

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

***“ESTUDO DE VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS NO DESEMPENHO DE
COLUNAS RECHEADAS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE)”***

Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Dissertação de Mestrado

Campinas

1995

UNIDADE IG
 N.º CHAMADA: UNICAMP
A 32e
 V. 1
 T. 000026931
 P. 000000000
 C. 0 D. 1
 PREÇO 8411,00
 DATA 02/03/96
 N.º CPD CM.00024955-1



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
 UNICAMP**

Queiroz, Sonia Claudia do Nascimento
 Q32e Estudo de variáveis experimentais no desempenho de co-
 lunas recheadas para cromatografia líquida de alta eficiência
 (CLAE). / Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz. -- Cam-
 pinas, [SP : s.n.], 1995.

Orientadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Cam-
 pinas. Instituto de Química.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 2.
 Fase reversa. 3. Quimiometria. I. Jardim, Isabel Cristina Sa-
 les Fontes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
 de Química. III. Título.

Dedico esta tese

*Ao Eudoxio, pelo amor e apoio
em todos os momentos.*

*Aos meus pais, pelos
ensinamentos e amor.*

*Aos meus irmãos, cunhados e
sobrinhos, pelo carinho e incentivo.*

Agradecimentos

- À Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, meus especiais agradecimentos pela orientação, feita com muita dedicação e pela amizade;
- À Prof^a Carol H. Collins, pela atenção e sugestões;
- Ao Prof. Dr. Kenneth E. Collins pelas informações fornecidas durante a elaboração da tese;
- Ao Prof. Dr. Roy E. Bruns, pelas sugestões e colaboração;
- Ao Marcelinho e Tania, pela grande amizade, durante o trabalho e fora dele;
- Às minhas amigas Raquel, Marta e Cristina², pela amizade, apoio e troca de experiências;
- Ao pessoal do grupo C²B, pela convivência agradável;
- Ao Waltinho, pela confecção das peças;
- Ao CNPq, pela bolsa concedida.
- Ao Instituto de Química, pela oportunidade.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABELAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
I-INTRODUÇÃO.....	1
I.1-Aspectos Gerais da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	1
I.1.1-Avaliação de colunas cromatográficas.....	1
I.1.2-Otimização da separação.....	5
I.1.3-Acoplamento de colunas.....	7
I.1.4-Revisão bibliográfica sobre acoplamento de colunas.....	10
I.1.5-Cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quimicamente ligada.....	13
I.1.5.1-Cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa..	13
I.2-Planejamento Experimental.....	16
I.2.1-Planejamento fatorial.....	16
I.2.1.1-Tratamento estatístico.....	21
I.2.2-Simplex sequencial modificado.....	22
II-OBJETIVOS.....	27
III-PARTE EXPERIMENTAL.....	28
III.1-Materiais.....	28
III.1.1-Reagentes e solventes.....	28
III.1.2-Gases empregados.....	28
III.1.3-Pasta de polimento.....	28
III.1.4-Colunas para CLAE.....	29
III.1.4.1-Colunas recheadas adquiridas comercialmente.....	29
III.1.4.2-Confecção de colunas.....	29
III.1.4.2.A-Corpo da coluna.....	29
III.1.4.2.B-Método de polimento das paredes interna do corpo da coluna.....	29

III.1.4.2.C-Fases estacionárias.....	30
III.1.5-Acessórios da coluna.....	31
III.2-Aparelhagem.....	31
III.3-Enchimento de Colunas.....	33
III.3.1-Método de enchimento.....	33
III.3.2-Escolha das condições de enchimento.....	34
III.3.2.1-Solvente de suspensão.....	37
III.3.2.2-Concentração da suspensão.....	37
III.3.2.3-Fases estacionárias.....	38
III.3.2.4-Válvula pós-coluna.....	38
III.3.2.5-Pressão de enchimento.....	39
III.4-Avaliação de Colunas.....	39
III.4.1-Escolha da mistura teste.....	39
III.4.2-Escolha de fase móvel.....	40
III.4.3-Condicionamento de colunas.....	43
III.4.4-Escolha da vazão ótima.....	43
III.4.5-Determinações dos parâmetros cromatográficos.....	43
III.5-Acoplamento de Colunas.....	44
III.5.1-Estudo do tipo de conexão.....	44
III.5.1.1-Conexão tipo capilar.....	44
III.5.1.2-Conexão tipo cabeça-cabeça.....	46
III.5.2-Eficiência de colunas acopladas.....	46
III.5.2.1-Estudo da separação de uma mistura de peralogenados....	46
III.5.3-Estudo da influência do tamanho da partícula da fase estacionária.....	46
III.6-Otimizações Via Métodos Quimiométricos.....	47
III.6.1-Planejamento experimental.....	47
III.6.1.1-Planejamento fatorial fracionário.....	47
III.6.2-Simplex sequencial modificado.....	48
IV-RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	49
IV.1-Enchimento de Colunas.....	49

IV.1.1-Método de enchimento.....	49
IV.1.2-Escolha das condições de enchimento.....	49
IV.1.2.1-Solvente de suspensão.....	50
IV.1.2.2-Concentração da suspensão.....	51
IV.1.2.3-Fases estacionárias.....	52
IV.1.2.4-Válvula pós-coluna.....	53
IV.1.2.5-Pressão de enchimento.....	53
IV.1.2.6-Condições ótimas de enchimento.....	54
IV.2-Acoplamento de Colunas.....	54
IV.2.1-Estudo do tipo de conexão.....	54
IV.2.1.1-Conexão tipo capilar.....	55
IV.2.1.2-Conexão tipo cabeça-cabeça.....	57
IV.2.2-Eficiência de colunas acopladas.....	58
IV.2.2.1-Estudo da separação uma mistura de peralogenados.....	63
IV.2.3-Estudo da influência do tamanho da partícula da fase estacionária.....	65
IV.3-Otimizações Via Métodos Quimiométricos.....	68
IV.3.1-Planejamento experimental.....	68
IV.3.1.1-Planejamento fatorial fracionário.....	68
IV.3.1.2-Planejamento fatorial completo.....	70
IV.3.2-Simplex sequencial modificado.....	73
V-CONCLUSÕES.....	76
VI-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE FIGURAS

I.1	Cromatograma com as medidas necessárias para os cálculos dos parâmetros cromatográficos.....	2
I.2	Curva da equação de van Deemter mostrando as contribuições dos vários termos e a velocidade linear ótima. (A) difusão turbilhonar; (B) difusão longitudinal; (C) transferência de massa e (D) H total.....	5
I.3	Medida do fator de assimetria (As_{10}) de um pico, tomada a 10% da altura..	6
I.4	Gráfico da altura de prato, H, versus a velocidade linear da fase móvel, u, para uma série de colunas de d.i. = 4,6 mm, recheadas com sílica octadecilsilanizada, de diferentes tamanhos de partícula. Os comprimentos das colunas foram = 250 mm para $t_p = 8$ e 5 μm , 150 mm para $t_p = 3 \mu m$ e 40 mm para $t_p = 2 \mu m$ (3).....	10
I.5	Representação gráfica dos valores das respostas em função dos níveis das variáveis. (A) dados obtidos da tabela I.4; B) dados obtidos da tabela I.5....	20
I.6	Representação gráfica dos movimentos do Simplex Sequencial Modificado: Reflexão (R), Expansão (S), Contração (U) e Contração com mudança de direção (T) (23)	24
I.7	Contração maciça de um simplex triangular. A resposta no ponto T é pior que a resposta no ponto W. O novo simplex é BX'Y' (23).....	26
III.1	Acessórios da coluna com ênfase aos tipos de conexões. A) conexão tipo capilar e B) conexão tipo cabeça-cabeça.....	32
III.2	Equipamento utilizado para o enchimento de colunas: A) Coluna, reservatório de suspensão e reservatório de CCl_4 e B) Bomba de enchimento, Haskel.....	35
III.3	Espectros de U.V. das substâncias que compõem a mistura teste de colunas para CLAE. A) acetona; B) benzonitrila; C) benzeno; D) tolueno e E) naftaleno.....	41
III.4	Otimização da resolução em função do aumento do fator de retenção (k), calculado para o pico do naftaleno (último pico eluído). 1 = acetona; 2 = benzonitrila; 3 = benzeno; 4 = tolueno e 5 = naftaleno.....	42

III.5	Perfil típico do pico do naftaleno, obtido no sistema cromatográfico sem coluna.....	45
IV.1	Influência da concentração da suspensão no enchimento de colunas com fase estacionária Hypersil ODS 10 μm	51
IV.2	Influência da concentração de suspensão no enchimento de colunas com fase estacionária Hypersil ODS 5 μm	52
IV.3	Estudo da dispersão cromatográfica.....	56
IV.4	Curvas de van Deemter para colunas individuais e acopladas.....	59
IV.5	Variação da resolução do par tolueno/naftaleno com o aumento da eficiência conseguida com o acoplamento. A) coluna 1; B) colunas 1+2; C) colunas 1+2+3 e D) colunas 1+2+3+4.....	60
IV.6	Comparação entre os valores de N calculado pela equação IV.6 e os obtidos experimentalmente.....	62
IV.7	Cromatogramas obtidos na separação de compostos peralogenados. 1 = CBr_4 ; 2 = CBr_2Cl_2 ; 3 = CBrCl_3 ; 4 = CCl_4 ; 5 = C_2Br_6 ; 6 = C_2Br_4 ; 7 = $\text{C}_2\text{Br}_2\text{Cl}_4$; 8 = C_2Cl_4 e 9 = C_2Cl_6 . Colunas 100 x 3,8 mm, recheadas com C-8, 10 μm . $F = 0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; FM = MeOH/ H_2O 70:30 (v/v); $V_i = 10 \mu\text{L}$; $\lambda = 220 \text{ nm}$. A) uma coluna; B) duas colunas; C) três colunas e D) quatro colunas acopladas.....	64
IV.8	Separação de compostos peralogenados obtida da referência (48). Coluna: 250 x 4,6 mm, recheada com Ultrasphere ODS, $t_p = 5 \mu\text{m}$, Alltech; FM: MeOH/ H_2O 70:30 (v/v); $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $V_i = 10 \mu\text{L}$; $\lambda = 220 \text{ nm}$	65
IV.9	Variação da pressão com a vazão de fase móvel para colunas recheadas com Hypersil ODS com $t_p = 3 \mu\text{m}$ (▲) e $5 \mu\text{m}$ (•). Fase móvel: MeOH/ H_2O 70:30 (v/v).....	67
IV.10	Fatoriais 2^2 para 2 comprimentos diferentes. A) uma coluna ($L = 125 \text{ mm}$) e duas colunas acopladas ($L = 250 \text{ mm}$).....	72
IV.11	Movimento do Simplex Sequencial Modificado.....	75

LISTA DE TABELAS

I.1	Número de pratos requeridos para uma resolução igual a 1 ($R_s=1$), $k=3$ e com diferentes valores de fator de separação (3).....	8
I.2	Número de pratos requeridos para $R_s=1$ a diferentes valores de k e de α (3).....	8
I.3	Radicais orgânicos mais comuns suportados em sílica através de ligações tipo siloxano (2, 18, 19).....	15
I.4	Exemplo de um Fatorial 2^2 sem interação entre as variáveis.....	17
I.5	Exemplo de um Fatorial 2^2 com interação entre as variáveis.....	18
III.1	Variáveis que afetam o enchimento de colunas (42).....	36
III.2	Quantidade de fase estacionária necessária para o enchimento de colunas de dimensões diferentes.....	38
III.3	Variáveis estudadas no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com os respectivos níveis menores (-) e maiores (+).....	47
IV.1	Eficiência das colunas recheadas com fase reversa porosa.....	49
IV.2	Influência do grau de purificação do solvente de suspensão, tetracloreto de carbono, em alguns parâmetros cromatográficos obtidos com uma coluna de 125 x 3,2 mm, recheada com Hypersil ODS 10 μm	50
IV.3	Influência da procedência da fase estacionária na eficiência e fator de assimetria de uma coluna de 125 x 3,1 mm recheada com fase estacionária ODS de $t_p = 5 \mu\text{m}$	53
IV.4	Influência da pressão no enchimento de colunas com fase estacionária C-18 Hypersil, com $t_p = 5 \mu\text{m}$. Coluna: 125 x 4,2 mm.....	54
IV.5	Resumo das condições ótimas de enchimento para as colunas estudadas.....	54
IV.6	Dispersão no sistema cromatográfico.....	57
IV.7	Parâmetros cromatográficos calculados, na vazão ótima, para as colunas individuais e acopladas.....	61
IV.8	Esquema e eficiências obtidas com a aplicação do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}	68

IV.9	Análise do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} em função da medida de N.....	69
IV.10	Esquema e eficiências obtidas com a aplicação do Fatorial Completo 2^3 (eliminando a coluna <u>3</u> do fatorial fracionário 2^{4-1}).....	70
IV.11	Análise do Planejamento Fatorial Completo 2^3 em função do N.....	71
IV.12	Movimento do Simplex Sequencial Modificado e seus valores para as variáveis: temperatura e vazão da fase móvel e resposta medida (N).....	74

Resumo

Título: "Estudo de Variáveis Experimentais no Desempenho de Colunas Recheadas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)"

Autora: Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

O interesse por CLAE vem crescendo nos últimos anos devido a sua alta capacidade de separação, sensibilidade, rapidez e versatilidade. Porém, o custo desta técnica é bastante elevado e todos os acessórios, incluindo as colunas, são importados. Assim, para baratear o custo das colunas, desenvolveu-se uma tecnologia de recheio que produz colunas com qualidade comparável às comerciais, porém de menor custo. As fases estacionárias utilizadas neste estudo foram as imobilizadas do tipo reversa, C-8 e C-18, pois são as mais amplamente empregadas em CLAE. As fases estacionárias C-18 foram obtidas comercialmente e as C-8 foram produzidas no nosso próprio laboratório.

O sucesso da separação de uma mistura em seus componentes individuais, por CLAE, é obtido em função de 3 parâmetros cromatográficos: número de pratos ou eficiência (N), fator de retenção (k) e fator de seletividade (α). Para análises de misturas complexas a variável N é de especial importância, pois ocorre muitas vezes que mesmo após a otimização de k e α , não se consegue uma resolução cromatográfica adequada. Visando este tipo de aplicação, fez-se um estudo sistemático de algumas variáveis que afetam N , utilizando sempre que possível métodos quimiométricos para determinar as melhores condições de análise.

Dessa forma, o acoplamento de colunas foi testado para aumentar o comprimento e consequentemente, a eficiência e para isso estudaram-se dois tipos de conexões: capilar e cabeça-cabeça. Ambos apresentaram baixa dispersão e se mostraram adequados para serem empregados no acoplamento de colunas.

O acoplamento de quatro colunas similares, forneceu um aumento na eficiência de 4 vezes, gerando $N = 12.825$ pratos e uma relação linear entre $N^{1/2}$ e R_s foi observada. A eficiência obtida com as colunas acopladas foi suficiente para obter a separação completa de uma mistura de compostos peralogenados.

Observou-se que no acoplamento de colunas é preferível utilizar colunas recheadas com tamanho de partículas de fase estacionária maiores devido às menores pressões de operação. O comprimento máximo estimado para colunas recheadas com $t_p = 5$ e $3 \mu\text{m}$ são 750 mm e 180 mm respectivamente, gerando na pressão máxima, N igual a 67.596 e 25.248 pratos. Estes números são suficientes para resolverem misturas ($k=3$) com um $\alpha = 1,02$ e $1,03$.

Através do método Planejamento Fatorial verificou que o comprimento da coluna é o principal fator a proporcionar aumento da eficiência, entre as variáveis, volume de injeção, composição da fase móvel e temperatura da coluna.

Usando o Simplex Sequencial Modificado conseguiu obter uma alternativa a construção da curva de van Deemter, onde além da vazão consegue-se determinar a temperatura ótima de análise com um número reduzido de experimentos.

ABSTRACT

Title: "Effect of Different Experimental Variables on the Efficiency of Packed Columns for High Performance Liquid Chromatography (HPLC)"

Author: Sonia Claudia do Nascimento de Queiroz

Supervisor: Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Interest in HPLC has increased in recent years due its high capacity for separation, as well as its sensitivity, rapidity and versatility. However, the cost of this technique is very high and all accessories, including the columns, are imported. Thus, we have developed a technology for packing columns with quality as good as commercial columns.

The stationary phases used in this study were immobilized reversed phases, C-8 and C-18, because they are the most widely used in HPLC. The C-18 stationary phases were obtained commercially and C-8 were produced in our own laboratory.

The success of the HPLC separation of a mixture into individual components is obtained as a function of 3 chromatographic parameters: plate number (N) or efficiency, retention factor (k) and selectivity factor (α). For analysis of complex samples, the efficiency has a special importance since sometimes, after the optimization of k and α , we do not obtain a good resolution. With this aim, we did a systematic study of some factors that affect N, using whenever possible, chemometrics methods to establish the best conditions of analysis.

The coupling of columns was tested to increase the length and consequently to increase the chromatographic efficiency and, for this, we studied two kinds of connections: a capillary connection and head to head. Both kinds showed little dispersion either could be used for coupling columns.

Coupling four similar columns provided a four times increase in the efficiency, resulting in $N = 12,825$ and a linear function between $N^{1/2}$ and Rs was observed. The efficiency obtained with the coupling columns was sufficient to separate completely a mixture of perhalogenated compounds.

We observed that for coupling columns it is better to use columns packed with larger particule sizes of stationary phase due the lower pressure of operation. The maximum length estimated for columns packed with 5 and 3 μm particule sizes are: 750 mm and 180 mm,

respectively, having, at the maximum pressure, $N = 67,596$ and $25,248$. These are adequate to separate mixtures ($k=3$) and $\alpha = 1.02$ and 1.03 .

Through Factorial Projection we observed that the length of the column is the main factor to produce an increase in the efficiency, among the possible factors: injection volume, composition of the mobile phase and temperature of the column.

Using the Sequential Modified Simplex we obtained an alternative to van Deemter plots, where we optimize the flow rate and the best temperature for analysis using a small numbers of experiments.

I - INTRODUÇÃO

I.1 - Aspectos Gerais da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das técnicas mais importantes entre os métodos de separação devido à sua sensibilidade, rapidez, alta capacidade de separação e versatilidade. A CLAE apresenta um vasto campo de aplicações, tais como, análise de sólidos, líquidos, compostos iônicos ou covalentes, com massa molecular que variam de 32 a 4.000.000. Alguns exemplos de amostras analisadas por CLAE são polímeros sintéticos, polissacarídeos, produtos farmacêuticos, proteínas, explosivos, drogas, metabólitos de animais e plantas, poluentes, etc.

A CLAE é definida como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes entre duas fases. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante o desenvolvimento cromatográfico, os componentes da mistura são distribuídos entre duas fases, resultando em migrações diferenciais destes componentes (1).

O sucesso da separação de um determinado tipo de amostra, dependerá da escolha adequada das fases empregadas (estacionária e móvel) e das condições de análise utilizadas.

I.1.1 - Avaliação de colunas cromatográficas

Quando uma coluna é nova, seja ela adquirida comercialmente ou através de enchimento no próprio laboratório, deve-se fazer os cálculos dos parâmetros cromatográficos, descritos abaixo, para avaliar a qualidade desta coluna em uma dada condição experimental. Para obtê-los, fazem-se medidas diretamente do cromatograma, como mostra a figura I.1.

O tempo de retenção do soluto, t_R , é o tempo gasto desde o momento da injeção

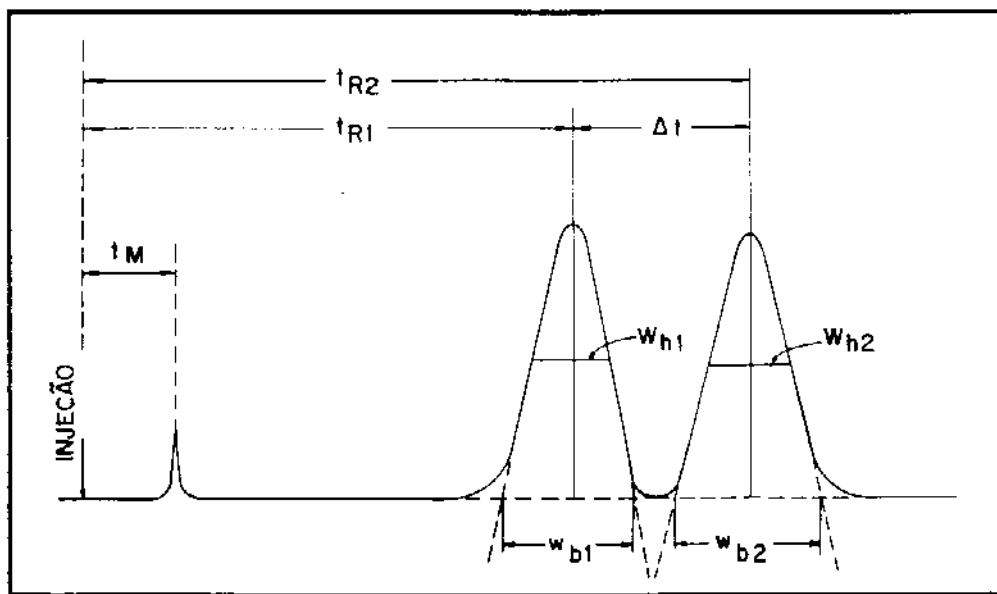


Figura I.1 - Cromatograma com as medidas necessárias para os cálculos dos parâmetros cromatográficos.

até a detecção máxima da banda. O tempo de retenção de um composto não retido, t_M , é o tempo gasto por ele para percorrer desde a injeção até a sua saída da coluna.

Normalmente os valores de t_R e t_M são obtidos diretamente do cromatograma quando se tem integrador eletrônico. Caso contrário, as medidas devem ser feitas por processo manual, no cromatograma, e os valores são calculados usando as seguintes equações:

$$t_R = d_R/f \quad \text{e} \quad t_M = d_M/f \quad (\text{I.1})$$

onde,

f é a velocidade do papel registrador;

d_R é a distância de retenção do soluto;

d_M é a distância de retenção de um soluto não retido.

O tempo de retenção ajustado, t'_R , é o tempo que as moléculas do soluto ficam retidas na fase estacionária, calculado pela diferença:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (\text{I.2})$$

O fator de retenção, k , também é uma medida de retenção de um soluto, ele é determinado pela razão dos tempos em que as moléculas do soluto ficam retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna na fase móvel, como mostra a equação:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1.3)$$

onde,

t'_R é o tempo de retenção ajustado.

A resolução, R_s , é uma medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a equação:

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} = 1,177 \cdot \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \quad (1.4)$$

onde,

t_{R1} e t_{R2} = tempos de retenção de 2 picos adjacentes;

w_{b1} e w_{b2} = largura dos picos na linha de base;

w_{h1} e w_{h2} = largura dos picos a meia-altura.

