

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Química

"Este exemplar corresponde a redação final da Tese defendida por MARIA APARECIDA FERNANDES DE LIMA e Aprovado pela Comissão Julgadora".

Campinas, 15 de dezembro de 1988

Kenneth E. Collins
PROF.DR. KENNETH ELMER COLLINS

"DESENVOLVIMENTO DE COLUNAS PARA

HPLC E MICRO-HPLC"

TESE DE DOUTORADO

Maria Aparecida Fernandes de Lima

Orientador: Prof.Dr. Kenneth Elmer Collins

Aos meus filhos Daniel e Felipe, que com seu sorriso inocente, tantas vezes, fizeram renascer em mim força e coragem para prosseguir.

Ao meu esposo pelo amor, carinho, dedicação e paciência durante todos estes anos, sem o que não teria sido possível completar este trabalho.

Aos meus pais pela enorme confiança, apoio e carinho dedicados durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Luzia e Luiz, aos meus cunhados João e Marta e aos meus sobrinhos pela grande amizade e colaboração, em especial à Mariângela pelo incentivo e à Regina por estar sempre presente e disponível.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu Orientador, Prof.Dr. Kenneth, pela amizade e compreensão.
- À Prof.Dra. Carol, pelas sugestões e discussões.
- A todos os colegas do grupo Collins pelo excelente ambiente de trabalho.
- Às amigas Martha, Eliana, Fátima, Abigail, Guadalupe, Pierina, Maria Isabel, Isabel Cristina, Cristina e Priscilla pelos "palpites" sempre benvindos.
- Ao Maurício, Sérgio e João pela amizade e ajuda durante a realização dos trabalhos práticos.
- Aos Diretores e Professores do Instituto de Química pela oportunidade e facilidades conseguidas.
- Aos funcionários do Instituto de Química pelas várias contribuições prestadas.
- À FAPESP, CNPq, CAPES e UNICAMP pelas bolsas concedidas.
- À Fundação de Tecnologia Industrial - FTI, pelas facilidades concedidas, em especial ao Dr. Daltro G. Pinatti, MSc. Carlos A. Baldan e MSc. Rosa A. Conti.
- Aos funcionários da FTI, Luiz R. Bizaio e Nacir pelas figuras; Carlos pela edição da tese; Graziela e Maria Eunice pela revisão do texto, e Sônia Mara pela colaboração.
- À Marisa pela dedicação e capricho no trabalho de datilografia e montagem da tese.
- À Maria J.G. Ayres pela grande amizade.
- A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram e apoiaram a realização deste trabalho.

Í N D I C E

| | Pág. |
|--|--------|
| CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. Fases Estacionárias | 1 |
| 2. Fases Móveis | 4 |
| 3. Interações na Fase Reversa-Aplicações | 4 |
| 4. Empacótamento de Colunas | 5 |
| a. Sedimentação das Partículas | 7 |
| b. Aglomeração das Partículas | 7 |
| c. Velocidade de Impacto das Partículas | 8 |
| d. Remoção do Solvente da Suspensão | 8 |
| 5. Métodos de Empacotamento | 9 |
| a. Via Seca | 9 |
| b. Via Úmida | 9 |
| 6. Métodos de Avaliação de Colunas para HPLC | 11 |
| 7. Dispersão Cromatográfica | 17 |
| 8. Principais Equações | 22 |
| 9. Microcolunas | 24 |
| CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 28 |
| 1. Colunas Convencionais | 28 |
| 2. Microcolunas | 38 |
| CAPÍTULO III - OBJETIVOS | 78 |
| CAPÍTULO IV - CONSIDERAÇÕES GERAIS | 81 |
| 1. Preparação das Colunas | 81 |
| a. Preparação dos Tubos Vazios | 81 |

| | |
|---|-----|
| b. Colocação dos Terminais | 82 |
| c. Seleção do Método de Empacotamento | 84 |
| d. Preparação da Bomba de Empacotamento | 85 |
| e. Empacotamento das Colunas | 88 |
| 2. Avaliação da Colunas | 90 |
| a. Aperfeiçoamento do Sistema Cromatográfico | 90 |
| b. Condicionamento das Colunas e Seleção da Fase Móvel | 92 |
| c. Determinação do Volume Morto da Coluna | 96 |
| d. Escolha da Mistura de Teste e sua Detecção | 97 |
| e. O Sistema de Injeção | 99 |
| f. O Sistema de Bombeamento | 101 |
| g. O Sistema de Detecção | 102 |
| h. O Sistema de Registro dos Cromatogramas | 107 |
| i. A Metodologia Empregada nos Cálculos | 108 |

CÁPITULO V - RESULTADOS E DISCUSSÃO 115

| | |
|--|-----|
| 1. COLUNAS CONVENCIONAIS | 115 |
| a. Escolha das Condições de Operação | 115 |
| b. Determinação do Volume Morto | 117 |
| c. Escolha do Método de Empacotamento | 120 |
| d. Uso da Região Visível | 132 |
| e. Algumas Alterações no Sistema Cromatográfico .. | 134 |
| f. Efeito do Comprimento da Coluna e do Diâmetro das Partículas | 135 |
| g. Aperfeiçoamento do Sistema de Empacotamento ... | 146 |
| g.1. O conector reservatório/coluna | 146 |
| g.2. O uso de pré-coluna durante o empacotamen- to | 147 |

| | |
|--|---------|
| g.3. A velocidade do fluxo do solvente propul sor | 148 |
| h. Aperfeiçoamento do Sistema Cromatográfico ... | 149 |
| i. Tentativas de Redução do Fator de Assimetria, As | 156 |
| j. Finalização do Estudo das Colunas Convencio nais | 159 |
| k. Comparação das Colunas Similares | 166 |
| l. Apresentação dos Resultados sob Outra Forma.. | 167 |
| m. Resultados do Acompanhamento da Eficiência da Coluna 32 | 169 |
| 2. AVALIAÇÃO DOS SISTEMA CROMATOGRÁFICO | 178 |
| 3. MICROCOLUMNAS | 194 |
| a. Primeiras Tentativas | 194 |
| b. Montagem do Sistema "Micro-HPLC" | 197 |
| c. O Emprego de Partículas de 10µm de diâmetro . | 198 |
| d. O Emprego de Material de Empacotamento Novo e os Testes com Diferentes Solventes | 201 |
| e. O Acoplamento de Microcolunas | 221 |
| CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES | 225 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 229 |

LISTA DOS SÍMBOLOS E SIGLAS

| | |
|--------------------|---|
| A | Área do Pico |
| As | Fator de Assimetria |
| α | Fator de Seletividade |
| CG | Cromatografia Gasosa |
| CL | Cromatografia Líquida |
| CLL | Cromatografia Líquido-Líquido |
| CLS | Cromatografia Líquido-Sólido |
| CPG | Cromatografia de Permeação em Gel |
| d_c | Diâmetro Interno da Coluna |
| d_i | Diâmetro Interno (genérico) |
| Dm | Coefficiente de Difusão do Sóluto da Fase Móvel |
| d_p | Diâmetro de Partícula |
| d_R | Distância de Retenção do Sóluto |
| Δd_p | Faixa de Distribuição de Tamanho da Partícula |
| Δp | Queda de Pressão |
| E | Impedância de Separação |
| ϵ_{total} | Porosidade Total da Coluna |
| ϵ_u | Porosidade Intrapartícula |
| ϵ_i | Porosidade Interpartícula |
| FEQL | Fase Estacionária Quimicamente Ligada |
| F | Vazão da Fase Móvel |
| ϕ | Fator de Resistência ao Fluxo |
| g | Aceleração da Gravidade |
| η | Índice de Performance |

