sup>(39)</sup> assumem que  $\epsilon_{tot}$  = porosidade total é 1,00 para tubos abertos; 0,75 para colunas recheadas com partículas porosas e 0,40 para partículas peliculares. Já Bakalyar <sup>(38)</sup> et al assumem a média entre 0,5 e 0,8 ;  $\epsilon = 0,65$ , quando este valor não é conhecido.

### 2.8.2 Dispersão nos tubos conectores

A dispersão de um componente em um tubo conector é causada pelo fato de que em diferentes secções do tubo existem diferentes velocidades de fluxo (ver fig 2.3). as quais podem ser atribuídas ao efeito de parede. Assim, a velocidade pode ser zero (0), e aumentar progressivamente até que, no eixo do tubo, será máxima ( $u_{max}$ ) e igual a duas vezes à velocidade média ( $u_{med}$ ). A velocidade média (cm/s) no tubo é o fluxo ( $u$ ) do líquido dividido pela área do tubo.

Existem três fatores que diminuem a dispersão no tubo conector : o primeiro é a redução do diâmetro interno do tubo, o segundo é a redução do comprimento do mesmo, e o terceiro é o aumento da velocidade de fluxo. As equações de Taylor <sup>(40)</sup>, Golay <sup>(41)</sup> et al descrevem a dispersão nos tubos em termos de altura de pratos :

$$H = 2D/u + r^2 u / 24D \quad (7)$$

onde :

$r$  = raio do tubo em cm

$(s)$  em cm/s

$u$  = velocidade linear do fluxo (L(cm)/TM

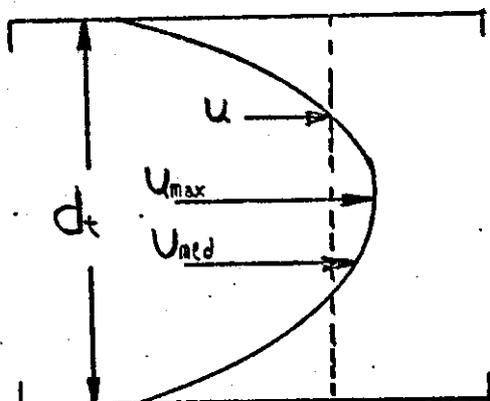


figura 2.3 - Efeito da parede do tubo no fluxo do solvente

$D$  = coeficiente de difusão em  $\text{cm}^2/\text{seg}$

Nesta equação, o primeiro termo,  $2D/u$ , é ignorado em Cromatografia Líquida porque considera a dispersão devido à difusão longitudinal, insignificante em CL com velocidades de fluxos normais, comparada com a dispersão causada pelo transporte laminar convectivo. O segundo termo, que é a difusão dinâmica, tem maior peso. Se considerarmos que :

$$H = \sigma^2 / L \quad (8)$$

e que  $\sigma^2 = \sigma^2 \cdot (\text{área})^2 \quad (9)$

e  $U = F/A = F/\pi r^2$ , teremos que :

$$\sigma^2 = 1,36 \cdot 10^{-8} d_t^4 L_i F / D \quad (10)$$

onde a variância tem unidades de  $\mu\text{l}^2$  e

$d_t$  = diâmetro do tubo em mm

$L_i$  = comprimento do tubo em mm

F = velocidade de fluxo em ml/min

D = coeficiente de difusão em  $\text{cm}^2/\text{seg}$  ( $\approx 10^{-5}$ )

A equação (7) é aplicada somente a tubos retos, tubos curvos ou em zig-zag reduzem a dispersão<sup>(42)</sup>.

Finalmente, o desvio padrão observado pode ser desmembrado na equação.<sup>(30)</sup>:

$$\sigma^2_{\text{obs}} = \sigma^2_{\text{col}} + \sigma^2_{\text{det}} + \sigma^2_{\text{inj}} + \sigma^2_{\text{conec}} \quad (11)$$

$$\sigma^2_{\text{obs}} = \sigma^2_{\text{col}} + \sigma^2_{\text{DI}} \quad (12)$$

onde  $\sigma^2_{\text{DI}} = \text{banda de variância adicional} = \sigma^2_{\text{det}} + \sigma^2_{\text{inj}} + \sigma^2_{\text{conec}}$

e para que a razão  $\sigma^2_{\text{obs}} / \sigma^2_{\text{col}} \leq 1,10$  correspondente à 10% da eficiência exista, é necessário que  $\sigma_{\text{DI}} \leq 1/3 \sigma_{\text{col}}$ .

## 2.9 Principais Equações

A grande dificuldade de se comparar as diferentes colunas de cromatografia líquida é que estas apresentam uma extensa gama de variações. Mesmo se for fixado seu comprimento e diâmetro interno, resta saber o tamanho das partículas que compõe o recheio, e aliado a este, as condições de recheio, tais como pressão utilizada, fase móvel, fluxo. É sabido que colunas recheadas nas mesmas condições, com partículas do mesmo diâmetro, mas de diferentes procedências ou mesmo de bateladas diferentes, apresentam número de pratos teóricos, tempo de retenção e seletividade diferentes. Para resolver esta questão, Bristow

e Knox<sup>(49)</sup> publicaram em um artigo, um sumário de recomendações e equações com o objetivo de parametrizar e comparar as diversas colunas recheadas, independentemente de seu tamanho, diâmetro interno e partículas empregadas, além é claro, da FM e velocidade de fluxo utilizados. Em suas recomendações, destacam no referido artigo, que para o teste das colunas é necessário anotar:

(a) Condições de operação, que incluem :

- temperatura da sala na qual se trabalha
- número do Batch ( a batelada acima referida) da FE utilizada / data e fabricante

- método de enchimento
- composição do eluente
- composição da amostra para testes
- método de detecção
- método de injeção

(b) Propriedades do soluto e eluente, que indica :

- viscosidade do eluente
- coeficiente de difusão do soluto no eluente

(c) Parâmetros geométricos

- tamanho da coluna
- diâmetro da coluna
- tamanho da partícula

(d) Parâmetros cromatográficos

- volume da amostra injetada
- distância da eluição do componente não retido e dos solutos retidos
- largura do pico à meia altura do soluto que será utilizado para fazer as medidas
- velocidade do papel do registrador
- pressão da coluna no fluxo correspondente
- volume necessário para eluir o componente

Para os cálculos das propriedades cromatográficas, aconselha-se que sejam calculadas :

(e) Propriedades maiores

- altura reduzida do prato,  $h$
- velocidade reduzida do eluente,  $v$
- resistência ao fluxo da coluna,  $\xi$

e finalmente

(f) Propriedades subsidiárias

- razão da capacidade da coluna,  $Dm$
- razão de Knox-Parcher,  $I$
- porosidade total,  $G_{tot}$

Assim, para uma boa coluna,  $h$  deve estar ao redor de 3, e a velocidade reduzida ao redor de 5. Porém,  $h$  não deverá exceder a 20, para uma velocidade reduzida,  $v$ , ao redor de 100. A resistência da coluna  $\xi$  não deverá exceder a 1000.

As principais equações são dadas a seguir :

número de pratos teóricos , n

$$n = 5,545 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (13)$$

onde  $t_R$  = tempo de retenção (em minutos)

$W_h$  = largura do pico à meia altura (em minutos)

número de pratos teóricos por metro

$$n/L \quad (14)$$

onde L = comprimento da coluna em metros

Altura equivalente de um prato teórico , H

$$H = L/n \quad (15)$$

Altura reduzida do prato, h

$$h = H/d_p \quad (16)$$

onde  $d_p$  = tamanho da partícula em metros

Velocidade linear do eluente, u

$$u = L/t_0 \quad (17)$$

onde  $t_0$  = tempo de retenção do componente não retido

Velocidade reduzida do eluente , v

$$v = \frac{u d_p}{D_m} = \frac{L d_p}{t_0 D_m} \quad (18)$$

onde  $D_m$  = razão de distribuição das massas entre a fase móvel e a fase estacionária, isto é, a razão entre o tempo em que o soluto fica na fase estacionária, retido, e percorre a coluna na fase móvel, em movimento.

tempo de eluição do :

a) componente não retido  $t_0$

$$t_0 = r_0/s \quad (19)$$

onde  $r_0$  = distância em cm do pico do componente não retido e

S = velocidade do papel em cm/min ou cm/h

b) do componente retido  $t_R$

$$t_R = r_R / s \quad (20)$$

onde  $r_R$  = distância em cm do pico do componente retido

largura do pico Wh em unidade de tempo

$$Wh(\text{min}) = Wh(\text{cm}) / s (\text{cm/min}) \quad (21)$$

Uma medida operacional simples do desempenho da coluna é obtida através do índice de desempenho,  $\pi$

$$\pi = n^2 / (t_R \cdot \Delta p) \quad (22)$$

onde  $\Delta p$  = pressão da coluna no fluxo correspondente em bar ou atm

Destas equações apresentadas, as mais utilizadas são as que medem a eficiência da coluna,  $n$ , o número de pratos teóricos por metro,  $n/L$ , e a altura equivalente de um prato teórico AEPT,  $H$ , ou mesmo a altura reduzida,  $h$ .

(45)

A forma da curva foi deduzida por Van Deemter a partir de uma relação existente entre a altura equivalente de um prato teórico,  $H$ , e a velocidade linear da fase móvel,  $u$ , cuja forma mais simples é :

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (23)$$

onde  $A$  representa a contribuição dos caminhos múltiplos,  $B$  representa a contribuição da difusão longitudinal e  $C$  representa a contribuição da resistência total à transferência de massa nas fases móvel e estacionária aos processos dispersivos

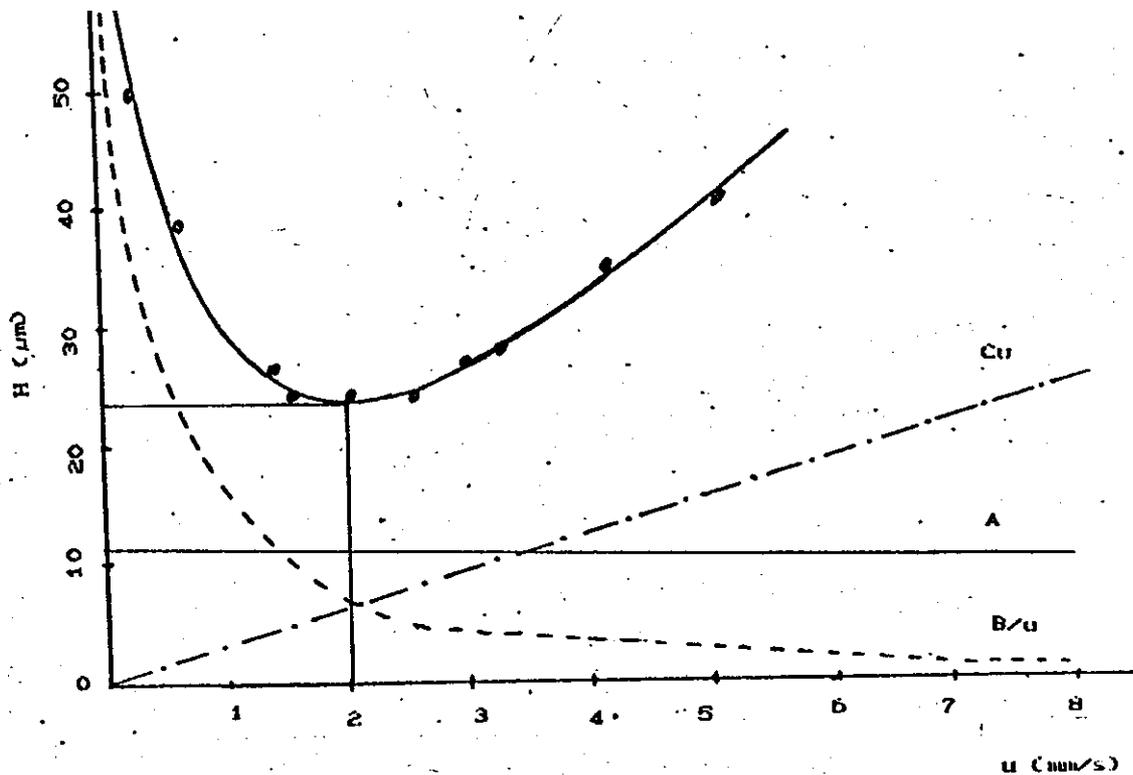


figura 2.4 Gráfico de Van Deemter e as curvas de contribuição

Deste modo, obtendo a curva de Van Deemter, podemos determinar o ponto ótimo da curva, da qual obtemos o fluxo ótimo da coluna, que corresponde à sua maior eficiência.

## 2.10

### OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é parametrizar as condições de enchimento de colunas microbore com 25cm de comprimento e 0,2cm de diâmetro interno, com partículas de pequeno diâmetro (5 ou 3 $\mu$ m) e obter sua reprodutibilidade e alta eficiência, utilizando-se de parâmetros tais como forma do funil de saída do reservatório da suspensão, volume do reservatório da suspensão, variação da pressão de enchimento da coluna e da temperatura durante o enchimento. Os resultados obtidos são

estudados sob o ponto de vista analítico, analisando-se os cromatogramas de cada coluna recheada e avaliando-se a coluna sob o ponto de vista da sua eficiência, sem dar ênfase aos fenômenos ocorridos.

## CAPITULO 3

### PARTE EXPERIMENTAL E RESULTADOS

#### 3.1 Reagentes utilizados

##### 3.1.1 Reagentes e solventes

- Metanol para cromatografia LiChrosolv<sup>®</sup>

Merck

- Acetona PA

Merck

- Benzonitrila PA

Carlo Erba

- Benzeno PA ACS

CAAL Reagentes Analíticos

- Tolueno PA

Vetec Química fina ltda

- Naftaleno PA

Carlo Erba

- Tetracloreto de carbono PA

Merck

##### 3.1.2 Fases estacionarias , fase movel e solvente de arraste

- Fase Estacionária : LiChrosorb RP 18 5 $\mu$ m

HYODS Shandon 3 $\mu$ m

- Fase Móvel : mistura de metanol/água na proporção 70:30

- Solvente de arraste : Metanol PA

### 3.2 Instrumental

#### 3.2.1 Enchimento das colunas

- Bomba Shandon modelo HPLC (RR-025) com depósito de suspensão de 18ml de capacidade (Fig. 9.1) e faixa de uso de 500-10000psi  
Southern Products Ltda
- Bomba Haskel modelo 51769 com faixa de uso de 1000-50000psi  
Autoclave Engineers

#### 3.2.2 Avaliação das colunas

- Cromatógrafo  $\mu$ LC-500 com bomba tipo seringa de 30ml de capacidade e velocidade de fluxo de 0,2-600 $\mu$ l/min  
ISCO
- Detector UV-Visível de comprimento de onda variável na faixa de 190-700nm com micro-cela de 1 $\mu$ l  
LDC-Milton Roy
- Injetor modelo 7413 com loop interno de 1 $\mu$ l  
Rheodine
- Registrador de velocidade variável na faixa de 1cm/h-1cm/min  
modelo RB101  
ECB

#### 3.2.3 Demais equipamentos

- Aquecedor d'água com termostatizador  
Ultra Termostato MTA Kutez

- Sistema de ultra-som Sonifer<sup>®</sup> modelo B-12  
Branson Sonic Power

### 3.3 Aperfeiçoamento dos demais equipamentos utilizados

- Construção de um novo depósito de suspensão para a bomba Shandon com 8ml de capacidade (Fig. 9.2) para testar o efeito da concentração da suspensão na eficiência da coluna.
- Construção de um novo depósito de suspensão para a bomba Haskel com 27ml de capacidade (Fig. 9.3).
- Construção de dois funis de saída da suspensão, um com pré-coluna (Fig. 9.4a) e outro sem pré-coluna (Fig. 9.4b).
- Construção de pós-colunas equipadas com anilhas (Fig. 9.5b) para reter a suspensão nas colunas equipadas com anilhas (Fig. 9.5a).
- Construção de colunas equipadas com roscas (Fig. 9.6a) para serem adaptadas à bomba Haskel e ao funil de saída da suspensão.
- Construção de pós-colunas equipadas com roscas (Fig. 9.6b) para serem adaptadas às colunas com roscas da bomba Haskel.

### 3.4 Preparação dos reagentes utilizados

#### 3.4.1 Preparação da fase móvel (FM)

Em uma proveta de 1 litro, mediu-se 700ml de metanol. Em outra proveta, de 500ml, mediu-se 300ml de água destilada. Misturou-se os dois solventes em um bequer de 2 litros e eliminou-se o gás contido no líquido mediante tratamento com

ultra-som, por 30 minutos. Após o resfriamento da solução, esta é transferida para um recipiente de fase móvel do cromatógrafo .

### 3.4.2 Preparação da solução teste

Escolheu-se cinco compostos com diferentes tempos de retenção e distribuição de massa, na seguinte ordem de eluição : acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. Em um balão volumétrico de 200ml, o qual já tinha 150ml de metanol, colocou-se aleatoriamente uma dada quantidade de cada um deles , até que o pico do componente injetado, em um cromatograma, perfizesse uma altura de 90% da folha do registrador. Quando todos os picos se apresentaram com a mesma altura, o balão foi completado até 200ml, a mistura homogeneizada, e verificou-se se houve diminuição significativa do tamanho dos picos do cromatograma, sendo então o balão selado e guardado em um armário escuro.

### 3.5 Sensibilidade do detector e velocidade do registrador

Em todos os testes das colunas utilizou-se os seguintes parâmetros fixos :

mistura de acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno

- comprimento de onda : 254nm
- sensibilidade do detector : 0,005 UA. (LDC-ISCO) e 0,1 UACWATERS)
- velocidade do papel : 20cm/h (corrida normal)  
3cm/min (medir largura a 1/2

altura do pico)

### 3.6 Metodos de avaliacao das colunas

O método utilizado na avaliação das colunas pelos cromatogramas foi o da largura a meia altura<sup>(97)</sup>, no qual as equações mais utilizadas são as que medem a eficiência da coluna,  $n$ , o número de pratos por metro,  $n/L$ , e a altura equivalente de um prato teórico,  $H$ , ou a altura reduzida de um prato teórico,  $h$ . O motivo de se usar somente estas equações é que elas são utilizadas para a confecção do gráfico de Van Deemter<sup>(45)</sup>, no qual se obtém o fluxo ótimo da coluna a partir da altura equivalente de um prato teórico mínimo, e conseqüentemente uma eficiência máxima.

### 3.7 Enchimentos de colunas - ensaios preliminares

#### 3.7.1 Procedimento de enchimento

Pesa-se aproximadamente 0,94g da fase estacionária utilizada (HYODS 3 $\mu$ m ou LiChrosorb RP18 5 $\mu$ m) .