O fator de separação, α , entre dois picos adjacentes é calculado pela razão entre os fatores de retenção do soluto mais retido (k_2) e do soluto menos retido (k_1), que estão, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, através da equação:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (1.5)$$

A eficiência ou número de pratos, N , é a medida do número de etapas de equilíbrio do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária, calculada por meio da equação:

$$N = 16 \cdot (t_R/w_b)^2 = 5,54 \cdot (t_R/w_h)^2 \quad (1.6)$$

A altura de prato, H , é a razão entre o comprimento da coluna (L) e o número de pratos, que pode ser calculada pela equação:

$$H = L/N \quad (1.7)$$

A velocidade linear da fase móvel, u , é obtida segundo a equação:

$$u = L/t_M \quad (1.8)$$

A eficiência em termos de altura de prato, H , pode ser obtida através da equação de van Deemter:

$$H = A + (B/u) + Cu \quad (1.9)$$

onde:

O termo A , difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos devido aos múltiplos caminhos percorridos pelas moléculas do soluto. Este termo pode ser minimizado, usando colunas com diâmetro interno reduzido, bem recheadas e partículas pequenas, com uma faixa estreita de distribuição de tamanho.

O termo B , refere-se ao alargamento do pico devido a difusão longitudinal (ao longo da coluna). Em cromatografia líquida este fator é muito menos importante que na gasosa, porém altas vazões de fase móvel contribuem para a minimização deste termo, pois diminuem o tempo de residência do soluto na coluna.

O termo C está relacionado com a transferência de massa, ou seja, a facilidade que as moléculas do soluto têm de serem transferidas da fase móvel para a fase estacionária ou vice-versa. Um filme fino de líquido que recobre o suporte irá minimizar este termo. A figura I.2 ilustra uma curva típica de van Deemter.

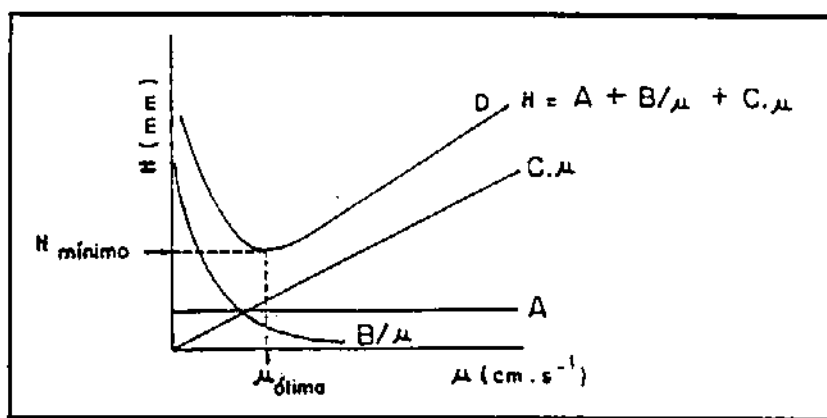


Figura I.2 - Curva da equação de van Deemter mostrando as contribuições dos vários termos e a velocidade linear ótima. (A) difusão turbilhonar, (B) difusão longitudinal; (C) transferência de massa e (D) H total.

O fator de assimetria, As_{10} , medido a 10% da altura do pico, é calculado de acordo com a equação I.10. O valor ótimo é de 0,9 até 1,2, se for maior, aumentam-se os erros positivos no cálculo de N, que tem como pressuposto que o pico possui formato gaussiano. Valores até 1,6 são aceitáveis, porém acima deste valor as colunas devem ser descartadas (2). A figura I.3 ilustra a medida do fator de assimetria.

$$As_{10} = \frac{CB}{AC} \quad (I.10)$$

I.1.2 - Otimização da separação

A meta da cromatografia é obter a separação de uma mistura em seus componentes individuais em um tempo razoável de análise. Uma das medidas quantitativas da separação entre dois componentes consecutivos é a resolução, R_s . Um valor de resolução de 1,0 corresponde a uma separação de 94%, que é considerado adequado para a otimização da separação. Já uma separação de 100%, onde os dois picos consecutivos atingem a linha de base, corresponde a uma resolução de aproximadamente 1,5 (3). Como pode ser visto na equação I.11, a resolução de uma dada amostra é um compromisso entre 3 parâmetros cromatográficos: a eficiência ou

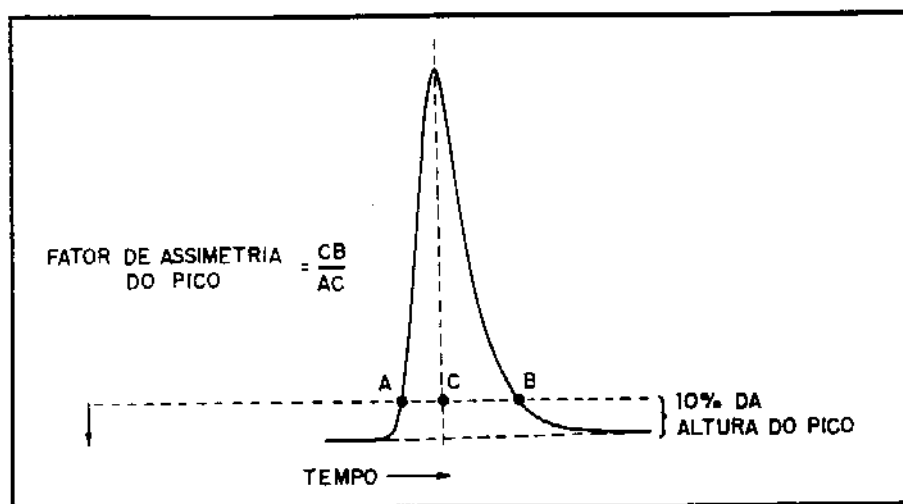


Figura I.3 - Medida do fator de assimetria (As_{10}) de um pico, tomada a 10% da altura.

número de pratos (N), o fator de separação entre picos adjacentes (α) e o fator de retenção (k).

$$Rs = \frac{\sqrt{N}(\alpha-1)}{4} \cdot \frac{k_2}{\alpha(k_2+1)} \quad (I.11)$$

A equação I.11 somente é verdadeira para picos adjacentes no cromatograma. Para uma primeira aproximação, os três termos da equação I.11 podem ser considerados como variáveis independentes. Uma coluna mais eficiente irá fornecer melhor resolução pela maximização de N . O valor de N é governado pelo fator que controla o alargamento do pico e, simplificando, N afeta somente a largura do pico não a posição do mesmo. Em uma dada posição fixa, picos mais estreitos são melhores resolvidos. O termo de eficiência aparece como a raiz quadrada na equação I.11, portanto mudanças no N devem ser bastante grandes para produzir mudanças significativas na resolução.

Afim de ilustrar a relação existente entre o número de pratos e o fator de separação, considere a tabela I.1 que mostra o número de pratos requeridos para obter uma resolução de um ($Rs=1$) para um par de solutos com k igual a 3 para o último soluto eluído. Os valores obtidos foram calculados através da equação I.11.

Similarmente, na tabela I.2 encontram-se os valores calculados do número de pratos requeridos para se obter uma resolução igual a 1 para 2 valores de α com diferentes valores de k (3). Quando os valores de k são pequenos, o número de pratos necessários para a separação é muito maior, mas cai, no início, rapidamente com o aumento dos valores de k . A faixa de resolução ótima para muitas separações corresponde ao intervalo de k entre 2 e 10. Valores de k maiores resultam num tempo de separação excessivo com uma melhora pequena na resolução (3).

I.1.3 - Acoplamento de colunas

O uso de colunas com cerca de 2.000 a 8.000 pratos, normalmente é adequado para obter a resolução de misturas simples, entretanto este número é insuficiente nas seguintes situações (4):

- Mesmo após a otimização da fase estacionária e móvel o valor do fator de separação continua muito baixo ($\alpha = 1,05 - 1,10$).
- O fator de retenção para os compostos de interesse não pode ser aumentado ou modificado a um valor adequado.
- A mistura a ser separada é tão complexa que a otimização não é possível para todos os valores de α , ou seja, quando aumenta para um par, diminui para outro. Este é o caso mais comum.

Então, se após a otimização de k e α a resolução desejada não for atingida, deve-se aumentar a eficiência da coluna.

Para colunas recheadas com a mesma fase estacionária, se a composição da fase móvel e o fluxo forem mantidos constantes, a performance destas colunas irá depender basicamente do comprimento da coluna, do tamanho da partícula da fase estacionária e da pressão de operação disponível. A eficiência de um leito de uma coluna aumenta com a diminuição do tamanho da partícula, nota-se que colunas menores recheadas

Tabela I.1 Número de pratos requeridos para uma resolução igual a 1 ($R_s=1$), $k=3$ e com diferentes valores de fator de separação (3).

Fator de Separação (α)	Número de Pratos (N)
1,005	1.150.000
1,01	290.000
1,015	130.000
1,02	74.000
1,05	12.500
1,10	3.400
1,20	1.020
1,50	260
2,00	110

Tabela I.2 Número de pratos requeridos para $R_s=1$ a diferentes valores de k e de α (3).

Fator de retenção (k)	Número de pratos (N)	
	($\alpha=1,05$)	($\alpha=1,10$)
0,1	853.780	234.260
0,2	254.000	69.700
0,5	63.500	17.420
1,0	28.220	7.740
2,0	15.880	4.360
5,0	10.160	2.790
10	8.540	2.340
20	7.780	2.130

com partículas de menor tamanho possuem eficiência maior que colunas de maior comprimento recheadas com partículas maiores, figura I.4. Também observando a figura I.4 e comparando-a com a figura I.2 verifica que conforme se diminui o tamanho da partícula ocorre uma redução no termo C da equação de van Deemter, o qual está relacionado com o fator de transferência de massa.

Para partículas menores que 5 μm , a curva é praticamente horizontal na região de altura mínima de prato, indicando que colunas recheadas com estas partículas pequenas podem ser operadas a velocidades lineares maiores sem perdas apreciáveis na eficiência. Por outro lado, quanto menor o tamanho da partícula maior é a pressão de operação. Assim, o comprimento da coluna deve ser reduzido com o decréscimo do tamanho da partícula quando a pressão de operação de uma coluna for um fator limitante (5).

A cromatografia pode ser realizada com colunas curtas de diâmetro interno de 4,6 mm recheadas com partículas de pequeno tamanho e operadas a fluxo alto, denominadas de colunas rápidas, que permitem que o tempo de análise seja reduzido para separações de misturas simples, que não requerem um número de pratos muito grande.

Além do problema da pressão, quanto menor o tamanho da partícula e menor o diâmetro da coluna, maior é a dificuldade no enchimento. O comprimento da coluna também é limitado a 300 mm para partículas de 10 μm ou menores devido às dificuldades na obtenção de um leito homogêneo.

Colunas de diâmetro pequeno, microbore e capilar (tubular aberta) também são utilizadas para gerarem alta eficiência (4). Porém mudanças grandes no equipamento devem ser feitas para minimizar os problemas de dispersão (5). Este tipo de técnica torna-se vantajosa quando a quantidade de amostra e/ou a fase móvel é limitada.

Assim, o método mais prático de obterem alto número de pratos é acoplar diversas colunas curtas e bem recheadas.

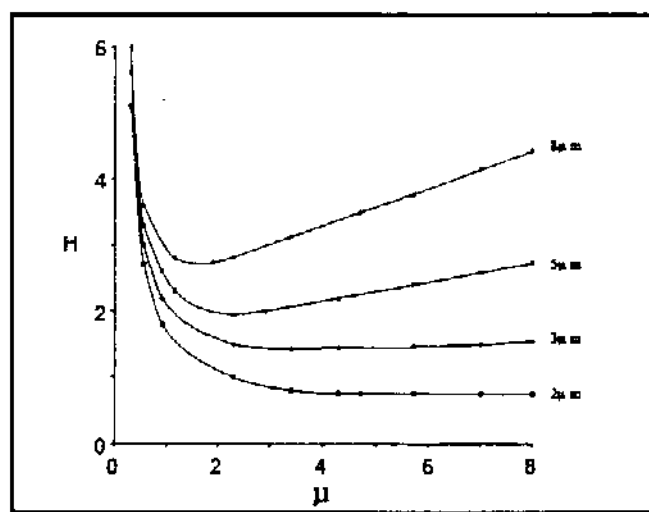


Figura 1.4 - Gráfico da altura de prato, H , versus a velocidade linear da fase móvel, u , para uma série de colunas de d.i. = 4,6 mm, recheadas com sílica octadecilsilanizada, de diferentes tamanhos de partícula. Os comprimentos das colunas foram: 250 mm para $t_p = 8$ e 5 μm , 150 mm para $t_p = 3$ μm e 40 mm para $t_p = 2$ μm (3).

1.1.4 - Revisão bibliográfica sobre acoplamento de colunas.

Em 1976 Kraak e col. (6), investigaram a possibilidade de obterem um valor alto de número de pratos, utilizando o acoplamento de colunas curtas de 250 x 2,8 mm, recheadas com sílica irregular de 6 μm . O poder da separação de 5 colunas acopladas gerando 50.000 pratos foi ilustrado utilizando-se misturas de difícil separação e misturas naturais.

Similarmente, Scott e Kucera (7), rechearam, à alta pressão, colunas de 1 m x 1 mm com sílica de 20 μm e acoplaram diversas destas colunas obtendo 14 m de comprimento e 510.000 pratos. Estas colunas foram utilizadas na separação de um óleo essencial.

Dewaele e Verzele (8) acoplaram 4 colunas de 250 x 2 mm que geraram 45.000 pratos. Neste acoplamento, a pressão de operação e o N aumentaram linearmente com o comprimento.

Kucera e Manius em 1981 (9) afirmaram que o acoplamento de colunas convencionais (4,6 mm d.i.) produz cerca de 60% de perda na eficiência em relação ao número de pratos das colunas individuais, para cada passo de acoplamento, enquanto que nas colunas microbore (1 mm d.i.) a eficiência resultante é de 100%. Os valores de eficiência obtidos para colunas de 4,6 mm d.i. e 1 mm d.i. respectivamente foram 19.500 e 47.420 para o comprimento total de 150 cm. Nove colunas (450 cm) microbore acopladas forneceram um máximo de 250.000 pratos, na velocidade linear de $0,02 \text{ cm.seg}^{-1}$, mostrando que o acoplamento é muito mais eficiente para colunas microbore.

Verzele e Dewaele (4) afirmaram em sua publicação que a forma mais prática e mais fácil de se obter de 20.000 a 70.000 pratos em menos de uma hora é acoplando 3 colunas de 250 x 4,6 mm recheadas com sílica gel 5 μm .

Mellor (10) demonstrou as vantagens do uso de colunas curtas recheadas com partículas de tamanho pequeno para cromatografia líquida de alta eficiência (colunas rápidas) e se necessário, estas colunas curtas podem ser facilmente acopladas para gerarem valores altos de pratos. Foram obtidos 30.000 pratos após o acoplamento de 4 colunas de 50 X 4,5 mm recheadas com ODS 3 μm .

Reed e Loscombe (11) obtiveram, após o acoplamento de 2 colunas de 250 x 5 mm, um valor de eficiência ligeiramente superior à soma das eficiências das colunas testadas individualmente. Os valores de N individuais foram 15.000 e 13.100 pratos gerando 33.900 pratos após a concatenação. Foi utilizado um tubo capilar de 50 mm de comprimento e 0,15 mm d.i. para união das colunas. Eles também verificaram que se utilizando tubo capilar de d.i. igual a 0,15 mm até o comprimento de 1,0 m não ocorriam mudanças significativas na eficiência, mas para 0,5 mm d.i. o comprimento deveria ser no máximo de 50 mm para que não houvesse perda no valor de N e para tubos de diâmetro de 0,9 mm, mesmo de comprimento pequeno (50 mm), ocorria alargamento do pico, com perda na eficiência.

Halász e Maldener (12) criticaram o uso do acoplamento de colunas microbore para gerarem altos valores no número de pratos, uma vez que o enchimento destas colunas não é fácil e há a necessidade do uso de equipamentos sofisticados (de baixa dispersão). Assim, eles defenderam o uso de colunas com diâmetro maior, 3-11 mm. Também foram discutidos os motivos pelos quais houveram perdas de eficiência no acoplamento de colunas convencionais citados por Scott e Kucera (7) e por Kucera e Manius (9). Eles previram que uma coluna de 6,7 m recheada com partícula de 8 μm e operando a pressão de 40,5 MPa fornece cerca de 400.000 pratos, com o tempo de uma hora de eluição (12).

Seguindo as mesmas previsões teóricas, 1.000.000 de pratos foram obtidos pelo acoplamento de colunas de 1 mm d.i., recheadas com sílica gel ZORBAX, de tamanho de partícula de 7-8 μm totalizando um comprimento de 22 m e utilizando uma vazão de fase móvel de 13-15 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, sob pressão de 60-70 MPa. Para ilustrar o poder de separação desta coluna, uma amostra de gasolina leve foi injetada e conseguiu a resolução de compostos com um $\alpha = 1,01$ e 1,02 (13).

Henry e col. (14) estudaram o acoplamento de colunas recheadas com a mesma fase estacionária e obtiveram aumento no valor de N e também verificaram o acoplamento de colunas recheadas com fases diferentes, conseguindo com isso uma mudança no fator de separação. Eles afirmaram que o tempo de retenção, a eficiência e a pressão de operação são aditivas e que o sistema de acoplamento é linear e vários exemplos de separações foram ilustrados.

Welsch e col. (15) estudaram o ajuste do fator de separação através de duas colunas, com características diferentes de retenção, acopladas em série. Este acoplamento foi feito com uma união tipo T e a retenção relativa dos componentes cromatografados no sistema foram mudadas pela variação na razão de fluxo individual das colunas. Exemplos de separações de misturas contendo clorofenóis, compostos nitroaromático e hidrocarbonetos aromáticos foram mostrados.

I.1.5 - Cromatografia líquida de alta eficiência com fase estacionária quimicamente ligada.

Entre os diversos tipos de cromatografia existentes, a cromatografia líquida com fase estacionária quimicamente ligada (CLFL) é um dos mais utilizados. Neste tipo de técnica a fase estacionária líquida encontra-se quimicamente ligada, através de ligação covalente, ao suporte, que normalmente é a sílica porosa, com formato de partícula esférica ou irregular. Além das fases estacionárias obtidas por meio de reações químicas, principalmente as do tipo siloxano, há também as fases estacionárias para CLAE imobilizadas por meio de radiação gama (16, 17) ou outros agentes.

As fases estacionárias quimicamente ligadas apresentam ótima estabilidade frente a solventes, às altas pressões e à temperatura moderada utilizada em CLAE.

Variando-se a natureza dos radicais orgânicos ligados à fase estacionária, é possível obterem diferentes retenções. Os radicais orgânicos mais comuns estão mostrados na tabela I.3 (2, 18, 19). A desvantagem destas fases é que o suporte de sílica somente pode ser utilizado na faixa de pH de 2 a 8.

O mecanismo de separação neste tipo de cromatografia é a partição, ou seja, baseia-se nas solubilidades diferentes que apresentam os componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. Desta forma os componentes mais solúveis na fase estacionária são seletivamente retidos por ela, enquanto que os menos solúveis são transportados mais rapidamente pela fase móvel.

I.1.5.1 - Cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa.

Entre os diversos tipos de CLAE, um deles é a fase reversa que é caracterizada pelo uso de uma fase móvel mais polar que a fase estacionária. Há uma estimativa de que cerca de 75-90% de todas as separações por CLAE são feitas por fase reversa (2).

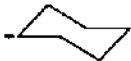
Este tipo de fase apresenta uma série de vantagens (2,20):

- Pode separar uma ampla faixa de compostos: não iônicos, ionizáveis e iônicos;
- Há uma grande flexibilidade para separação de compostos iônicos e ionizáveis através de par iônico, supressão iônica e troca de ligante;
- Sistema relativamente simples de operar;
- Sendo a fase estacionária quimicamente ligada, as colunas são estáveis e reprodutíveis;
- As análises são rápidas e o tempo de equilíbrio é curto;
- Pode ser utilizada como “enriquecimento de traços” pela passagem de solventes significativamente mais fracos que a fase móvel e desta forma os solutos ficam “pré-concentrados” na cabeça da coluna;
- Pode ser usada para determinar várias propriedades físico-químicas, como por exemplo hidrofobicidade;
- Usa solvente de menor custo e menos tóxico, como mistura de água e metanol, como fase móvel;
- Pode-se utilizar técnicas de programação de gradiente.

Assim fica claro o quanto é ampla e importante a aplicação deste tipo de fase.

A principal desvantagem apresentada pelas fases reversas é a presença dos grupos silanóis residuais (21, 22), que fazem com que haja adsorção do soluto causando cauda no pico. Este problema pode ser contornado através do processo de capeamento, que consiste em reagir os grupos -OH com reagentes menos volumosos, tais como, trimetilsiloxano (TMCS) ou hexametildisilazano (HMDS).

Tabela I.3 - Radicais orgânicos mais comuns suportados em sílica através de ligações tipo siloxano (2, 18, 19).

<u>CLFR</u>	
<u>GRUPO FUNCIONAL</u>	<u>ESTRUTURA</u>
n-alquil	$-C_n H_{2n+1}$
Ex: C-18, C-8, C-4 e C-1	
ciclohexil	
fenil	
ciano*	$-C \equiv N$
amina*	$-NH_2$
<u>CLFN</u>	
<u>GRUPO FUNCIONAL</u>	<u>ESTRUTURA</u>
ciano*	$-C \equiv N$
amina*	$-NH_2$
diol	$-O-CH_2-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH}-\underset{\substack{ \\ OH}}{CH_2}$

*as suas características dependem do tipo de fase móvel utilizada

I.2 - Planejamento Experimental.

O planejamento experimental é feito para se obter as condições experimentais que forneçam o melhor resultado de uma experiência, procedimento, etc. Há algum tempo atrás, utilizava-se somente o método univariado para otimizar as variáveis de um processo. Por exemplo, considerando um processo com duas variáveis envolvidas: temperatura e pressão, mantinha-se a temperatura fixa e variava-se a pressão até encontrar o rendimento máximo e depois mantinha-se a pressão no rendimento máximo obtido e variava-se a temperatura. Em geral este método apresenta falhas, pois pode haver efeitos sinérgicos ou antagônicos entre as variáveis. Para contornar este problema foram desenvolvidos os métodos quimiométricos de otimização (23).

A quimiometria é definida como sendo a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e o número de experiências e permitir a obtenção do maior número de informações possíveis a partir da análise de dados químicos (24). Atualmente é muito raro encontrar um periódico que não traga artigos reportando dados obtidos com o auxílio de métodos quimiométricos.

Os métodos estudados neste trabalho foram o Planejamento Fatorial e o Simplex Sequencial Modificado. As vantagens destes métodos são que eles requerem um número mínimo de experimentos, funcionam bem na presença de erro experimental, utilizam somente operações matemáticas simples e necessitam de pouco conhecimento de estatística. Na literatura existe uma série de publicações com aplicação destes métodos em CLAE (25-36).

I.2.1 - Planejamento fatorial.

O Planejamento Fatorial é um método que envolve a seleção de um número fixo de níveis para cada variável e se faz o arranjo de experimentos com todas as combinações possíveis. Se a primeira variável tem n_1 níveis, a segunda n_2 e a terceira n_3 até a n_k -ésima n_k , este arranjo experimental $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ é chamado Fatorial Completo. Por exemplo, um Planejamento Fatorial com 2 níveis e três variáveis, $2 \times 2 \times 2 = 2^3$, requer 8

experimentos. Os níveis são denominados arbitrariamente de nível menor (-) e nível maior (+). Através de tratamento matemático, os efeitos principais (a importância relativa entre as variáveis) podem ser avaliados, bem como os efeitos de interação (37).