| | |
|----------------|---|
| η | Viscosidade do Solvente ou Fase Móvel |
| H | Altura Equivalente a um Prato Teórico |
| h | Altura do Prato Reduzida |
| h | Altura do Pico |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| iso-ProOH | Iso-Propanol |
| I | Razão de Knox-Parker |
| K | Permeabilidade Específica da Coluna |
| k' | Fator de Capacidade |
| λ | Comprimento de Onda |
| L | Comprimento da Coluna |
| LD | Limite de Detecção |
| MeOH | Metanol |
| MPa | MegaPascal (=10 ⁶ Pa \approx 7000 psi) |
| N | Número de Pratos Teóricos ou Eficiência da Coluna |
| v | Velocidade Linear Reduzida da Fase Móvel |
| ODS | Octadecilsilano |
| p | Pressão |
| psi | Libra por Polegada Quadrada (1000psi \approx 70bar \approx 70 atm) |
| RP-8 | Fase Reversa/Octilsilano |
| RP-18 | Fase Reversa/Octadecilsilano |
| R _S | Resolução |
| ρ | Densidade |
| σ | Desvio Padrão |
| σ^2 | Variância |
| S-DVB | Poliestireno-Divinilbenzeno |
| TLC | Cromatografia em Camada Delgada |
| T | Temperatura Absoluta |

| | |
|-----------|--|
| t_0 | Tempo de Retenção de Um Soluto Não Retido |
| t_R | Tempo de Retenção do Soluto |
| u | Velocidade Linear da Fase Móvel |
| UA | Unidades de Absorvância (da Escala Total) |
| v/v | Composição da Fase Móvel (Volume a Volume) |
| V_i | Volume Injetado |
| V_0 | Volume de Retenção de Um Soluto Não Retido ou Volume Morto |
| V_p | Velocidade do Papel |
| V_R | Volume de Retenção do Soluto |
| V_3 | Velocidade de Sedimentação da Partícula |
| W | Largura do Pico |
| $W_{1/2}$ | Largura do Pico a 50% da Altura |
| PTFE | Politetrafluoretileno |
| PVC | Polivinilcloro |

RESUMO

"DESENVOLVIMENTO DE COLUNAS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC) E MICRO-HPLC"

Autora: Maria Aparecida Fernandes de Lima

Orientador: Prof. Dr. Kenneth Elmer Collins

Tese de Doutorado

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas

Caixa Postal 6154 - CEP 13081 - Campinas - SP, Brasil.

O interesse crescente em técnicas de alta resolução e a importância atual dos fatores econômicos têm levado ao desenvolvimento de colunas cromatográficas de dimensões cada vez mais reduzidas. O objetivo deste projeto é o desenvolvimento de métodos de empacotamento de colunas para HPLC, dando ênfase às colunas com diâmetro interno da ordem de 2mm, genericamente denominadas "microcolunas", visando a uma substancial economia de reagentes, sem, contudo, onerar a técnica cromatográfica.

As colunas vazias foram montadas com tubos de aço inoxidável 316, sem costura, através de cortes, tratamentos e adaptações de terminais específicos com volume morto baixo ou nulo. Os tubos conectores também foram montados em nosso laboratório, assim como os reservatórios e adaptadores para o sistema de empacotamento.

Para a preparação e avaliação das colunas realizou-se uma otimização dos sistemas de empacotamento e cromatográficos através da adaptação de conexões adequadas e da redução das dimensões dos tubos e conectores. A variância dos sistemas cromatográficos mostrou-se adequada ao emprego das colunas estudadas.

Os resultados obtidos com a avaliação e colunas preparadas com sílica gel ligada quimicamente a ODS, mostraram que altas vazões durante o empacotamento são mais críticas que

pressões muito elevadas, produzindo melhores colunas tanto para a HPLC quanto para a "Micro-HPLC". As suspensões preparadas com solventes de baixa viscosidade mostraram-se adequadas, e a densidade da mistura de solventes não se apresentou tão relevante.

O estudo da influência do diâmetro da partícula e comprimento da coluna sobre sua eficiência revelou que o comprimento ideal da coluna a ser empacotada é cerca de 15 a 18 mil vezes o diâmetro da partícula empregada (para partículas de 3, 5 e 10 μ m de sílica ODS).

Foram obtidas colunas convencionais com eficiência similar ou melhor que daquelas disponíveis no mercado, cerca de 70 mil pratos teóricos por metro para partículas esféricas de sílica ODS, - 5 μ m ($h \sim 2,8$).

A performance das colunas com diâmetro reduzido superou as expectativas. Colunas com 2mm de diâmetro empacotadas com partículas de 10 μ m apresentaram número de pratos teóricos superior a 40 mil por metro ($h \sim 2,3$).

A aplicabilidade das microcolunas mostrou-se perfeitamente viável, tanto em pesquisa quanto em rotina, permitindo o uso de equipamentos convencionais com pequenas modificações e pouquíssimo ônus, o que é rapidamente recuperado diante da economia de 80% na quantidade de fase estacionária e um consumo 20 vezes menor de fase móvel, em relação às colunas de 4,6mm de diâmetro interno.

Há ainda as vantagens com relação ao emprego de menor quantidade de amostra com a mesma sensibilidade de massa e a possibilidade do acoplamento de 2 ou mais colunas sem perdas na eficiência, permitindo a resolução de misturas complexas, como as de compostos do carbono per-halogenados.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF COLUMNS FOR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) AND FOR MICRO-HPLC

Author: Maria Aparecida Fernandes de Lima

Supervisor: Prof. Dr. Kenneth Elmer Collins

Doctoral Thesis

Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas

Caixa Postal 6154 - CEP 13081 - Campinas - SP, Brasil

The search for better chromatographic resolution, supported by its evident economic advantages, has led to the development of high performance liquid chromatographic columns of ever smaller dimensions. Thus, the objective of this project is the development of methods to prepare columns for HPLC, with emphasis on those of 2mm internal diameter, usually called "microcolumns". Such columns show considerable economies with respect to both stationary and mobile phases, without placing exacting requirements on the chromatographic equipment to be used.

Empty columns were fabricated from seamless 316 stainless steel. These were treated and fitted with special low dead volume end fittings. The connecting tubes were also made in the laboratory, as were the reservoirs and adapters for the packing system.

To better prepare and evaluate the performance of the columns, the packing and chromatographic systems used were optimized through a reduction in the connector tube dimensions and the use of zero dead volume fittings. Measurements of system variance indicate them to be adequate for the purposes of this project.

Evaluation of the different columns show that a

high flow rate during the packing is more critical to obtaining good column performance, both in HPLC and in Micro-HPLC, than is the pressure employed. Neither the viscosity or the density of the solvent used to prepare the packing suspension were found to be of high importance.

A study of how column efficiency is related to column length and to particle diameter showed that the ideal column length was about 15000 to 18000 times the diameter of the particles used (for particles of 3, 5 and 10 μ m of silica -ODS).

The conventional columns packed during this study had efficiencies similar to or better than those commercially available, reaching 70000 theoretical plates per meter for columns packed with 5 μ m diameter particles for silica-ODS h \sim 2,3).

For the 2mm diameter columns, with 10 μ m particles, columns were obtained with up to 40000 theoretical plates per meter, well within our expectations considering the limits imposed by the chromatographic system available h \sim 2,3).

The use of columns with reduced dimensions, such as those studied in this work, showed itself to be completely viable, both for research and for routine analysis, even with conventional equipment. To optimize performance with these columns of reduced internal diameter, a number of minor modifications must normally be made. However, the cost of such modifications is compensated by the economies of approximately 80% in the amount of stationary phase required to pack the column and of the significant (up to 20 times) reduction in consumption of mobile phase, compared to 4.6mm diameter columns. Smaller samples can be injected with the same mass sensitivity. In addition, two or more columns can be coupled to permit separation of more complex mixtures, such as mixtures of perhalogenated compounds.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A qualidade das colunas empregadas na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, HPLC, tem melhorado muito nos últimos anos. Esta evolução é o resultado de intensas pesquisas realizadas no desenvolvimento de micropartículas /1 - 8/ e de técnicas de preparação de fases estacionárias quimicamente ligadas /9 - 24/. No entanto, as tentativas de domínio da metodologia de empacotamento de colunas continuam uma constante na área da HPLC /37/.