Adiciona-se 10ml do solvente de suspensão utilizado (metanol ou tetracloreto de carbono/metanol 95:5).

Homogeneiza-se em ultra-som por 3min.

Verte-se a suspensão obtida no reservatório de suspensão utilizado, já parcialmente preenchido com o mesmo solvente de suspensão .

Atarracha-se a coluna, mais pós-coluna, ao

reservatório de suspensão e inverte-se este de modo que o fluxo da bomba fique a favor da gravidade.

Liga-se a bomba de enchimento, já previamente calibrada na pressão de uso.

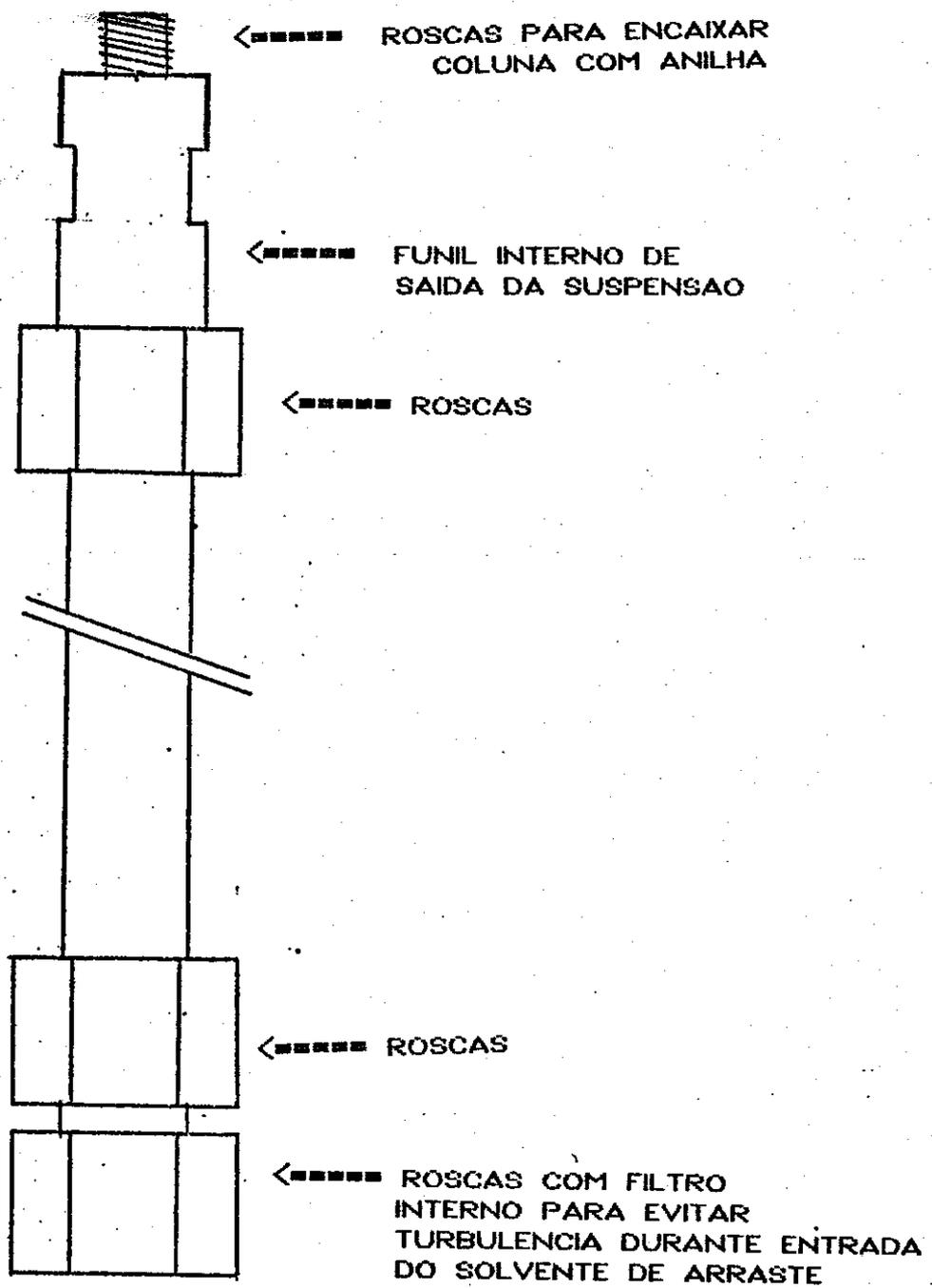
Recolhe-se 30ml do solvente de suspensão mais solvente de arraste em uma proveta.

### 3.7.2 Selecao do solvente de suspensao

Foram feitos ensaios com dois tipos de solventes de suspensão; o metanol e a mistura de tetracloreto de carbono/metanol 95:5. O objetivo destes ensaios era verificar o comportamento que as suspensões compostas com estas fases estacionárias teriam frente a estes solventes. Para tanto, foram recheadas algumas colunas a 5000psi de pressão utilizando-se o reservatório da bomba Shandon, de 10ml de capacidade, com o procedimento descrito anteriormente.

Notou-se que com o metanol puro havia uma rápida floculação da suspensão, que não se mantinha mesmo com a adição de uma solução de ácido acético 10% utilizada como estabilizador<sup>(12)</sup>, e que com a solução de tetracloreto de carbono/metanol 95:5,<sup>(28)</sup> a suspensão se mantinha, para ambas as fases estacionárias, pelo espaço de algumas horas. A avaliação mostrou que, com o solvente de suspensão composto de metanol estabilizado com 1ml de ácido acético 10%, a coluna recheada com a fase estacionária de 3 $\mu$ m (fig. 3.7a) apresentou uma baixa eficiência, enquanto que a coluna recheada

com a fase estacionária de  $5\mu\text{m}$  apresentou uma alta eficiência. (fig. 9.8a). Ao se utilizar como solvente de suspensão a solução de tetracloreto de carbono/metanol 95:5, a coluna recheada com a fase estacionária de  $3\mu\text{m}$  apresentou uma alta eficiência, e a coluna recheada com a fase estacionária de  $5\mu\text{m}$  permaneceu inalterada em sua eficiência. Deste modo, escolheu-se como solvente de suspensão definitivo, a solução de tetracloreto de carbono/metanol 95:5, pelo fato de que este mantém a suspensão por um tempo razoável, e escolheu-se a fase estacionária HYODS  $3\mu\text{m}$  da Shandon, pois a mesma é mais sensível às variações experimentais empregadas.



**Figura 3.1 - Reservatório com capacidade volumétrica de 19ml, utilizado na Bomba de Enchimento Shandon**

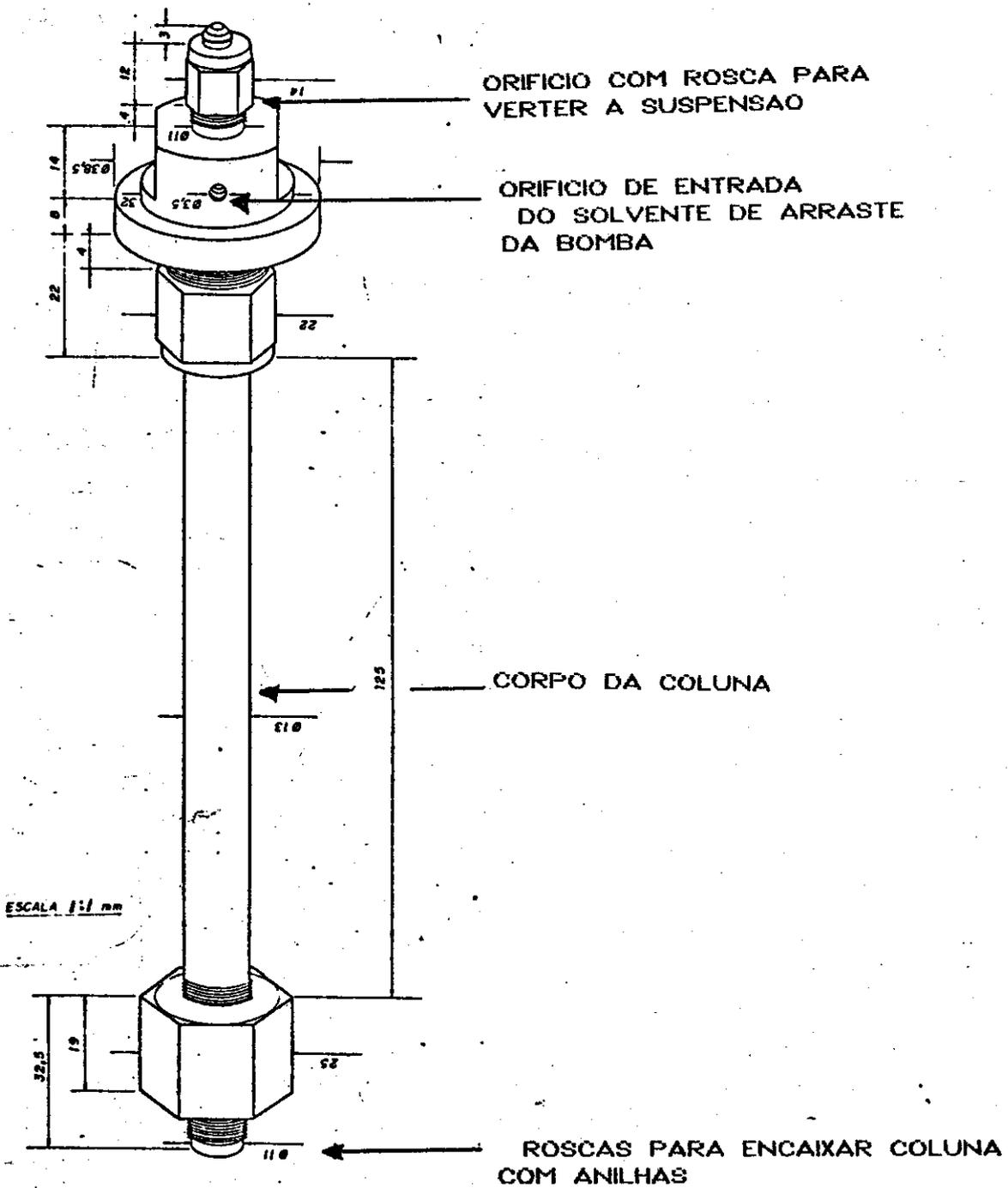


Figura 3.2 - Reservatório com capacidade volumétrica de 6ml, utilizado na Bomba de Enchimento Shandon

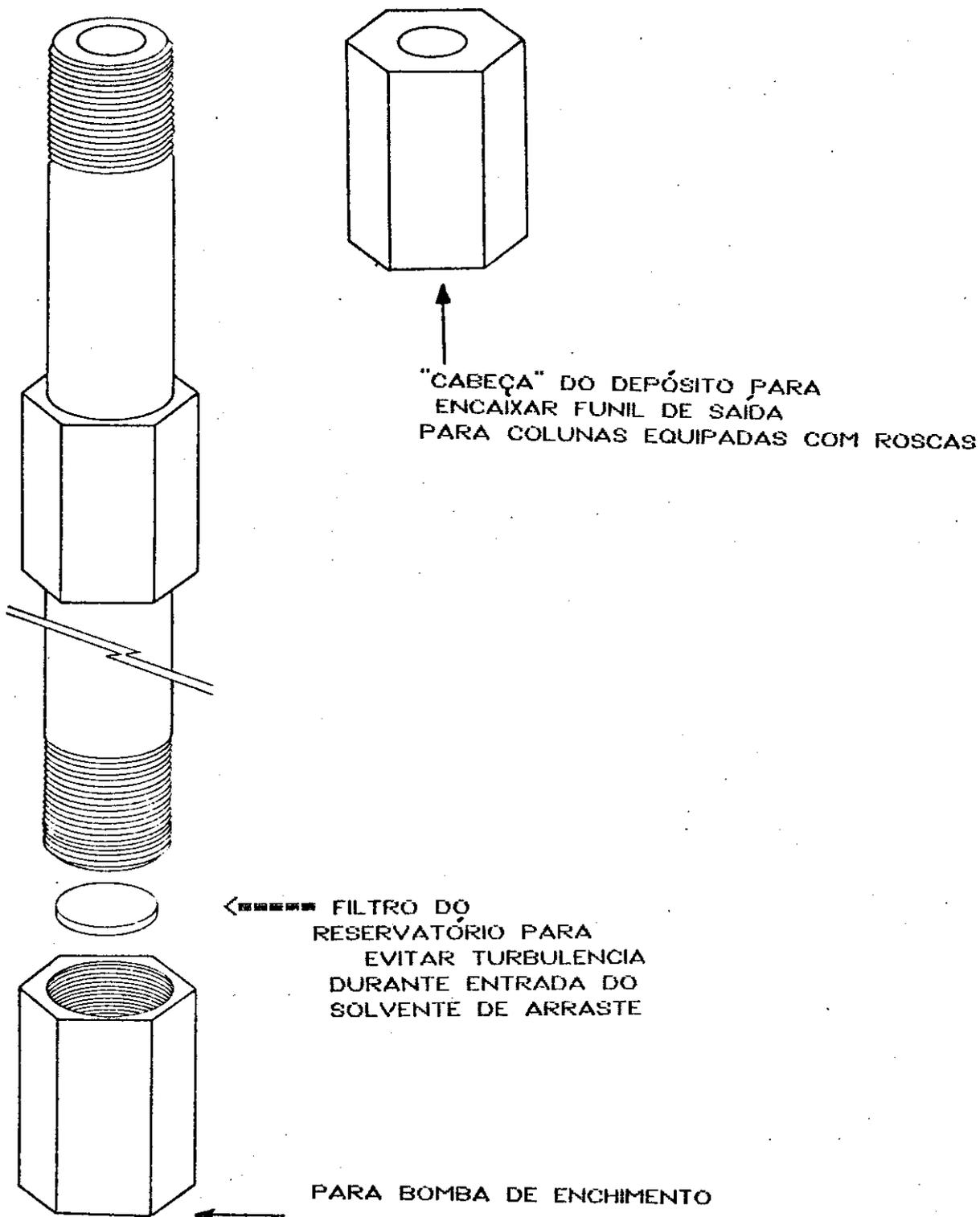
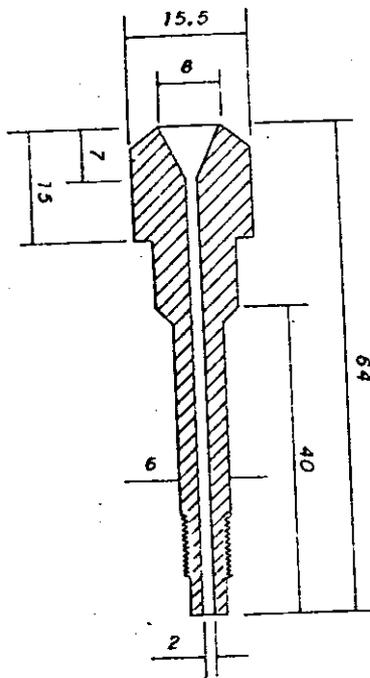
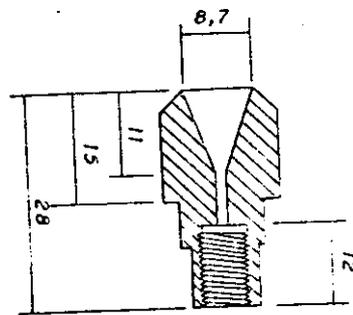


Figura 3.3 - Reservatório com capacidade volumétrica de 27ml de capacidade, utilizado na bomba de Enchimento Haskel



A)



B)

ESCALA 1:1 mm

figura 3.4 - funis de saída do reservatório de suspensão equipados com pré-coluna (a) e sem pré-coluna (b)

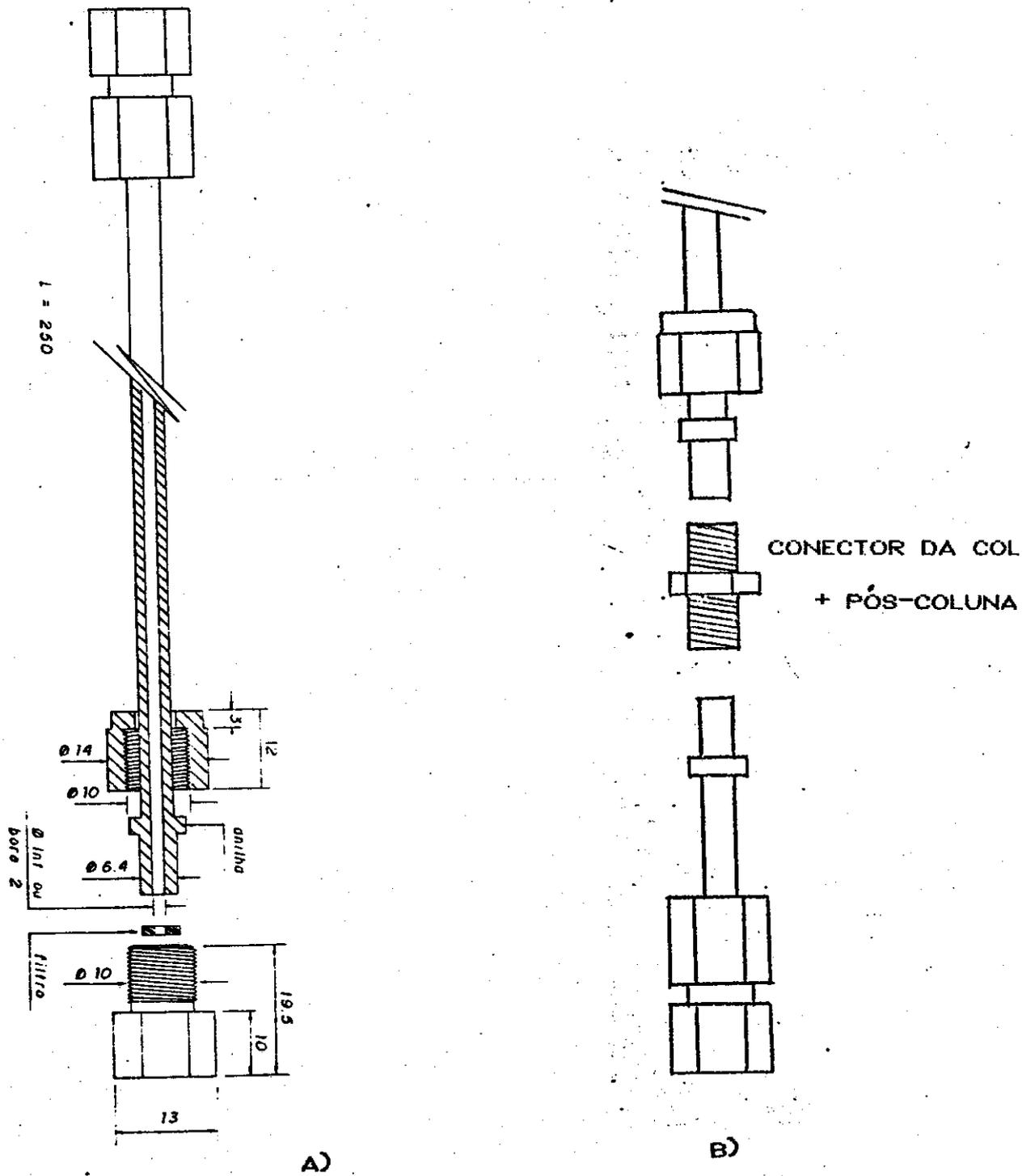


Fig 3.5 - Esquemas representativos de :