O Efeito do Fatorial é definido como a alteração na resposta causada pela mudança do nível da variável. Isto é chamado de efeito principal porque ele se refere ao fator primário de interesse no experimento (38). Por exemplo, para um Fatorial 2^2 , considere os dados da tabela I.4. O efeito principal da variável A pode ser obtido através da diferença entre a média da resposta de nível maior de A (+) e do nível menor de A (-). Numericamente, isto pode ser representado da seguinte forma:

$$A = \frac{40 + 52}{2} - \frac{20 + 30}{2} = 21$$

Ou seja, aumentando-se a variável A do nível menor (-) para o nível maior (+), há um aumento na média das respostas de 21 unidades.

Similarmente, o efeito principal de B é calculado da seguinte forma,

$$B = \frac{52 + 30}{2} - \frac{20 + 40}{2} = 11$$

Tabela I.4 - Exemplo de um Fatorial 2^2 sem interação entre as variáveis.

Número do experimento	Variáveis		Interação	Resposta medida
	A	B	AB	
1	-	-	+	20
2	+	-	-	40
3	-	+	-	30
4	+	+	+	52

O efeito de interação entre as variáveis pode ser determinado através da multiplicação dos sinais de A e B, conforme a coluna de interação da tabela I.4.

$$\text{Efeito de AB} = \frac{52 + 20}{2} - \frac{30 + 40}{2} = 1$$

Pelo resultado obtido verifica-se que a medida do efeito de interação entre as variáveis é de 1 unidade. Neste caso, o valor de 1 é consideravelmente menor que os valores do efeito principal e portanto, diz-se que não há interação entre as variáveis. Porém, em outros experimentos, pode-se verificar a presença destas interações. Considere o exemplo da tabela I.5.

$$\text{Efeito principal de A} = \frac{50 + 12}{2} - \frac{20 + 40}{2} = 1$$

$$\text{Efeito principal de B} = \frac{12 + 40}{2} - \frac{20 + 50}{2} = -9$$

$$\text{Efeito de interação AB} = \frac{20 + 12}{2} - \frac{50 + 40}{2} = -29$$

Tabela I.5 Exemplo de um experimento Fatorial 2^2 com interação entre as variáveis.

Número do experimento	Variáveis		Interação	Resposta medida
	A	B	AB	
1	-	-	+	20
2	+	-	-	50
3	+	+	+	12
4	-	+	-	40

Neste exemplo, o efeito de interação, -29, é significativo, pois leva-se em conta o valor absoluto, então deve ser considerado. Para ficar mais claro, estas idéias podem ser ilustradas graficamente. A figura I.5.A plota os dados de respostas da tabela I.4 versus a variável A, para ambos os níveis de B. Nota-se que as linhas B (-) e B (+) são paralelas, indicando uma falta de interação entre as variáveis A e B (exemplo de um modelo aditivo). Da mesma forma, a figura I.5.B plota os dados da tabela I.5. Aqui, observa-se que as linhas B (-) e B (+) não são paralelas. Isto é um indicativo da existência de interação. Neste caso, há um efeito antagônico entre as variáveis.

Nota-se que quando o efeito de interação é grande, o efeito principal correspondente tem um significado prático pequeno. O valor do efeito igual a 1, calculado para a variável A, da tabela I.5, é muito pequeno e pode-se concluir que não é significativo, porém não é isso que ocorre. A variável A tem um efeito, mas ele depende da variável B. Assim, uma interação tende a mascarar a significância dos efeitos principais. Quando isto acontece, as variáveis devem ser analisadas conjuntamente e deve-se escolher uma faixa de níveis onde os resultados sejam válidos. Com o uso do método Planejamento Fatorial, ao se detectar a presença de interações, evita-se conclusões enganosas, ao contrário do método univariado.

Normalmente não é necessário determinar todas as respostas do Planejamento Fatorial Completo, uma fração deste Fatorial pode ser executada, diminuindo assim o número de ensaios, mas ainda permitindo a determinação dos efeitos mais importantes. Se for necessário completa-se o Fatorial. Quando isso ocorre, é denominado Fatorial Fracionário. Pode também ocorrer que uma ou mais variáveis não possuam efeitos significativos, assim o Fatorial Fracionário poderá tornar-se um Fatorial Completo e seus efeitos principais e de interações poderão ser avaliados.

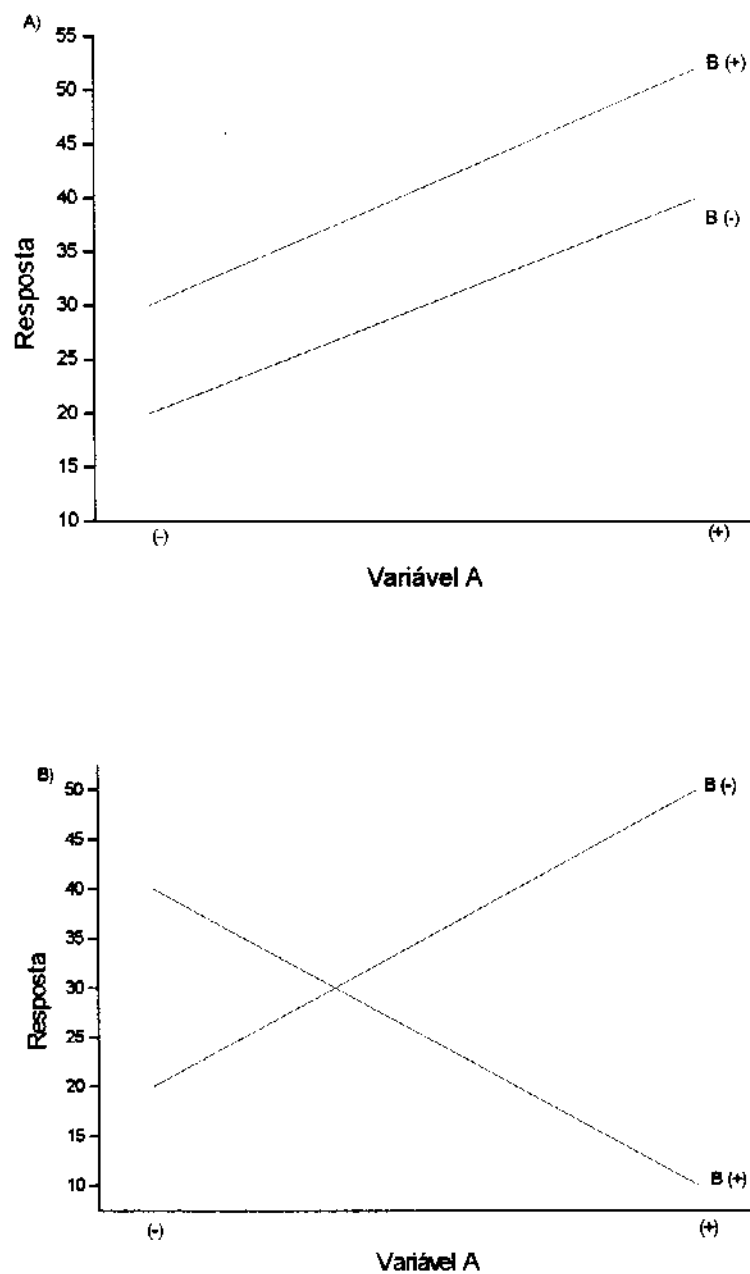


Figura 1.5 - Representação gráfica dos valores das respostas em função dos níveis das variáveis.

A) dados obtidos da tabela I.4; b) dados obtidos da tabela I.5.

I.2.1.1 - Tratamento estatístico.

Uma vez que um erro experimental está presente, torna-se necessário fazer replicatas para cada combinação do arranjo experimental. Assim, as estimativas dos erros dos efeitos, usando respostas médias, bem como a estimativa dos erros das medidas, podem ser avaliados (37).

Desta forma, a estimativa da variância de uma observação individual, S^2 , é dada por,

$$S^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - \bar{y})^2}{n - 1} \quad (\text{I.12})$$

onde,

y_i = medida da resposta;

$\bar{y}$ = média das respostas;

n = número de respostas medidas.

Para duplicatas, $n=2$,

$$S^2 = \frac{(y_1 - y_2)^2}{2} = \frac{(\text{intervalo})^2}{2} \quad (\text{I.13})$$

A média ponderada de todas as estimativas das variâncias conjuntas ou globais, S_p^2 , pode ser calculada conforme a seguinte equação:

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1).S_1^2 + (n_2 - 1).S_2^2 + \dots + (n_k - 1).S_k^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots + (n_k - 1)} \quad (\text{I.14})$$

onde,

n_i = número de medidas repetidas para a i -ésima replicata, $i = 1, 2 \dots k$.

S_j^2 = variância de y para a j -ésima replicata, $j = 1, 2 \dots k$.

A raiz quadrada deste valor fornece a estimativa do desvio padrão global, S_p , isto é, a estimativa do erro experimental das medidas:

$$S_p = (S_p^2)^{1/2} \quad (I.15)$$

A estimativa da variância de um efeito é calculada de acordo com a equação:

$$S^2_{(efeito)} = S_p^2(R_i - R_c) \quad (I.16)$$

onde:

para um fatorial 2^2 com medidas feitas em duplicatas,

$$S^2_{(efeito)} = S_p^2 \cdot \left(\frac{1}{4} + \frac{1}{4} \right) = \frac{1}{2} S_p^2 \quad (I.17)$$

e portanto, o erro padrão do efeito é determinado por:

$$S_{(efeito)} = (S^2_{(efeito)})^{1/2} \quad (I.18)$$

$S_{(efeito)}$ mostra se o valor medido é significativo ou não, ou seja, se o valor de $S_{(efeito)}$ for maior que o valor medido, então a grandeza analisada não é significativa. Um exemplo de como são feitos estes cálculos pode ser visto no capítulo IV, item IV.3.1.1.

I.2.2 - Simplex sequencial modificado

A palavra simplex significa uma figura geométrica que tem um número de vértices igual ao número de variáveis mais um. Se o estudo é feito para duas variáveis, o simplex é um triângulo. Este método envolve uma sequência de experimentos na forma de simplexes, cujo movimento se dá através de um simplex adjacente, o qual é obtido descartando-se o vértice correspondente a pior resposta, pela reflexão de sua imagem (39).

O método Simplex Sequencial foi inicialmente introduzido por Spendley e col. (39), mais tarde este foi melhorado por Nelder e Mead (40) e foi denominado Simplex

Sequencial Modificado. Nesta modificação os seguintes movimentos foram incluídos, além do de reflexão (R): Expansão (S), Contração (U) e Contração com mudança de direção (T).

A vantagem deste método é que ele faz a otimização de sistemas sem necessitar de uma função que descreva a dependência de uma resposta com as variáveis experimentais. Este método não utiliza testes estatísticos de significância, funciona bem na presença de erros experimentais e na otimização de muitas variáveis independentes.

As desvantagens deste método são: há dificuldade em se determinar o máximo com precisão, não determina a importância relativa entre as variáveis e dificilmente se aplica para fatores qualitativos.

Na figura I.6, tem-se a representação gráfica dos movimentos do Simplex Sequencial Modificado, os vértices BNW compõe o simplex inicial e os movimentos subsequentes são determinados por um conjunto de regras:

R é a reflexão do vértice contendo a pior resposta (W) e é dado pela seguinte equação:

$$R = \bar{P} + (\bar{P} - W) \quad (I.19)$$

onde, $\bar{P}$ é o centróide do hiperplano definido pelos vértices remanescentes, após o pior vértice ter sido eliminado, $\bar{P}$ foi obtido da seguinte forma:

$$\bar{P} = \frac{1}{2} \cdot (B + N) = \left[\frac{(x_{1N} + x_{1B})}{2}, \frac{(x_{2B} + x_{2B})}{2} \right] \quad (I.20)$$

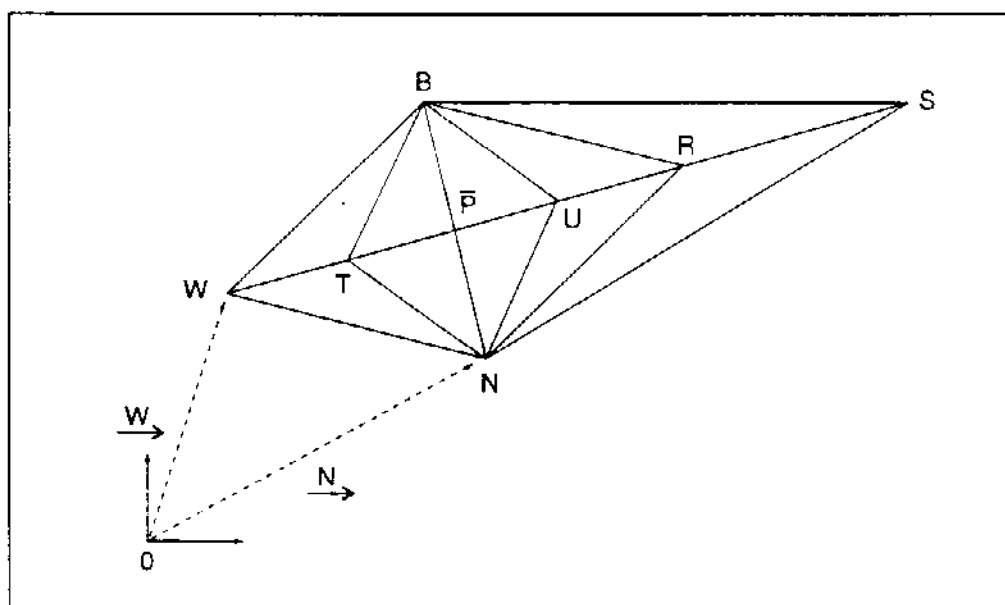


Figura I.6 - Representação gráfica dos movimentos do Simplex Sequencial Modificado: Reflexão (R), Expansão (S), Contração (U) e Contração com mudança de direção (T) (23).

O simplex adjacente é formado por BNR. Há três possibilidades a serem consideradas neste ponto:

i) Se a resposta experimental em R é mais desejável que a resposta experimental em B, o simplex sugere uma expansão nesta direção e um novo vértice é gerado por:

$$S = \bar{P} + 2.(\bar{P} - W) \quad (I.21)$$

Se a resposta experimental em S é melhor que a resposta em R, o vértice é retido e o novo simplex será BNS. Se isto não ocorrer, diz-se que houve falha de expansão e BNR é o novo simplex.

ii) A resposta experimental em R encontra-se num valor intermediário entre N e B, então nenhum movimento de expansão ou contração é indicado e o processo é reiniciado com o novo simplex BNR.

iii) Se a resposta experimental em R é menos desejável que a resposta em W, significa que o simplex foi efetuado numa direção inadequada. Portanto, o simplex deve sofrer contração.

Existem dois tipos de contração:

a) Se a resposta experimental em R é pior que a obtida em N, mas não é pior que a obtida em W, o novo vértice deverá situar-se mais próximo do vértice R que do vértice W. Este novo vértice é denominado de U.

$$U = \bar{P} + \frac{1}{2}(\bar{P} - W) \quad (1.22)$$

b) Se a resposta para R é menos desejável que a resposta para W, então o novo vértice deve situar-se mais próximo do vértice W que do vértice R e é denominado de T.

$$T = \bar{P} - \frac{1}{2}(\bar{P} - W) \quad (1.23)$$

Quando a resposta experimental em T é pior que em R ou quando a resposta em T é pior que a resposta em W, diz-se que ocorreu falha de contração. Para resolver este problema, Nelder e Mead (40) recomendam a contração maciça, na qual o tamanho do simplex é reduzido a metade. Esse procedimento pode ser observado na figura I.7, onde se conserva o melhor vértice (B) e cria-se novos vértices, os quais são a metade do caminho entre B e cada vértice do simplex anterior.

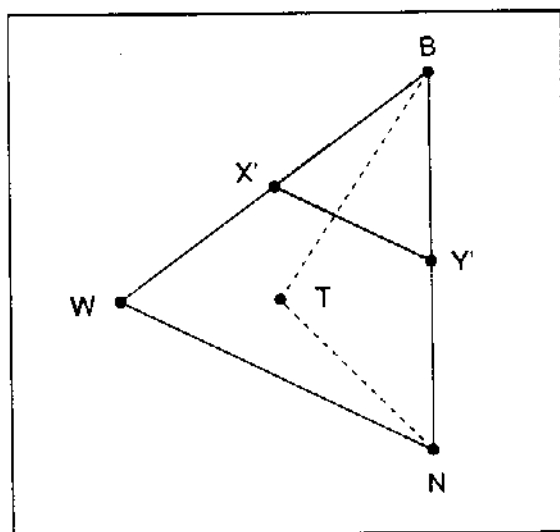


Figura I.7 - Contração maciça de um simplex triangular. A resposta no ponto T é pior que a resposta no ponto W. O novo simplex é $BX'Y'$ (23).

II - OBJETIVOS

Em CLAE, a otimização das separações de misturas complexas por métodos convencionais (univariados) é muito trabalhosa devido a uma série de variáveis envolvidas, tais como: tipo de fase estacionária e seu tamanho de partícula, dimensão da coluna, composição da fase móvel e fluxo, tempo de separação, etc. Outro fator a considerar é o custo muito elevado da técnica devido a utilização de fases móveis de alta pureza, fases estacionárias (todas importadas) além das colunas e conexões. Assim, foi proposta esta pesquisa com o objetivo de conseguir altas eficiências, necessárias à resolução de misturas complexas, aliada a um menor custo e tempo de análise, utilizando-se quando possível alguns métodos quimiométricos de otimização.

Para alcançar esta meta, o trabalho experimental foi dividido nas seguintes partes:

- aperfeiçoar o método de enchimento para diferentes tamanhos de colunas e de partículas de fase estacionária;
- estudar o tipo de conexão de coluna-coluna que fornecesse a menor dispersão possível;
- pesquisar o acoplamento de colunas visando obter um aumento na eficiência, a fim de que pudessem ser utilizadas em separações de misturas complexas;
- verificar, nos sistemas estudados, a separação de uma mistura de difícil resolução;
- aplicar os métodos quimiométricos: *Planejamento Fatorial Completo e Fracionário* e o *Simplex Sequencial Modificado* na otimização de variáveis relacionadas com a eficiência de colunas.

III - PARTE EXPERIMENTAL

III.1 - Materiais

III.1.1 - Reagentes e solventes

- acetona p.a., Merck;
- ácido nítrico p.a., CAAL;
- ácido sulfúrico p.a., Merck;
- água deionizada, sistema NANOPURE da Bartshead e Milli-Q da Millipore;
- benzeno p.a., Carlo Erba;
- benzonitrila p.a., Carlo Erba;
- hidróxido de sódio p.a., Merck;
- metanol grau cromatográfico, Merck;
- metanol p.a., Merck;
- naftaleno p.a., Carlo Erba;
- tetracloreto de carbono grau espectroscópico, Merck;
- tetracloreto de carbono p.a., Merck;
- tolueno p.a., Vetec.

III.1.2 - Gases empregados

- hélio de alta pureza, White Martins;
- nitrogênio, White Martins e Oxigênio do Brasil.

III.1.3 - Pasta de polimento

Pasta de polimento compacta em barra, para lapidação de aço-inoxidável e acrílico, produzida pela NORTON S/A - Ind. e Com. e comercializado pela NORBRASA, referência NB 2012.

III.1.4 - Colunas para CLAE

III.1.4.1 - Colunas recheadas adquiridas comercialmente

As colunas recheadas utilizadas neste trabalho foram:

- 100 x 2,1 mm, recheada com Hypersil ODS, tamanho de partícula 5 μm , Hewlett Packard;
- 250 x 4,0 mm, recheada com Hypersil ODS, tamanho de partícula 5 μm , Hewlett Packard;
- 60 x 4,6 mm, recheada com Hypersil ODS, tamanho de partícula 3 μm , Hewlett Packard.

III.1.4.2 - Confeção de colunas

III.1.4.2.A - Corpo da coluna

As colunas para CLAE devem ser constituídas de um pedaço de tubo de diâmetro uniforme, capaz de resistir mecanicamente às altas pressões utilizadas e ser inerte frente às fases, estacionária e móvel, empregadas. Assim, o aço-inoxidável 316L trefilado foi o material escolhido, pois apresenta as características descritas acima e é o mais utilizado pelos fabricantes de colunas.

Tubos de aço-inoxidável de diferentes diâmetros interno, 3,1 e 4,2 mm, foram cortados no comprimento de 125 mm na oficina mecânica da UNICAMP produzindo 8 colunas, sendo quatro de cada diâmetro.

Além das colunas confeccionadas por nós, utilizaram-se 4 colunas de aço inoxidável adquiridas comercialmente de 100 x 3,8 mm, fabricadas pela UPCHURCH.

III.1.4.2.B - Método de polimento das paredes interna do corpo da coluna

A superfície interna de uma coluna deve ser altamente polida, brilhante e espelhada. Desta forma, proporciona um leito mais homogêneo após o enchimento e conseqüentemente obtém-se uma maior eficiência, pois não há possibilidade de existir fase móvel estagnada nas imperfeições da parede. Para isso, utilizou-se o método de polimento desenvolvido no laboratório de Cromatografia/Radioquímica do Instituto de Química da Unicamp.

Este método consistiu em fixar na furadeira um bastão de metal de diâmetro menor que o tubo a ser polido. Com a furadeira ligada, envolveu-se o bastão com uma camada de palha de aço e adicionou-se a pasta de polimento. Segurou-se a coluna com o auxílio de uma garra, pois devido ao atrito gerava-se calor. Iniciou-se o processo de polimento com movimentos verticais de vai-vem com a coluna para obter um polimento mais uniforme. Repetiu-se o mesmo procedimento apenas substituindo a palha de aço por algodão para obter um polimento mais fino.

Em seguida, a coluna foi lavada com detergente e água e depois com uma sequência de solventes: 100 mL de solução de ácido nítrico 20%, água da torneira, água destilada e metanol. Por fim, as colunas foram secas em estufa ou em temperatura ambiente.

Após o tratamento, os tubos foram olhados contra a luz a um ângulo de 45°C e girados lentamente. Se alguma imperfeição fosse detectada, o procedimento era repetido.

III.1.4.2.C - Fases estacionárias

As fases estacionárias empregadas neste trabalho para rechear as colunas confeccionadas no laboratório e as adquiridas prontas foram do tipo reversa das seguintes procedências:

- C-8, 40% de polimetiloctilsiloxano (Petrarch Systems Silanes & Silicones) sobre 60% de sílica gel (Davisil), tamanho de partícula de 10 µm, diâmetro do poro 6 nm, imobilizada por radiação gama (dose de irradiação: 90 e 110 KGy), produzida no laboratório;
- C-18, adquiridas comercialmente das marcas Hypersil, tamanhos de partículas 5 e 10 µm e Phase Separation, tamanho de partícula 5 µm.

III.1.5 - Acessórios da coluna

- anel de aço-inoxidável e de PEEK;
- anilha de aço-inoxidável e de PEEK;
- conector tipo cabeça-cabeça de latão;
- conector de tubo de PEEK;
- corpo da coluna de aço-inox;
- filtro sinterizado poroso de 2 μm para coluna;
- reductor de fluxo;
- tampa para coluna;
- terminal de PEEK e de aço-inoxidável;
- terminal com reductor de fluxo de aço-inoxidável;
- tubo capilar de PEEK e de aço-inoxidável.