1. FASES ESTACIONÁRIAS

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de melhorar a qualidade das fases estacionárias, especialmente com respeito à redução do diâmetro, d_p , /8, 25/ e da faixa de distribuição de tamanho, Δd_p , /4 e 7/ das partículas.

O número de novos fabricantes de fases estacionárias aumenta com frequência, mas os tipos de fases mantiveram-se constantes durante algum tempo, e só recentemente têm surgido, na literatura e no mercado, novos materiais de empacotamento para HPLC /3, 5, 17, 19, 23, 24/.

O preço da fase estacionária ou material de empacotamento cresce com a redução do diâmetro da partícula e de sua faixa de distribuição de tamanho.

Partículas de sílica gel menores que $5\mu\text{m}$ (já existem partículas de 4, 3, 2 e $1\mu\text{m}$) são usadas em colunas analíticas de alta resolução, mas exigem pressões elevadíssimas para o empacotamento. Tais materiais são muito caros e fogem aos objetivos de nosso projeto. Prepararam-se apenas algumas colunas com partículas de $3\mu\text{m}$ de diâmetro neste trabalho.

Partículas com diâmetro igual ou maior que $20\mu\text{m}$, em geral peliculares ou superficialmente porosas, são mais baratas e facilmente empacotadas através de técnicas por via seca /26/. Foram muito usadas na década passada, porém hoje são apenas empregadas na cromatografia preparativa e na preparação de pré-colunas.

Esferas porosas e rígidas de diversos diâmetros preparadas por entrecruzamento de poliestireno e divinilbenzeno, S-DVB, são empregadas na cromatografia por troca iônica e exclusão (dão baixos valores de N).

De maior interesse atualmente são as partículas totalmente porosas, com 5 ou $10\mu\text{m}$ de diâmetro, mecanicamente estáveis e constituídas de sílica gel. Podem ser irregulares ou esféricas, conforme a técnica de preparação.

Sílica gel é não apenas o mais importante adsorvente usado na Cromatografia Líquido-Sólido, CLS, ou Cromatografia Líquida por Adsorção, mas também o material básico ou suporte sólido mais empregado na preparação de fases estacionárias quimicamente ligadas, FEQL, utilizadas na Cromatografia Líquida por Partição ou Cromatografia Líquido-Líquido, CLL.

As primeiras FEQL foram preparadas por esterificação da superfície ativa da sílica gel (grupos silanóis) com

álcoois ou fenilisocianatos. Os produtos obtidos por remoção contínua da água, apresentam estruturas monoméricas com ligações $\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{R} / 27 /$. Embora apresentem rápida transferência de massa e boa seletividade, são facilmente hidrolizáveis. Outras técnicas surgiram, produzindo estruturas do tipo $\equiv \text{Si} - \text{R}$ ou $\equiv \text{Si} - \text{N} \begin{matrix} \text{H} \\ \diagup \\ \text{R} \end{matrix}$, mais estáveis hidroliticamente, porém envolvem muitas etapas de preparação, cujo controle deve ser rigoroso /10/, podendo resultar em baixo recobrimento dos silanóis livres da sílica gel, além de resíduos provenientes dos reagentes orgânicos metálicos usados.

As FEQL disponíveis no mercado são do tipo siloxano, $\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{Si} - \text{R} / 11, 28, 29 /$, preparadas através da reação dos grupos silanóis da superfície da sílica gel com organoclorosilanos ou organoalcoxisilanos. O controle do recobrimento da superfície pelo modificador orgânico é importante e depende de suas características, podendo variar entre 10 e 60%/30%.

Conforme a natureza do grupo ligado à superfície da sílica, têm-se fases com diferentes polaridade e seletividade.

Os grupos ou modificadores orgânicos mais comumente empregados são: Etil, Hexil, Octil, Octadecil, Fenil, Cloropropil, Aminopropil e Cianopropil.

Fases estacionárias polares são empregadas com solventes apolares ou menos polares que a FEQL, resultando a conhecida e mais antiga técnica denominada Cromatografia com Fase Normal, NP.

Fases apolares do tipo Octilsilano, C8, ou

octadecilsilano, ODS ou C18, são empregadas com fases móveis polares e constituem a técnica de Cromatografia com Fase Reversa, RP, o que dá origem às expressões "RP8, RP18" etc.

2. FASES MÓVEIS

As fases móveis empregadas com as FEQL, do tipo fase reversa, em geral, são misturas aquosas com solventes orgânicos de média ou alta polaridade. Os solventes mais utilizados são metanol, MeOH, e acetonitrila, ACN. Tetra-hidrofurano, THF, também é empregado, embora seja menos polar e mais caro que os anteriores.

A proporção de água na mistura varia conforme a seletividade e resolução desejadas, podendo muitas vezes ultrapassar os 50%. Além do menor preço dos solventes polares em relação aos apolares, como hexano e heptano, normalmente usados na cromatografia com fase normal, e da possibilidade de misturas com água em diversas proporções, outras vantagens podem ser destacadas, como sua menor toxidez, simples manuseio, versatilidade e ampla gama de aplicações da técnica, inclusive na realização de eluições por gradiente de solvente.

Em suma, a Cromatografia com Fase Reversa oferece uma série de vantagens e seu uso tem se intensificado a cada dia. Estima-se que perto de 90% das aplicações da HPLC situam-se na referida técnica atualmente /31/.

3. INTERAÇÕES NA FASE REVERSA - APLICAÇÕES

A retenção na Cromatografia com Fase Reversa

ocorre por interações hidrofóbicas do soluto com a fase esta
cionária.

O caráter quase universal da Fase Reversa ba
seia-se no fato de as moléculas orgânicas apresentarem região hi
drofóbica em sua estrutura, que interage com a fase estacioná-
ria, tornando a técnica adequada à separação de componentes de
séries homólogas e oligoméricas. Como a fase móvel é polar e
geralmente contém água, o método é também adequado às separa-
ções de moléculas polares insolúveis em solventes orgânicos ,
como é o caso de muitas amostras biológicas. Além disto, com-
postos com polaridades diferentes podem ser separados com o
emprego de eluições por gradiente. Ao contrário da retenção ,
que é função do caráter hidrofóbico da amostra, a seletividade
depende de interações específicas do soluto com a fase móvel /32/
e pode ser ajustada por variação de sua força (proporção e na-
tureza dos constituintes) /33,34/. Mais detalhes sobre o meca-
nismo envolvido na fase reversa podem ser encontrados na lite-
ratura /35, 36/.

4. EMPACOTAMENTO DE COLUNAS

Até o início da década de 80, poucos usuários
arriscavam o empacotamento de suas próprias colunas para HPLC.
Colunas eficientes só eram conseguidas se adquiridas prontas e
de fabricantes de renome. No entanto, o misticismo que envol-
via as técnicas de empacotamento tem desaparecido em nossos
dias, muito embora os novatos no ramo aprendam, rapidamente ,
que a obtenção de colunas estáveis e reprodutíveis exige muito
mais que a simples reprodução de uma publicação da literatura.

É possível que existam tantas diferentes técnicas de empacotamento quantos são os interessados em preparar suas próprias colunas. Muitos pesquisadores concordam que o "Empacotamento de Colunas" é muito mais arte que ciência.

Uma análise dos diversos métodos de empacotamento de colunas para HPLC, descritos na literatura, deixa bem claro que não há um método universal nem uma fórmula mágica capazes de produzir colunas sempre com o mesmo nível de excelência. A qualidade das colunas depende não apenas da metodologia empregada mas também do material de empacotamento e da habilidade do usuário da técnica/37/

O desenvolvimento tecnológico de equipamentos de alta pressão muito tem contribuído à metodologia de empacotamento de colunas, ao lado da produção de acessórios, com baixo ou nenhum volume morto, empregados como terminais ou conexões para colunas de HPLC.

Os primeiros métodos de empacotamento de colunas, por via úmida, para micropartículas à base de sílica com diâmetro, d_p , menor que $10\mu\text{m}$, foram publicados no início dos anos 70 / 83-84/.