a) coluna equipada com anilha; (b) pós-coluna equipada com anilha

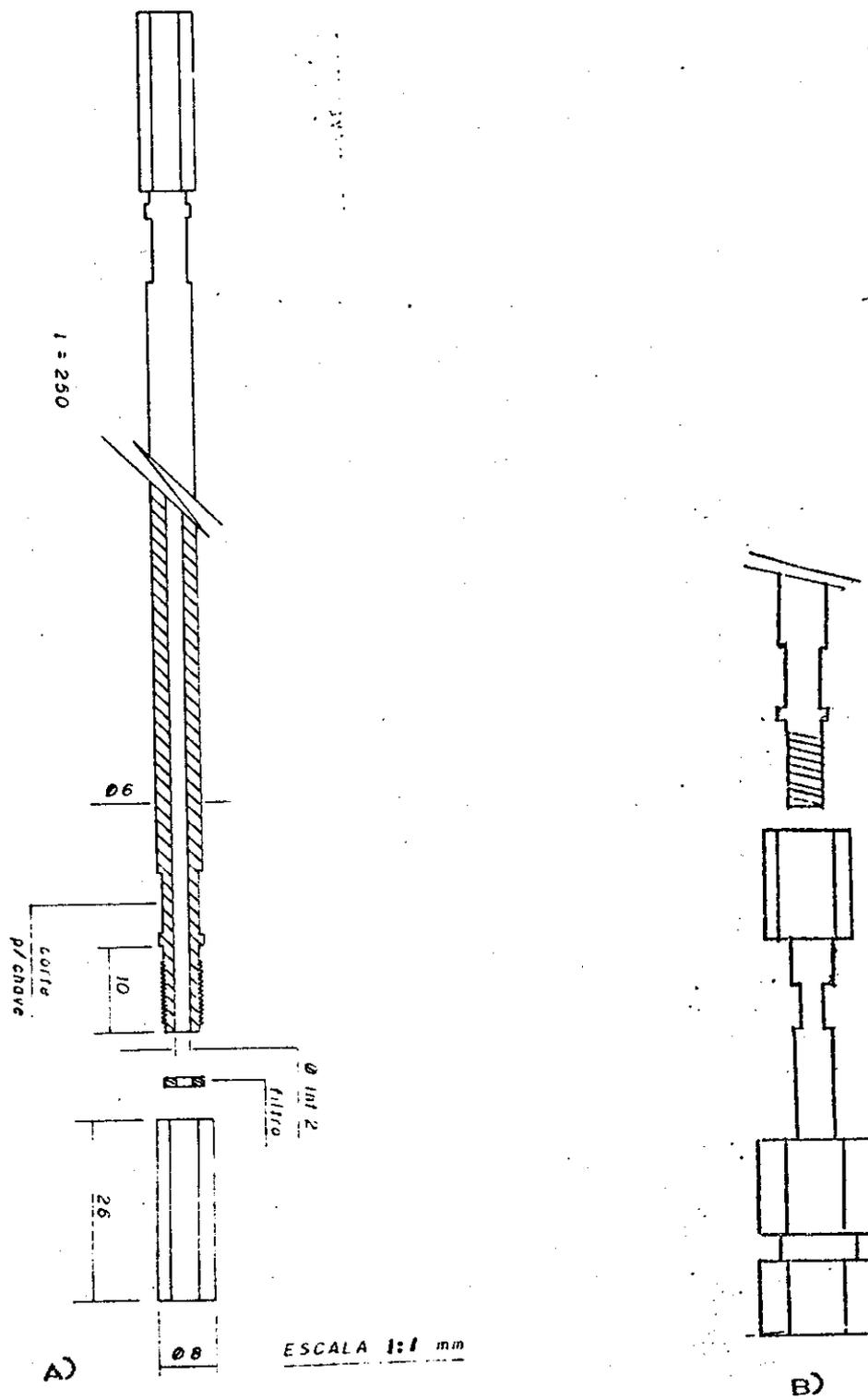


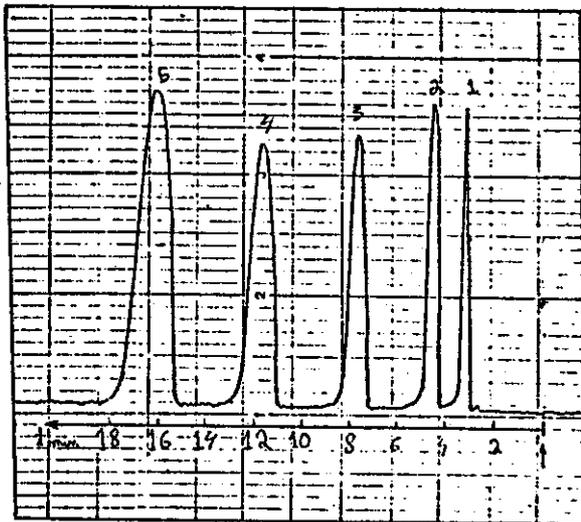
Fig 3.6 - Esquemas representativos de :  
 a) coluna equipada com rosca ; (b) pós-coluna equipada com rosca

Tabela 3.1 - Propriedades de alguns solventes de empacotamento

solvente	Densidade, $\rho$ (g/ml)	viscosidade, $\eta$ (cP, 20°C)
Diiodometano	3,3	2,9
Dibromometano	2,5	1,0
Iodometano	2,3	0,5
Tetracloroetileno	1,6	0,9
Tetracloroeto de Carbono	1,6	1,0
Cloroformio	1,5	0,6
Tricloroetileno	1,5	0,6
Bromoetano	1,5	0,4
Diclorometano	1,3	0,4
Etileno glicol	1,1	1,7
água	1,0	1,0
n-Butanol	0,8	3,0
n-Propanol	0,8	2,3
Etanol	0,8	1,2
Metanol	0,8	0,6
Ciclohexano	0,8	1,0
Isocetano	0,7	0,5

### 3.7.3 Variacao da concentracao da suspensao

Para verificar qual a concentração da suspensão é mais adequada para as colunas utilizadas, foram feitos alguns ensaios com o reservatório de 6ml e de 10ml de capacidade, utilizando-se do procedimento (3.7.1) descrito anteriormente. Observou-se que com a suspensão concentrada, a eficiência da coluna recheada diminuía consideravelmente, <sup>(fig. 9.9a)</sup> enquanto que com a suspensão diluída, a eficiência da coluna mantinha-se alta. <sup>(fig. 9.9b)</sup>

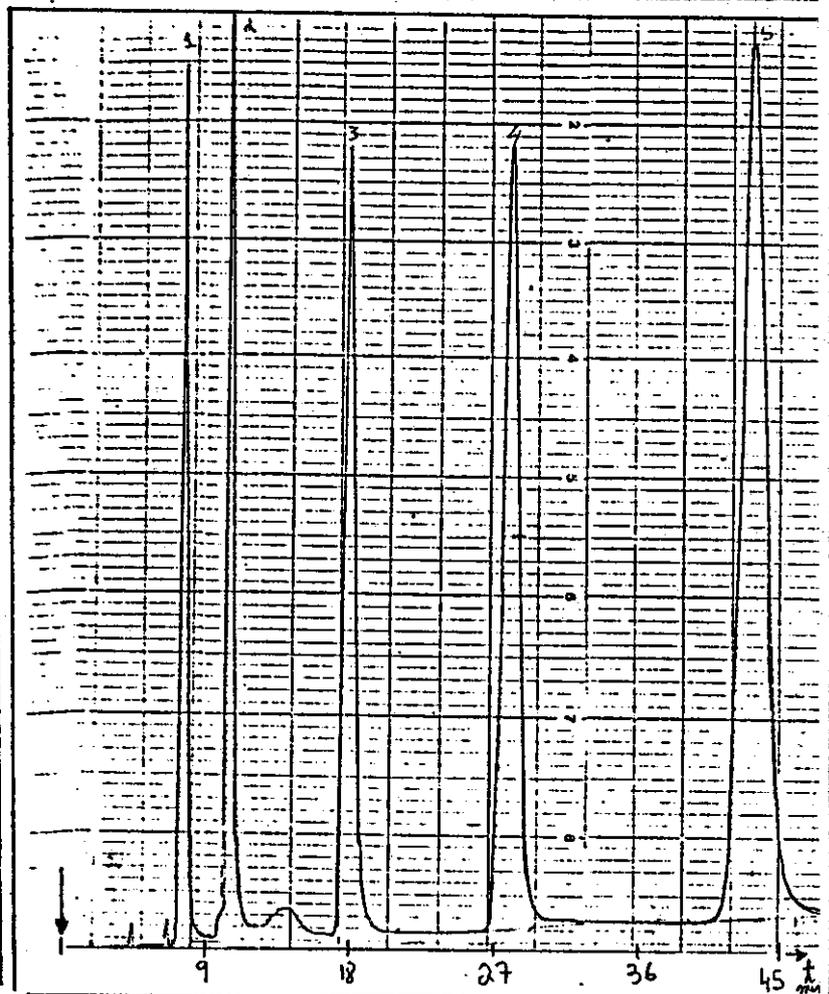


Coluna 5000 psi 3 micrometros  
 solvente de suspensão = MeOH puro  
 fluxo = 0,1ml/min  
 atenuação = 0,2  
 velocidade do papel = 30cm/h  
 compr. de onda = 254nm  
 fase móvel = MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30

1- acetona  
 2- benzonitrila  
 3- benzeno  
 4- tolueno  
 5- naftaleno  
 TR<sub>5</sub> = 16 min

PRATOS TEORICOS POR METRO (NAFTALENO): 2 558

a



Coluna 5000 psi 3 micrometros  
 solvente de suspensão = CCl<sub>4</sub>/MeOH 95:5  
 fluxo = 0,1ml/min  
 atenuação = 0,05  
 velocidade do papel = 20cm/h  
 compr. de onda = 254nm  
 fase móvel = MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30

1- acetona  
 2- benzonitrila  
 3- benzeno  
 4- tolueno  
 5- naftaleno  
 TR<sub>5</sub> = 43 min

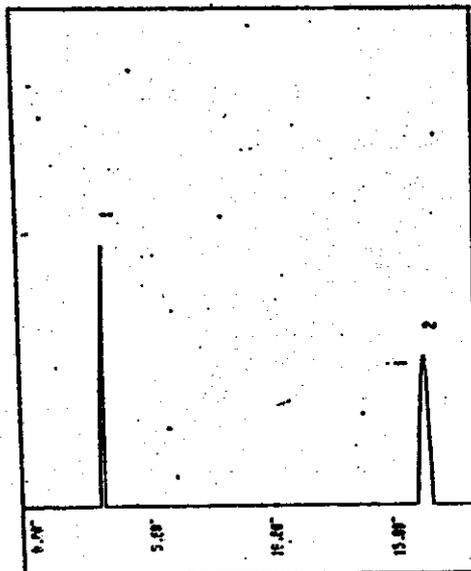
PRATOS TEORICOS POR METRO (NAFTALENO): 17 140

b

Figura 3.7 - Testes com solventes. Cromatogramas mostrando o efeito do solvente de suspensão sobre a FE HYODS 3 $\mu$ m da bomba Shandon :

(a) - Metanol puro

(b) - CCl<sub>4</sub>/MeOH 95:5

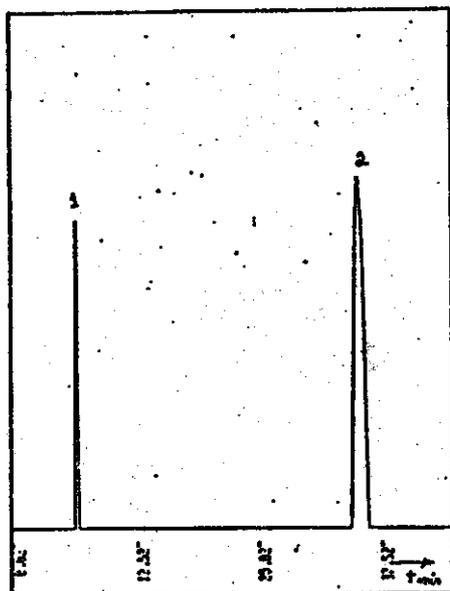


Coluna 5000 psi 5 micrometros  
 solvente de suspensão = MeOH puro  
 fluxo = 0,19ml/min  
 atenuação = 128 (Waters)  
 velocidade do papel = 12cm/h (Waters)  
 compr. de onda = 254nm  
 fase móvel = MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30

1- metanol  
 2- naftaleno (t<sub>R2</sub> = 16,38 MIN)

PRATOS TEORICOS POR METRO (NAFTELENO): 28 000

a



Coluna 5000 psi 5 micrometros  
 solvente de suspensão = CCl<sub>4</sub>/MeOH 95:5  
 fluxo = 0,1ml/min  
 atenuação = 128 (Waters)  
 velocidade do papel = 12cm/min (Waters)  
 compr. de onda = 254nm  
 fase móvel = MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30

1- metanol  
 2- naftaleno (t<sub>R2</sub> = 35,57 MIN)

PRATOS TEORICOS POR METRO (NAFTELENO): 27 970

b

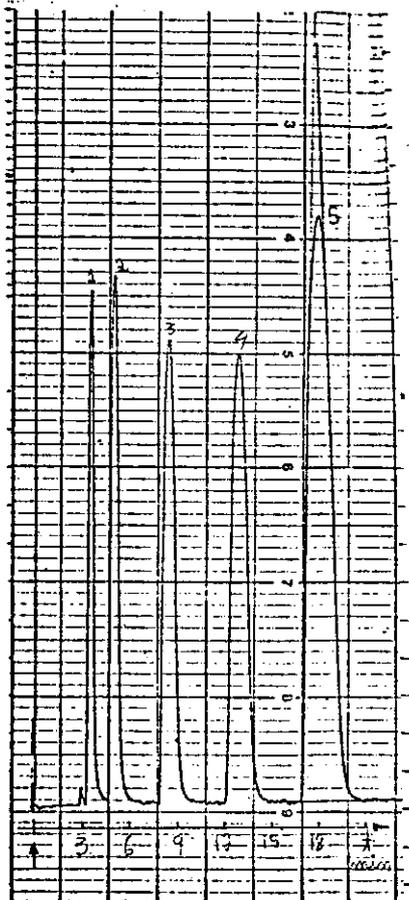
Figura 3.8 - Testes com solventes. Cromatogramas mostrando o efeito do solvente de suspensão sobre a FE LiCrosorb RP-18 5µm :

(a) - Metanol puro

(b) - CCl<sub>4</sub>/MeOH 95:5

Fluxo : 0,1ml/min  
 Velocidade do papel : 20cm/h  
 Atenuacao : 0,01 (Waters)  
 Compr. de onda : 254nm  
 Fase Movei : MeOH/H2O 70:30

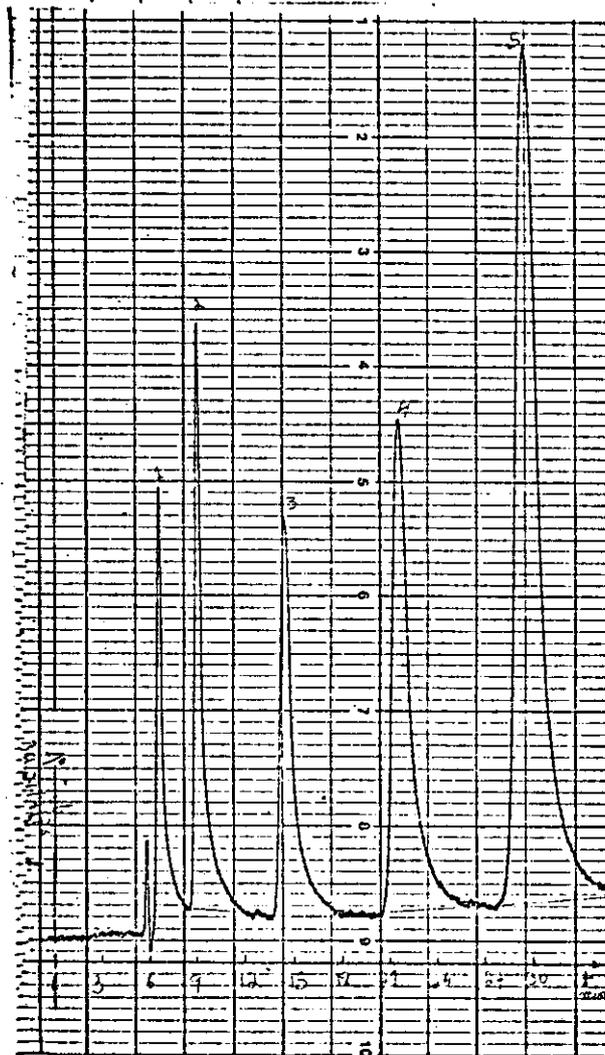
Fluxo : 0,10ml/min  
 Velocidade do papel : 30cm/h  
 Atenuacao : 0,2 (Waters)  
 Compr. de onda : 254 nm  
 Fase Movei : MeOH/H2O 70:30



- 1 - acetona
- 2 - benzonitrila
- 3 - benzeno
- 4 - tolueno
- 5 - naftaleno

COLUNA 5000 psi 25C  
 RESERVATORIO DE 6ml

a



COLUNA 5000 psi 25C  
 RESERVATORIO DE 19ml

- 1 - acetona
- 2 - benzonitrila
- 3 - benzeno
- 4 - tolueno
- 5 - naftaleno

b

Figura 3.9 - Cromatogramas mostrando a influencia do volume do reservatório sobre as Fases estacionárias utilizadas a T ambiente:

(a) 6ml ; (b) 19ml

Muito embora não haja um compromisso entre a concentração e a velocidade de enchimento,<sup>(28)</sup> verificou-se que as melhores colunas recheadas foram obtidas com suspensões diluídas. Assim, fixou-se novamente o volume do reservatório em 10ml.