Os acessórios citados foram empregados na própria coluna, nas ligações coluna-coluna, coluna-detector e coluna-injetor. A figura III.1 ilustra alguns dos acessórios citados, com ênfase aos tipos de conexões

III.2 - Aparelhagem

a)-Cromatógrafos a líquidos de alta eficiência:

a.1-cromatógrafo a líquido Waters constituído de:

-bomba de alta pressão, recíproca, do tipo pistão cabeça dupla, modelo 510, com fluxo na faixa de 0,1 a 9,9 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$,

-detector espectrofotométrico por absorção no UV/Vis. de comprimento de onda variável entre 170 e 700 nm, célula de 14 μL de volume, modelo 481,

-injetor pneumático SSIX3L, com amostrador de 10 μL , modelo 02-0240,

-integrador, modelo 740;

a.2-cromatógrafo a líquido Hewlett Packard modelo 1090 série II/M, constituído de:

-bomba de alta pressão, recíproca, do tipo pistão cabeça dupla, modelo DR5 com fluxo de até 5.000 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,

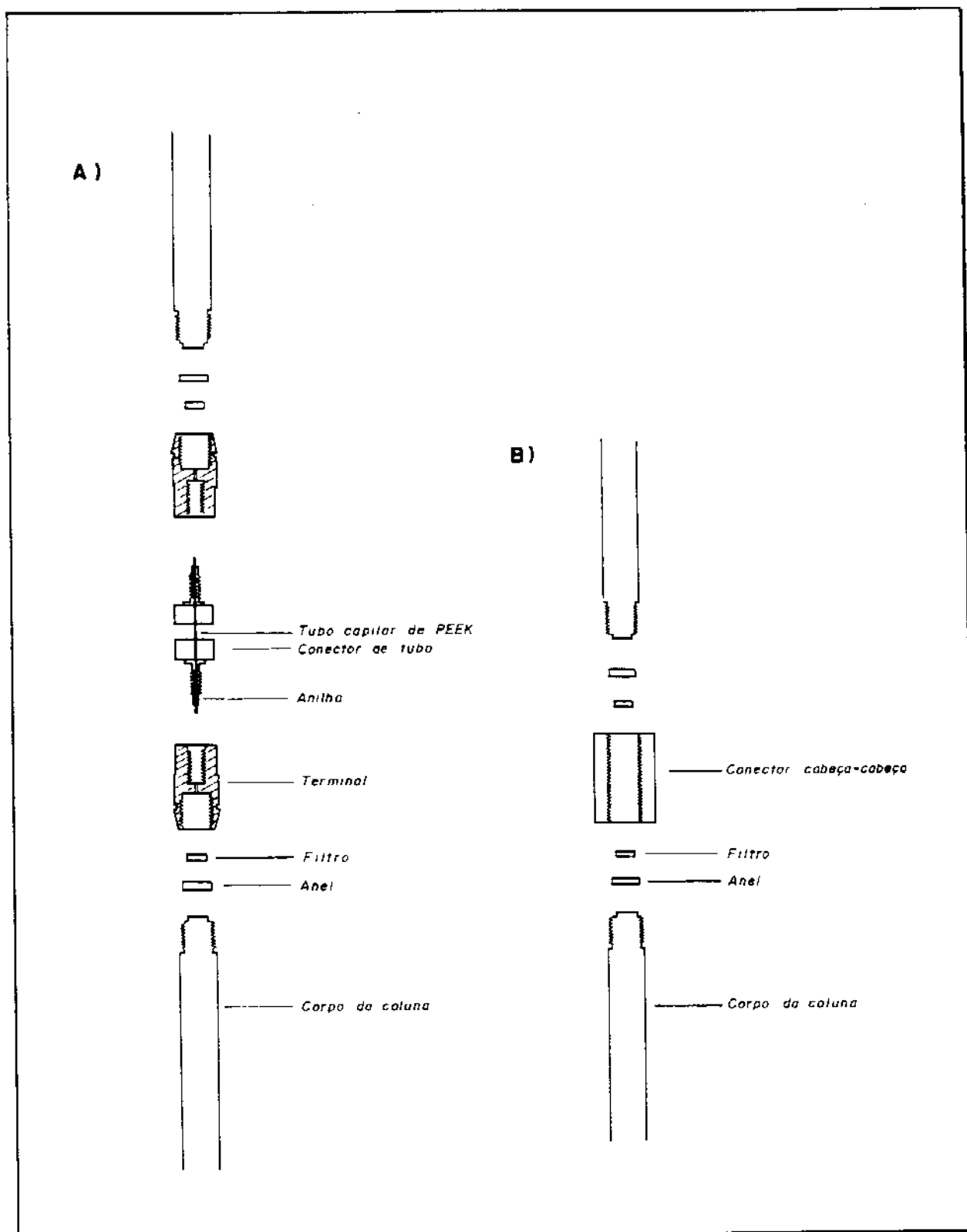


Figura III.1 - Acessórios da coluna com ênfase aos tipos de conexões. A) conexão tipo capilar e B) conexão tipo cabeça-cabeça.

-detector espectrofotométrico por conjunto de fotodiodos, com cela de 8 μL de volume,

-forno para termostatização de colunas desde a temperatura ambiente até 100°C,

-injetor automático com volume de injeção variável de até 25 μL .

-sistema de aquisição de dados: ChemStation, série Pascal, com computador modelo HP 79994A

b)-bomba de alta pressão para enchimento de colunas da marca Haskel, com faixa de pressão de 6,9 a 344,8 MPa (1.000 a 50.000 psi), modelo 51769;

c)-balança analítica, Fisher Scientific A-250, sensibilidade $\pm 0,0001$ g;

d)-agitador "rototorque", Cole Parmer Instrument Company, modelo 7637;

e)-sistema de filtração de fase móvel Millipore, com membrana de Teflon FHUP 04700, 0,5 μm ;

f)-estufa, Soc. Fabbe Ltda;

g)-furadeira de bancada, Schulz;

h)-impressora DeskJet 560C, HP;

i)-microcomputador 486 DX-2 80 MHZ.

III.3 - Enchimento de Colunas

III.3.1 - Método de enchimento

O método de enchimento mais adequado para recheiar colunas com fase estacionária de tamanho de partícula menor que 20 μm é o de suspensão com alta pressão, pois quanto maior a área superficial, maior é a probabilidade de formação de cargas eletrostáticas, impossibilitando o enchimento por vibração a seco, devido à formação de aglomerados (41). Dentre este método uma das quatro técnicas possíveis é a da suspensão com densidade não balanceada onde se escolhe como solvente de suspensão ou tetracloreto de carbono, ou acetona, ou metanol, ou tetraidrofurano e faz-se o enchimento rapidamente para evitar a sedimentação das partículas.

Assim, preparou-se uma suspensão com o material de enchimento em um líquido adequado, que foi agitada por um certo período e a seguir foi colocada no reservatório de suspensão e foi forçada a percorrer a coluna por ação de um solvente propulsor, metanol, a uma determinada pressão. Na extremidade oposta a coluna, o material de enchimento foi retido por um filtro de 2 μm de porosidade, acumulando-se até formar o leito da coluna. A pressurização do solvente foi feita por uma bomba pneumática, movida a gás (N_2), que opera a pressão constante. Após ter passado pela coluna um volume de 80 mL de solvente propulsor, desligou-se a bomba e esperou-se parar de gotejar. Tornou-se a ligar a bomba por 20 segundos e em seguida foi desligada, repetiu-se este procedimento por mais duas vezes. Após estes três pulsos, fechou-se a válvula de pressão da bomba e deixou-se a coluna conectada ao sistema por 20 min. para equilibrar as pressões. Depois deste período, desconectou-se a coluna, limpou-se a extremidade, colocou-se o filtro e por fim, fechou-se a coluna com tampas para evitar a evaporação do solvente.

A figura III.2 ilustra o esquema do equipamento utilizado para realizar o enchimento de colunas, que consiste de 5 partes: bomba de alta pressão, reservatório de suspensão, reservatório de CCl_4 , reservatório de solvente propulsor e coluna.

III.3.2 - Escolha das condições de enchimento

A eficiência de uma coluna cromatográfica recheada com um determinado tipo de fase estacionária, está diretamente relacionada com a escolha adequada de vários parâmetros conforme mostra a tabela III.1 (42). Na tentativa de obterem bons resultados, alguns estudos de variação de parâmetros envolvidos no processo de enchimento foram realizados.

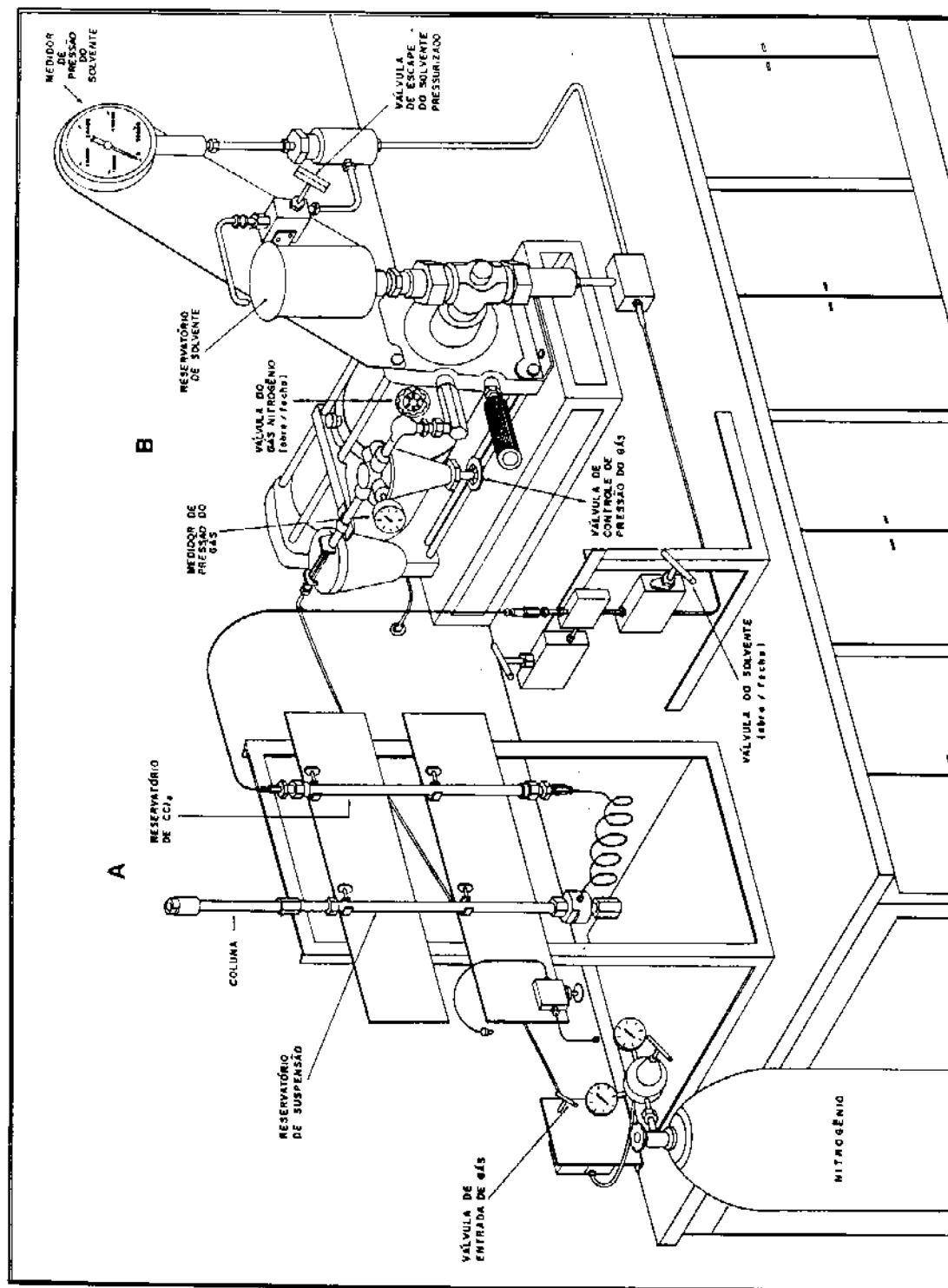


Figura III.2 - Equipamento utilizado para o enchimento de colunas: A) Coluna, reservatório de suspensão e reservatório de CCl_4 e B) Bomba de enchimento, Haskel.

Tabela III.1 - Variáveis que afetam o enchimento de colunas (42).

<i>Qualidade do suporte</i> -tamanho de partícula -distribuição de tamanho de partícula -tamanho de poro -distribuição de tamanho de poro -densidade de partícula -formato da partícula <i>Métodos de preparação da fase estacionária</i> -reagentes de derivatização (mono-, di-, tricloro, ou etoxisilanos) -reação de derivatização (monomérica ou polimérica) -capeamento <i>Preparação de suspensão</i> -solvente -qualidade do solvente -concentração de suspensão -temperatura de suspensão <i>Procedimento de enchimento</i> -pressão -enchimento ascendente ou descendente -geometria do reservatório <i>Características da coluna</i> -diâmetro interno -comprimento -polimento da parede -porosidade e espessura do filtro

III.3.2.1. - Solvente de suspensão

A suspensão foi preparada utilizando tetracloreto de carbono. Inicialmente utilizou-se p.a. purificado segundo Perrin e Armarego (43) conforme descrito abaixo:

Agitaram-se 1 litro de CCl_4 vigorosamente por 2 horas com solução saturada de hidróxido de potássio (300 mL), separaram-se as fases e adicionaram-se água deionizada para lavagem da fase orgânica, agitaram-se e separaram-se as fases. Repetiu-se este procedimento mais uma vez e em seguida agitaram-se com pequenas porções de ácido sulfúrico concentrado (25 mL) até não haver coloração. Lavaram-se por 3 vezes com água e por último secou-se com cloreto de cálcio anidro e destilou-se.

Posteriormente testou-se o tetracloreto de carbono grau Uvasol da Merck.

III.3.2.2 - Concentração da suspensão

A massa de fase estacionária requerida para fazer o enchimento é proporcional ao volume da coluna. O volume da coluna pode ser calculado através da equação III.1, sendo que ao valor obtido, acrescenta-se 20% por segurança, para garantir que toda a coluna seja completamente recheada. Neste cálculo considera-se que a densidade da fase é ~ 1 g/mL. Assim, o valor numérico obtido corresponde à quantidade em gramas de fase estacionária. As quantidades de fase estacionária necessárias para o enchimento das colunas estão mostradas na tabela III.2.

$$V_c = \pi.r^2.L \quad (\text{III.1})$$

onde,

V_c = volume da coluna,

$\pi = 3,14$,

r = raio da coluna,

L = comprimento da coluna,

Tabela III.2: Quantidade de fase estacionária necessária para o enchimento de colunas de dimensões diferentes.

Dimensão da coluna		Volume da coluna (mL)	Massa de fase estacionária (g)
L (mm)	d.i.(mm)		
100	3,8	1,13	1,36
125	3,1	0,94	1,13
125	4,2	1,73	2,08

A influência de diferentes concentrações de suspensão foi estudada. Nestes ensaios, levou-se em consideração o volume dos reservatórios de suspensões disponíveis no laboratório: 4,5; 6,8; 3,5 e 16 mL. Para partículas de 10 μm , rechearam-se colunas com concentrações de suspensões: 10, 15 e 20% e para as de 5 μm : 7, 8, 10, 13, 20 e 22%.

III.3.2.3 - Fases estacionárias

A metodologia empregada na produção de fases estacionárias difere de um fabricante para outro, conseqüentemente as características físico-químicas para um mesmo tipo de fase também são diferentes. Pode mudar o tipo de partícula (esférica ou irregular), a faixa de distribuição de tamanho, a porcentagem de carbono, etc. Desta forma, rechearam-se colunas com fases estacionárias de 5 μm de diferentes fabricantes: Hypersil e Phase Separation, com o objetivo de verificar qual forneceria melhor eficiência.

III.3.2.4 - Válvula pós-coluna

Quando se faz um enchimento, é difícil obterem colunas reprodutíveis. Uma das causas é a diferença de pressão ocasionada pela posição do pistão da bomba nos primeiros instantes do enchimento. Isto proporciona diferenças na estrutura dos leitos das colunas. Na tentativa de

contornar este problema, instalou-se na saída da coluna uma válvula, a qual era aberta após todo o sistema estar pressurizado.

III.3.2.5 - Pressão de enchimento

Outro fator importante estudado foi a pressão de enchimento. Se fosse muito alta poderia causar quebra das partículas de fase estacionária, além de compactar fortemente o leito, gerando pressões altas de operação no sistema cromatográfico. Se fosse muito baixa, poderia deixar a estrutura do leito muito frágil, podendo ser deformada com quaisquer alterações de pressão no sistema, perdendo a eficiência. Dessa forma, as colunas foram recheadas com pressões intermediárias, ou seja, para as partículas de 10 μm a pressão de enchimento foi de 34,5 MPa e para as de 5 μm estudaram-se pressões 41,4 MPa e 54,5 MPa.

III.4 - Avaliação de Colunas

Para avaliar adequadamente as colunas, tanto as comerciais como as recheadas no laboratório, vários fatores foram levados em consideração:

III.4.1 - Escolha da mistura teste

Injetou-se uma mistura padrão no sistema cromatográfico, para testar a performance de todas as colunas utilizadas. Esta mistura foi constituída de: acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno, dissolvidos na fase móvel. Estes compostos foram escolhidos em função do tipo de coluna (fase-reversa), por possuírem absorção de luz no U.V., disponibilidade no laboratório, além de coincidir com a mistura utilizada por alguns fabricantes de colunas.

Não se teve nenhuma preocupação quantitativa ao fazer esta solução, pois foi preparada adicionando-se gotas da solução estoque dos componentes individuais na fase móvel até que as alturas dos picos ficassem dentro da mesma escala, ocupando de 60 a 80% da altura do papel.

O comprimento de onda escolhido para realizar as análises foi de 254 nm. Os espectros de U.V. de cada componente, obtidos no cromatógrafo a líquido da Hewlett Packard, podem ser vistos na figura III.3.

III.4.2 - Escolha da fase móvel

Em fase reversa, os solventes mais comumente utilizados são misturas de água com: metanol, acetonitrila ou tetraidrofurano.

Os solventes usados para preparar a fase móvel foram metanol grau cromatográfico e água ultrapurificada (destilada e deionizada). Esta mistura foi selecionada pelos seguintes motivos:

- é compatível com o detector e com a coluna;
- solubiliza a amostra;
- não reage com a fase estacionária;
- possui baixa viscosidade;
- é disponível na forma pura;
- possui um baixo custo;
- tem baixa inflamabilidade,
- baixa toxicidade e
- principalmente por separar bem a mistura teste em seus componentes individuais.

Para determinar qual a melhor composição de fase móvel, isto é, a que fornecia melhor resolução entre os componentes da mistura, realizaram-se alguns testes. Inicialmente utilizou-se um solvente de alta força de eluição, metanol 100%, para certificar que todos os compostos seriam eluídos próximo ao t_M . A seguir, aumentou-se a concentração de água na mistura até que o parâmetro k , medido para o pico do naftaleno, estivesse na faixa entre 2 e 10, conforme figura III.4.

Após verificar a melhor composição de fase móvel, MeOH:H₂O (70:30) v/v, a qual forneceu a melhor resolução entre todos os picos cromatográficos em um tempo razoável de análise, ela foi fixada para todas as medidas posteriores.

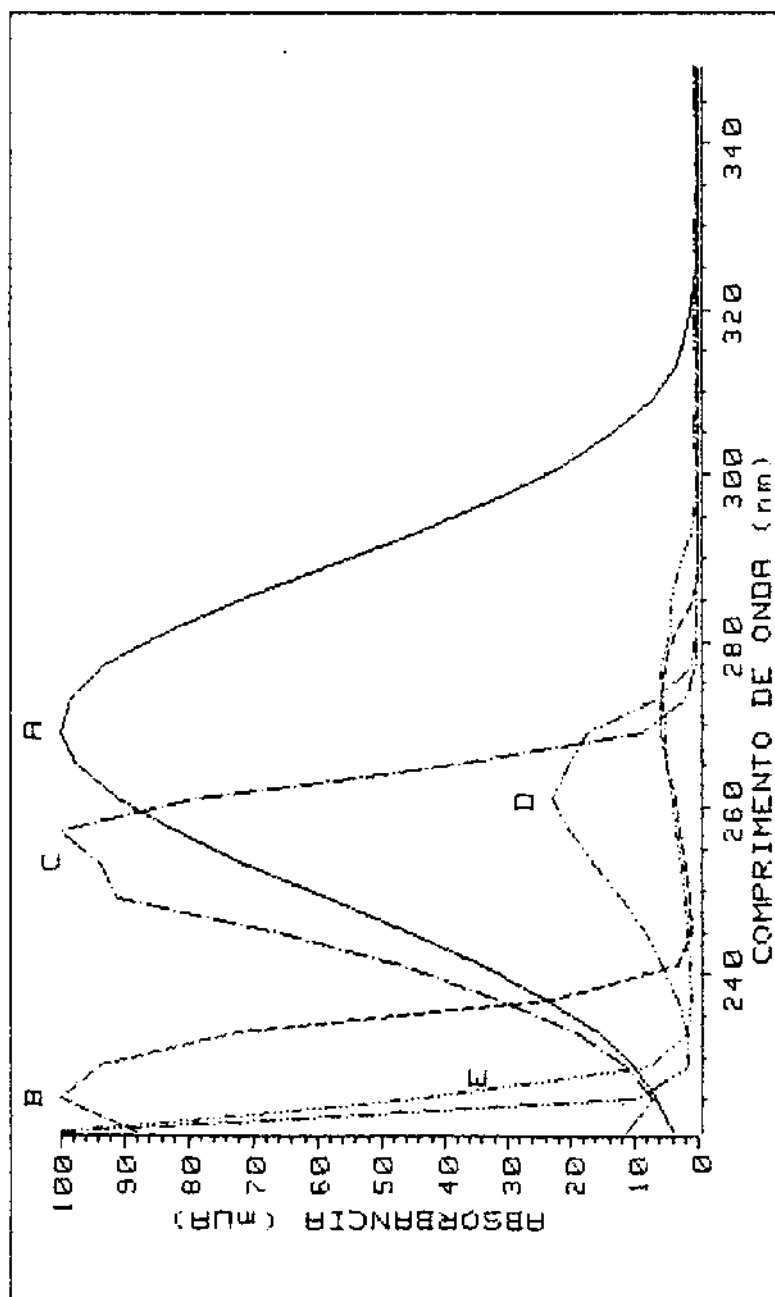


Figura III.3 - Espectros de UV. das substâncias que compõem a mistura teste de colunas para CLAE. A) acetona; B) benzonitrila; C) benzeno; D) tolueno e E) naftaleno.