Na época das primeiras publicações só existiam partículas irregulares, empregadas na Cromatografia em Camada Delgada, TLC, produzidas por classificadores a ar /38/ ou elutriação por solvente /39/. A faixa de distribuição de tamanho destas partículas era grande e comumente formavam-se "finos" (partículas com $d_p < 1\mu\text{m}$) durante o processo de preparação. Partículas com diâmetro muito pequeno causam alta queda de pressão durante o procedimento analítico, reduzindo o tempo

de vida das colunas. Partículas com d_p muito grande reduzem a eficiência.

Ao longo dos anos, ocorreu grande evolução na qualidade das partículas e foram sintetizadas as esféricas, totalmente porosas, com uma distribuição de tamanho relativamente estreita, através de técnicas de polimerização homogênea, sem a necessidade de posterior separação /40/.

Mesmo quando se empregam partículas de alta qualidade e estreita Δd_p , muitas precauções devem ser tomadas, principalmente com relação aos seguintes parâmetros:

a) Sedimentação das Partículas

A velocidade de sedimentação de partículas numa suspensão, V_s , é dada pela equação de Stokes /84/:

$$V_s = \frac{d_p^2 g (\rho_p - \rho_L)}{18\eta} \quad (\text{cm/s}) \quad (01)$$

onde:

g é a aceleração da gravidade (cm/s^2)

ρ_p é a densidade da partícula (g/cm^3)

ρ_L é a densidade do líquido (g/cm^3)

η é a viscosidade do líquido (poise)

A equação de Stokes sugere que a escolha de solventes densos e/ou viscosos é um parâmetro relevante para partículas com grande diâmetro ($d_p > 10\mu\text{m}$) ou com larga Δd_p .

b) Aglomeração das Partículas

A área superficial das partículas aumenta com a diminuição do seu tamanho. Durante o empacotamento sob alta

pressão, as partículas são dotadas de grande velocidade. O atrito entre as partículas e com as paredes do reservatório, conexões e coluna gera cargas eletrostáticas, podendo formar aglomerados que impedem a sedimentação individual das partículas no leito da coluna. Tais agregados causam redução na eficiência. Deve-se evitar o uso de misturas aquosas na preparação das suspensões, pois provocam cargas negativas na superfície da sílica, formando aglomerações.

c) Velocidade de Impacto das Partículas

Deve haver um compromisso entre a velocidade de impacto das partículas no leito da coluna em preparação e o tempo que cada partícula leva para ocupar sua posição no interior da coluna. Assim, embora haja necessidade de elevada energia cinética para as partículas, cada uma delas deve ter tempo suficiente para se "alojar" antes que outra se choque com ela, causando riscos de formação de aglomerados, vazios ou canais no leito da coluna.

d) Remoção do Solvente da Suspensão

Várias características dos solventes empregados no empacotamento de colunas devem ser observadas. Entre elas, destacam-se a facilidade de remoção após o processo e a não reatividade com o material de empacotamento. Quando se deseja preparar colunas para Cromatografia com Fase Reversa, ou seja, materiais de empacotamento apolares, deve-se dar preferência a solventes polares, cuja polaridade se assemelhe à da fase móvel, facilitando sua remoção após o empacotamento e prevenindo reações indesejáveis.

5. MÉTODOS DE EMPACOTAMENTO

a) Via Seca

Materiais de empacotamento peliculares, com partículas rígidas e $d_p > 20\mu\text{m}$, em geral, são empacotados através de técnicas por via seca (Método do "Encher-Bater"). Tais técnicas empregam batidas verticais da coluna sobre uma mesa com força e frequência controladas produzindo colunas reproduzíveis e de boa qualidade. Existem equipamentos destinados a esta técnica que permitem operações reproduzíveis com muito menos esforço e grande economia de tempo.

b) Via Úmida

Partículas com $d_p < 20\mu\text{m}$ devem ser empacotadas por via úmida, pois, quanto maior a área superficial, maior será a probabilidade de formação de cargas eletrostáticas por via seca.

As técnicas por via úmida fundamentam-se na filtração de uma suspensão do material de empacotamento em um líquido adequado ("slurry") sob pressão elevada.

A suspensão colocada em um reservatório é forçada a percolar através da coluna por ação de um solvente pressurizado, que denominamos **solvente propulsor**. Na extremidade oposta da coluna, o material de empacotamento é retido por um filtro, acumulando-se ali até formar o leito da coluna. O solvente, que passa através do filtro, é coletado, podendo ser recuperado e/ou reciclado. A pressurização do solvente é feita, geralmente por uma bomba pneumática movida a gás (N_2), que opera a pressão constante. Há também equipamentos de vazão cons

tante, cuja eficácia é defendida por alguns autores.

O sentido do empacotamento também é motivo de controvérsia entre alguns pesquisadores.

O parâmetro mais polêmico é, sem dúvida, a seleção do solvente da suspensão.

Dependendo das características do solvente em pregado, quatro técnicas básicas podem ser enumeradas:

- Densidade balanceada ou ajustada
- Alta viscosidade
- Suspensão estabilizada
- Baixa viscosidade

As duas primeiras foram muito empregadas na década de 70, quando a Δd_p do material de empacotamento era muito larga. Hoje, principalmente para partículas com $d_p < 5\mu\text{m}$, não se faz necessária a preocupação com sua rápida sedimentação, pois a Δd_p reduziu-se com o avanço da tecnologia de preparação destes materiais, de 0,5 - 1,0 para 0,1 - 0,2.

Por outro lado, técnicas envolvendo alta viscosidade exigem pressões mais elevadas para o empacotamento e são desaconselháveis se não forem realmente necessárias.

As características mais negativas destas duas técnicas situam-se na alta toxicidade da maioria dos solventes empregados, nos elevados preços, nas dificuldades de remoção e nas possibilidades de reação com as fases estacionárias, em especial com as quimicamente ligadas.

A terceira técnica, suspensão estabilizada, é mais empregada para sílica não modificada, embora algumas ten-

tativas tenham sido feitas com FEQL /100, /.

Atualmente, o que se percebe na literatura é uma mistura das diferentes técnicas, muitas vezes sem um mínimo de embasamento teórico, meras modificações das primeiras técnicas que foram publicadas, porém aplicadas a situações totalmente diferentes.

O uso de eletrólitos é recomendado por alguns autores /41/ no empacotamento de colunas para cromatografia com fase reversa, para evitar a formação de cargas na superfície modificada por hidrocarbonetos.

O emprego de solventes com baixa viscosidade permite a obtenção de elevada velocidade de fluxo já no início do empacotamento, conferindo alta energia cinética às partículas; no entanto, estas características quase não são exploradas na literatura /42/.

Mais detalhes sobre o empacotamento de colunas são discutidos neste trabalho na revisão bibliográfica, Capítulo II e Considerações Gerais, Capítulo IV.

6. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DE COLUNAS PARA HPLC

Apesar de sugestões de novas formas de avaliação para as colunas cromatográficas /43/, a maneira mais empregada ainda é através do Número de Pratos Teóricos, N .

Antes que uma coluna seja colocada em operação, em análises de rotina ou pesquisa, deve-se testá-la.

Bidlingmeyer e Warren /44/ publicaram um interessante artigo onde discutem diferentes formas para a reali

zação dos cálculos de obtenção da eficiência de uma coluna para HPLC. Os autores partem de uma distinção ente EFICIÊNCIA e PERFORMANCE. Segundo eles, a performance de uma coluna depende da separação em que ela será empregada e não pode ser expressa por um único número, enquanto que a eficiência dá uma indicação da qualidade do empacotamento da coluna, através de medidas das contribuições cinéticas ao espalhamento da banda. Os efeitos extracoluna, que contribuem ao alargamento da banda, ou mesmo os fatores termodinâmicos (freqüentemente manifestados como cauda do pico), na prática, não são considerados nos cálculos da eficiência da coluna. Assim, o valor do número de pratos teóricos, na verdade, expressa apenas a performance cinética da coluna, denominada Eficiência, N.