#### 3.7.4 Variação da Temperatura de Enchimento

##### A) 75°C

Uma vez fixados os parâmetros de volume do reservatório, solvente de suspensão e tamanho e tipo da fase estacionária, restava otimizar o tempo de enchimento, que está diretamente ligado à viscosidade do solvente de suspensão. Como não se objetivava mudar o solvente de suspensão para o Iodeto de Metila (por ser caro, volátil e tóxico), tentou-se diminuir a viscosidade total da solução com um aumento da temperatura. Se fosse possível desta maneira melhorar a eficiência das colunas, então poderia ser dado um grande passo no aperfeiçoamento e até reprodutibilidade das colunas de CLAE recheadas com partículas de 3µm. Existem poucos estudos sobre como se comporta as colunas com o aumento da temperatura<sup>(27)</sup>, e estes se restringem à melhora da análise<sup>(53,54)</sup> e não ao enchimento das colunas.

O CCl<sub>4</sub> apresenta uma viscosidade de 0,9517 centipoise(cp) a uma temperatura de 21,21 °C, que diminui para 0,5017 cp a 74,16°C, bem próximo à viscosidade do Metanol à temperatura ambiente (ver tabela complementar A ).

Assim, foi montado um sistema composto por um aquecedor d'água termostatzado, bomba d'água e uma camisa de banho feita de vidro envolvendo a coluna fig. 3.10. Com o sistema assim instalado, a FE foi pesada, conforme esquema anterior, homogeneizada e vertida imediatamente no reservatório de suspensão. O sistema composto de reservatório, coluna mais pós-coluna foi invertido, bombeou-se a água previamente aquecida para dentro da camisa de banho e ligou-se a bomba Shandon.

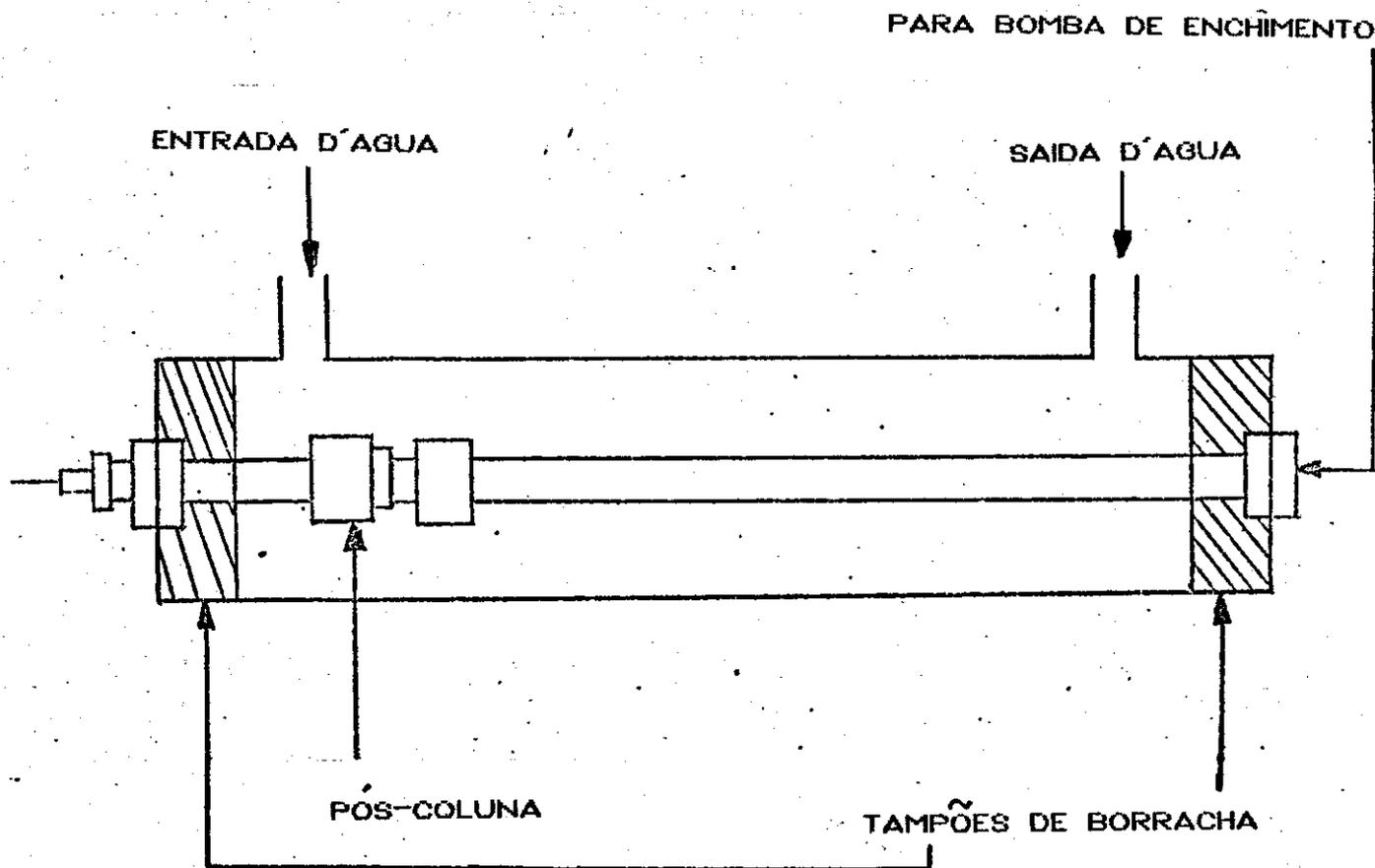


Figura 3.10- Esquema representativo da coluna envolta na " camisa de banho "

Percebeu-se um aumento do fluxo do solvente de suspensão e uma queda no tempo de enchimento da coluna. Após completado o recolhimento de 30ml da mistura de solventes, deixou-se a coluna resfriar até a temperatura ambiente, passando pela coluna a fase móvel utilizada. Então, a coluna foi adaptada ao cromatógrafo e condicionada a  $100\mu\text{l}/\text{min}$ , por duas horas, iniciando-se os testes para obtenção da curva de Van Deemter. Os resultados são apresentados nas tabelas 3.2, 3.3 e figura 3.11.

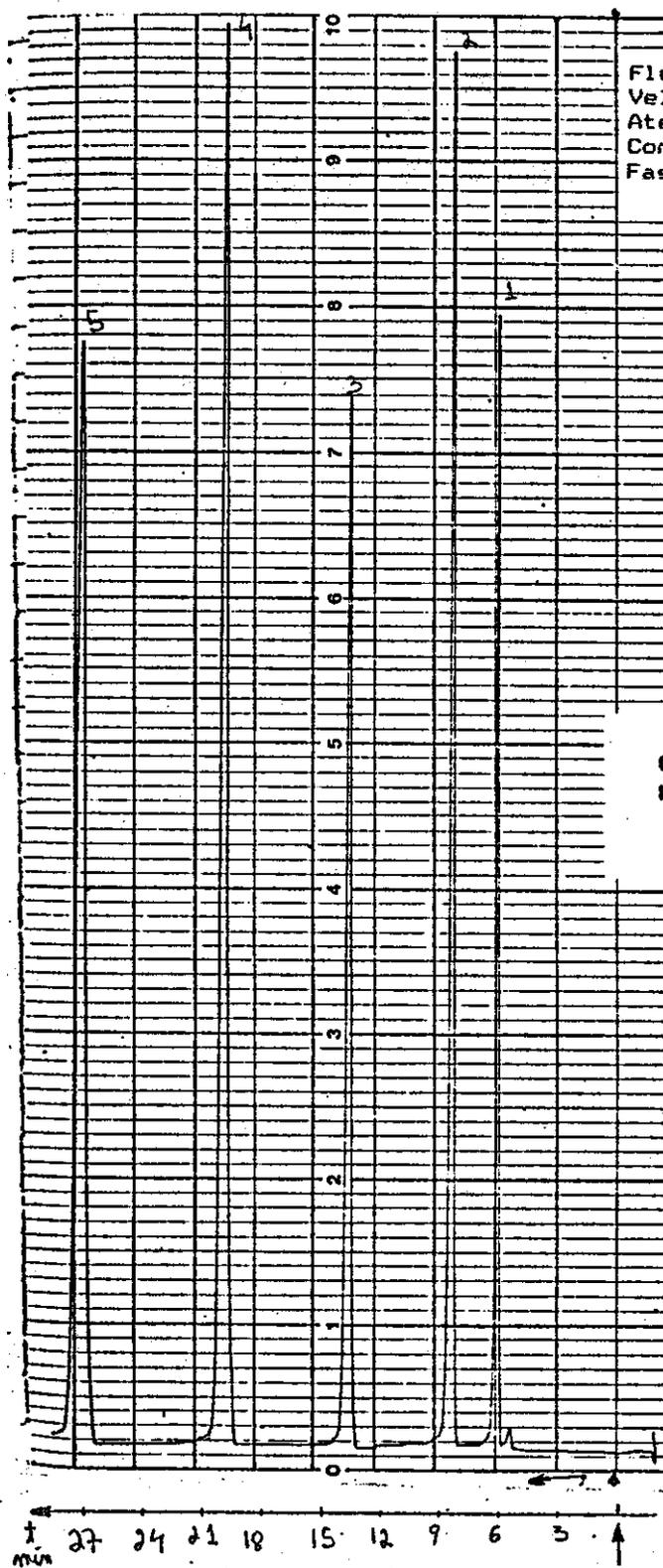
Tabela 3.2 - Influência do volume do solvente propulsor no tempo de enchimento de colunas recheadas a  $75^{\circ}\text{C}$  e a 5000psi

Massa utilizada HYODS $3\mu\text{m}$ (g)	Tempo de enchimento ( min )		
	10ml	25ml	35ml
0,953	7	-	45

Tabela 3.3 - Parâmetros cromatográficos obtidos com a coluna recheada a 5000psi de Pressão, a  $75^{\circ}\text{C}$  com a FE HYODS  $3\mu\text{m}$

Fluxo ótimo ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	$n/L$ ( $\text{m}^{-1}$ )	$h$ (m)	$u$ ( $\text{cm}/\text{min}$ )	$t_R$ (min)	$t_M$ (min)	As
110	82300	4,0	4,8	38,69	5,2	1,0

Os resultados mostram que a diminuição da viscosidade com o aumento da temperatura é viável, uma vez que aumenta o desempenho da coluna.



Fluxo : 0,1ml/min  
 Velocidade do papel : 20cm/h  
 Atenuacao : 0,005 (LDC-ISCO)  
 Compr. de onda : 254nm  
 Fase Movel : MeOH/H2O 70:30

COLUNA 5000 psi 75C  
 primeiro teste a 100 microlitros/min

- 1 - acetona
- 2 - benzonitrila
- 3 - benzeno
- 4 - tolueno
- 5 - naftaleno

Figura 3.11-Cromatograma da coluna recheada a 5000 psi, a 75°C com um reservatório de 19 ml de capacidade e FE HYODS 3µm Shandon

B) 95 °C

Efetuuou-se idêntico procedimento ao descrito no item anterior para temperatura de 75°C. Notou-se o aparecimento de bolhas nas juntas das anilhas, indicando vazamento do solvente de suspensão, o que poderia secar a FE dentro da coluna, inutilizando-a. Tal fato foi confirmado, pois com a coluna assim preparada foi impossível avaliá-la ,mesmo a um único fluxo. Deste modo, abandonou-se de vez as colunas com anilhas e começou-se a utilizar definitivamente as equipadas com rosca.

### 3.7.5 Mudanca da pressao de enchimento para 10000psi .

Uma vez que o reservatório da bomba Shandon não resiste a pressão de 10000psi, foi feito um outro reservatório equipado com roscas e com maior capacidade volumétrica para tornar a suspensão mais diluída (fig. 1 e 3). Uma vez que se tratava de testes preliminares, foi utilizado o funil de saída do reservatório equipado com a pré-coluna (figura 4), porém não foram obtidos bons resultados, devido ao fato de que a suspensão perdia seu caráter por causa da turbulência que ocorria no funil de saída do reservatório, ocasionando acúmulo da fase estacionária utilizada no mesmo. Assim, baseados em um artigo de Menet *et al*<sup>(27)</sup> foi construído um novo funil de saída da suspensão, sem pré-coluna, que eliminou definitivamente o problema de turbulência do funil.

Os testes foram realizados a temperatura

ambiente, 75°C e 95°C, conforme metodologia anterior (item 3.7.1). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.4 e os cromatogramas mostrados na figuras 3.12, 3.13 e 3.14.

Tabela 3.4 - Parametros cromatograficos das colunas recheadas a 10000psi de Pressao a várias temperaturas

coluna a :	fluxo( $\mu$ l/min)	n/l(cm)	h(cm)	u(cm/min)	As
AMB	200	17600	17,4	8,93	0,6
75 °C	200	62700	4,8	9,62	0,7
95°C	300	38000	7,8	12,0	0,4

AMB = AMBIente

Notou-se que a assimetria das colunas obtidas é aproximadamente igual às das colunas recheadas posteriormente sem pré-coluna, porém de sinal invertido (ex com pré-coluna a 75°C e 10000psi; As = 0,7; sem pré-coluna, mesma T e P; As = 1,7). Porém a eficiência das mesmas colunas recheadas com pré-coluna são maiores do que as similares recheadas sem pré-coluna. Podemos atribuir este fato à pré-coluna, que no inicio do recheamento direcionava o jato da suspensão para a coluna eficientemente, porém, logo em seguida, começava a destruir o caráter da suspensão pelo atrito ou turbulência no bocal do funil de suspensão. É de se notar que existe uma inversão de eficiências conforme a temperatura quando se utiliza a pré-coluna ou não. De qualquer modo, optamos por um sistema de recheio ou hardware que nos desse o mínimo desperdício de FE utilizada, uma vez que deveria-se utilizar um sistema que permitisse eliminar a maioria dos

problemas apresentados, e que permitisse uma análise confiante sobre o comportamento das condições de recheio empregadas. As interações multiplas que possivelmente existem entre a Pressão, a Temperatura e a Forma do sistema serão explicadas na Discussão deste trabalho.

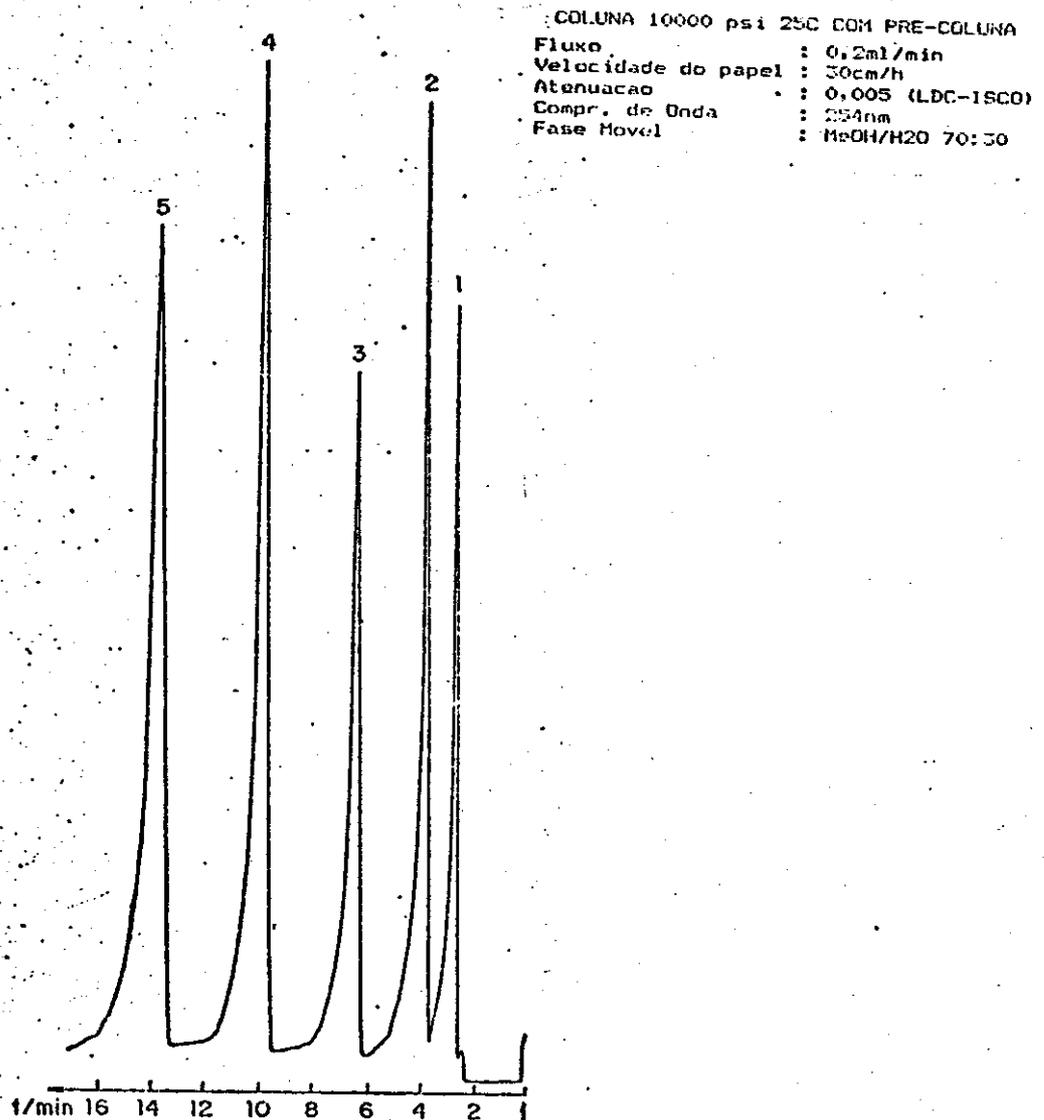
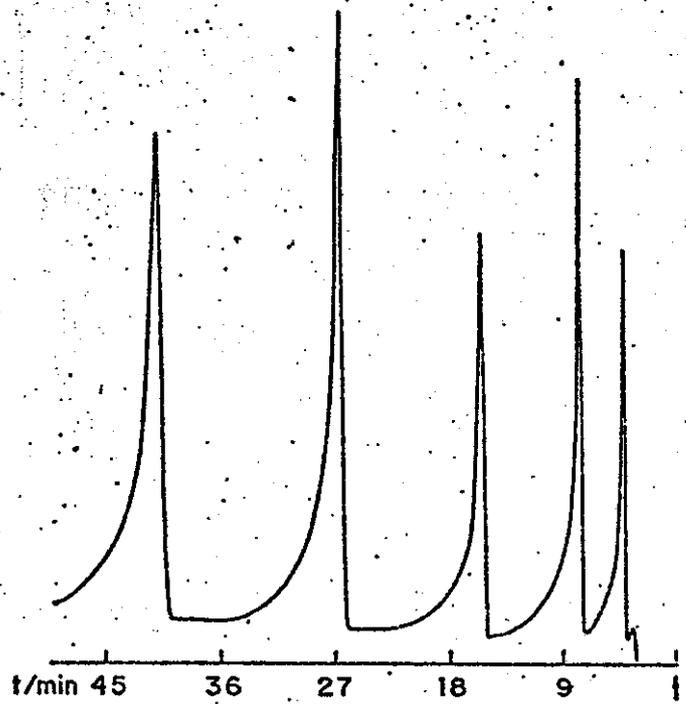
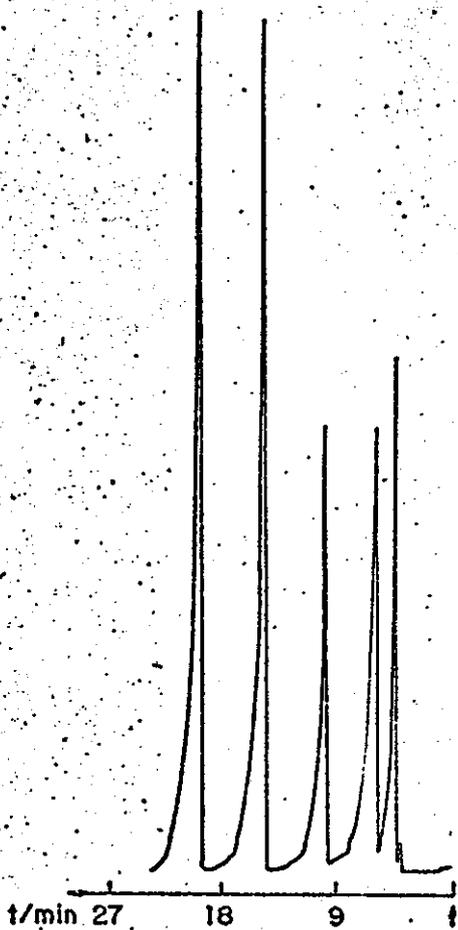