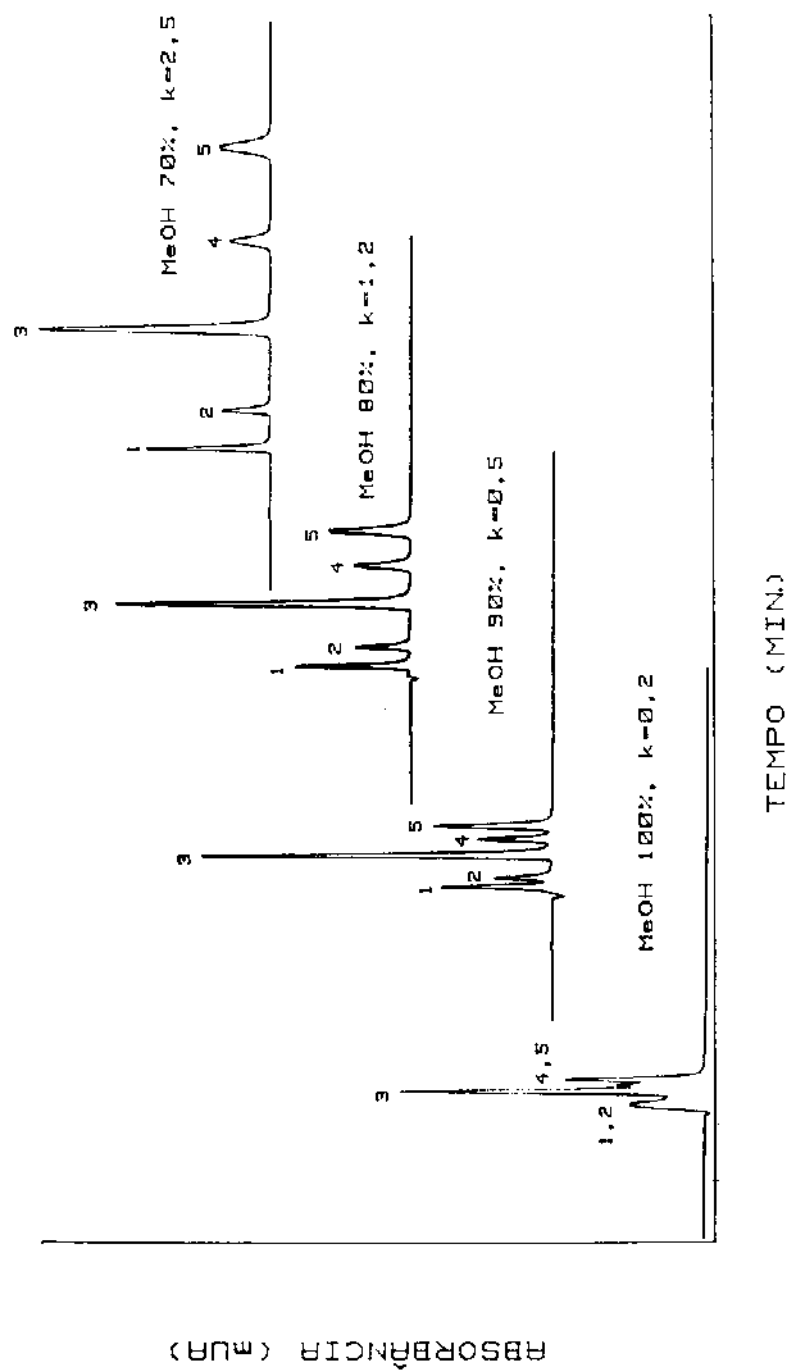


Figura III.4 - Otimização da resolução em função do aumento do fator de retenção (k), calculado para o pico do naftaleno (último pico eluído). 1 = acetona; 2 = benzonitrila; 3 = benzeno; 4 = tolueno e 5 = naftaleno. A fase móvel foi uma mistura de MeOH e H_2O .

A fase móvel antes de ser utilizada foi filtrada em membrana de 0,45 μm e degaseificada ou por ultrassom por 12 min na frequência de 6 Hz ou borbulhando gás hélio de alta pureza por alguns minutos. A finalidade deste tratamento é eliminar gases dissolvidos na fase móvel que poderiam ser responsáveis pela formação de bolhas na bomba e no detector, isto pode causar instabilidade na linha de base.

III.4.3 - Condicionamento de colunas

Após o enchimento, as partículas de fase estacionária ficavam solvatadas pelo solvente propulsor (metanol). Para que um perfeito equilíbrio entre as fases, móvel e estacionária, fosse atingido, fazia-se o condicionamento das colunas através da passagem de fase móvel, na vazão 0,1 mL.min⁻¹, por pelo menos 8 horas antes de iniciar as análises cromatográficas. Se a coluna tivesse sido utilizada e guardada por alguns dias, fazia-se o condicionamento por um tempo menor, aproximadamente 2 horas. Se tivesse sido utilizada por vários dias seguidos, um tempo de 15 min. era suficiente.

III.4.4 - Escolha da vazão ótima

Após a coluna ter sido condicionada, injetava-se a mistura teste em diversos fluxos de fase móvel. Calculavam-se os seguintes parâmetros cromatográficos: altura de prato, H , e velocidade linear, u , e em seguida construía-se a curva de van Deemter para determinar a vazão ótima de análise. O ponto mínimo desta curva corresponde a velocidade linear ótima de análise.

III.4.5 - Determinações dos parâmetros cromatográficos

Para avaliar as colunas, injetaram-se no cromatógrafo 10 μL da mistura teste dissolvida na fase móvel e calcularam-se os seguintes parâmetros cromatográficos, na vazão ótima, obtida através das curvas de van Deemter:

- número de pratos, N ;
- número de pratos por metro, $N.m^{-1}$;

- resolução, R_s ;
- fator de assimetria a 10% da altura do pico, As_{10} ;
- fator de separação, α ;
- fator de retenção, k .

Durante o registro do cromatograma a velocidade do papel do integrador foi alterada para um valor mais rápido, 2 ou 5 cm.min.⁻¹, para que se diminuísse os erros nas medidas de w_h , AC e CB (equação I.10).

Os valores dos parâmetros foram obtidos em duplicata ou triplicata para os picos dos compostos mais retidos, tolueno e naftaleno.

III.5 - Acoplamento de Colunas

III.5.1- Estudo do tipo de conexão

Nas pesquisas sobre o acoplamento de colunas estudaram-se dois tipos de conexões: com tubo capilar de PEEK e tipo cabeça-cabeça, mostrados na figura III.1.

III.5.1.1 - Conexão tipo capilar

Para verificar se este tipo de conexão era adequado, fez-se um estudo da dispersão no sistema cromatográfico. Este experimento consistiu em injetar uma solução de naftaleno dissolvido em metanol em 2 situações:

- no sistema cromatográfico sem coluna, com a conexão unindo diretamente o injetor ao detector;
- no sistema cromatográfico com 2 colunas em série conectadas entre si por um tubo capilar.

Em ambos os casos, o comprimento dos tubos foi variado e mediu-se a variância, σ^2 , em relação ao pico do naftaleno. Um perfil típico do pico do naftaleno, obtido no sistema sem coluna, está ilustrado na figura III.5.

As colunas utilizadas foram recheadas com fase estacionária C-8 (40% de polimetiloctilsiloxano sobre sílica, com $t_p = 10 \mu m$, imobilizada por radiação gama).

Os dados obtidos foram tratados e com isso determinou-se a dispersão no sistema cromatográfico.

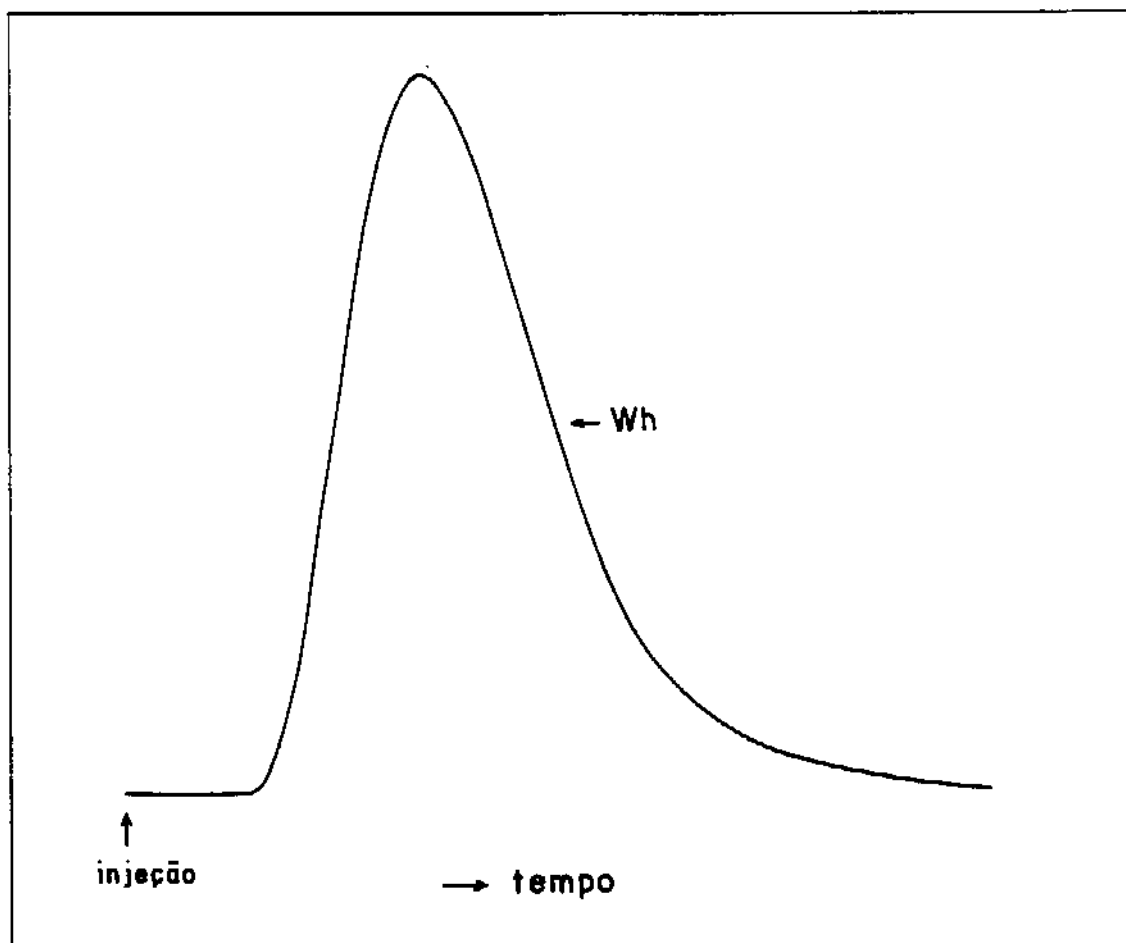


Figura III.5 - Perfil típico do naftaleno, obtido no sistema cromatográfico sem coluna.

III.5.1.2 - Conexão tipo cabeça-cabeça

Além da conexão das colunas feitas por tubos de PEEK de diâmetro reduzido, estudou-se a conexão tipo cabeça-cabeça. Esta conexão foi feita em latão na oficina mecânica da UNICAMP. As colunas utilizadas neste experimento foram as mesmas do item anterior. Mediu-se o número de pratos para avaliar a qualidade deste tipo de conexão.

III.5.2 - Eficiência de colunas acopladas

Rechearam-se 4 colunas com fase estacionária C-8 e contruíram-se curvas de van Deemter, tanto para as colunas individuais como para as acopladas. Com estes dados observaram se houve perda de eficiência a cada passo de acoplamento ou não. Os resultados foram comparados com cálculos teóricos.

III.5.2.1 - Estudo da separação de uma mistura de peralogenados

Estudou-se o efeito do acoplamento de colunas na resolução de uma mistura contendo nove compostos peralogenados: CBr_4 , CBr_2Cl_2 , CBrCl_3 , CCl_4 , C_2Br_6 , C_2Br_4 , $\text{C}_2\text{Br}_2\text{Cl}_4$, C_2Cl_4 , C_2Cl_6 . Para fazer este experimento, utilizaram-se 4 colunas de 100 x 3,8 mm recheadas com C-8 (40% de polimetiloctilsiloxano sobre 60% de sílica, imobilizada por radiação gama). Injetou-se a mistura em 1 coluna, 2, 3 e 4 acopladas

III.5.3 - Estudo da influência do tamanho da partícula da fase estacionária

Para verificar a influência do tamanho de partícula da fase estacionária na eficiência, mediu-se o número de pratos em várias vazões, as quais correspondiam a determinadas pressões de operação. As colunas utilizadas neste experimento foram as seguintes: 60 x 4,6 mm, recheada com Hypersil ODS, tamanho de partícula 3 μm e 250 x 4,0 mm, recheada com Hypersil ODS, tamanho de partícula 5 μm , ambas da marca Hewlett Packard.

III.6 - Otimizações Via Métodos Quimiométricos

III.6.1 - Planejamento experimental

III.6.1.1 - Planejamento fatorial fracionário

Utilizou-se um planejamento fatorial fracionário com dois níveis e 4 variáveis, 2^{4-1} , totalizando 8 experimentos para estudar os efeitos principais e de interação nas respostas de eficiência e de tempo de análise. As variáveis estudadas foram: comprimento da coluna (L), temperatura no compartimento de coluna (T), composição da fase móvel (FM) e volume de injeção (Vi).

Foram utilizadas duas colunas de 125 mm de comprimento e 4,2 mm de diâmetro interno, recheadas com fase estacionária Hypersil ODS, 10 μm . Para aumentar a variável L foi utilizado um conector de latão tipo cabeça-cabeça, confeccionado na oficina mecânica da UNICAMP.

As demais variáveis Vi, T e FM foram alteradas utilizando recursos do próprio equipamento, um cromatógrafo a líquido de alta eficiência da marca Hewlett Packard descrito no item III.2.a.2. Durante as medidas o fluxo da fase móvel foi mantido constante em 0,5 mL.min⁻¹. Os valores dos níveis das variáveis estão descritos na tabela III.3.

A ordem dos experimentos foi obtida através de sorteio para que fosse aleatória e assim os erros experimentais pudessem ser avaliados. As medidas das respostas N e t_R foram feitas em triplicatas e utilizando o pico do naftaleno.

Tabela III.3 Variáveis estudadas no Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} com os respectivos níveis menores (-) e maiores (+).

Variáveis	(-)	(+)
L (mm)	125	250
Vi (μL)	5	20
FM (MeOH/H ₂ O)(v/v)	80:20	70:30
T (°C)	26	45

III.6.2 - Simplex sequencial modificado

Quando uma coluna cromatográfica é utilizada pela primeira vez deve-se determinar a vazão ótima de análise, onde a eficiência (N) apresenta valor máximo. O método comumente utilizado, para uma dada temperatura, é a construção da curva de van Deemter, que é obtida plotando-se a altura de prato (H) versus a velocidade linear da fase móvel (u). O ponto mínimo deste gráfico corresponde ao maior valor de eficiência.

Se o sistema cromatográfico dispõe de forno para controle da temperatura, o estudo desta variável torna-se muito interessante, pois ela afeta diretamente a viscosidade das fases móvel e estacionária e o coeficiente de difusão do soluto e pode alterar os termos B e C da curva de van Deemter, mostrados na figura 1.2.

Assim, com o objetivo de determinar de uma maneira simples e rápida as condições experimentais que resultem em um maior valor de eficiência utilizou-se o método Simplex Sequencial Modificado (SSM) ao invés de construir várias curvas em temperaturas diferentes (processo univariado).

Para realizar este experimento as variáveis consideradas foram: vazão da fase móvel e temperatura do compartimento de coluna. Para se obterem os valores de eficiência injetou-se uma mistura sintética constituída de acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno dissolvidos em metanol/água. A coluna utilizada foi 100 x 2,1 mm, recheada com Hypersil ODS 5 μm . A fase móvel foi uma mistura de metanol/água 70:30 v/v e o volume de injeção foi de 5 μL .

Os pontos foram fornecidos pelo programa Simplex (cedido pelo Prof. Dr. Roy E. Bruns do Inst. de Química da Unicamp).

Para obterem os cromatogramas, em cada condição estipulada pelo programa, foi utilizado o cromatógrafo citado no item III.2.a.2 e os limites das variáveis foram:

⇒ Temperatura 30-60°C

⇒ Vazão da fase móvel: 0,15-0,7 mL.min⁻¹

RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1 - Enchimento de Colunas

IV.1.1 - Método de enchimento

A primeira etapa deste trabalho foi conseguir rechear colunas com boa qualidade, empregando-se para isso o método de enchimento de suspensão com alta pressão.

O material de recheio escolhido foi do tipo fase reversa, C-8 ou C-18, pois é o material mais utilizado em CLAE (44,45). Isto ocorre devido à ampla gama de compostos que podem ser separados por estas fases estacionárias, bem como as muitas vantagens que apresentam quando comparadas às fases do tipo normal.

IV.1.2 - Escolha das condições de enchimento

Há diversos métodos de enchimento descritos na literatura, entretanto, na prática, existe uma grande dificuldade em se conseguir colunas com boa qualidade e reprodutibilidade. Isto é devido ao grande número de variáveis que afetam o enchimento de colunas, as quais estão descritas na tabela III.1.

Assim, rechearam-se as colunas, variando-se alguns parâmetros citados na tabela III.1. Para analisar se o valor de eficiência obtido estava bom ou não comparou-se com os valores reportados na literatura (2) ou fornecidos por fabricantes de colunas (Hichrom Ltda.). Estes dados constam na tabela IV.1.

Tabela IV.1 - Eficiência das colunas recheadas com fase reversa porosa.

Tamanho da partícula (μm)	Eficiência (número de pratos por metro) (m^{-1})	
	Valores obtidos da literatura (2)	Valores típicos obtidos dos fornecedores de colunas*
10	12.000-20.000	20.000
5	35.000-45.000	60.000
3	80.000-100.000	100.000

* Hichrom Ltda; Fases estacionárias: ODS Hypersil e Phase Separation (Spherisorb).

IV.1.2.1 - Solvente de suspensão

A suspensão foi preparada utilizando-se tetracloreto de carbono, pois estudos anteriores mostraram que este solvente fornece suspensões cineticamente estáveis e colunas com alta eficiência (16, 17, 46).

Apesar de inicialmente ter-se utilizado o tetracloreto de carbono p.a. com bons resultados, resolveu-se purificá-lo, para maior segurança, pois mesmo quantidades pequenas de HX (onde X é um halogênio) são prejudiciais. Se presentes, elas adsorvem sobre a sílica resultando numa linha de base flutuante quando detectores de U.V. são usados. Além disso, fases ligadas podem partir-se pela hidrólise com estes ácidos fortes. O melhor caminho para garantir que estas impurezas não estivessem presentes foi purificá-lo conforme o tratamento descrito por Perrin e Armarego (43).

O método de purificação era bastante trabalhoso, então, para simplificar, testou-se um solvente grau Uvasol da Merck. Conforme mostra os resultados da tabela IV.2, não se observou nenhuma alteração significativa em relação aos parâmetros cromatográficos, nem flutuações na linha de base, então passou a utilizá-lo como solvente de suspensão.

Tabela IV.2 - Influência do grau de purificação do solvente de suspensão, tetracloreto de carbono, em alguns parâmetros cromatográficos obtidos com uma coluna de 125 x 3,2 mm, recheada com Hypersil ODS 10 μm .

Solvente (CCl_4)	N	$N.m^{-1}$	As_{10}	R_s
p.a. purificado	$t=3.092$ $n=3.008$	$t=24.735$ $n=24.066$	$t=1,1$ $n=1,1$	3,8
Uvasol	$t=3.160$ $n=3.153$	$t=25.282$ $n=25.221$	$t=0,98$ $n=0,91$	3,8

t =tolueno e n =naftaleno

$F = 0,1 \text{ mL.min}^{-1}$ e $V_i = 10 \mu\text{L}$.

IV.1.2.2 - Concentração de suspensão

A figura IV.1 ilustra a influência da concentração de suspensão no enchimento de colunas recheadas com fase estacionária comercial Hypersil ODS 10 μm . Como pode-se observar, todas as colunas apresentaram boa eficiência, entretanto a suspensão de 20% resultou em N um pouco maior. Então passou-se a adotar esta concentração no enchimento de colunas com fase estacionária de mesmo tamanho de partícula.

Para partículas menores, 5 μm , inicialmente utilizou-se uma concentração de suspensão de 22%, porém os resultados foram ruins. Assim, outras concentrações foram estudadas afim de otimizar este parâmetro e os resultados podem ser observados na figura IV.2. Ao contrário da fase estacionária com tamanho de partícula 10 μm , houve uma melhora significativa na qualidade da coluna com a diminuição da concentração da suspensão, encontrando melhores eficiências com suspensão de 7%. Uma suspensão mais diluída deve aumentar a distância interpartículas e portanto minimizar os efeitos de formação de aglomerados, gerando colunas mais eficientes, pois neste caso o número de partículas é maior.

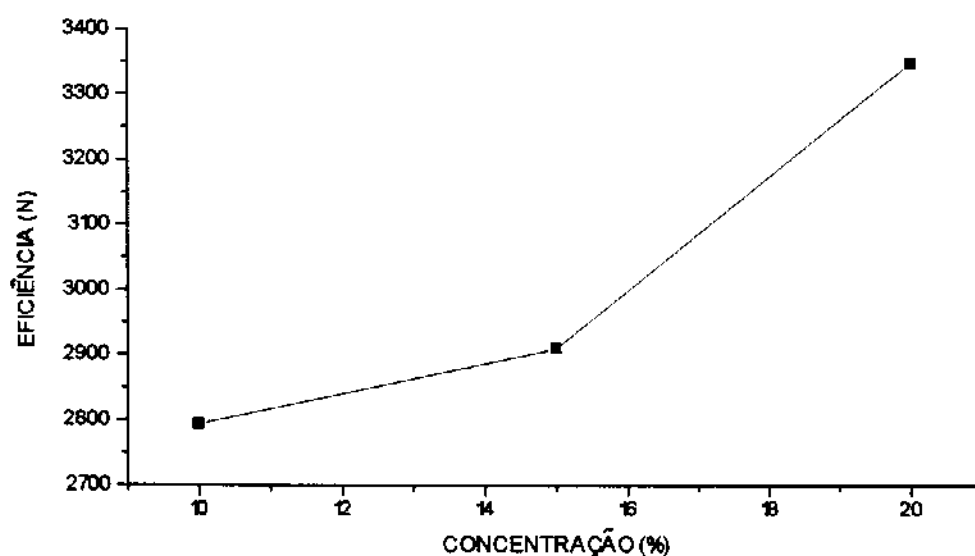


Figura IV.1 - Influência da concentração da suspensão no enchimento de colunas com fase estacionária Hypersil ODS 10 μm .