A consideração acima justifica a escolha dos solutos considerados "ideais" para a avaliação da coluna. Uma vez que apenas a performance cinética tem interesse, os solutos não devem interagir com as fases móvel e estacionária, apresentando, portanto, um comportamento termodinâmico ideal.

Devido a considerações de que o pico resulta do espalhamento da banda, com uma distribuição Gaussiana da concentração do soluto entre as fases móvel e estacionária, o cálculo do número de pratos teóricos baseia-se no modelo Gaussiano. Assim, a eficiência, N, de uma coluna é convencionalmente definida por:

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

onde t_R é o tempo de retenção do pico e σ^2 é a variância para

a medida do pico em unidades de tempo (a variância é, por definição, igual ao quadrado do desvio padrão, σ , de uma medida).

Diferentes larguras do pico podem ser relacionadas à variância de acordo com a relação:

$$w^2 = a \sigma^2 \quad (3)$$

onde a é uma constante que depende da altura do pico em que a largura é medida.

Pode-se escrever, então:

$$N = a \frac{t_R^2}{w^2} \quad (4)$$

Esta é a equação básica para os métodos comumente empregados para o cálculo da eficiência da coluna ou performance cinética..

A figura I.1 mostra a relação entre o pico de perfil Gaussiano, a altura em que a largura é medida e o valor da constante a na equação 4, para seis possíveis determinações de N .

Dos métodos sugeridos na figura I.1, o mais amplamente empregado é o da "Meia Altura" /45/, devido à facilidade na determinação da posição da medida (50% da altura do pico), tornando-o muito reprodutível (é o método usado neste trabalho).

O método de inflexão (2σ) é o que menos "sente" a assimetria do pico; por outro lado, o método que usa a largura a 4,4% da altura do pico (5σ) é o que sofre maior in

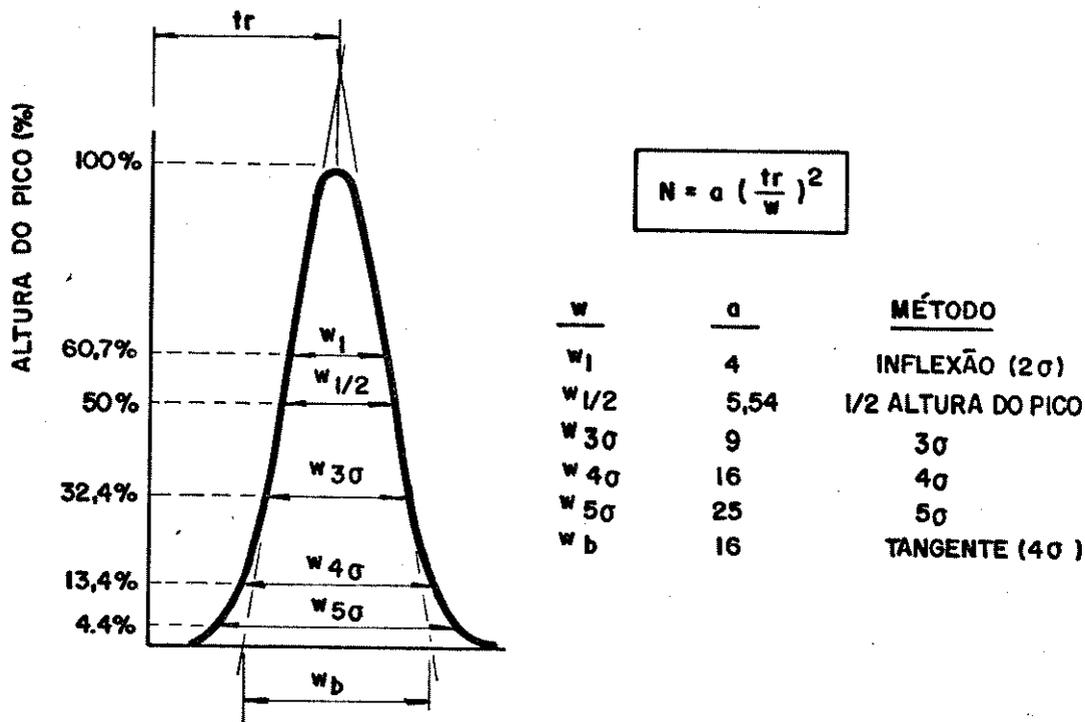


Figura I.1 - Relação entre a Largura do Pico, w , e a Constante a , para Diferentes Alturas do Pico de Forma Gaussiana Empregadas no Cálculo de $N/44/$

fluência da distorção do pico.

Outros métodos são discutidos por Bidlingmeyer e Warren /44/ e por Colmsjö e Ericsson /45/. O Método do Momento, onde não são feitas considerações com relação à forma do pico, fundamenta-se na determinação de momentos estatísticos e exige o uso de microcomputadores e técnicas de aquisição de dados. Este método é considerado o mais exato, justamente por não se basear em um perfil ideal do pico /44/.

Os métodos baseados na assimetria são aproximações do Método do Momento, empregando modelo Gaussiano modificado exponencialmente.

Finalmente, tem-se o método da razão Altura/Área, às vezes empregado pelos usuários da HPLC, mormente por aqueles que dispõem de integradores interfaceados a seus equipamentos. Neste caso, vale uma ressalva: alguns principiantes na área cromatográfica costumam usar este método e consideram a área do pico Gaussiano como se fosse a área de um triângulo $[(b.h)/2]$. No entanto, a área de um pico Gaussiano, A , é função de seu desvio padrão, σ , e de sua altura, h :

$$A = \sqrt{2\pi} \sigma h \quad (5)$$

Combinando as equações 2 e 5 tem-se:

$$N = \frac{2\pi (ht_R)^2}{A^2} \quad (6)$$

Bristow e Knox /46/ sugerem o uso dos parâmetros reduzidos para facilitar as comparações entre diferentes

colunas, materiais e métodos de empacotamento. Fazem uma revisão dos procedimentos de teste, enumeram muitas recomendações para o sucesso na avaliação e sugerem uma padronização para os testes. Defendem a premissa de que a mistura de teste deve ser selecionada para mostrar o melhor da coluna.

Entre os parâmetros reduzidos ou quantidades adimensionais, sugeridos por Bristow e Knox /46/, destacam-se:

$$\bullet \text{ Altura de prato reduzida : } h = \frac{H}{d_p} \quad (7)$$

$$\bullet \text{ Velocidade linear reduzi} \\ \text{da do eluente (FM) : } v = \frac{ud_p}{D_m} \quad (8)$$

$$\bullet \text{ Resistência da coluna : } \phi = \frac{\Delta p d_p^2}{L \eta u} \quad (9)$$

As principais vantagens do uso destes parâmetros em lugar dos similares absolutos, altura equivalente a um prato teórico, H , velocidade linear da fase móvel, u e permeabilidade da coluna, K , são as facilidades na comparação dos resultados de colunas contendo materiais com diferentes tamanhos de partícula, ou avaliadas com diferentes solventes ou solutos. Além disto, a padronização de "alta performance" torna-se facilmente estabelecida.

Assim, boas colunas devem ter h em torno de 3 para v na faixa de 5, enquanto que ϕ não deve exceder a 1000.

Para se obter a altura de prato reduzida, h , como pode ser constatado através da equação 7, necessita-se

do valor de H e este, por sua vez, é relacionado a N através da equação:

$$H = \frac{L}{N} \quad (10)$$

Portanto, qualquer que seja o caminho escolhido, a obtenção de N é sempre a primeira preocupação.

7. DISPERSÃO CROMATOGRÁFICA

A coluna cromatográfica é um operador de função Gaussiana. O soluto, durante sua passagem através da coluna, deve sofrer um "espalhamento" com uma distribuição uniforme. Mas, na prática, isto raramente ocorre, resultando erros significativos nos cálculos onde são feitas tais considerações. Então, o modelo Gaussiano só é apropriado quando o grau de assimetria do pico for bastante reduzido.