Figura 3.12  
Cromatograma da coluna recheada a 10000psi e 25°C com pre-coluna e  
FE HYODS 3µm da Shandon



**A) coluna a 75°C e 10000psi**  
 fluxo : 200µl/min  
 velocidade do papel : 30cm/h  
 Compr. de onda : 254 nm  
 Fase Móvel : MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30  
 n/L : 62700

**B) coluna a 95°C e 10000 psi**  
 : 300µl/min  
 : 30cm/h  
 : 254 nm  
 : MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30  
 : 38000

Figura 3.13-Cromatogramas das colunas recheadas a 10000psi com pre-coluna a temperaturas de : (A) 75°C; (B) 95°C

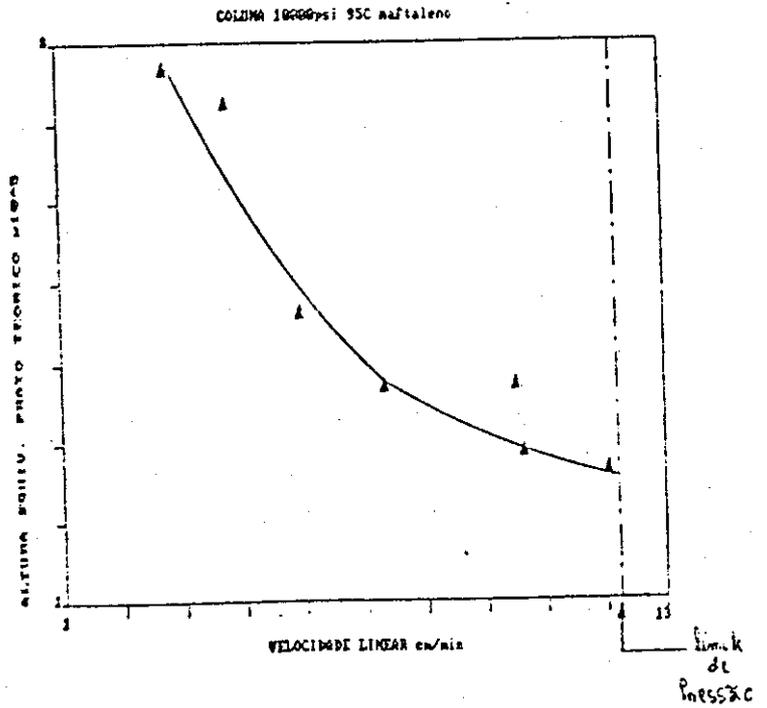
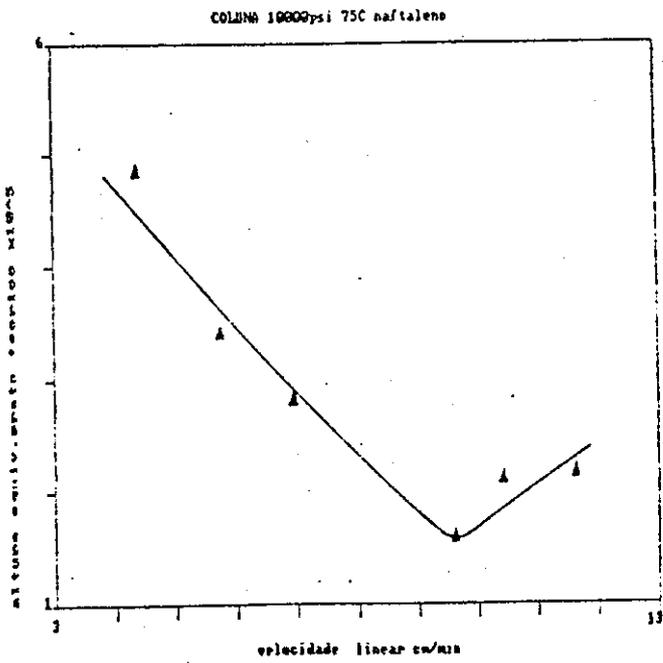
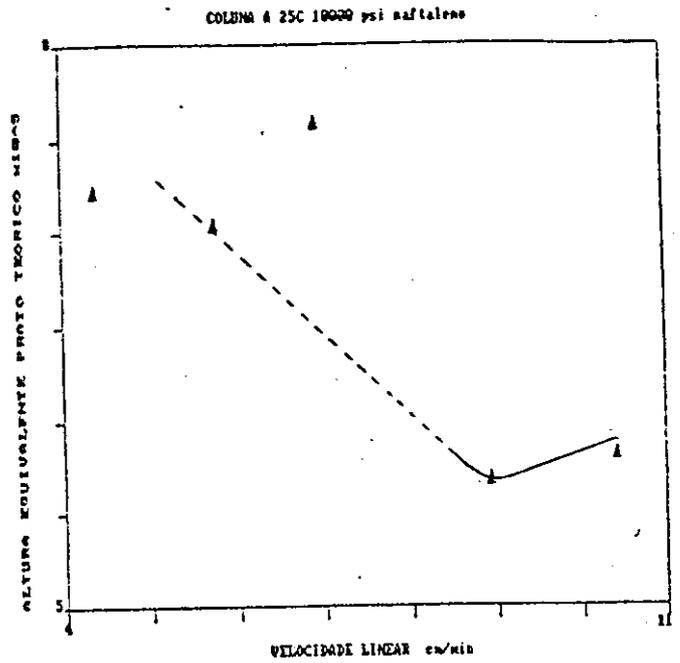
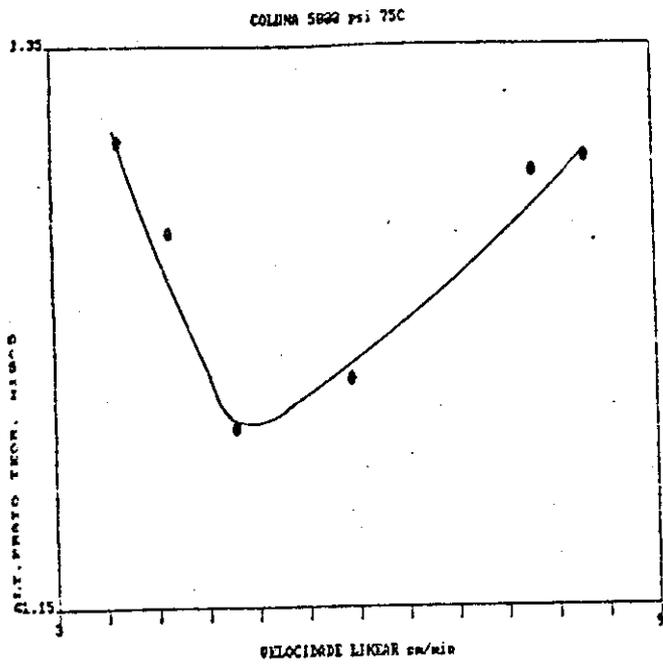


Figura 3.14  
Curvas de Van Deemter dos Cromatogramas obtidos

Com estes resultados, verificou-se que poderia haver um ponto ótimo de P e T no qual a coluna recheada poderia apresentar uma máxima eficiência. Para confirmar esta possibilidade, planejou-se o esquema de trabalho descrito no próximo item.

### 3.8 Esquema de Trabalho (a partir das otimizações já feitas)

#### 3.8.1 - Parâmetros fixos :

- A) - Hardware
- Volume do reservatório : 27ml
  - Bomba utilizada : Haskel
  - Colunas utilizadas : com roscas e pós-coluna
  - Funil de saída utilizado : sem pré-coluna
- B) - Solventes
- de Suspensão : CCl<sub>4</sub>/MeOH 95:5
  - de Arraste : MeOH puro
  - Fase Móvel : MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30
- C) - Fase Estacionária utilizada - HYODS 3 $\mu$ m da Shandon
- D) - Modificações propostas :
- A polaridade do solvente de suspensão para a fase reversa foi modificada para um solvente aproximadamente apolar<sup>(28)</sup>, ao passo que deveria ser polar<sup>(42)</sup> para ter similaridade com a fase móvel utilizada. Devido a isto, sempre que terminamos o enchimento das

colunas, lavamos a mesma na própria bomba de enchimento com  $\cong$  3ml de metanol puro para remoção do solvente de suspensão.

- O próprio hardware apresentado foi modificado para a sua forma atual devido às observações feitas nos testes priliminares. Com isso, chegou-se à conclusão de que o conjunto de colunas equipadas com roscas, que suportam pressões até 15000psi com segurança, funil de saída do reservatório de suspensão e o próprio reservatório de suspensão, feito para suportar altas pressões, estariam otimizados para recheiar colunas com alta eficiência.

- A utilização do aquecimento durante o recheio das colunas é adotado, porque verificou-se uma melhora no desempenho das mesmas com o auxílio da temperatura. Resta saber em qual combinação de temperatura e pressão atinge-se a eficiência máxima.

- Antes que a suspensão obtida por ultra-som fosse colocada no reservatório de suspensão, o mesmo é preenchido com uma camada de 15ml do mesmo solvente de suspensão utilizado, para evitar que o solvente de arraste, ao ser injetado no reservatório, encontre a suspensão e ocasione a quebra do seu caráter .

- Foi proposto e construído uma pós-coluna, que foi utilizada tanto nas colunas com anilhas, como nas colunas com roscas, devido ao problema que os filtros das colunas apresentavam de

entupimento, ao serem utilizados para barrarem a suspensão durante o recheamento das colunas.

### 3.8.2 - Parâmetros Móveis

A) - Obtenção das Melhores valores de P e T

Pressão de Enchimento da Coluna(psi)			
	5000	10000	15000
T °C	Ambiente	Ambiente	Ambiente
	75	75	75
	95	95	95

B) - Repetição dos melhores resultados : Obter reprodutibilidade das Colunas

C) - Após achar a pressão ótima de enchimento, variar a temperatura a:

Temperatura (°C )			
Pressão Ótima	35	55	85

D) - Repetição dos melhores resultados

### 3.9 Resultados Obtidos

#### 3.9.1 - Enchimento de colunas a 5000, 10000 e 15000 psi de pressão

As colunas foram recheadas nas condições descritas no item 3.8.2 A, conforme procedimento geral descrito no item 3.7.1, lembrando sempre que o volume do reservatório é de 27ml, e o volume total coletado, após a "lavagem" coluna é de 30ml.

Os resultados das colunas obtidas são apresentados nas tabelas 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 e figuras 3.15, 3.16 e 3.17

Tabela 3.5 : Condições de preparo das Colunas Recheadas a T.AMB

T(°C)	Pressão psi	massa de FE (g)	tempo de escoamento em min. a :		
			10 ml	20ml	35ml
21	5000	0,825	8	30	82
23	10000	0,868	3	12	35
19	15000	0,941	3	16	35

Tabela 3.6 : Condições de Preparo das Colunas Recheadas a 75°C

Pressão psi	massa de FE (g)	tempo de escoamento em min. a :		
		10ml	20ml	30ml
5000	0,828	5	21	38
10000	0,943	3	13	31

Obs : devido a problemas de corrosão no reservatório, não foram

feitos os testes a 15000psi de pressão por motivo de segurança

Tabela 3.7 - Condições de Preparo da Colunas Recheadas a 95°C

Pressão psi	massa de FE (g)	tempo de escoamento em min a :		
		10ml	20ml	30ml
5000	0,928	6	19	46
10000	0,967	4	14	30

Tabela 3.8 - Parâmetros Cromatográficos das Colunas Recheadas a Várias Temperaturas e Pressão. Cálculos feitos utilizando o pico do naftaleno

Temp. (°C)	fluxo ótimo ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	$n/l$ ( $\text{m}^{-1}$ )	$h$ ( $\text{m}$ )	$u$ ( $\text{cm}/\text{min}$ )	$T_r$ ( $\text{min}$ )	$T_m$ ( $\text{min}$ )	$A_s$
<sup>a</sup> AMB	230	41480	8,33	10,20	13,19	2,45	3,74
75	170	19089	17,46	7,58	18,34	3,3	3,22
95	110	11574	29,53	4,02	22,36	6,23	2,54
<sup>b</sup> AMB	250	14203	23,53	10,64	12,85	2,35	4,68
75	165	10238	32,56	7,58	13,75	3,3	1,72
95	120	10809	31,09	5,05	20,95	4,95	1,81
<sup>c</sup> AMB	90	7311	45,6	3,70	38,13	6,75	1,06

a = 5000psi , b = 10000psi , c = 15000psi

Observou-se que houve um decréscimo da eficiência das colunas com o aumento da temperatura, e que a assimetria dos picos diminuíam com o aumento da pressão.

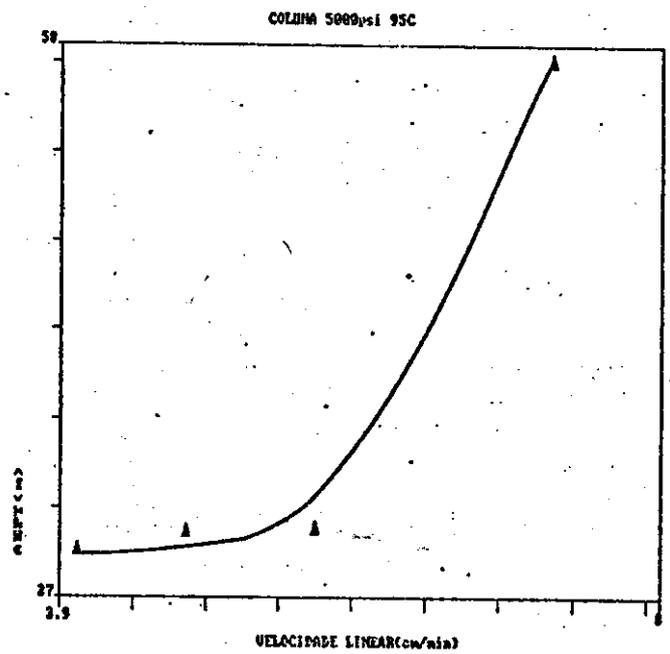
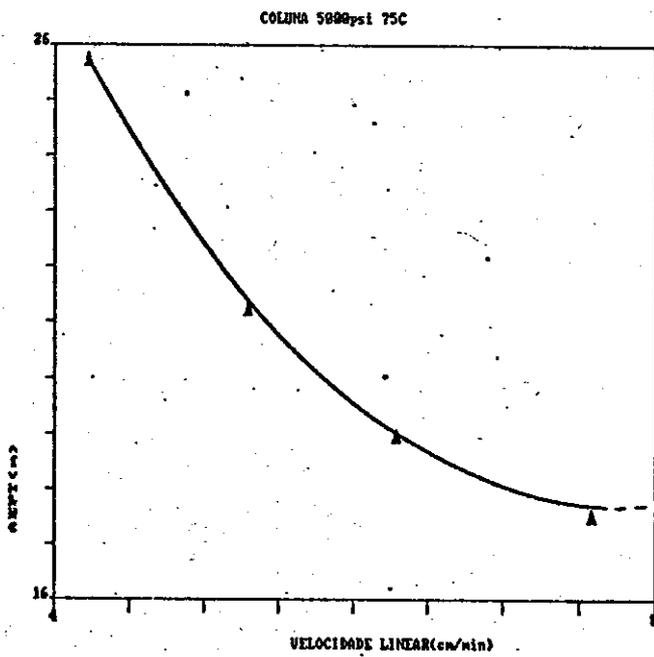
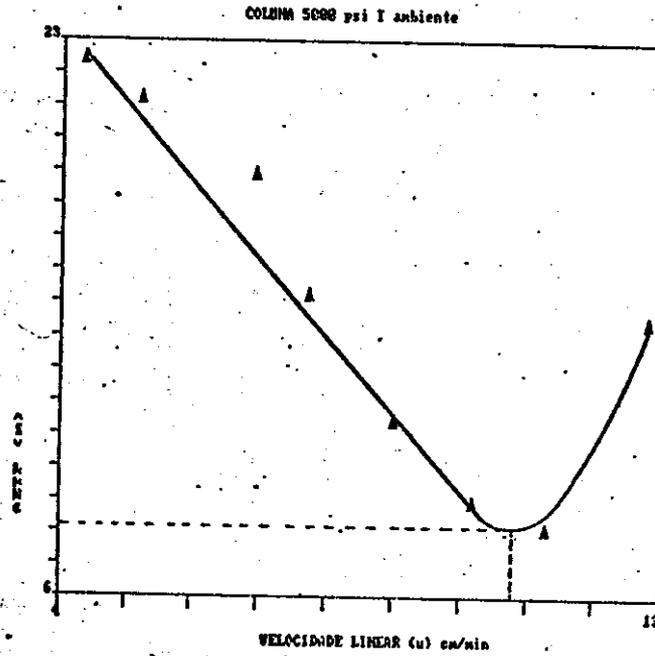