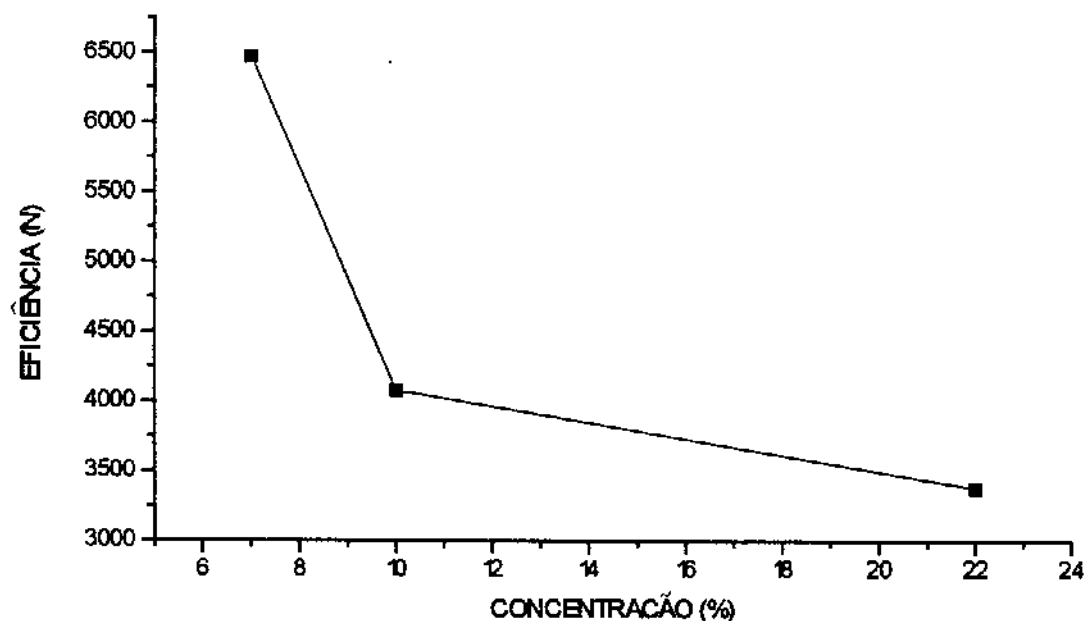


Figura IV.2 - Influência da concentração de suspensão no enchimento de colunas com fase estacionária Hypersil ODS 5 μm .

Analisando estes resultados, conclui-se que a concentração é realmente um fator importante na obtenção de colunas eficientes.

IV.1.2.3 - Fases estacionárias

Rechearam-se colunas com fases estacionárias ODS 5 μm de diferentes fabricantes. Houve uma diferença acentuada em termos de eficiência entre as duas fases testadas: Hypersil e Phase Separation, conforme mostra a tabela IV.3. A recheada com fase estacionária Phase Separation apresentou eficiência superior as das obtidas pela literatura e das comerciais, indicando que se obteve coluna de ótima qualidade.

Tabela IV.3 - Influência da procedência da fase estacionária na eficiência e fator de assimetria de uma coluna de 125 x 3,1 mm recheada com fase estacionária ODS de $t_p = 5 \mu\text{m}$.

Fabricante	N^*	$N \cdot m^{-1} (m^{-1})$	As_{10}^*
Hypersil	6.471	51.768	1,2
Phase Separation	10.420	83.360	1,3

*calculado para o naftaleno

Concentração de suspensão = 7%; Volume do reservatório de suspensão: 16 mL; $P = 41,4 \text{ MPa}$.

IV.1.2.4 - Válvula pós-coluna

Utilizando-se uma válvula pós-coluna observou uma pequena diminuição no tempo de enchimento da coluna cromatográfica e a eficiência obtida permanecia praticamente sem variação.

Considerando a diminuição no tempo de enchimento e a possibilidade de ter leitos mais homogêneos passou a usar a válvula pós-coluna nos próximos enchimentos realizados.

IV.1.2.5- Pressão de enchimento

A pressão de enchimento para colunas com $t_p = 10 \mu\text{m}$ foi mantida constante a $41,4 \text{ MPa}$, pois todas as colunas recheadas foram de boa qualidade.

No enchimento de colunas com $t_p = 5 \mu\text{m}$, aumentou-se a pressão de enchimento de $41,4 \text{ MPa}$ para $54,5 \text{ MPa}$ e não houve melhora significativa em termos de eficiência, porém a pressão menor foi escolhida por resultar em valor de assimetria menor, como mostra a tabela IV.4.

Tabela IV.4 - Influência da pressão no enchimento de colunas com fase estacionária C-18 Hypersil, com $t_p = 5 \mu\text{m}$. Coluna: 125 x 4,2 mm.

pressão de enchimento (MPa)	N^*	$N \cdot m^{-1*}$ (metros ⁻¹)	As_{10}^*
41,4	6.072	48.576	2,4
54,5	6.295	51.360	2,8

* calculado para o naftaleno

Concentração de suspensão: 20%; Volume do reservatório de suspensão: 6,8 mL.

IV.1.2.6 - Condições ótimas de enchimento

Na tabela IV.5 encontra-se um resumo das condições ótimas de enchimento obtidas para as colunas estudadas, com $t_p = 5$ e $10 \mu\text{m}$.

Tabela IV.5 - Resumo das condições ótimas de enchimento para as colunas estudadas.

dimensão da coluna L x d.i. (mm)	FE	t_p (μm)	Conc. de Susp. (%)	Pressão de enchi- mento (MPa)	Vol. do reserva- tório (mL)	N^*	$N \cdot m^{-1*}$ (m^{-1})	As_{10}^*
100 x 3,8	C-8	10	20	34,5	13,5	4.024	32.192	1,1
125 x 4,2	C-18**	10	20	34,5	6,8	4.429	35.432	1,4
125 x 3,1	C-18**	10	20	34,5	4,5	4.042	32.336	1,4
125 x 3,1	C-18***	5	7	41,4	16	10.420	83.360	1,3
125 x 3,1	C-18**	5	7	41,4	16	6.471	51.768	1,2

*calculado para o naftaleno

**Hypersil

***Phase Separation

IV.2 - Acoplamento de Colunas

IV. 2.1 - Estudo do tipo de conexão

No estudo do acoplamento de colunas, a maneira como as colunas são ligadas umas às outras é um fator determinante, pois se forem utilizadas conexões com grande

volume morto, ocorre alargamento dos picos devido à dispersão e consequentemente há um decréscimo na eficiência da coluna.

Assim, estudaram-se os dois tipos de conexões descritas a seguir:

IV.2.1.1 - Conexão tipo capilar

Realizou-se a avaliação da dispersão no sistema cromatográfico, com o objetivo de verificar se um tubo capilar de PEEK seria adequado para a conexão em série de colunas.

A dispersão se relaciona com a variância de acordo com a equação IV.1 (47)

$$\sigma = (\sigma^2)^{1/2} \quad (\text{IV.1})$$

onde,

σ = dispersão;

σ^2 = variância.

A variância se relaciona com a largura do pico a meia altura de acordo com a seguinte equação (2,18):

$$\sigma^2 = (w_h)^2/5,545 \quad (\text{IV.2})$$

onde,

w_h é a largura do pico a meia altura em unidades de volume (cm.F/f), sendo F a vazão da fase móvel e f a velocidade do papel no registrador.

A variância total do sistema é a soma das variâncias individuais, segundo a equação:

$$\sigma^2 = \sigma_{\text{inst}}^2 + \sigma_{\text{t/c}}^2 + \sigma_{\text{col}}^2 \quad (\text{IV.3})$$

onde,

σ_{inst}^2 = variância devido ao instrumento

$\sigma_{\text{t/c}}^2$ = variância devido aos tubos e conectores

σ_{col}^2 = variância devido a coluna

σ^2 = variância total

Para medir a variância do sistema cromatográfico descrito no item III.2.a.1 utilizaram-se 2 colunas (col.1 e col.2) que apresentaram respectivamente na vazão de $0,2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 3.532 e 3.868 pratos e fator de assimetria de 1,1 para ambas as colunas.

O experimento consistiu em acoplar 2 colunas (col. 1 e col. 2), utilizando-se um tubo capilar de PEEK com 0,305 mm de diâmetro interno e dois adaptadores. Mantiveram-se todos os parâmetros constantes e variaram-se o comprimento do tubo capilar (400, 300, 200, 100 e 50 mm). Mediu-se a variância através do pico do naftaleno. Plotando-se a variância versus o comprimento do tubo capilar, figura IV.3, e extrapolando-se para $L = 0 \text{ mm}$, obtém-se a variância total do sistema com a coluna, excetuando-se a contribuição dos tubos como segue:

$$\sigma^2 = \sigma_{\text{inst.}}^2 + \sigma_{\text{col.}}^2 \quad (\text{IV.4})$$

Repetiu-se o mesmo procedimento, porém sem coluna e utilizando-se naftaleno dissolvido na fase móvel para o cálculo das medidas. Plotou-se a variância versus o comprimento do tubo, figura IV.3, e extrapolando-se para $L = 0 \text{ mm}$, encontrou-se a

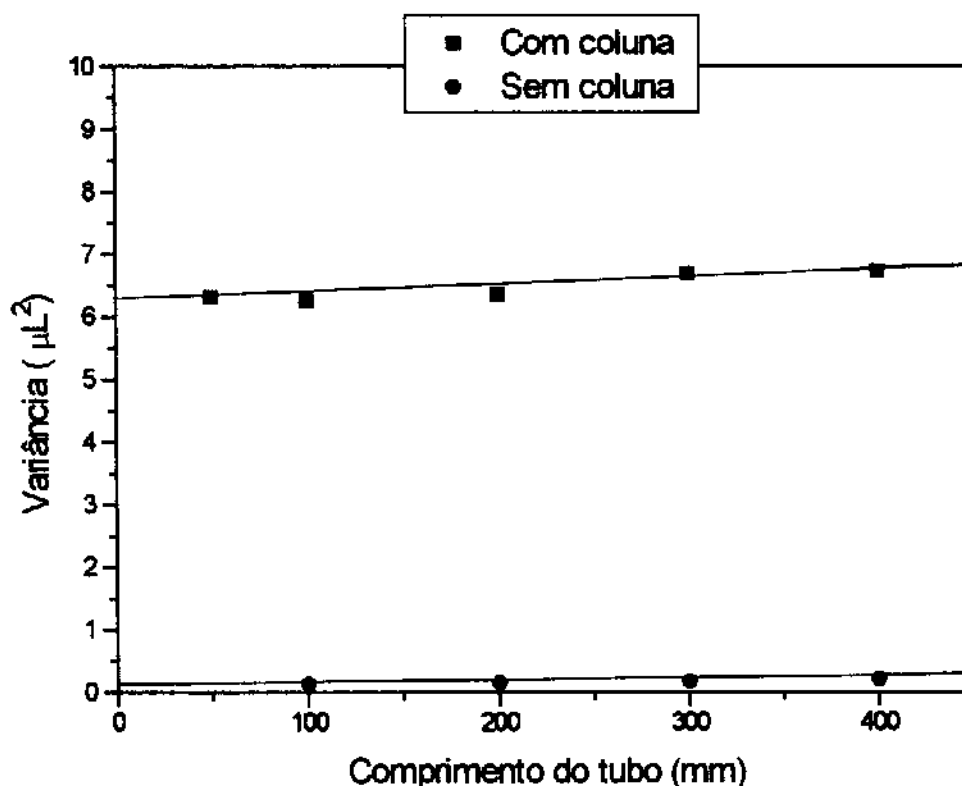


Figura IV.3 - Estudo da dispersão cromatográfica.

variância instrumental devido ao sistema de injeção e detecção, uma vez que foi obtido a comprimento nulo e na ausência de colunas:

$$\sigma^2 = \sigma_{\text{inst}}^2 \quad (\text{IV.5})$$

Substituindo-se a equação IV.5 na IV.4, obtém-se a variância devido a coluna e a variância total do sistema. Os resultados estão na tabela IV.6.

Estes resultados independem do diâmetro do tubo, pois

$$\sigma_{\text{vc}}^2 = 0 \quad (L=0)$$

Segundo a literatura (47), a dispersão instrumental deve ser menor ou igual a 1/3 da dispersão da coluna para que a perda máxima de eficiência em N, devido às contribuições do detector e injetor no espalhamento de banda, seja de 10%. A dispersão calculada nas colunas foi cerca de 7 vezes maior que a do instrumento (det/inj). Portanto, a variância do instrumento não contribuiu efetivamente para o alargamento do pico cromatográfico. A dispersão nos vários comprimentos de tubos capilares estudados, foi desprezível em relação à causada pelas colunas.

Tabela IV.6 - Dispersão no sistema cromatográfico

Local	Dispersão (μL)	Variância (μL) ²
tubo de PEEK de 50 mm	0,14	0,02
colunas (1 e 2)	2,46	6,05
instrumento (det. e inj.)	0,33	0,11
total	2,93	6,18

IV.2.1.2 - Conexão tipo cabeça-cabeça.

Neste estudo empregou-se a conexão tipo cabeça-cabeça e após o acoplamento das duas colunas (col.1 e col.2), verificou-se que o valor resultante de N (7.700) foi similar ao obtido com conectores de capilares de PEEK (7.500), sendo ambos ligeiramente superiores ao somatório de cada coluna individual (7.400).

Portanto, ambos os tipos de conexões podem ser utilizados, sem que haja perda na eficiência, porém o tipo capilar é preferido, pois ao realizar o acoplamento, diferente da conexão cabeça-cabeça, não há necessidade de abrir as extremidades da coluna, o que poderia causar alteração em seu leito.

IV.2.2 - Eficiência de colunas acopladas

Utilizaram-se 4 colunas e fez-se um estudo da variação do fluxo de fase móvel para que com os dados pudesse construir as curvas de van Deemter e determinar a vazão ótima a ser utilizada em cada passo do acoplamento. A figura IV.4 mostra as curvas de van Deemter obtidas com as colunas individuais e acopladas. O ponto mínimo da curva mostra a velocidade linear ótima de análise. Os parâmetros cromatográficos das colunas individuais e acopladas estão na tabela IV.7.

A seguir, na vazão ótima, injetou-se a mistura teste para calcular a resolução do par tolueno/naftaleno. A relação entre a $\sqrt{N}$ e a R_s mostrou ser linear e está ilustrada na figura IV.5. A equação que descreve esta curva é a seguinte:

$$R_s = \frac{\sqrt{N} - 16,5}{21,4}$$

Coeficiente de correlação = 0,998

Segundo Snyder e Kirkland (48), o número de pratos das colunas individuais devem ser aditivos se os picos forem simétricos e se conexões de baixo volume morto forem utilizadas e se os tempos de retenção, t_R , para o soluto teste forem aproximadamente iguais. Então o número de pratos para o sistema conectado, N_t , pode ser calculado de acordo com a seguinte equação;

$$N_t = \frac{\gamma^2}{\sum (N_i)^{-1}} \quad (\text{IV.6})$$

onde,

γ = número de colunas acopladas em série;

N_i = número de pratos das colunas individuais.

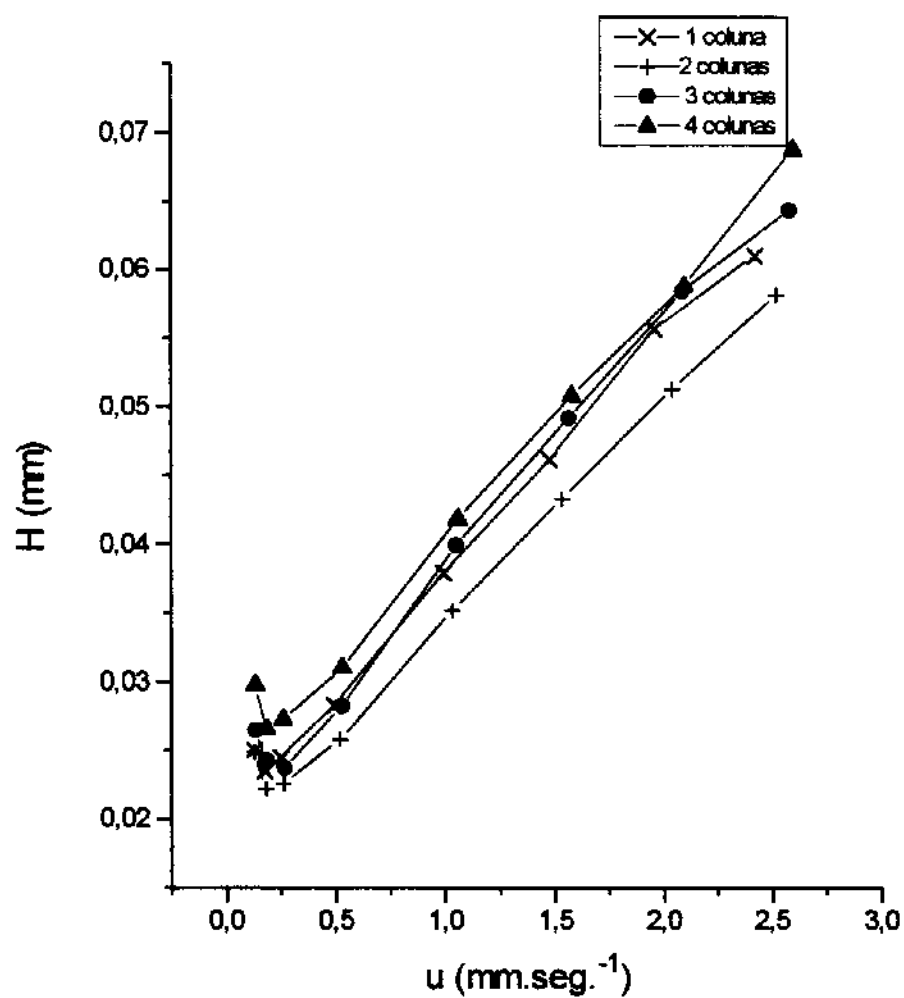


Figura IV.4 - Curvas de van Deemter para colunas individuais e acopladas.

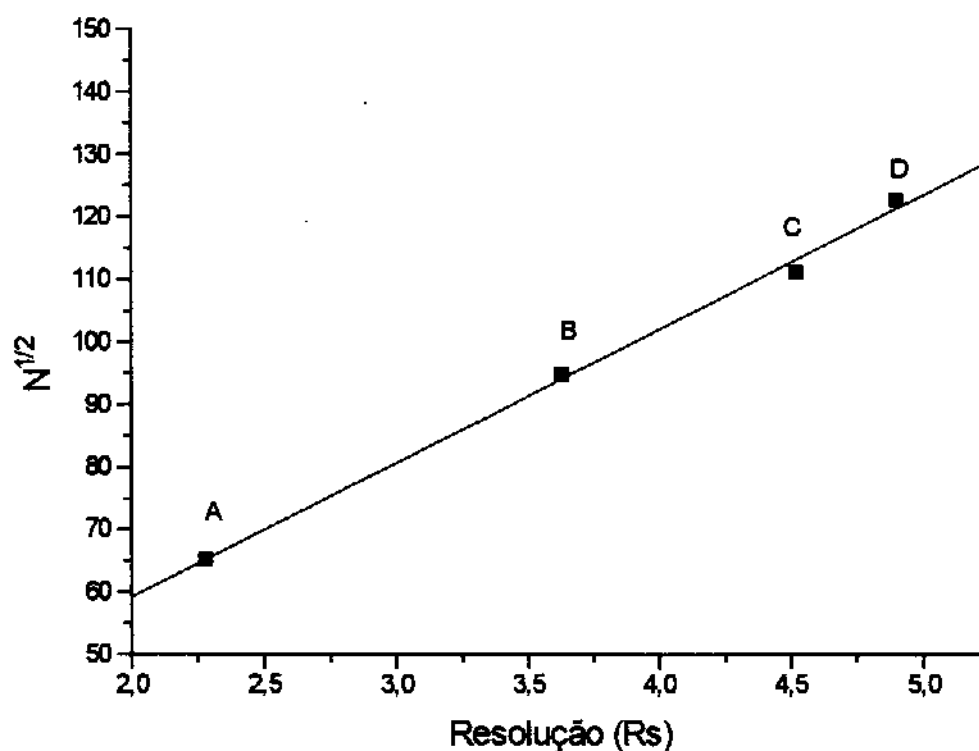


Figura IV.5 - Variação da resolução do par tolueno/naftaleno com o aumento da eficiência conseguida com o acoplamento. A) coluna 1, B) colunas 1+2, C) colunas 1+2+3, D) colunas 1+2+3+4.

Tabela IV.7 - Parâmetros cromatográficos calculados, na vazão ótima, para as colunas individuais e acopladas.

Número da coluna	t_M (min.)	t_R^* (min.)	N^*	$N.m^{-1*}$ (m^{-1})	μ^* (mm.seg ⁻¹)	H^* (mm)	As_{10}^*	Rs^{**}
1	9,54	50,8	4.252	34.016	0,175	0,0235	0,93	2,3
2	9,44	49,7	4.342	34.736	0,177	0,0230	1,1	2,3
3	9,35	51,7	4.217	33.736	0,178	0,0237	1,0	2,3
4	9,48	49,9	3.056	24.448	0,176	0,0327	1,1	1,8
1+2	18,5	95,6	8.990	35.960	0,180	0,0222	1,2	3,6
1+2+3	27,4	146,2	12.341	32.909	0,182	0,0243	1,1	4,5
1+2+3+4	36,4	195,3	15.042	30.084	0,183	0,0266	1,1	4,9

* calculado para o naftaleno.

**calculado para o par tolueno/naftaleno

F=0,07 mL.min⁻¹

A comparação entre o número de pratos obtidos experimentalmente e o calculado pela equação IV.6 está mostrada na figura IV.6. Como pode-se verificar, os valores são muito próximos, então esta equação pode ser utilizada para prever a eficiência final após uma série de acoplamentos de colunas com valores de N conhecidos e verificar se o acoplamento é vantajoso ou não. Se uma coluna tiver um valor de N muito menor que os de outras colunas é melhor não utilizá-la. Por exemplo, 4 colunas com $N = 5.000, 4900, 5100$ e 1500 . A soma dos valores individuais de N é 16.500 e o valor calculado pela equação é 12.630 . Se esta última coluna não for utilizada o valor de N , pela equação, seria 14.996 , que é praticamente o mesmo que o obtido pela soma dos valores de N individuais (15.000).

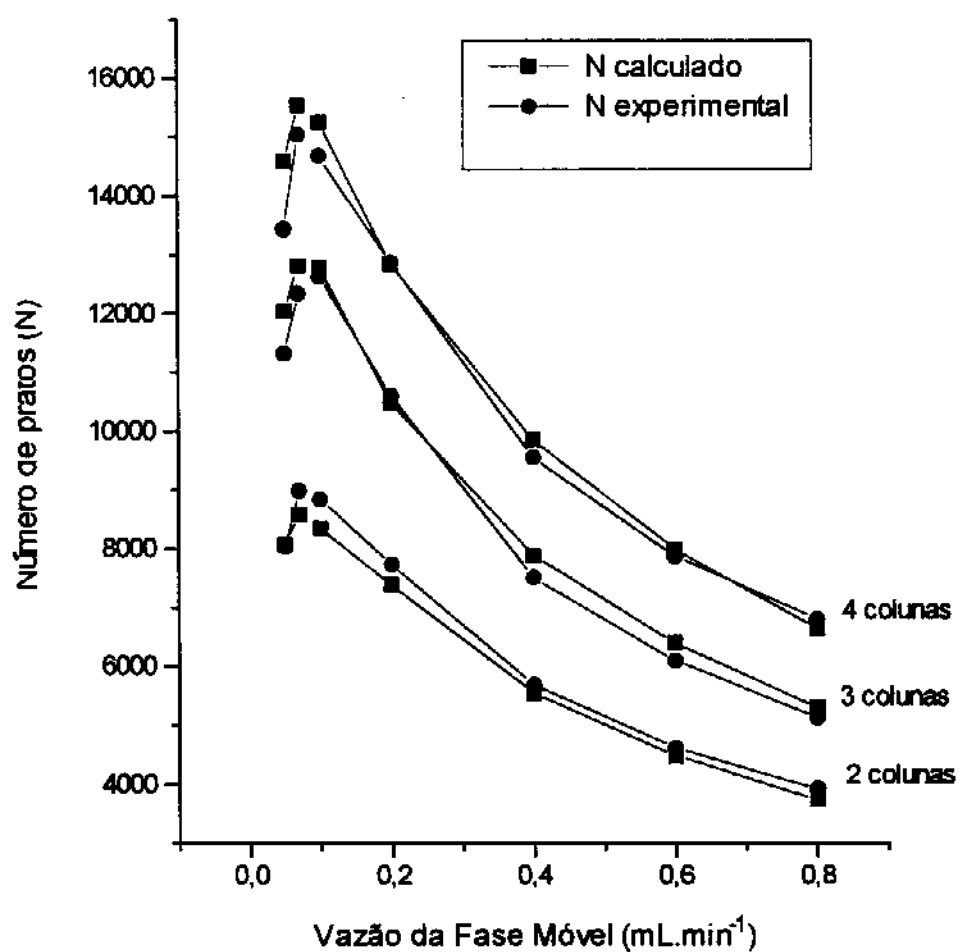


Figura IV.6 - Comparação entre os valores de N calculado pela equação IV.6 e os obtidos experimentalmente.