A assimetria do pico é o resultado das diferentes dispersões devido às fontes cromatográficas e às fontes instrumentais.

As fontes cromatográficas de dispersão são relacionadas à natureza e qualidade das colunas e podem ser resumidas em:

1. Resolução incompleta
2. Processos de cinética lenta
3. Reações químicas
4. Defeitos no interior da coluna

As principais fontes instrumentais de dispersão podem estar relacionadas a:

1. Válvula de injeção
2. Tubos e conexões
3. Sistema de detecção

Não é possível determinar cada dispersão individualmente, mas pode-se obter a somatória delas, o que nos dá o valor da "Variância Total" - σ^2 .

A largura de um pico, na altura da linha de base, é igual a 4σ , onde σ é o desvio padrão (ver fig. I.1). A variância total sentida pelo detector é σ^2 e pode ser escrita como:

$$\sigma^2 = \sigma_c^2 + \sigma_s^2 \quad (11)$$

onde:

σ_c^2 = Dispersão devido à coluna

σ_s^2 = Dispersão devido ao sistema cromatográfico ou "Variância extracoluna"

Pode-se escrever ainda:

$$\sigma_s^2 = \sigma_i^2 + \sigma_t^2 + \sigma_d^2 \quad (12)$$

onde:

σ_i^2 = Dispersão devido ao sistema de injeção

σ_t^2 = Dispersão devido aos tubos e conexões

σ_d^2 = Dispersão devido ao sistema de detecção

A concepção proposta por Klinkenberg /47/ e aceita hoje pelos cientistas ligados à área cromatográfica é a de que a variância do sistema, σ_s^2 , seja, no máximo, 10% do

valor da variância total, σ^2 .

$$\sigma_s^2 = 0,1 \sigma^2 \quad (13)$$

Isto corresponde a um incremento de cerca de 5% no valor do desvio padrão, σ . Valores superiores causariam redução significativa na eficiência da coluna, comprometendo sua resolução.

Van Deemter et al /48/, deduziram uma relação entre a altura equivalente a um prato teórico, H , e a velocidade linear da fase móvel, u , cuja forma mais simples é:

$$H = A + B/u + (C_m + C_s)u \quad (14)$$

onde:

A é a contribuição dos caminhos múltiplos

B é a contribuição da difusão longitudinal, e

C é a contribuição da resistência total à transferência de massa nas fases móvel e estacionária aos processos dispersivos.

A figura I.2 apresenta a forma da curva $H \times u$ evidenciando as diversas contribuições ao espalhamento da banda.

A equação 14 mostra que a soma de todos os processos dispersivos contribui para a dispersão total da banda do soluto, que pode ser expressa como a variância por unidade de comprimento da coluna, σ^2 , considerada como a altura equivalente a um prato teórico, H .

Depois de Van Deemter /48/, muitos pesquisadores discutiram a validade da equação 14, entre eles Giddings/49, 50/, Huber et al/51,52/, Knox et al/53,54/, Horvath e Lin /55, 56/, Kirkland /57/ e Knox e Scott /58/ introduzindo novos ter

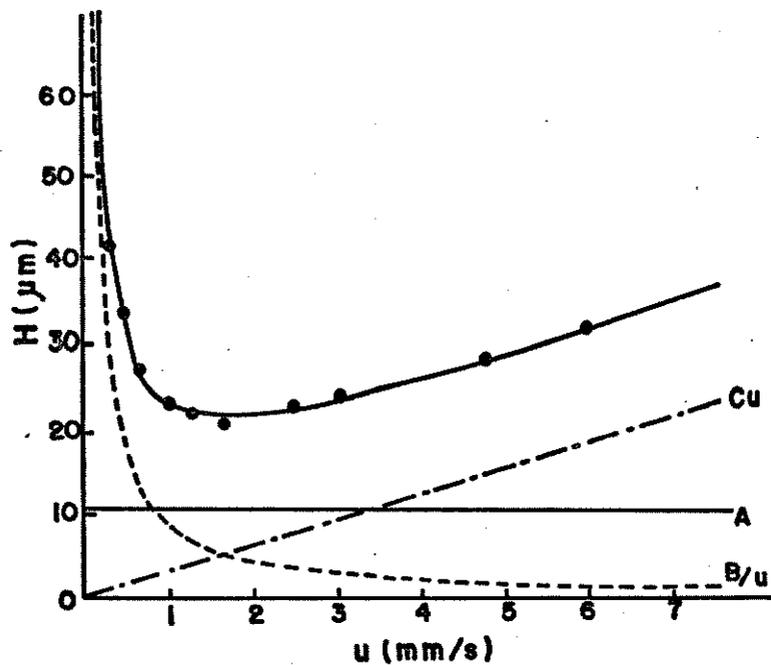


Figura I.2 - Relação entre Altura Equivalente a um Prato Teórico, H , e a Velocidade Linear da Fase MÓvel, u .

mos e modificações. No entanto, até hoje há controvérsias e o assunto continua despertando o interesse, principalmente na área de "microcolunas", colunas com diâmetro reduzido, uma vez que a equação 14 não prevê qualquer dependência da variância com o raio da coluna. Nos últimos anos, tem aumentado o número de trabalhos na literatura relacionados à dispersão, não só causada pela coluna, mas também pelo sistema cromatográfico. Este interesse crescente deve-se ao desenvolvimento de colunas com diâmetro cada vez menor e a conseqüente necessidade de equipamento com baixa dispersão para ser empregado com tais colunas. Em geral, a preocupação dos pesquisadores está voltada para a determinação da contribuição das diferentes partes de um cromatógrafo a líquido ao espalhamento da banda, ou seja, a variância extracoluna /59-68/. Cada componente pode contribuir com cerca de 30% da variância do sistema cromatográfico:

$$\sigma_i^2 \sim \sigma_t^2 \sim \sigma_d^2 = \sigma_s^2/3 \quad (15)$$

Para se otimizar um sistema cromatográfico, é preciso estimar quantitativamente a dispersão extracoluna que pode ser tolerada sem que haja perda significativa da eficiência da coluna. Neste trabalho, a determinação experimental das diversas contribuições à variância total, σ^2 , é detalhada no Capítulo V. Para uma coluna padrão, de comprimento 25cm e diâmetro 4,6mm, empacotada com partículas de 10 μ m de diâmetro e eficiência N, pode-se escrever:

$$\sigma_s^2 = 0,1 \sigma_c^2 \quad (16)$$

$$\sigma_C^2 = V_O^2/N \quad \text{ou} \quad \sigma_C^2 = V_R^2/N \quad (17)$$

Encontra-se que a máxima dispersão em unidades de volume é $8\mu\ell$ e portanto, a variância máxima será de $64\mu\ell^2$. Mas para uma coluna de 1mm de diâmetro e mesmo comprimento, a variância extracoluna máxima será de $0,15\mu\ell^2$.

Estes resultados indicam que o equipamento cromatográfico a ser empregado com colunas de diâmetro reduzido deve ter uma dispersão total muito menor que aquele utilizado para as convencionais.

Scott et al /69/, Capítulos I e II, apresentam uma completa discussão, indicando, inclusive, como estimar cada uma das variâncias individualmente. Mostram também que o comprimento da coluna é determinado apenas pelo fator de seletividade, α , e diâmetro das partículas, d_p , para um dado sistema, enquanto que o mínimo diâmetro da coluna, d_c , depende da dispersão do equipamento. Assim, a total otimização de um sistema cromatográfico exige que as propriedades físicas de uma coluna sejam relacionadas às características do sistema. Por exemplo, se a dispersão do equipamento for grande, deve-se aumentar o diâmetro da coluna para compensar as deficiências do sistema.