Figura 3.15  
 Curvas de Van Deemter das colunas recheadas a 5000 psi e a temperatura de 25, 75 e 95 °C

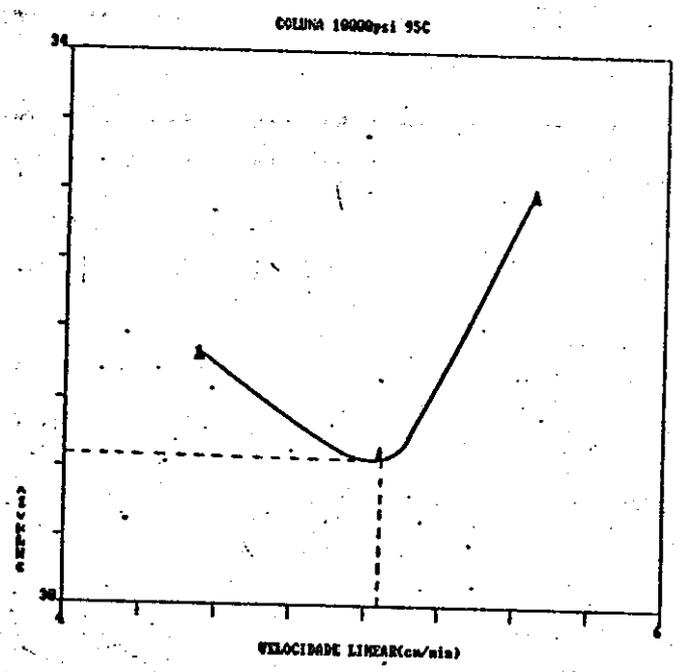
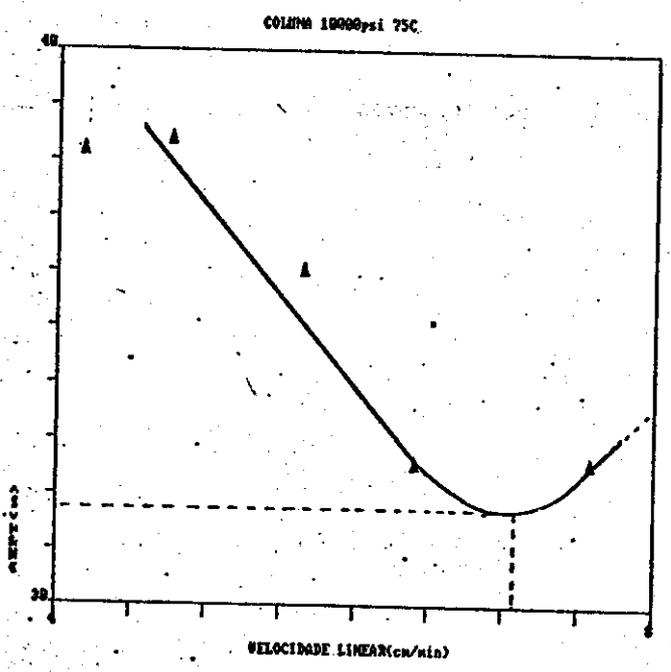
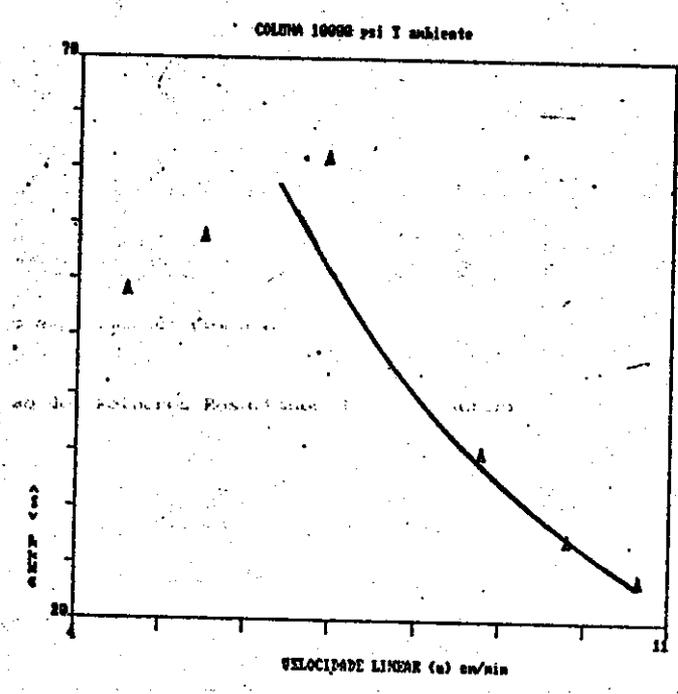
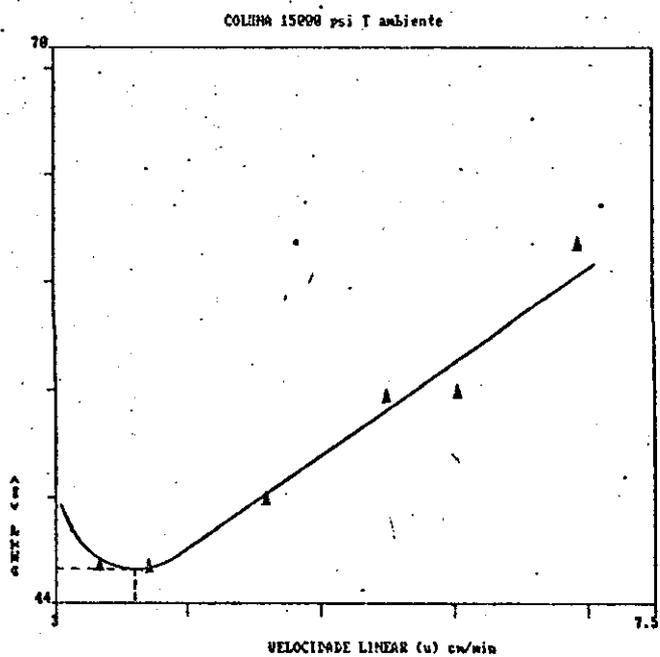


Figura 3.16  
 Curvas de Van Deemter das colunas recheadas a 10000psi e a temperatura ambiente, 75 e 95°C



**Figura 3.17**  
**Curva de Van Deemter da coluna recheada a 15000 psi e a**  
**temperatura ambiente.**

### 3.9.2 - Repetição dos melhores resultados

Fazendo-se uma avaliação individual de cada coluna, chegou-se à conclusão de que as melhores colunas foram obtidas à pressão de 5000psi. Fazendo-se a média das colunas à uma mesma pressão, a melhor coluna obtida foi também a 5000psi. Do mesmo modo, fazendo-se a média das colunas à uma mesma temperatura, notou-se que a melhor coluna foi obtida à temperatura ambiente.

Assim, resolveu-se repetir as melhores colunas obtidas nas seguintes condições : pressão de enchimento de 5000psi e temperatura ambiente. Para isso, utilizamos o mesmo procedimento geral anteriormente descrito, no item 3.7.1. Os resultados são apresentados a seguir, nas tabelas 3.9 e 3.10.

Tabela 3.9 - Condições de repetição do preparo da coluna recheada a 5000psi e a temperatura ambiente.

Coluna	massa de FE (g)	tempo de escoamento ( min. ) a :		
		10ml	20ml	30ml
A	0,879	7	30	64
B	0,855	8	30	64

Tabela 3.10 - Parâmetros cromatográficos das colunas recheadas a 5000psi e temperatura ambiente ( naftaleno somente)

Coluna	fluxo ótimo ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )	$n/l$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	h (cm)	u cm/min	Tr (min)	Tm (min)	As
A	200	37893	8,77	8,77	12,40	2,85	2,34
B	160	37038	9,16	8,67	16,45	3,75	3,28

Verificou-se que com ambas as colunas foi obtida a mesma eficiência, embora a vazões distintas, o que não impede de concluir que sejam reprodutíveis.<sup>(6)</sup>

3.9.3 - Enchimento de colunas utilizando a pressão ótima (5000psi) e variando-se a temperatura do recheio de modo intermediário.

Estabelecida a melhor pressão, resolveu-se variar a temperatura intermediariamente às já utilizadas, para verificar se havia uma temperatura ideal, que não estivesse entre as mesmas. Assim, utilizando procedimento do item 3.6.1, encheu-se as colunas a 5000psi de pressão, às temperaturas de 35°C, 55°C e 85°C. Nas tabelas 3.11 , 3.12 e figura 3.18 são apresentados os resultados obtidos.

Tabela 3.11- Tempos de enchimento das colunas recheadas à 5000psi a várias temperaturas

Temp. (°C)	massa FE (g)	tempo de enchimento ( min ) a :		
		10ml	20ml	30ml
35	0,910	9	30	55
55	0,880	7	28	51
85	0,895	6	22	44

Tabela 3.12 - Parâmetros cromatográficos das colunas recheadas a 5000psi e a várias temperaturas (naftaleno somente)

Temp (°C)	fluxo ótimo ( $\mu$ l/min)	n/l ( $m^{-1}$ )	h (cm)	u ( $\frac{cm}{min}$ )	Tm (min)	Tr (min)	As
35	110	35925	9,28	5,05	4,95	22,44	2,25
55	>180	17473	19,07	8,33	3,00	13,61	2,88
85	>120	16701	19,98	5,05	4,95	23,74	4,50

Notou-se novamente o mesmo comportamento anterior, de que as melhores colunas eram obtidas a temperaturas menores. Notou-se também que a coluna recheada a 85°C apresentava uma alta pressão de trabalho (>que 5000psi) e que tinha uma baixa eficiência. Decidiu-se então abandonar os experimentos com a mesma.

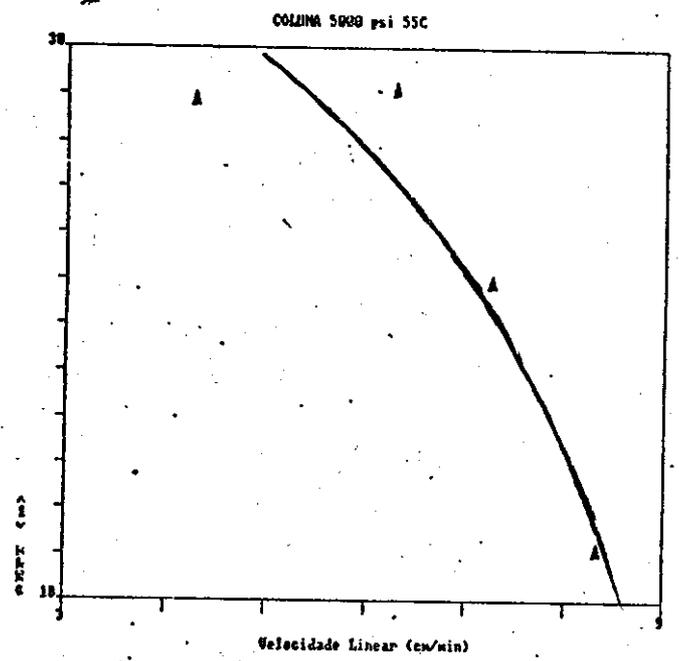
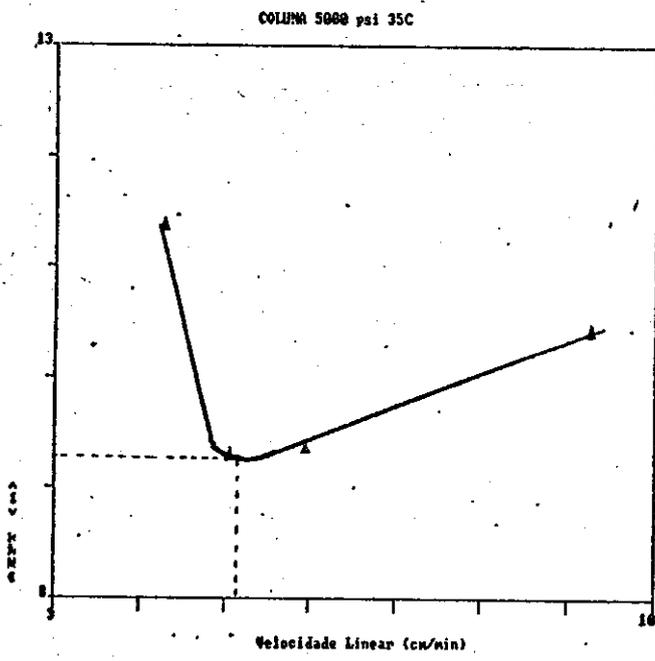


Figura 3.18-Curvas de Van Deemter das colunas recheadas a 5000psi  
 a : (A) 35°C ; (B) 55°C

### 3.9.4 - Repeticao dos Melhores Resultados da Etapa Anterior - ensaio com a permeabilidade

A melhor coluna foi a obtida a 35°C. Planejou-se então, repetir esta coluna para verificar sua reprodutibilidade. Antes porém, o filtro da pós-coluna foi lavado em ultra-som, por 15 min, e depois deixado por 24h em uma mistura de HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O 1:1, sendo finalmente lavado com água destilada. O objetivo deste tratamento foi eliminar quaisquer micro-partículas que porventura tivessem se instalado nos poros do filtro, uma vez que verificou-se que com o sistema montado e sem a fase estacionária (coluna, pós-coluna e filtro, atarrachado no reservatório de da bomba ) havia uma resistência de quase 5000psi de pressão à passagem do solvente, igual portanto à pressão utilizada nos testes, e que poderia prejudicar o recheio das colunas. Após a lavagem, verificou-se que a resistência à passagem do solvente diminuiu para 2500 psi, o que foi considerado normal. Assim, repetiu-se o procedimento de preparação da suspensão descrito anteriormente, e uma nova coluna foi feita a 5000psi e a 35°C. Os resultados são apresentados nas tabelas 3.13, 3.14 e figura 3.19-a..

Tabela 3.13 - Condição de preparo da coluna recheada a 5000psi e a 35°C

massa de FE (g)	tempo de enchimento ( min ) a :		
	10ml	20ml	30ml
0,980	7	30	57

Tabela 3.14 - Parâmetros cromatográficos da coluna recheada a 5000psi a 35°C (naftaleno somente)

fluxo ótimo (μl/min)	n/l ( m <sup>-1</sup> )	h (m)	u ( $\frac{cm}{min}$ )	Tm (min)	Tr (min)	As	Pressão máxima (psi)
220	50891	6,55	9,51	2,63	11,45	4,63	6015

Notou-se que, ao se aumentar a permeabilidade do filtro de retenção da suspensão da pós-coluna, a eficiência da coluna aumentou, apesar de se utilizar a mesma temperatura anterior, embora o tempo total de enchimento tenha permanecido praticamente o mesmo.

### 3.9.5 Enchimento da coluna a baixa temperatura

Para verificar o efeito que a temperatura baixa tem sobre a viscosidade da suspensão, e conseqüentemente sobre a eficiência da coluna, foi feito um enchimento a -15°C utilizando a

mesma camisa de banho da coluna, porém recheada com uma mistura de gelo e sal. Os resultados são apresentados nas tabelas 3.15 e 3.16 .

Tabela 3.15 - Condição de preparo da coluna recheada a 5000psi e a -15 °C

massa utilizada ( g )	Tempo de enchimento ( min ) a:		
	10ml	20ml	30ml
0,820	12	54	118

Tabela 3.16 - Parâmetros cromatográficos obtidos da coluna recheada a 5000psi e a -15°C (naftaleno somente)

fluxo ótimo	$n/l$ ( $m^{-1}$ )	h (cm)	u ( $\frac{cm}{min}$ )	t <sub>M</sub> (min)	t <sub>R</sub> (min)	P <sub>máx.</sub> (psi)	As
240µl/min	55160	6	11	2	10	4910	3

Notou-se que, apesar da baixa temperatura utilizada, e do tempo excessivo para se atingir o volume necessário para completar o recheio, a coluna apresentou uma alta eficiência.