Há uma controvérsia na literatura sobre acoplamento de colunas. Enquanto Snyder e Kirkland (48) afirmam que o número de pratos é aditivo, Kucera e Manius (9) afirmam que há perda de eficiência a cada passo do acoplamento de colunas analíticas. Então, de acordo com os resultados obtidos concordamos com Snyder e Kirkland (48) não com Kucera e Manius (9), que provavelmente utilizaram colunas com diferentes permeabilidades que fazem com que o termo de múltiplos caminhos, da equação de van Deemter, se torne exagerado e cause perda na eficiência final.

IV.2.2.1 - Estudo da separação de uma mistura de peralogenados.

Este experimento teve como objetivo conseguir a separação completa de uma mistura relativamente complexa constituída de nove compostos peralogenados, para ilustrar as vantagens do uso do acoplamento em série de colunas analíticas.

Utilizaram-se 4 colunas de 100 x 3,8 mm, recheadas com fase reversa C-8 (40% de polimetiloctilsiloxano sobre 60% de sílica, imobilizada por radiação gama). A fase móvel foi uma mistura de metanol/água 70:30 (v/v).

O número de pratos para uma coluna individual foi de 3.532, de duas colunas 7.738, de três colunas 10.611 e de 4 colunas 12.825.

Considerando que a $R_s \propto \sqrt{N}$, um acréscimo da eficiência de 4 vezes provoca uma melhora na resolução de cerca de duas vezes e este aumento na eficiência foi suficiente para a separação completa dos compostos estudados. Isto pode ser observado na figura IV.7 para o par $C_2Br_2Cl_4/C_2Cl_4$ onde a resolução inicial foi ~ 0.7 e a final ~ 1.4 .

Assim, apesar do aumento no tempo de retenção dos compostos analisados ter sido grande, neste procedimento foi solucionado o problema da falta de resolução. Também em comparação com cromatograma publicado na referência (49), figura IV.8, verifica-se que o acoplamento proporcionou melhor resultado.

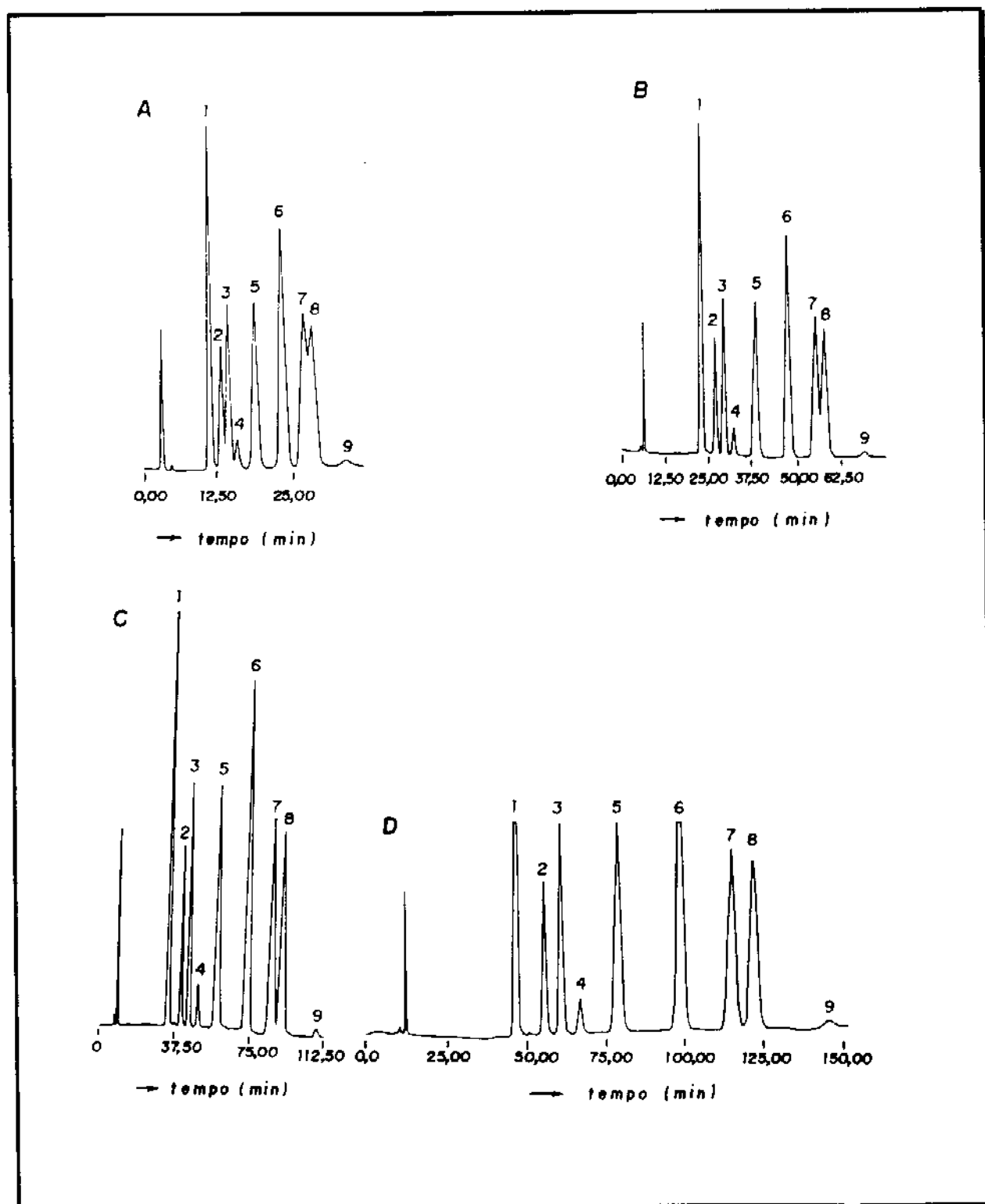


Figura IV.7 - Cromatogramas obtidos na separação de compostos perhalogenados. 1= CBr_4 , 2= CBr_2Cl_2 , 3= CBrCl_3 , 4= CCl_4 , 5= C_2Br_6 , 6= C_2Br_4 , 7= $\text{C}_2\text{Br}_2\text{Cl}_4$, 8= C_2Cl_4 e 9= C_2Cl_6 . Colunas 100 x 3,8 mm, recheadas com C-8, 10 μm . F = 0,2 mL.min⁻¹; FM = MeOH/H₂O 70:30 (v/v); V.i. = 10 μL ; λ = 220 nm. A) uma coluna, B) duas colunas, C) três colunas e D) quatro colunas acopladas.

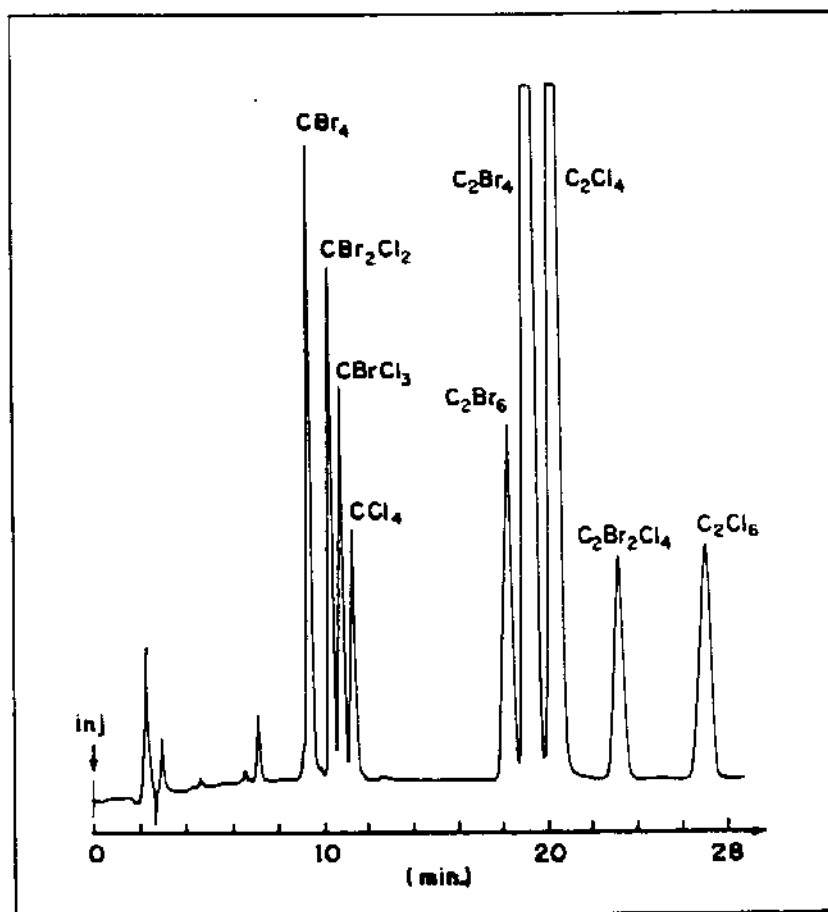


Figura IV.8 - Separação de compostos peralogenados obtido da referência (48). Coluna: 250 x 4,6 mm, recheada com Ultrasphere ODS, $t_p = 5 \mu\text{m}$, Alltech; FM: MeOH/H₂O 70:30 v/v, $F = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; V.i. = 10 μL ; $\lambda = 220 \text{ nm}$.

IV.2.3 - Estudo da influência do tamanho da partícula

Normalmente as colunas analíticas disponíveis comercialmente possuem os seguintes $t_p = 3, 5$ e $10 \mu\text{m}$. Isto afeta diretamente a eficiência, pois quanto maior o comprimento da coluna e menor t_p , maior é a área superficial e maior é o número de etapas de equilíbrio. No estudo do acoplamento de colunas esta variável, t_p , é de especial importância, pois está associada à pressão de operação que é um fator limitante.

Neste estudo utilizaram-se duas colunas comerciais de mesmo fabricante: Hypersil ODS com $t_p = 3$ e $5\ \mu\text{m}$ e os valores de eficiências medidos na vazão ótima foram: 8.416 e 22.532 pratos e pressões: 13,0 e 11,8 MPa respectivamente.

Observa-se que há uma relação linear entre fluxo de fase móvel e pressão de operação conforme mostra a figura IV.9. Assim, considerando que a pressão máxima no cromatógrafo, fornecida pelo fabricante, é 40 MPa, o comprimento máximo da coluna para $t_p = 3\ \mu\text{m}$, na vazão ótima seria cerca de 3 vezes maior, ou seja, 180 mm, gerando $N = 25.248$ pratos. Para $t_p = 5\ \mu\text{m}$ o comprimento máximo seria 3 vezes maior, ou seja, 750 mm gerando $N = 67.596$ pratos.

Conforme equação 1.11, para valores de $k = 3$ e com os valores de N obtidos, 25.248 e 67.596 pratos, consegue-se separar misturas com valores de $\alpha = 1,03$ e 1,02 respectivamente.

Então, as fases estacionárias devem ter tamanhos de partículas maiores quando longos comprimentos de colunas são necessários para gerarem altos valores de N . Além disso, outra vantagem em se utilizar tamanhos de partículas maiores é que o tempo de vida útil da coluna é maior devido à pressões de operações menores.

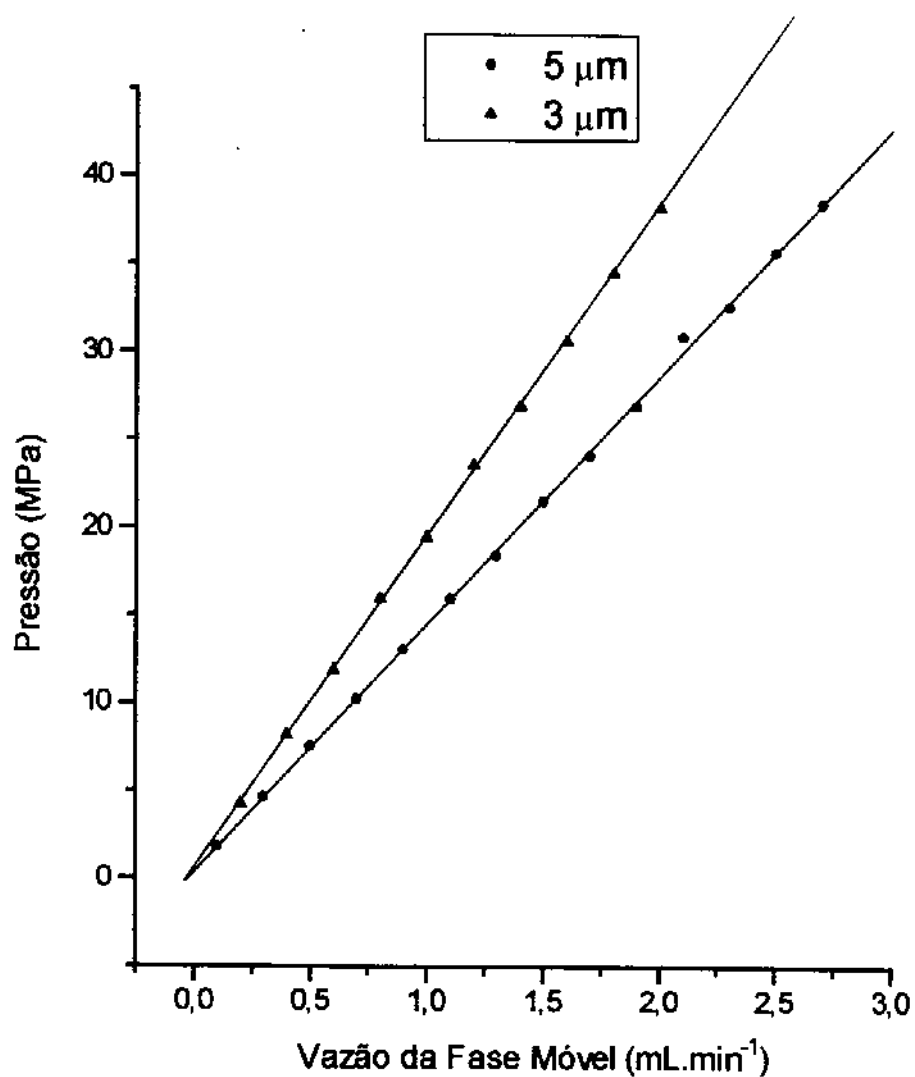


Figura IV.9 - Variação da pressão com a vazão de fase móvel para colunas recheadas com Hypersil ODS com $t_p = 3 \mu\text{m}$ (▲) e $5 \mu\text{m}$ (●). Fase móvel: MeOH/H₂O 70:30 (v/v).

IV.3 - Otimizações Via Métodos Quimiométricos

IV.3.1 - Planejamento experimental

IV.3.1.1 - Planejamento fatorial fracionário

Para avaliar a influência das variáveis: temperatura de análise (T), composição da fase móvel (FM), comprimento da coluna (L) e volume de injeção (Vi) na eficiência, utilizou-se um planejamento fatorial fracionário com 2 níveis e quatro variáveis, 2^{4-1} (o expoente -1 significa que o fatorial completo 2^4 foi dividido por dois). O esquema deste planejamento está ilustrado na tabela IV.8 e na tabela IV.9 estão os valores calculados em função da resposta medida, número de pratos (N).

Tabela IV.8 - Esquema e eficiências obtidas com a aplicação do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1}

Variável	(-)	(+)
1: L (mm)	125	250
2: Vi (μL)	5	20
3: FM (MeOH/H ₂ O)(v/v)	80:20	70:30
4: T (°C)	26	45

N ^o	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>12</u>	<u>13</u>	<u>14</u>	<u>23</u>	<u>24</u>	<u>34</u>	N [*]	S ²
1	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	4477	2191
2	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	9772	38227
3	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	4233	377
4	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	7955	13681
5	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	4859	1999
6	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	8872	5898
7	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	3830	6485
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8960	571

* Calculado para o pico do naftaleno, as medidas foram feitas em triplicatas.

S² é a estimativa das variâncias.

I = 1234 (relação geradora do fatorial), onde I é denominado identidade

Tabela IV.9 - Análise do Planejamento Fatorial Fracionário 2^{4-1} em função da medida de N.

Média = 6620	
$l_1 = \underline{1} + \underline{234} = 4540 \pm 38$	$l_{12} = \underline{12} + \underline{34} = -114 \pm 38$
$l_2 = \underline{2} + \underline{134} = -750 \pm 38$	$l_{13} = \underline{13} + \underline{24} = 31 \pm 38$
$l_3 = \underline{3} + \underline{124} = 21 \pm 38$	$l_{14} = \underline{14} + \underline{23} = 280 \pm 38$
$l_4 = \underline{4} + \underline{123} = 672 \pm 38$	

Média ponderada de todas as estimativas das variâncias conjuntas ou globais:

$$S_p^2 = 8679$$

A raiz quadrada de S_p^2 fornece a estimativa do desvio padrão global, S_p , ou seja a estimativa do erro experimental:

$$S_p = 93$$

Estimativa da variância do efeito:

$$S^2(\text{efeito}) = 1/6 \cdot S_p^2 = 1446$$

Erro padrão do efeito:

$$S(\text{efeito}) = 38$$

O comprimento da coluna é o principal fator de aumento da eficiência, como pode ser observado pelo valor de l_1 . Dobrando-se o comprimento, proporciona um aumento de 2 vezes no valor de N (tabela IV.9). A desvantagem é que o t_R dos compostos aumenta linearmente. O aumento do volume de injeção de 5 para 20 μL , l_2 , contribui para o para um decréscimo de 750 pratos, isto ocorre devido à sobrecarga da coluna e dispersão da amostra. O aumento de 26°C para 45°C, l_4 , melhora a eficiência em 672 pratos, provavelmente devido à diminuição da viscosidade da fase móvel, que favorece a transferência de massa entre o soluto e as fases estacionária e móvel. Verificou-se também que na faixa estudada, a variação da composição da fase móvel de 80:20 para 70:30, l_3 , não causa mudança significativa no valor de N. Assim, esta

variável pode ser eliminada, porém o tempo de retenção dos compostos na composição 80:20 foram menores, e como não houve comprometimento da resolução, numa análise de rotina esta composição seria preferida, pois envolve menor tempo e menor consumo de fase móvel.

IV.3.1.2 - Planejamento fatorial completo

Eliminando-se a coluna 3 (composição da fase móvel), este fatorial fracionário torna-se um fatorial completo nas variáveis 1, 2 e 4, como mostra a tabela IV.10. Desta forma, pode-se avaliar os efeitos de primeira, segunda e terceira ordem, como mostra a tabela IV.11. Assim, pode-se verificar a vantagem em se usar o planejamento fatorial fracionário, pois com um número menor de experimentos foi possível determinar a importância relativa entre as variáveis.

Assim, observa-se que os efeitos de segunda ordem L_{12} e L_{14} possuem efeitos significativos, -114 e 280 respectivamente. Aumentando-se o comprimento e o volume de injeção ao mesmo tempo ocorre um efeito antagônico, pois há um decréscimo no número de pratos e aumentando-se o comprimento e a temperatura simultaneamente

Tabela IV.10 - Esquema e eficiências obtidas com a aplicação do Planejamento Fatorial Completo 2^3 (eliminando a coluna 3 do fatorial fracionário 2^{4-1})

<u>1</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	N
-	-	-	4477
+	-	-	8872
-	+	-	3830
+	+	-	7955
-	-	+	4859
+	-	+	9772
-	+	+	4233
+	+	+	8960

Tabela IV.11 - Análise do Planejamento Fatorial Completo 2^3 em função do N.

Efeitos de primeira ordem:

$$L_1 = \underline{1} = 4540 \pm 38$$

$$L_2 = \underline{2} = -750 \pm 38$$

$$L_3 = \underline{3} = 21 \pm 38$$

$$L_4 = \underline{4} = 672 \pm 38$$

Efeitos de segunda ordem são:

$$L_{12} = \underline{12} = -114 \pm 38$$

$$L_{24} = \underline{24} = 31 \pm 38$$

$$L_{14} = \underline{14} = 280 \pm 38$$

Efeito de terceira ordem:

$$L_{124} = \underline{124} = 21 \pm 38$$

ocorre um efeito sinérgico pois há um acréscimo na eficiência final. O efeito L_{24} , volume de injeção e temperatura não são significativos, uma vez que o valor obtido do efeito é menor que o erro.

O efeito de terceira ordem não foi significativo, pois seu valor é menor que o erro do efeito, então não há interações entre as três variáveis.

Este fatorial 2^3 também pode ser visto como dois fatoriais 2^2 nas variáveis $\underline{2}$ e $\underline{4}$ para dois diferentes comprimentos, conforme figura IV.10.

Desta forma, observa-se que para uma coluna ($L = 125$ mm), um aumento no volume de injeção de $5 \mu\text{L}$ para de $20 \mu\text{L}$, ocasiona um decréscimo na eficiência de aproximadamente 14%. Utilizando-se duas colunas acopladas ($L = 250$ mm), observa-se que a eficiência diminui 9%, pois quando a quantidade de F.E. é maior, há um número maior de interações e um aumento na capacidade de carga da coluna.

O aumento na temperatura proporcionou um acréscimo de aproximadamente 10% na eficiência para as colunas acopladas e aproximadamente 9% para uma individual. Portanto não houve uma variação significativa.