8. PRINCIPAIS EQUAÇÕES

De uma forma geral, os parâmetros cromatográficos de interesse podem ser inter-relacionados através das equações a seguir:

luna Eficiência ou Número de pratos teóricos da co

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (18)$$

Velocidade linear da fase móvel

$$u = L/t_o \quad (19)$$

Fator de capacidade da coluna

$$k' = \frac{t_R - t_o}{t_o} \quad (20)$$

Resolução

$$R_s = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(W_1 + W_2)} \quad (21)$$

Fator de seletividade

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_o}{t_{R1} - t_o} = \frac{k'_2}{k'_1} > 1 \quad (22)$$

Queda de pressão

$$\Delta p = \frac{\phi \eta}{t_o} = \frac{\phi \eta L}{t_o d_p^2} \quad (23)$$

Permeabilidade cromatográfica

$$K = \frac{u \eta L}{\Delta p} \quad (24)$$

Índice de performance /70/

$$\pi = \frac{N^2}{t_R \Delta p} \quad (25)$$

Impedância de separação /71/

$$E = \frac{l}{\pi \eta (1+k')} = h^2 \phi = \frac{H^2}{K} \quad (26)$$

E ainda:

A razão de Knox-Parker

$$I = \frac{d_c^2}{L d_p} \quad (27)$$

A porosidade total da coluna

$$\epsilon_{total} = \frac{F t_0}{\pi r^2 L} = \frac{F}{\pi r^2 u} \quad (28)$$

$$\epsilon_{total} = \epsilon_u + \epsilon_i \quad (29)$$

9. MICROCOLUNAS

As colunas mais amplamente empregadas na HPLC atualmente têm comprimentos entre 100 e 300mm. O diâmetro mais comum é o de 4,6mm. Estas colunas, denominadas "convencionais", são empregadas a vazão típica de 1ml/min.

A tendência na redução das dimensões da coluna acentuou-se no final da década passada, objetivando a obten

ção de colunas mais eficientes e com maior resolução, a exemplo da cromatografia gasosa /72/.

Por outro lado, a redução nas dimensões da coluna torna a técnica cromatográfica muito mais econômica. A quantidade de fase estacionária gasta no empacotamento de colunas de 2mm de diâmetro interno é cerca de 20% daquela necessá-ria para colunas de 4,6mm de mesmo comprimento. O consumo de fase móvel é 20 vezes menor, pois as análises são feitas a vazão típica de 50 μ l/min.

Outros incentivos ao desenvolvimento de microcolunas são a capacidade de alta resolução, elevada eficiência e a possibilidade de interfacear com detectores que requerem pequeno volume de amostra, como o espectrômetro de massa.

Como o volume do pico obtido com microcolunas é também muito pequeno, a sensibilidade de massa é bastante elevada e permite o trabalho com amostras em quantidades limitadas.

As mesmas características que tornam a técnica vantajosa, por outro lado, exigem certos requisitos do equipamento utilizado, e requerem colunas muito bem empacotadas e equipamentos com baixíssima dispersão /65, 73-77/.

Devido ao pequeno volume do pico, defeitos no empacotamento serão muito mais facilmente evidenciados através de distorções da forma do pico e perda no número de pratos teóricos.

Se a contribuição extracoluna ao espalhamento da banda for significativa os defeitos no leito da coluna

não serão refletidos na forma do pico.

Em suma, muitas precauções devem ser tomadas tanto durante o empacotamento das colunas de diâmetro reduzido, quanto com relação ao equipamento cromatográfico empregado na sua avaliação /69/.

Muita confusão com relação à terminologia destas colunas é encontrada na literatura.

Novotny /78/ procurou classificar os diferentes tipos de colunas, e Basey e Oliver /79/ sugeriram uma designação geral para eliminar os muitos termos que apareceram.

Knox /80/ estabeleceu uma versão da equação de Van Deemter para microcolunas:

$$h = Av^{1/3} + B/v + Cv \quad (30)$$

onde A, B e C são os coeficientes de Knox, análogos aos de Van Deemter.

O máximo número de pratos teóricos, $N_{\text{máx}}$, será alcançado quando a coluna de comprimento L for operada à velocidade linear ótima, v_o , onde a altura de prato reduzida será mínima, $h_{\text{mín}}$.

E $N_{\text{máx}}$ será igual a $L/2d_p$.

Para microcolunas a vazão é bastante baixa e o valor de v_o é muito pequeno, o que torna o termo Cv negligenciável ($C < 0,1$).

Como a condição de v_o é obedecida para $h_{\text{mín}}$, pode-se diferenciar a equação 30 e igualar a zero resultando:

$$v_o = \left(\frac{3B}{A} \right)^{3/4} \quad (31)$$

$$h_{\text{mín}} = \frac{4}{3} (3A^3 B)^{1/4} \quad (32)$$

logo: $v_o \cdot h_{\text{mín}} = 4B \quad (33)$

O termo B não varia muito com diferentes colu
nas e vale, em geral, 1,5.

Pode-se escrever então:

$$v_o \cdot h_{\text{mín}} = 6 \quad (34)$$

Assim, pode-se estimar experimentalmente o va
lor de A. Boas colunas tem A em torno de 2.

CAPÍTULO II

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. COLUNAS CONVENCIONAIS

A escolha da técnica adequada ao empacotamento de colunas para HPLC depende muito da natureza e do tamanho das partículas empregadas. Materiais utilizados, tais como, tubos vazios, conexões e terminais também exercem grande efeito. A meta final é um leito denso e compacto sem estruturas deformadas, vazios, canais ou aglomerados com uma distribuição uniforme das partículas em toda a extensão da coluna.

As primeiras colunas empacotadas para HPLC seguiram procedimentos básicos para colunas da cromatografia líquida a baixa pressão ou meras adaptações de métodos usados para o empacotamento de colunas para a cromatografia gasosa.

O empacotamento era feito "a seco", sem quaisquer cuidados ou técnicas especiais, apenas por introdução da fase estacionária nos tubos vazios, com uma das extremidades fechada, através de um funil adequado às dimensões das colunas.

Uma das primeiras tentativas de automação /81/ em 1964 usou um procedimento por via úmida que consistiu, basicamente, na preparação de uma suspensão da fase estacionária em solução tampão e transferência para um funil de separação acoplado a um agitador mecânico e a um sifão de PVC que, por sua vez, foi ligado à coluna. Esta técnica representou um grande avanço nos procedimentos usados até então por via seca, ou mes

mo por via úmida, baseados em filtrações da suspensão por ação da gravidade, porém com adições manuais sem controle da quantidade ou da velocidade de adição da fase estacionária. A técnica empregada mostrou ainda que a qualidade da coluna empacotada dependia da velocidade de agitação, da sifonação e da concentração da suspensão.

Maiores avanços ocorreram na década de 70. De talhes de um procedimento de empacotamento foram descritos /82/, comparando o comportamento de fases estacionárias constituídas de partículas superficialmente porosas (Zipax e Corasil) com aquelas totalmente porosas, no caso, quimicamente ligadas que acabavam de surgir no mercado de micropartículas na época (Dura pack). O procedimento descrito caracterizou-se por um pré-empacotamento a seco, com adição de pequenas quantidades de fase estacionária de cada vez e com suaves "batidas" nas laterais da coluna, enquanto se deixava cair a coluna de uma certa altura ("socar"). Uma vez cheia, a coluna foi "socada" e "batida" lateralmente por mais 10 minutos. Após este procedimento, a coluna foi conectada a uma bomba e fez-se passar solvente, aumentando gradativamente a pressão. Observou-se que as colunas empacotadas com Zipax e Corasil produziram maior número de pratos teóricos que aquelas com fase estacionária quimicamente ligada, levando à conclusão de que a porosidade das partículas era um fator crítico.