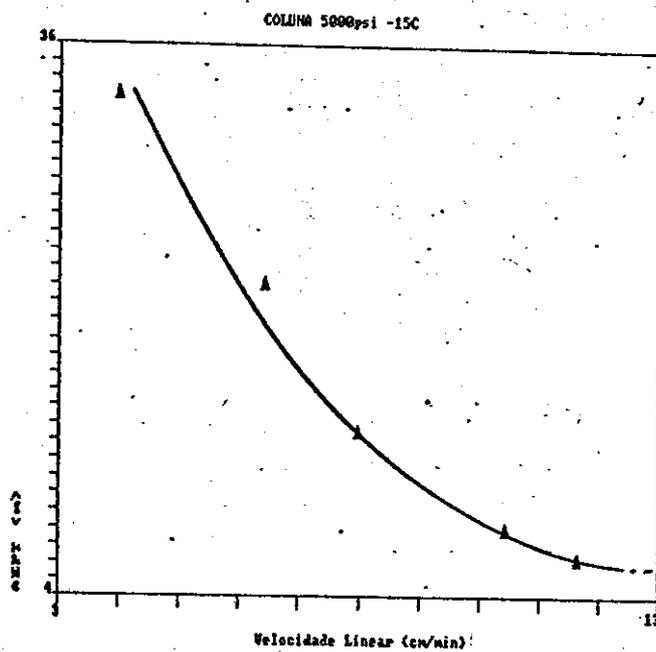
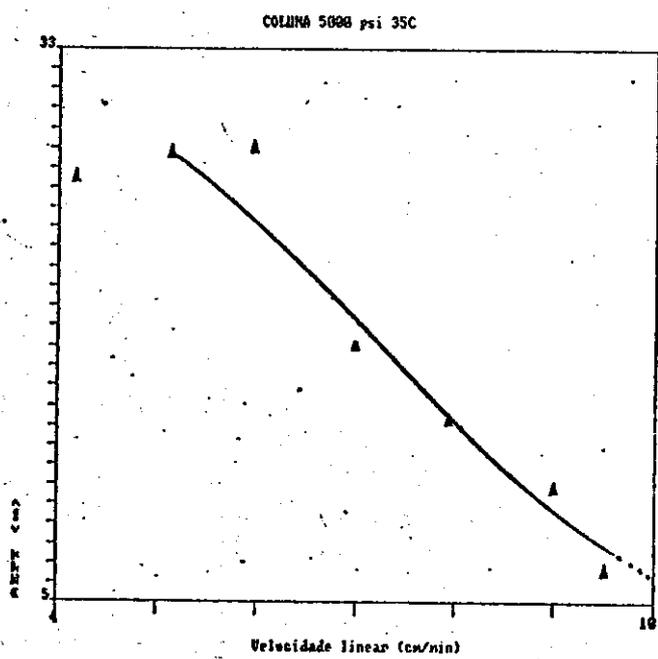
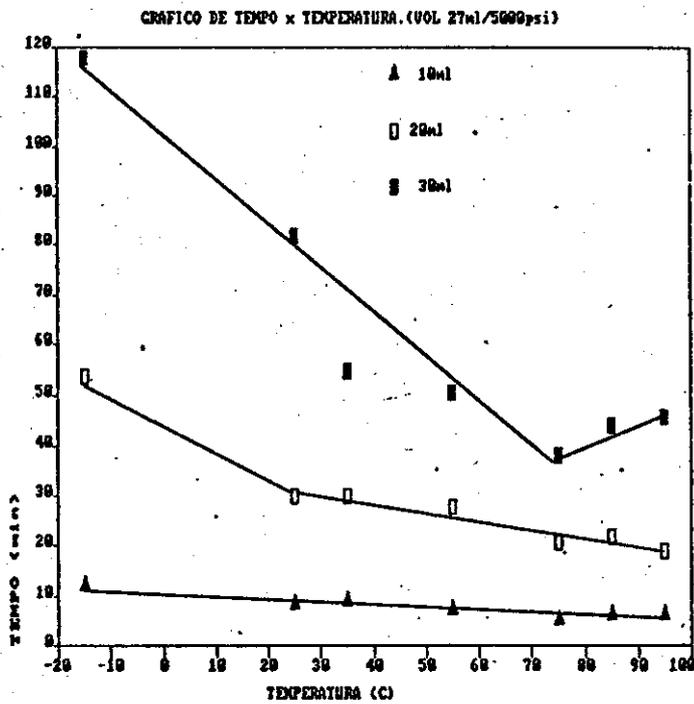
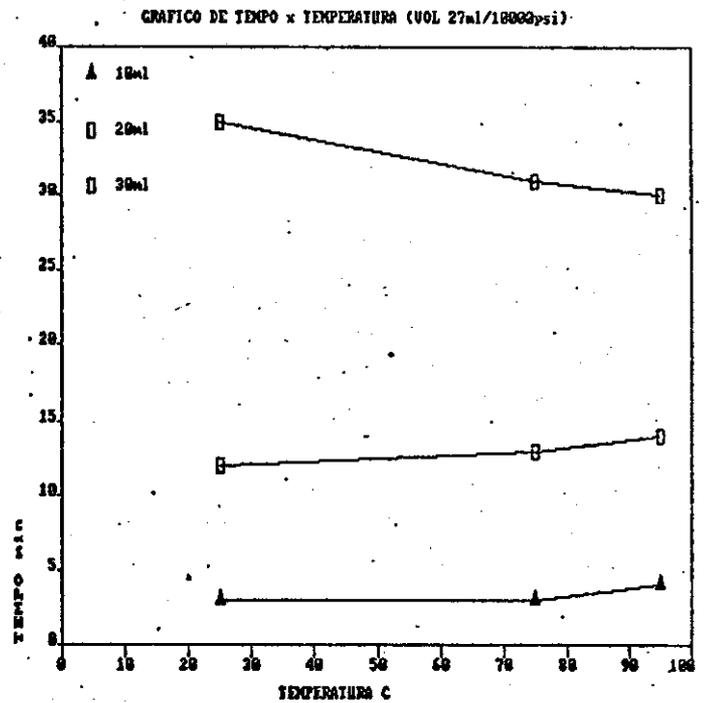


Figura 3.19-Curva de Van Deemter da repetição da coluna recheada a 5000psi a : (a) 35°C e (b) -15°C

Foram feitos alguns gráficos no qual foram comparados os diversos tempos de enchimento das colunas com as temperaturas utilizadas. Os gráficos podem ser vistos nas figuras 20 e 21, no qual notamos que o tempo de enchimento da coluna cai com o aumento da temperatura, juntamente com a sua eficiência.



A



B

figura 3.20-Tempo de enchimento das diversas colunas contra a temperatura utilizada, para o reservatório de 27ml.

A: colunas recheadas a 5000psi

B: colunas recheadas a 10000psi

Gráfico da perda da Eficiência com a temperatura

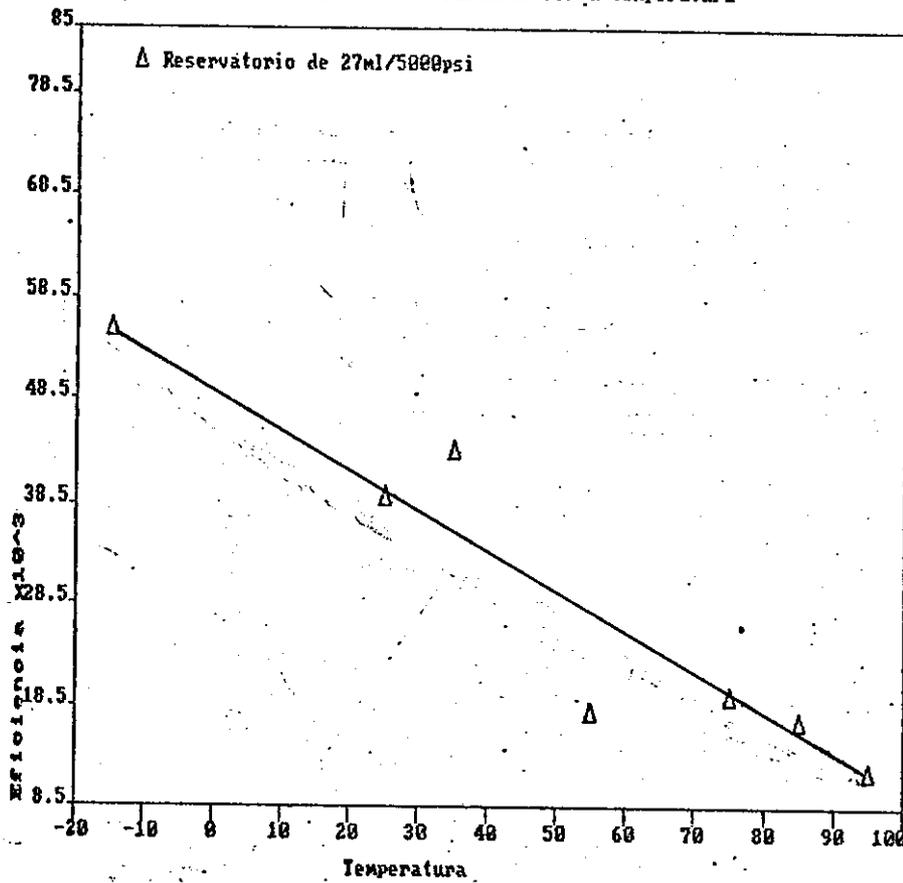


Figura 3.21-Perda da eficiencia das colunas com o aumento da temperatura de empacotamento, para o reservatorio de 27ml

## CAPITULO 4

### DISCUSSAO

Nos experimentos realizados, foi notado que:

- A concentração da FE na suspensão, conforme se apresenta diluída ou não no reservatório de suspensão, é um fator importante para obter colunas eficientes. Tal fato foi observado nos experimentos preliminares realizados. Ao se obterem colunas recheadas com partículas de  $3\mu\text{m}$  com um reservatório de 6ml e a temperatura ambiente, foi notado que, para todas as colunas há um decréscimo surpreendente do número de pratos teóricos por metro, com uma média ao redor de 2500-3000 p/m

O interessante é que com um reservatório de capacidade maior, no caso o utilizado foi o da bomba Shandon, de 19ml, este número crescia, para as mesmas condições, para 28000p/m, e que com um reservatório maior ainda, como o da bomba Haskel, este número subia para 41000p/m. Não foram encontrados na literatura muitas referências sobre este fato, exceto em algumas<sup>(5,28)</sup> que o citam como necessário para a obtenção de boas colunas, sem detalhar precisamente o porquê. Dependendo do tipo de líquido usado e da FE empregada, observou-se que as suspensões não se mantêm estáveis, e a floculação ocorre<sup>(2)</sup>, tal como

acontece quando é utilizado o metanol puro.

Por outro lado, a utilização de um líquido neutro, tal como o tetracloreto de carbono, porém que contém elementos fortemente eletroatrativos como o cloro, permite que ou sítios de cargas sejam formados entre as partículas e os reagentes, compensando deste modo o efeito de agregação, e estabilizando a suspensão, ou a carga das partículas da sílica coloidal ligada seja compensada pela força eletroatrativa do cloro.<sup>(50)</sup> Uma suspensão diluída deve, portanto, aumentar a distância inter-partículas e minimizar os efeitos de formação de aglomerados, ao passo que nas soluções concentradas, estes efeitos devem prevalecer com maior intensidade.

- A densidade da suspensão deve ser aproximadamente igual à das partículas utilizadas, de acordo com Gluckman <sup>(6)</sup> *et al* e confirmadas por nós, de modo a manter as partículas estáveis o maior tempo possível no solvente de suspensão. Os métodos descritos na introdução revelam que o objetivo dos mesmos é o de aproximar a densidade da solução o mais perto possível da densidade da sílica. Foi obtido por Mayer e Hartwick<sup>(28)</sup> soluções de suspensão, feitas com álcool isopropílico puro e tetracloreto de carbono/metanol 95:5, com os quais conseguiram bons resultados.

No trabalho realizado nesta tese, primeiramente a suspensão era obtida homogeneizando-se a sílica em metanol com

10ml de ácido acético 10%<sup>(12)</sup>, porém com as partículas de 3 $\mu$ m ocorria a decantação rápida. Ao contrário, utilizando-se o tetracloreto de carbono/metanol 95:5, as partículas permaneciam por várias horas em suspensão antes de começarem a decantar, sem contudo formarem aglomerados, algo como um véu ou uma névoa que vai abaixando para o fundo do frasco. Ao que parece, baseado nos artigos citados e comentados, o efeito da formação de carga para estabilizar a suspensão é mais importante quando aliado ao balanço da densidade, porque, se a suspensão se mantiver, mesmo em baixa densidade, não ocorrerá a formação de agregados. Porém se os efeitos de adesão entre as partículas adjacentes se manifestam, os agregados se formam, decantam ou aglutinam em pequenos "clusters" ocasionando uma formação irregular do leito da coluna.

- A viscosidade do solvente não parece ser um fator preponderante durante o processo de enchimento da coluna, porém, sua diminuição ajuda a obter colunas com alta eficiência. O uso de solventes com várias viscosidades é fartamente documentada (9,5,27,28,34). Muitos autores preferem solventes de baixa viscosidade, para obterem um recheio rápido, que evite a má formação do leito da coluna.

Ao ser feito um gráfico do tempo de enchimento das várias colunas obtidas a 5000psi versus a temperatura utilizada em cada coluna (Figura 20-a), foi notado uma uniformização

no tempo de enchimento dos primeiros 10ml coletados, e que independe da temperatura utilizada. Porém, notou-se que o tempo do enchimento aumenta com o decréscimo da temperatura, quando o volume coletado ultrapassa os 10ml coletados, sendo sempre maior o tempo quanto mais baixa for a temperatura utilizada. Podemos concluir disto que :

1) o aumento da temperatura para diminuir a viscosidade somente tem influência positiva quando a permeabilidade do sistema diminui a vazão de tal modo que somente um líquido de baixa viscosidade pode fluir através do leito da coluna que está sendo formado.

2) o aumento da temperatura favorece uma diminuição do tempo de enchimento da coluna e, fato observado, caminha até um ponto ótimo de 75°C, após o qual a tendência é aumentar o tempo de enchimento com maiores temperaturas. Este fato deve estar ligado à temperatura de ebulição do tetracloreto de carbono, em torno de 76°C, o que possivelmente faz com que ele, a temperaturas maiores do que a de seu ponto de ebulição, se evapore dificultando o processo de recheio. Notou-se também que uma maior pressão de enchimento da coluna (10000psi) faz com que o tempo medido a cada 10ml se torne igual para todas as colunas, independente do fato das colunas serem recheadas a diferentes temperaturas. (Figura 20-b) o que parece indicar que uma maior pressão de enchimento fornece uma vazão mais uniforme, sendo desnecessário a diminuição da viscosidade do solvente utilizado.

3) O aumento da viscosidade pela diminuição da temperatura de enchimento da coluna não parece afetar a eficiência da mesma. Observou-se este fato ao se recheiar uma coluna a  $-15^{\circ}\text{C}$  e a 5000psi de pressão (vide página 68), a qual obteve um grande número de pratos teóricos por metro.

A fase estacionária, conforme nos relata Unger<sup>(49)</sup>, deve resultar em um leito uniforme e homogêneo na coluna, de modo que a fase móvel percorra o maior número possível de caminhos ao passar pelo leito da coluna. A conclusão é óbvia : quanto mais caminhos a fase móvel percorrer, maiores as interações entre o soluto e o solvente , e entre o soluto e a fase estacionária, e maior a eficiência da coluna e maior sua permeabilidade. A alta permeabilidade faz com que a fase móvel não exerça uma pressão grande ao passar sobre o leito da coluna, diminuindo a pressão de trabalho.

Deste modo a conclusão geral que se pode tirar a respeito da viscosidade do solvente utilizado é que a função desta é fornecer um fluxo rápido de modo a se obter um recheio homogêneo. Porém, a diminuição da viscosidade no solvente utilizado, no caso o tetracloreto de carbono/metanol 95:5 só parece ter significância quando a permeabilidade do sistema diminui de tal modo que se torna necessário diminuir a viscosidade do solvente de modo a evitar uma maior compactação do leito da

coluna, motivada pelo aumento do tempo de enchimento da mesma. Porém se a permeabilidade do sistema se mantém alta, então a viscosidade do solvente não é determinante na obtenção de boas colunas.

- Existe uma relação entre a temperatura utilizada, o volume do reservatório ideal, e o tempo de enchimento completo da coluna. Notou-se que as melhores colunas, tanto a 5000psi como a 10000psi, foram as obtidas a temperaturas iguais a 75°C com um reservatório de 19ml de capacidade, da bomba Shandom. Ao se passar a utilizar um reservatório de maior capacidade (27ml) para a bomba Haskel, foi observado um decréscimo da eficiência das colunas, embora se estivesse utilizando os mesmos parâmetros, exceto o volume do reservatório, o que levou a concluir que existe um valor ótimo de diluição ou capacidade volumétrica do reservatório, que está associado ao tempo de enchimento das colunas, o qual se associado com o aumento da temperatura levam a fatores tais como uma maior compactação do leito da coluna<sup>(49)</sup>, prejudicando o desempenho da mesma.

Isto nos levou a concluir que o tempo de enchimento da coluna começa a ter um papel determinante quando se começa a aumentar a temperatura do enchimento da mesma. Notou-se que com baixas temperaturas, o tempo de enchimento não parece influenciar o desempenho da coluna (vide tabela 3.15 e 3.16).

porém , se a temperatura aumenta, então o tempo de enchimento começa a ter um papel significativo na formação do leito da coluna, devido à problemas de compactação anteriormente descritos, e que tendem a diminuir a eficiência da coluna à medida que aumenta o tempo necessário para esgotar o volume da suspensão contido no reservatório.

O único elo que foi encontrado para explicar a ligação do tempo de enchimento, e de como ele prejudica o desempenho da coluna conforme se aumenta a temperatura, foi o volume do reservatório. É o volume do reservatório que fornece um bom ou mau desempenho da coluna, pois dele depende o tempo de enchimento da mesma, daí concluirmos que existe um ponto ideal de pressão, volume e temperatura que podem produzir colunas com alta eficiência e bom desempenho.

De todos estes fatos observados, notamos que a eficiência da coluna se traduz pelo alto número de pratos teóricos e baixa assimetria. Observamos que qualquer mudança das condições de recheio afetam a eficiência da coluna. A diminuição da eficiência se traduz por um alargamento da banda cromatográfica resultante da diminuição do número de caminhos possíveis entre a FM e a FE e a redução do número de trocas entre o soluto e a FE na coluna, e conseqüente aumento da assimetria. O alargamento da banda dos picos e o aumento da assimetria dos mesmos se devem

única e exclusivamente ao desempenho da própria coluna, e das condições de recheio da mesma, e não à dispersão no aparelho de cromatografia líquida (tubos, conectores, injetores e cela de detecção). Experimentos realizados por Pezzin<sup>(42)</sup> demonstraram que a dispersão nas tubulações e conectores do cromatógrafo LDC-ISCO são mínimas, e que podem ser desprezadas, na faixa de trabalho de fluxo, correspondente a 100-200  $\mu$ l/min, para as colunas microbore utilizadas.

## CAPITULO 5

### CONCLUSAO

Dos fatos observados pode-se concluir que :

1) Existe um volume ótima do reservatório de suspensão, situado em torno de 19ml, o qual permite que o tempo de enchimento da coluna não se exceda demais, e que se for aliado ao aumento da temperatura de recheio, evitará uma maior compactação da FE no leito da coluna, melhorando o seu desempenho. Este volume está condicionado à geometria do reservatório, no qual o comprimento é mais importante do que o seu diâmetro.

2) A forma do funil de saída, bem como as roscas, devem possuir angulações suaves e livres de obstáculos, que evitem o rompimento da suspensão por atrito ou turbulência.

3) Para evitar que a interação motivada pela grande área superficial por grama das partículas de  $3\mu\text{m}$  faça com que estas se aglutinem no solvente apropriado, deve-se utilizar o solvente na forma de suspensões diluídas, cuidando-se do fato de não utilizar um volume excessivo, que venha a prejudicar o leito da coluna com uma maior compactação, pelo aumento excessivo do

tempo de enchimento .

4) A temperatura parece ter o mesmo efeito que uma alta pressão na compactação excessiva do leito da coluna, se o tempo utilizado no enchimento da coluna for grande.

5) Existe um triplice efeito de pressão, temperatura e volume do reservatório de suspensão, que combinados na relação ideal, proporcionam colunas recheadas de excelente desempenho, ótima estabilidade e baixa permeabilidade. Este triplice efeito parece estar nas seguintes proporções :  $P = 5000$  psi ;  $t = 75^{\circ}\text{C}$  ; e  $V = 19\text{ml}$  de capacidade.

6) Fora destas condições, foi notado uma tendência para uma melhora no desempenho da coluna, conforme se diminui a temperatura de enchimento utilizada.