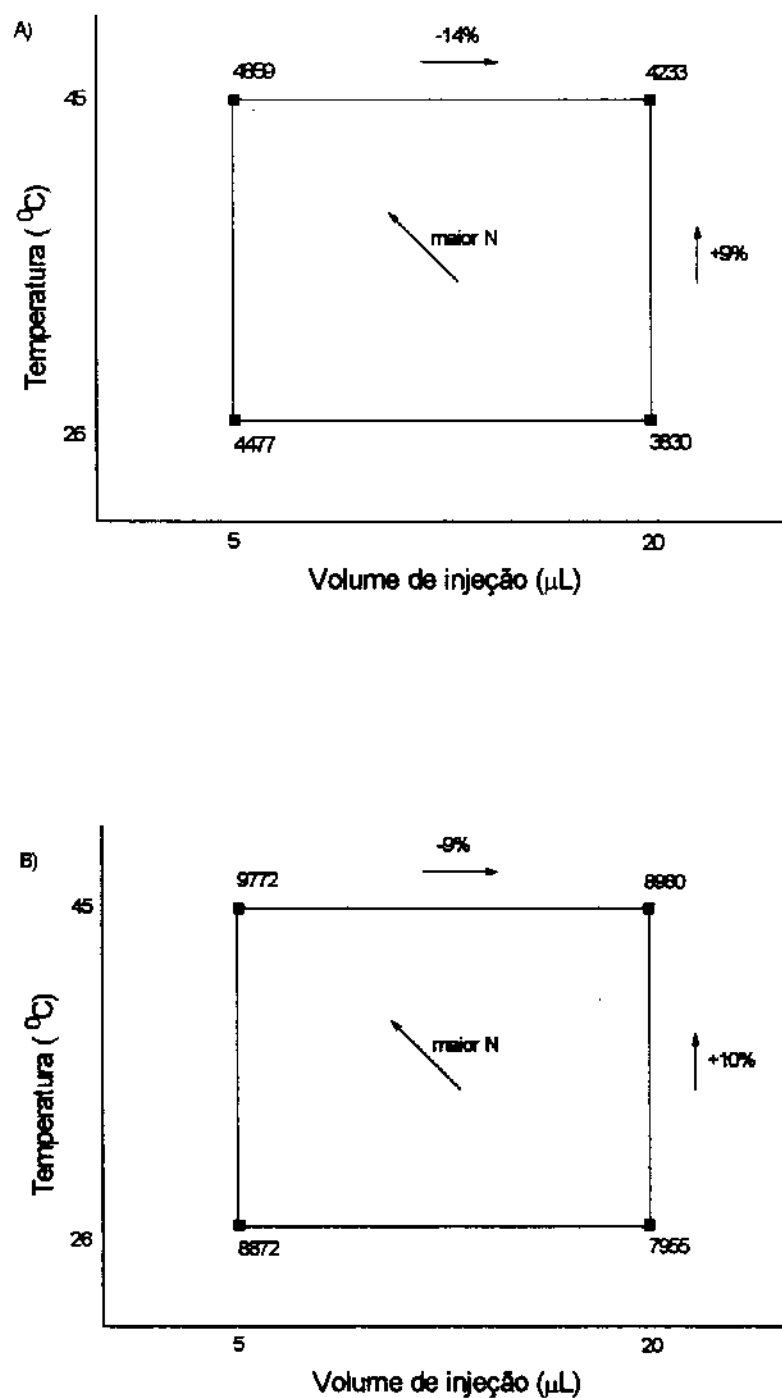


Figura IV.10 - Fatoriais 2^2 para 2 comprimentos diferentes. A) uma coluna ($L=125$ mm) e B) duas colunas acopladas ($L=250$ mm).

Este método indicou as variáveis que afetam a medida de N (volume de injeção, temperatura e comprimento da coluna). Obteve-se também, através dos gráficos, figura IV.10 a direção preferencial para a realização de ensaios com maior eficiência. Ou seja, aumentar o comprimento e a temperatura e diminuir o volume de injeção.

IV.3.2 - Simplex sequencial modificado

Os valores obtidos para as variáveis temperatura e vazão da fase móvel, por meio da aplicação do programa Simplex e as respectivas medidas de N estão mostrados na tabela IV.12. A seguir a figura IV.11 mostra os movimentos do Simplex em direção ao ponto ótimo.

Observou-se que o Simplex se deslocou em direção ao ponto ótimo rapidamente e houve um aumento de 3.189 pratos em relação ao inicial. Os valores ótimos para a temperatura e para a vazão da fase móvel foram de 60°C e 0,2 mL.min⁻¹ respectivamente, correspondendo ao vértice número 8. O segundo melhor resultado (vértice número 12), é o ponto mais próximo ao ótimo obtido, confirmando portanto o resultado.

O limite máximo estipulado para a temperatura da coluna foi de 60°C, pois temperaturas maiores poderiam ocasionar quebras nas ligações entre a fase estacionária (C-18) e o suporte (sílica) e causar danos irreversíveis à coluna.

Este método mostrou ser bastante adequado na obtenção da vazão ótima e pode ser utilizado, a princípio, para qualquer coluna cromatográfica. Ele representa uma alternativa vantajosa à construção da curva de van Deemter, visto que é um método simples e o tempo necessário para obter o ponto ótimo é bem pequeno, devido ao número reduzido de experimentos.

Tabela IV.12 - Movimentos do Simplex Sequencial Modificado e seus valores para as variáveis: temperatura e vazão da fase móvel e resposta medida (N).

Número do Vértice	Movimento do Simplex	Temperatura (°C)	Vazão da F.M. (mL.min ⁻¹)	Resposta Medida (N) ^{***}
1		40	0,6	3.309
2		30	0,7	2.875
3		30	0,6	3.196
4	R	40	0,5	3.500
5	E	45	0,4	4.336
6	R	55	0,4	4.553
7	E	67,5	0,3	1.000*
8	R	60	0,2	6.064
9	E	70	0,0	100*,**
10	R	70	0,2	50
11	C	51,25	0,35	4.833
12	R	56.25	0,15	5.545

* Temperatura maior que 60°C, violação dos limites

** Fluxo 0,0 mL.min⁻¹, violação dos limites.

*** Calculado para o naftaleno.

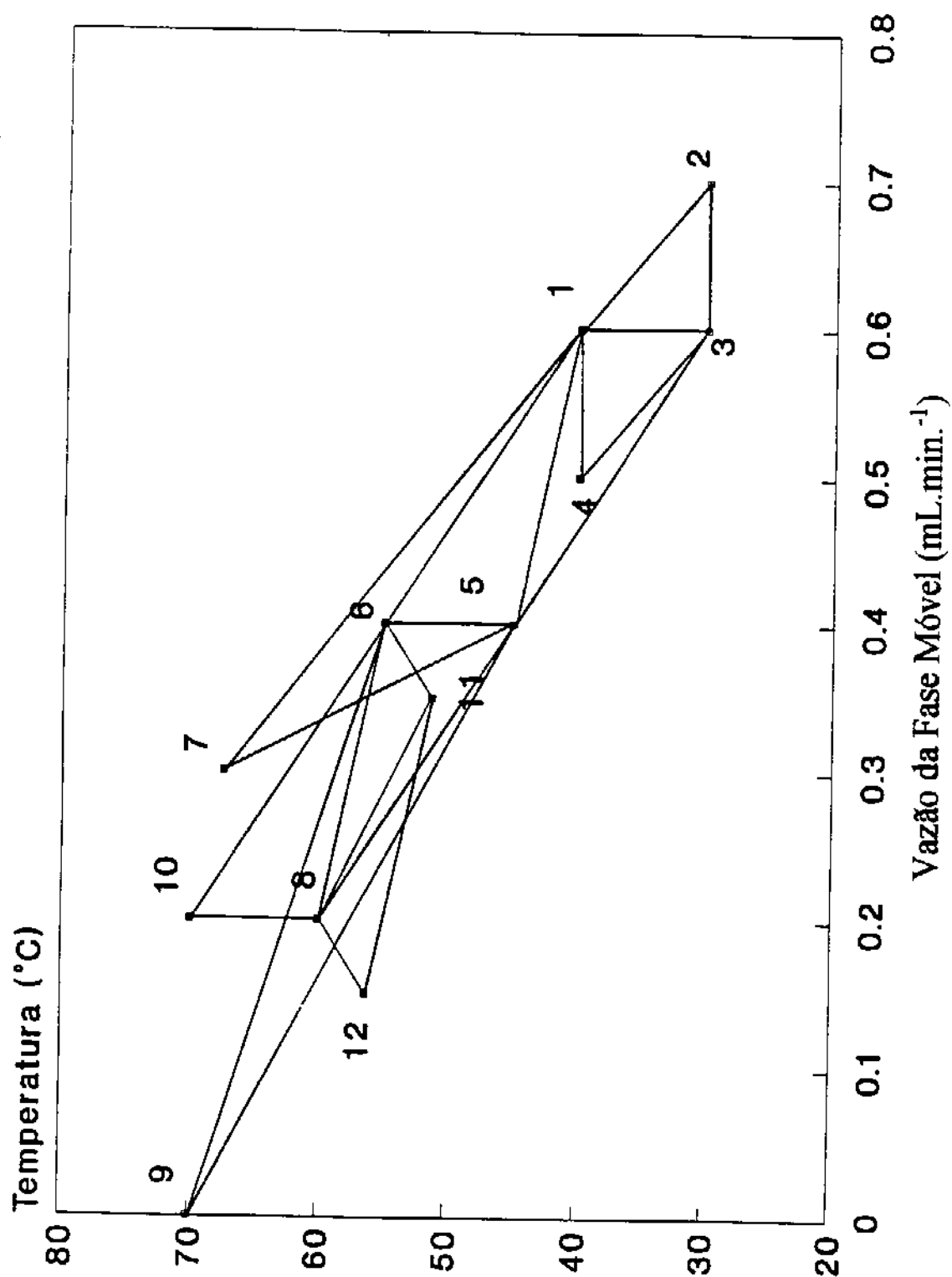


Figura IV.11 - Movimentos do Simplex Sequencial Modificado.

CONCLUSÕES

O método mais indicado para o enchimento de colunas para CLAE, com partículas de tamanho pequeno, é o de suspensão com alta pressão. As suspensões devem ser estáveis e não formar aglomerados, então o CCl_4 foi utilizado, pois, possui estas características. Este solvente foi testado em dois graus diferentes de purificação e os resultados mostraram que tanto o p.a. tratado segundo Perrin e Armarego (43) como o grau Uvasol da MERCK, fornecem colunas com boa qualidade. As pressões ótimas de enchimento foram 34,5 e 41,3 MPa para os $t_p = 10$ e $5 \mu\text{m}$, respectivamente. A concentração da suspensão é um fator importante no enchimento de colunas. Para $t_p = 5 \mu\text{m}$, soluções mais diluídas, 7%, forneceram eficiências maiores, enquanto que para $t_p = 10 \mu\text{m}$, os melhores resultados foram obtidos com soluções mais concentradas, 20%. Os valores ótimos de eficiências para as colunas recheadas com fase estacionária C-18 com $t_p = 5 \mu\text{m}$ foram: Phase Separation: 83.360 N.m^{-1} e Hypersil 51.768 N.m^{-1} . Para $t_p = 10 \mu\text{m}$: C-18 Hypersil 35.432 N.m^{-1} e para C-8 32.192 N.m^{-1} . Dessa forma, o método de enchimento desenvolvido por nós forneceu colunas com eficiências, no mínimo, similares às adquiridas comercialmente e maiores que da literatura (2). Isto demonstra que a metodologia empregada foi bastante eficaz e portanto colunas com ótima qualidade podem ser obtidas, a um custo muito menor.

No estudo do tipo de conexão, ambos os conectores, capilar (com $L = 50 \text{ mm}$ e diâmetro interno do tubo de $0,305 \text{ mm}$) e cabeça-cabeça, se mostraram adequados para serem empregados no acoplamento de colunas, pois não causaram dispersão significativa no sistema e conseqüentemente não alargaram as bandas cromatográficas. Porém o tipo capilar é preferido devido as facilidades de uso.

O acoplamento de quatro colunas similares, forneceu um aumento na eficiência de quatro vezes e uma relação linear entre $N^{1/2}$ e R_s foi observada. O valor de N obtido das colunas acopladas foi suficiente para obter a separação completa de uma mistura sintética de nove compostos do tipo peralogenados ($\text{C}_x\text{Br}_y\text{Cl}_z$, onde $x = 1$ ou 2

e $y + z = 4$ ou 6). Apesar do tempo de análise ter sido grande, a resolução obtida foi melhor que a publicada anteriormente (49).

A diminuição do tamanho de partícula de fase estacionária de 5 para 3 μm fornece colunas mais eficientes, em termos de $N\cdot\text{m}^{-1}$, porém o comprimento máximo estimado para as colunas são: 750 mm e 180 mm, respectivamente, gerando, na pressão de operação máxima, N igual a 67.596 e 25.236 pratos. Estes números são suficientes para resolver misturas ($k=3$) com um $\alpha = 1,02$ e $1,03$. Então, no acoplamento de colunas é preferível utilizar colunas recheadas com fases estacionárias com t_p maiores, devido à menores pressões de operação.

Um Planejamento Fatorial fracionário 2^{4-1} foi aplicado para obter a importância relativa entre as variáveis: comprimento da coluna (L), volume de injeção (V_i), temperatura da coluna (T) e composição da fase móvel (FM) em função da eficiência. O aumento do L foi o fator que mais contribuiu para o aumento de N , pois dobrou a eficiência, 4.540 pratos. Em seguida, a diminuição da viscosidade das fases, obtida por meio do aumento de T , ocasionou um aumento de cerca de 672 pratos. A mudança na composição da FM praticamente não alterou o valor de N , pois se relaciona apenas com o fator de retenção, k . Por último, o aumento do V_i forneceu um decréscimo no N de cerca de 750 pratos. Como uma das variáveis não apresentou efeito significativo, a composição da FM , um Fatorial Completo 2^3 foi obtido e os efeitos principais, de segunda e terceira ordem puderam ser avaliados. Isto mostra que quando se faz um planejamento dos experimentos é possível obter, com poucos ensaios, um número maior de informações e com maior confiança nos resultados, pois fornece os efeitos de interações entre as variáveis.

A curva de van Deemter é a maneira mais comum de se obter a vazão ótima de uma coluna. Porém, o perfil da curva pode ser alterado com mudanças na temperatura devido às alterações nas viscosidades das fases, móvel e estacionária. Assim uma outra alternativa foi proposta, para se conseguir a melhor vazão para se fazer as análises, que é através do método de otimização Simplex Sequencial Modificado. Este método mostrou ser bastante vantajoso, pois o número de experimentos é menor que se construir várias curvas de van Deemter em diversas temperaturas. Ele pode ser

empregado para qualquer coluna cromatográfica, desde que se disponha de forno para aquecimento.

I - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. coordenadores, "Introdução a Métodos Cromatográficos", 4ª edição, Editora da UNICAMP, Campinas, 1990.
2. POOLE, C. F. e SCHUETTE, S. A., "Contemporary Practice of Chromatography", Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, 1984.
3. POOLE, C. F. e POOLE, S. K., "Recent Advances in Chromatography", *Analytica Chimica Acta*, 216 (1989) 109-145.
4. VERZELE, M. e DEWAELE, C., "High Resolution HPLC", *J. High Resol. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.*, 5 (1982) 245-249.
5. POOLE, C. F. e POOLE, S. K., "Chromatography Today", Elsevier Science Publishers Company Inc., New York, 1991.
6. KRAAK, J. C.; POPPE, H. e SMEDES, F., "Construction of Columns for Liquid Chromatography with Very Large Plate Numbers. Theory and Practice.", *J. Chromatogr.*, 122 (1976) 147-158.
7. SCOTT, R. P. W. e KUCERA, P., "Mode of Operation and Performance Characteristics of Microbore Columns for Use in Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 169 (1979) 51-72.
8. DEWAELE, C. e VERZELE, M., "High Efficiency HPLC with Long Packed Columns", *J. High Resol. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.*, 3 (1980) 273-276.
9. KUCERA, P. e MANIUS, G., "High-Resolution Reversed-Phase Liquid Chromatography Utilizing Microbore Column Concatenation", *J. Chromatogr.*, 216 (1981) 9-21.
10. MELLOR, N., "Faster Analysis by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 16 (1982) 359-363.
11. REED, G. D. e LOSCOMBE, C. R., "Long Columns and Column Coupling: Alternative Routes to High Efficiency in HPLC", *J. High Resol. Chromatogr. & Chromatogr. Commun.*, 10 (1983), 106-107.
12. HALÁSZ, I. e MALDENER, G., "Packing Method for Coupled Macrobore Liquid Chromatography Columns", *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1842-1847.
13. MENET, H. G.; GAREIL, P. C. e ROSSET, R. H., "Experimental Achievement of One Million Theoretical Plates with Microbore Liquid Chromatographic Columns", *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1770-1773.

14. HENRY, R. A.; GARVER, J. e ROMESBERG, R., "Performance and Potential of Series-Coupled Columns in Liquid Chromatography", Newsletter, 3(1990)1-11.
15. WELSCH, T.; DORNBERGER, U. e LERCHE, D., "Selectivity Tuning of Serially Coupled Columns in High Performance Liquid Chromatography", J. High Resol. Chromatogr. & Chromatogr. Commun., 16 (1993)18-26.
16. ANAZAWA, T. A., "Imobilização por Radiação Gama de Fase Estacionária Líquida sobre Suporte de Sílica para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)", Tese de Mestrado, Instituto de Química da Unicamp, Campinas, S.P., 1990.
17. HESPANHOL, M. C., "Estudo da Imobilização, Via Radiação Gama da Fase Estacionária Líquida, Polimetiloctadecilsiloxano, sobre Suporte de Sílica para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)", Tese de Mestrado, Instituto de Química da Unicamp, Campinas, S.P., 1993.
18. MILLER, J. M. "Chromatography: Concepts and Contrasts", John Wiley & Sons, New York, 1988.
19. SNYDER, L. R., "Practical HPLC Method Development", John Wiley & Sons, New York, 1988.
20. COLIN, H. e GUIOCHON, G., "Introduction to Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", J. Chromatogr., 141(1977)289-312.
21. MELANDER, W.; STOVEKEN, J. e HORVÁTH, C., "Stationary Phase Effects in Reversed-Phase Chromatography. I - Comparison of Energies of Retention on Alkyl-Silica Bonded Phases", J. Chromatogr., 199(1980)35-36.
22. NAHUN, A. e HORVÁTH, C., "Surface Silanols in Silica-Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases. I - Dual Retention Mechanism in Reversed-Phase Chromatography", J. Chromatogr., 203(1981)53-63.
23. NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E., "Planejamento e Otimização de Experimentos", Editora da Unicamp, Campinas, 1995.
24. BRUNS, R. E. e FAIGLE, J. F. G., "Quimiometria", Química Nova, 8(1985),84-99.
25. RIGHEZZA, M. e CHRETIEN, J. R., "Factor Analysis and Experiment Design in High-Performance Liquid Chromatography. X. Chemometric Characterization of Packings, Solvents and Solutes with Hierarchical Ascending Classification and Correspondence Factor Analysis", J. Chromatogr., 556(1991)393-411.

26. SCHMITZ, S. J. ZWANZIGER, H. e ENGELHARDT, H., "Characterization of Reversed Phases by Chemometric Methods", *J. Chromatogr.*, 544(1991)381-391.
27. KELLER, H. R.; KIECHLE, P.; ERNI, F.; MASSART, D. L. e EXCOFFIER, J. L., "Assessment of Peak Homogeneity in Liquid Chromatography Using Multivariate Chemometric Techniques", *J. Chromatogr.*, 641(1993)1-9.
28. SILVA, I. C. E., "Otimização Quimiométrica de Métodos de Separação", Tese de Doutorado, Instituto de Física e Química, USP, São Carlos, S.P., 1993.
29. DONDI, F.; KAHIE, Y. D.; LODI, G.; RESCHIGLIAN, P.; PIETROGRANDE, C.; BIGHI, C. e CARTONI, G. P. , "Comparison of the Sequential Simplex Method and Linear Solvent-Strength Theory in HPLC Gradient Elution Optimization of Multi-Component Flavonoid Mixtures", *Chromatographia*, 23(1987)844-849.
30. DUNN, D. L. e THOMPSON, R. E., "Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatographic Separation for Pilocarpine and Isopilocarpine Using Radial-Compression Columns", *J. Chromatogr.*, 264(1983)264-271.
31. VANDENBOSCH, C.; VANNECKE, C. e MASSART, D. L., "Optimization of the Separation of (6R) and (6S) Leucovorin [Folic Acid] and Avaluation of the Robustness of the Optimum", *J. Chromatogr.*, 592(1992) 37-41.
32. RIGHEZZA, M. e CHRETIEN, J. R., "Factor Analysis and Experimental Design in High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 556(1991)169-180.
33. WEI, J.; WEI, J. e ZHOU, X., "Computer-Aided Optimization of the Experimental Conditions for the Isocratic Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Separation of Hormonal Steroids", *J. Chromatogr.*, 552(1991)103-111.
34. LEMA, M.; OTERO, J. e MARCO, J., "Two-Parameter Mobile Phase Optimization for the Simultaneous High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Dopamine, Serotonin[5-hidroxitryptamine] and Related Compounds in Micro-Dissected Rat Brain Nuclei", *J. Chromatogr.*, 547(1991)113-120.
35. YUZHU, H.; PEETERS, A.; MUSCH, G. e MASSARDT, D. L., "Integration of Optimization Methodology with Expert Systems", *Anal. Chim. Acta*, 223(1)(1989)1-17.
36. HUNG, C. T.; LIM, J. K. C.; ZOEST, A. R. e LAM, F. L., "Optimization of High-Performance Liquid Chromatographic Analysis for Isoxazolympenicillins Using Factorial Design", *J. Chromatogr.*, 425(1988)331-341.

37. BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G e HUNTER, J. S., "Statistics for Experiments. An Introduction to Design Data Analysis and Model Building", Editora John Wiley & Sons, New York, 1978.
38. MONTGOMERY, D., "Design and Analysis of Experiments", John Wiley & Sons, New York, 1976.
39. SPENDLEY, W.; HEXT, G. R. e HIMSWORTH, F. R., "Sequential Application of Simplex Designs in Optimisation and Evolutionary Operation", *Technometrics*, **4**(1962)441-461.
40. NELDER, J. A. e MEAD, R., "A Simplex Method for Function Minimization", *Computer J.*, **7**(1965)308-312.
41. MAJORS, R. E., "Slurry Packing Microparticulate Columns", *LC*, **2**(1984)502-506.
42. VERZELE, M. e DEWAELE, C., "Low-Viscosity Solvent Packing of HPLC Columns Using the "Up-Tube" Packing Procedure", *LC-GC*, **4**(1986)614-618.
43. PERRIN, D. D. e ARMAREGO, W. F. L., "Purification of Laboratory Chemicals", 3ª edição, Pergamon Press p/c, Oxford, 1988.
44. OLSEN, J. e SULLIVAN, G. R., "Chemometric Categorization of Octadecylsilyl Bonded Phase Silica Columns Using Test Mixtures and Confirmation of Results with Pharmaceutical Compound Separations", *J. Chromatogr.*, **692** (1995) 147-159.
45. MAJORS, R. E., "Trends in HPLC Column Usage", *LC-GC*, **6**(1988)298-302.
46. TRINDADE, M. F. S., "Estudo da Influência da Radiação Gama sobre Fases Comerciais Utilizadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, S.P., 1992.
47. FREEBAIRN, K. W. e KNOX, J. H., "Dispersion Measurements on Conventional and Miniature HPLC Systems", *Chromatographia*, **19** (1984)37-47.
48. SNYDER, L. R. e KIRKLAND, J. J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2ª Edição, John Wiley & Sons Inc., New York, 1979.
49. LEONE, P. A., "Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Compostos Peralogenados do tipo $C_xBr_yCl_z$ ($x = 1$ ou 2 ; $y + z = 4$ ou 6)", Tese de Mestrado, Instituto de Química da Unicamp, Campinas, S. P., 1988.