## CAPITULO 6

### PERSPECTIVAS FUTURAS

Dos dados obtidos, verificou-se que existe uma gama de fatores que podem levar a uma melhora no desempenho global das colunas, no tocante à sua preparação e enchimento. Parece ser de vital importância saber como e porque agem o comportamento reológico das suspensões, nas condições descritas no experimento, devido ao interesse que se tem atualmente na preparação e obtenção de boas colunas CLAE. Um estudo das condições dinâmicas das partículas com vários solventes, bem como um estudo aprofundado da influência da temperatura na mudança da viscosidade das suspensões utilizando tubos capilares responderia algumas questões sobre o comportamento das suspensões durante o processo de enchimento das colunas. Um estudo mais aprofundado sobre a relação que existe entre a polaridade dos solventes e seus efeitos nas diversas fases estacionárias ajudariam a evitar muitos erros decorrentes da tradição que se manteve durante os primeiros anos de utilização das fases estacionárias, e que é usada até nossos dias, apesar do progresso obtido na fabricação de fases estacionárias com diâmetro de partículas cada vez menores e mais eficientes.

## TABELAS COMPLEMENTARES

### 1) DADOS FISICO-QUIMICOS DOS SOLVENTES UTILIZADOS

#### A) TETRAKLORETO DE CARBONO <sup>(52)</sup>

P.E. normal : 76,75 °C		Pontos Criticos	
Relação da Temperatura com a Pressão		Tc(°C) 283,1	Pc (atm) 45,0
		dc (g/cm <sup>3</sup> ) 0,558	
T (°C)	P (mm Hg)	Viscosidade do Líquido Puro	
		T° C	100η <sup>a</sup>
76,75	760	0,60	1,3222
80,00	838	21,21	0,9517
90,00	1112	35,21	0,7855
100,0	1457	56,29	0,6078
		74,16	0,5017

(a) 100η = centipoise

Densidade $d_4^{20} = 1,5941 \text{ g/cm}^3$		
Viscosidade $\eta_{30}^0 = 0,00845 \text{ poise}$		
Influência da Pressão na Viscosidade		
P (Kg/cm <sup>2</sup> )	30°C	75°C
1	0	9,76
500	0,190	9,946
1000	0,351	0,100
4000	-	0,542

B) ALCOOL METILICO (52)

P.E normal : 64,6 °C		Pontos Criticos		
		Tc(°C)	Pc(atm)	dc(g/cm <sup>3</sup> )
		240,0	78,7	0,272
Solução aquosa : viscosidade $\eta$ em milipoise				
% agua	Temperatura(°C)			
	25	35	45	55
21,41	14,2	10,8	8,58	7,02
47,36	15,61	11,9	9,47	7,74
71,61	11,8	9,57	7,80	6,52
100,00	5,48	4,76	4,17	3,71

Viscosidade do Metanol Puro $\eta$ - Poise							
T (°C)	0	10	20	30	40	50	60
$10^3 \eta$	8,08	6,90	5,93	5,15	4,49	3,95	3,49

Mistura Azeotrópica P.E. = 55,70 °C % CCl<sub>4</sub> = 44,5

2) TABELAS COMPLEMENTARES SOBRE AS COLUNAS RECHEADAS - INCLUSAO DA PRESSAO MAXIMA ATINGIDA (EM PSI) E O FATOR DE DISTRIBUICAO DAS MASSAS (Dm)

A) TESTES INICIAIS - COLUNAS RECHEADAS NA BOMBA SHANDON COM RESERVATORIO COM CAPACIDADE DE 19ML. (a partir das otimizações feitas - FE 3 $\mu$ m e CCl<sub>4</sub>/MeOH 95:5)

Coluna (psi)	T (°C)	Fluxo ótimo ( $\mu$ l/min)	n/L ( $m^{-1}$ )	Pmax no fluxo ótimo (psi)	Dm
5000	75	110	82300	2160	6,44
10000	25	200	17600	3509	4,04
10000	75	200	62700	4140	4,12
10000	95	300	38000	5930	5,90

B) TESTES OBTIDOS A PARTIR DAS OTIMIZACOES FEITAS NO VOLUME DO RESERVATORIO (27ML) E NO FUNIL DE SAIDA DO MESMO (SEM PRE-COLUNA) BOMBA HASCKEL E COLUNAS COM ROSCAS

Coluna (psi)	T (°C)	Fluxo ótimo (µl/min)	n/L (m <sup>-1</sup> )	Pmax no fluxo ótimo (psi)	Dm
5000	25	230	41480	4880	4,04
10000	25	250	14200	6100	4,04
15000	25	90	7300	3220	4,59
5000	75	170	19000	5780	4,60
10000	75	165	10000	5960	3,11
5000	95	110	11500	2810	2,71
10000	95	120	10800	4510	3,30

c) REPRODUCAO DOS MELHORES RESULTADOS : COLUNAS A 5000 PSI T AMB (25°C)

Coluna	fluxo ótimo (psi)	n/L (m <sup>-1</sup> )	Pmax no fluxo ótimo (μl/min)	Dm
A	200	37843	4910	3,35
B	160	37000	5920	3,24

d) OBTENCAO DE COLUNAS NAS TEMPERATURAS INTERMEDIARIAS A 5000PSI DE PRESSAO

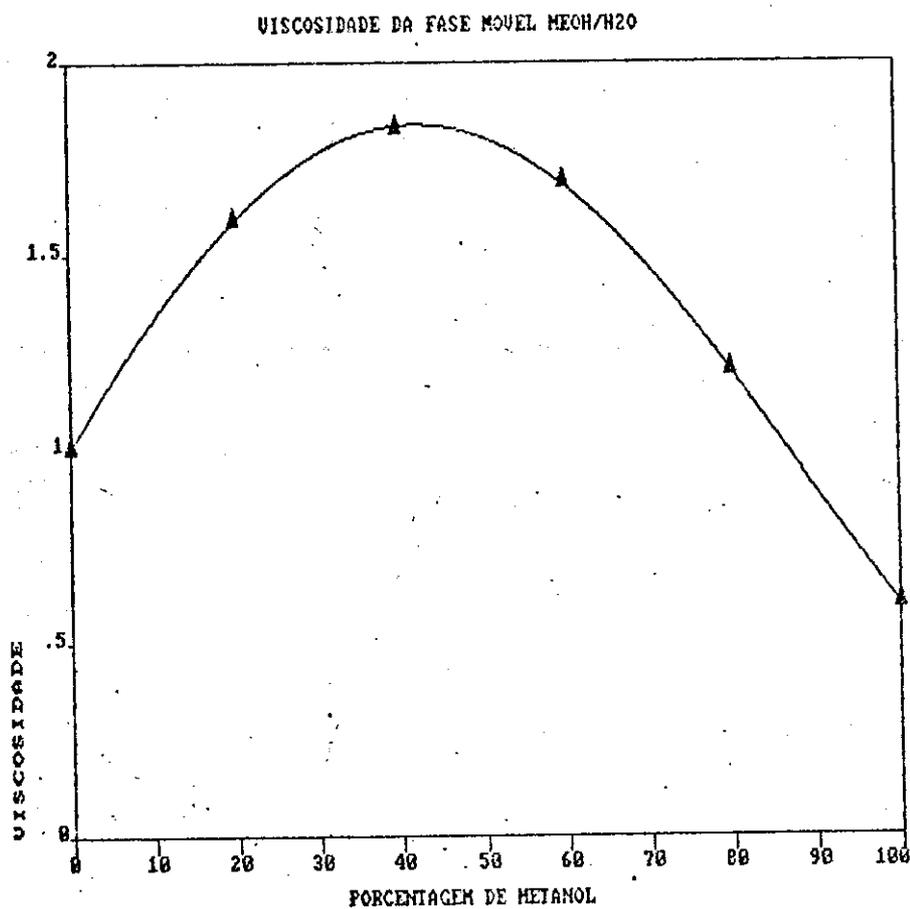
T (°C)	Fluxo ótimo (μl/min)	n/L ( m <sup>-1</sup> )	Pressão no fluxo ótimo (psi)	Dm
35	110	35900	2575	3,62
55	>180	17400	4550	3,42
85	>120	16700	5735	3,80

E) REPETICAO DO MELHOR RESULTADO - COLUNA A 5000PSI E 35°C  
TESTE REALIZADO APOS LAVAGEM DO FILTRO DA POS-COLUNA

Fluxo ótimo (µl/min)	n/l (m <sup>-1</sup> )	Pressão no fluxo ótimo (psi)	Dm
220	50890	6015	3,35

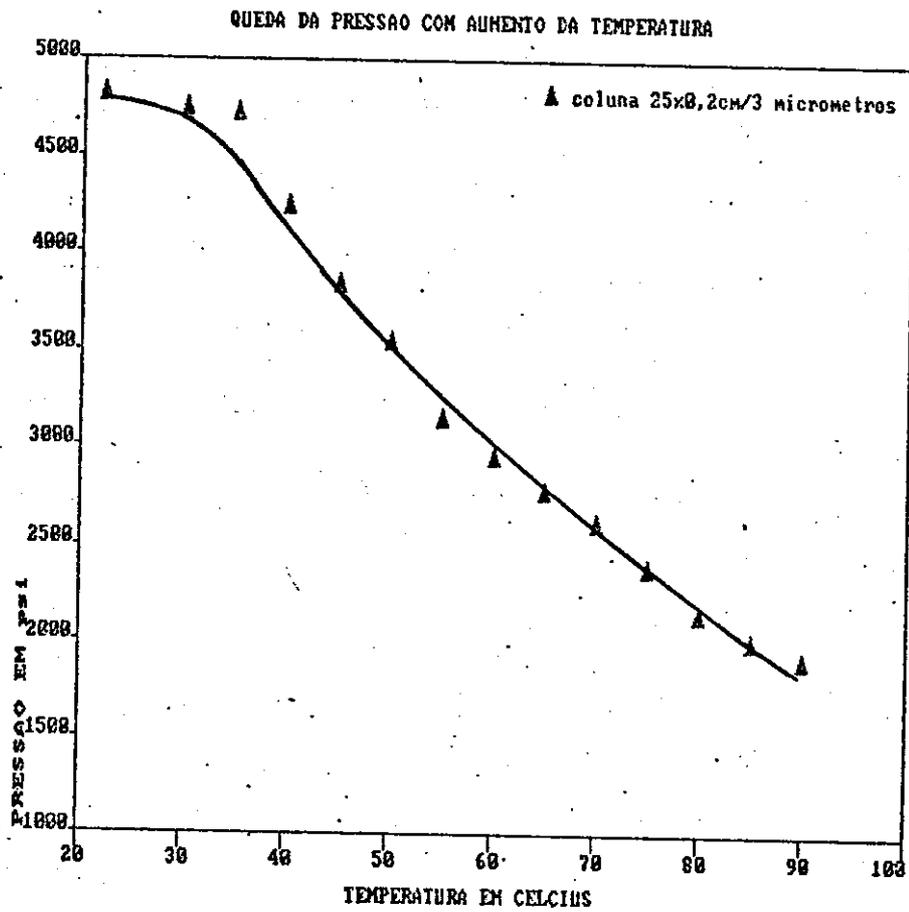
F) TESTE COM COLUNA RECHEADA A -15°C . A 5000PSI

Fluxo ótimo (µl/min)	n/L (m <sup>-1</sup> )	Pressão no fluxo ótimo (psi)	Dm
240	55160	4910	3,61



Viscosidade da Fase Movel Metanol/ agua

cuja equacao de 4º grau e :  $y = 3,5x^4 - 5,52x^3 - 1,889x^2 + 3,504x + 1,001$



Queda da pressao com o aumento da temperatura na coluna

## BIBLIOGRAFIA

- 1) VERZELE, M; DEWALE, C; WEENDT, M; LC - GC 6 (1986) 966
- 2) SHELLY, D. C; EDKINS, T. J; J. CHROMATOGR. 411 (1987) 185
- 3) SCOTT, R. P. W; KUCERA, P; J. CHROMATOGR. 169 (1979) 51
- 4) MARTIN, A. J. P; SYNGE, R. L. M; BIOCHEM J. 35 (1941) 1358
- 5) VERZELE, M; DEWAELE, C; LC - GC 4 (1986) 614; J. CHROMATOGR. 391 (1987) 111
- 6) GLUCKMAN, J. C. ; HIROSE, A; MCGUFFIN, V. L; NOVOTNY, M; CHROMATOGRAPHIA 17 (1983) 303
- 7) KIRKLAND, J. J; J. CHROMATOGR. SCI. 7 (1969) 7
- 8) KIRKLAND, J. J; de STEFANO, J. J; J. CHROMATOGR. SCI. 8 (1970) 309
- 9) KIRKLAND, J. J; de STEFANO, J. J J. CHROMATOGR. SCI. 7 (1969) 361
- 10) de STEFANO, J. J; J. CHROMATOGR. SCI. 8 (1970) 434; 10 (1972) 655

11) KNOX, J. H. ; PARCER, J. F. ANAL. CHEM. 41 (1969) 1599

12) de LIMA, M. A. F " DESENVOLVIMENTO DE COLUNAS PARA HPLC E MICRO-HPLC " TESE DE DOUTORADO; UNICAMP- INSTITUTO DE QUIMICA, CAMPINAS (1988)

13) VERZELE, M; DEWAELE, C; DUQUET, D; J. CHROMATOGR. 391 (1987) 111

14) MAJORS, R. F; J. CHROMATOGR. SCI. 18 (1980) 488

15) KARUHN, R; WOOD, R. D; WYATT, S. D; LC -GC 4 (1986) 1072

16) COLLINS, C. H; BRAGA, G. L ; COORDENADORES; " INTRODUÇÃO A METODOS CROMATOGRÁFICOS " EDITORA DA UNICAMP, CAMPINAS 3ª ED. 1988

17) LEONE, P. A; " ANALISES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIENCIA DE COMPOSTOS PERALOGENADOS DO TIPO  $C_xB_rY_C|z$ " (  $x = 1$  ou  $2$ ,  $y + z = 4$  ou  $6$  )

TESE DE MESTRADO - UNICAMP - INSTITUTO DE QUIMICA , CAMPINAS (1988)

18) MARTIRE, D. E; BOLHM, R. E ; J. PHYS. CHEM. 87 (1988) 1045

19) BAYER, E. ; PAULUS, A; J. CHROMATOGR, 400 (1987) 1

- 20) JANDERA, P.; COLIN, H; GUIOCHOM, G; ANAL. CHEM. 54 (1982) 435
- 21) OTTO, M; WEGSCHEIDER, W; J. CHROMATOGR. 258 (1983) 11
- 22) HEARN, M. T. W; GRECO, B; J. CHROMATOGR. 266 (1983) 75
- 23) SNYDER, L. R; KIRKLAND, J. J; "INTRODUCTION TO MODERN LIQUID CHROMATOGRAPHY " 2<sup>a</sup>ED. JOHN WILEY & SONS, NEW YORK ( 1979) CAP. 2
- 24) DONE; KNOX; LOBEAC; " APPLICATION OF HIGHT-SPEED LIQUID CHROMATOGRAPHY " - A WILEY-INTERSCIENCE NEW YORK (1974) CAP. 3
- 25) KIRKLAND, J. J ; J. CHROMATOGR. SCI. 9 (1971) 206
- 26) MAJORS, R. E; ANAL. CHEM 44 (1972) 1722
- 27) MENET, H; GAREIL, P; CAUDE, M; ROSET, R; CHROMATOGRAPHIA 18 (1984) 73
- 28) MAYER, F. R; HARTWICK, R. A; ANAL. CHEM. 56 (1984) 2211
- 29) KUCERA, P; MANIUS, G; J. CHROMATOGR. 216 (1981) 9
- 30) ASSHAUER, J; HALASZ, I; J. CHROMATOGR. SCI. 12 (1974) 139
- 31) HALASZ, I; MOLDENER, G; ANAL. CHEM. 55 (1983) 1842

- 32) WELLER, I. J.; Mc KERRILL, E. H; J. CHROMATOGR. 122 (1976) 243
- 33) KUWATA, K; VEHORI, M; YAMAZUKI, Y; J. CHROMATOGR. 211 (1981) 378
- 34) BROQUEIRE, M; J. CHROMATOGR. 170 (1979) 43
- 35) YAMUCHI, Y; KUMANOTANI, J; J. CHROMATOGR. 210 (1981) 512
- 36) MAJORS, R; ANAL. CHEM. 44 (1972) 1722
- 37) COLMSJÖ, A. L; ERICSSON, E. W ; J. CHROMATOGR. 398 (1987) 63-71
- 38) BAKALYAR, S. R; OLSEN, K; SPRUCE, B; BRAGG, B. G; RHEODYNE INCORPORATED  
TECHNICAL NOTES - AUGUST 1988
- 39) FREEHAIRN, K. W; KNOX, J. H; CHROMATOGRAPHIA 19 (1984) 37
- 40) TAYLOR, G; PROC. ROY. SOC. A. 255(1958) 67
- 41) GOLAY, M. J. E ; in COATES, V. J; NOCHELS, H. J; FAGERSON, E. S; GAS  
CHROMATOGRAPHY 1957 ACADEMIC PRESS NEW YORK (1958) pg1
- 42) PEZZIN, S. H; de LIMA, M. A. F; COLLINS, K. E; CIENCIA E CULTURA,  
39 , SUPL. 7 (1987)

- 43) BRISTOW, P. A; KNOX, J. H; CHROMATOGRAPHIA 10 (1977) 279
- 44) BIDLINGMEYER, B. A; WARREN JR, F. V; ANAL. CHEM 56 (1984) 1583A
- 45) VAN DEEMTER, J. J; ZEUDREWEG, F. J; KLINKENHEY, A; CHEM ENG. SCI. 5 (1956) 271
- 46) ISHI, D; WATANABE, K; ASAI, H; HASHIMOTO, Y; TAKEUCHI, T; J. CHROMATOGR. 332 (1985) 3
- 47) TAKEUCHI, T; ISHII, D; J. CHROMATOGR. 218 (1981) 199
- 48) KONISHI, M; MORI, Y; AMANO, T; ANAL. CHEM. 57 (1985) 2235
- 49) UNGER, K. K JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY LIBRARY, 16  
"POROUS SILICA : ITS PROPERTIES AND USE AS SUPPORT IN COLUMN LIQUID CHROMATOGRAPHY "  
ELSEVIER SCIENTIFIC PUBLISHING CO. N. Y. (1979) 1<sup>st</sup> ED CAP 5
- 50) McNAIR, H; BOWERMASTER, J; J. HIGH RESOL. CHROMATOGR. CHROMATOGR. COMMUN. 10 (1987) 27
- 51) WARREN, F. V; BIDLINGMAYER, B. A; ANAL. CHEM. 60 (1988) 2824
- 52) International Critical Tables (1930) McGraw-Hill Book Co