Kirkland /83/ e depois Majors /84/, publicaram, em revistas diferentes, artigos relatando métodos de empacotamento de colunas para HPLC baseados na técnica de "densidade balanceada", com fases estacionárias quimicamente liga-

das. Foi empregada uma mistura de tetrabromoetano/percleno(21/15) para o preparo da suspensão. Após agitação em banho de ultra-som por 2 minutos, a suspensão foi transferida imediatamente para o reservatório da bomba. Completou-se o volume com água. Fez-se a conexão com a coluna e a pressurização a 5000 psi (35MPa). Após a coleta de 25ml do solvente de densidade balanceada, o conjunto foi desmontado e o reservatório enchido com metanol. Remontado o conjunto, fez-se a passagem de metanol até eliminação total da água. O procedimento foi, então, repetido com a fase móvel. As colunas preparadas por esta técnica foram comparadas àquelas empacotadas a seco e verificou-se que o método proposto produziu colunas com eficiência muito maior. Verificou-se também que procedimentos que empregam solventes comuns permitem a sedimentação das partículas por ação da gravidade, não sendo adequados a partículas porosas, principalmente se houver muita variação no tamanho das partículas. Os autores concluíram ainda que a pressão não deve ser relaxada subitamente após o empacotamento, para evitar distúrbios no leito da coluna, causando perda de eficiência. A concentração ideal para a suspensão foi cerca de 10-25% em peso. A função da água durante o empacotamento foi a de líquido separador ou pistão, entre a suspensão e o solvente propulsor. Então, se o solvente for imiscível com a suspensão, o emprego da água é dispensável. Os autores constataram que a pressurização deve ser instantânea e não gradativa. O tempo gasto para empacotar cada coluna variou entre 3 e 4 minutos, levando 30-35 minutos para o condicionamento.

Apesar de todas as vantagens apresentadas pela técnica proposta, há inconvenientes quanto ao uso dos solventes de alta densidade, especialmente os bromados, que são extrema-

mente tóxicos e de difícil manipulação, além da liberação de bromo que pode, inclusive, reagir com a fase estacionária.

Em 1974, surgiu uma técnica alternativa /85-86/ empregando o controle da viscosidade do solvente para manter o material de empacotamento em suspensão. No entanto, o aumento da viscosidade reduz a velocidade do fluxo do solvente propulsor, exigindo maior pressão de empacotamento.

Outras técnicas foram publicadas com base no controle da densidade e/ou viscosidade, porém com algumas modificações.

Cassidy et al /87/, ainda em 1974, investigaram e compararam diferentes técnicas de empacotamento de colunas para HPLC com micropartículas irregulares de sílica gel ($d_p \approx 10\mu\text{m}$), inclusive comparando as técnicas de adição incremental com a de densidade balanceada. Fez-se substituição de alguns solventes, elevou-se a temperatura de ativação de sílica gel, variaram-se as condições de agitação da suspensão, usaram-se diferentes bombas, além de outras modificações. Finalmente os autores concluíram que, para micropartículas, quanto maior for a pressão de empacotamento maior será a eficiência da coluna. Constataram que o emprego da técnica de suspensão reduz as interações entre as partículas e que a densidade do solvente empregado é um fator importante. Verificaram também que o emprego de bombas com pressão constante mostrou-se mais eficaz que o de bombas com vazão constante, e que, por sua vez, bombas movidas a gás são melhores que as de pulsação. Os autores notaram ainda que a técnica de adição incremental foi mais reprodutível; no entanto, a de densidade equilibrada produziu colu

nas mais eficientes, principalmente quando empregaram pressão constante. Interessantes foram as observações de que pressões de 2500 psi (\sim 18MPa) produziam colunas com eficiência comparável às aquelas preparadas à 4500-5000 psi (31-35MPa). Além disso, os resultados mostraram que o uso do ultra-som não era crítico, bastando uma agitação vigorosa.

Em 1975, Coq, Gonnet e Rocca /88/ empregaram tetraclorometano com o agente dispersante para vários tipos de fases estacionárias à base de sílica e alumina com partículas de 5 μ m de diâmetro.

O procedimento experimental foi praticamente o mesmo proposto por Kirkland /83/, com exceção do emprego de uma pré-coluna e do solvente pré-pressurizado entre a bomba e a coluna, o que forneceu maior reprodutibilidade nos resultados e colunas mais eficientes. Os autores constataram que a densidade do solvente, no empacotamento de partículas de 5 μ m, não era tão crítica, quanto para as partículas com diâmetro de 10 μ m ou mais.

Webber e McKerrell /89/, em 1976, propuseram um equipamento modular para o empacotamento de colunas analíticas e semipreparativas. Foram empacotadas várias colunas com micropartículas de sílica usando vários meios para a dispersão da fase estacionária. Os melhores resultados foram obtidos com tetraclorometano à pressão de 3000 psi (21MPa) e concentração de 1 a 10%.

Outras alterações e adaptações foram sugeridas, tais como o uso de duas bombas paralelas para a propulsão de iso-octano na técnica de densidade balanceada, para

o empacotamento de colunas com FEQL/90/; e o emprego de agitação da suspensão ("Dynamic Slurry") /91/.

Bristow et al /92/ empregaram metanol como solvente pré-pressurizado e na preparação de uma suspensão bem diluída, encontrando bons resultados com o emprego da técnica de empacotamento ascendente.

No mesmo ano, Little et al /93/ relataram o emprego de iso-propanol, com sucesso, na preparação de suspensões estáveis e obtenção de colunas bastante eficientes.

Ainda Bristow /94/, em 1978, publicou um trabalho sobre empacotamento de colunas preparativas (500 x 8mm) usando metanol como agente dispersante e empregando a técnica de empacotamento ascendente e descendente, o que levou à obtenção de bons resultados.

Broquaire /95/ propôs um método de preparação usando suspensão sob agitação constante e alta pressão para um rápido e simples empacotamento a pressão constante. O solvente usado para a suspensão foi o mesmo da propulsão. O sistema de empacotamento foi evacuado, abrindo e fechando a válvula de solventes antes do início da pressurização. A seguir, a pressão foi elevada para 6000psi (42MPa). Durante o empacotamento fez-se vibração da coluna. Registrou-se o fluxo até que se tornasse constante, indicando o final do empacotamento. As colunas preparadas através desta técnica apresentaram eficiência equiparável à maioria dos métodos descritos na literatura com vantagens relativas à facilidade de uso, baixo custo, rapidez e boa reprodutibilidade.

Yamauchi et al /96/ sugeriram outra alternatiu

va para contornar o problema do bromo gerado a partir do tetra bromoetano na técnica de densidade balanceada. O controle da viscosidade com ciclo-hexanol ou parafina líquida também não foi adequado para fases à base de sílica gel recobertas com nitrato de prata, pois não produziu uma boa suspensão. Empregou-se, então, hexanol-1 como agente dispersante e 10 minutos de agitação com ultra-som. Para o empacotamento foi usado benzeno com vazão decrescente, mantendo a pressão constante em 650 psi ($\approx 4,5$ MPa) por 7-8 minutos. A seguir, a coluna foi condicionada por três horas com benzeno a 450 psi (≈ 3 MPa).

Yamauchi e Kumanotami /97/, em 1981, propuseram alterações em seu próprio método, para fases estacionárias quimicamente ligadas, com partículas de $3\mu\text{m}$ de diâmetro. Empregou-se uma mistura de hexanol-1/cloreto de metileno (1:1) como meio dispersante e uma bomba de vazão constante, conseguindo uma grande melhora na eficiência das colunas assim preparadas.

No mesmo ano, 1981, Kuwata et al /98/ propuseram um método rápido para o empacotamento de colunas para HPLC, usando uma mistura constituída de vários solventes. Para tal empregaram metanol (para aumentar a dispersão), iso-propanol e ciclo-hexanol (para controlar a viscosidade) e nonipol-40 (surfatante não iônico, para estabilizar a suspensão). Usou-se um gradiente de pressão de 400 a 700 psi (2,8 a 4,9MPa) e fluxo no sentido ascendente. O solvente propulsor foi metanol e, após eluição de 15mL , o reservatório foi invertido e a coluna aquecida a 60°C . Uma vez empacotada a coluna, reduziu-se a temperatura e relaxou-se a pressão. Os autores verificaram que o reser

vatório empregado proporcionou grande economia da fase estacionária e que o uso do sentido ascendente no início do processo facilitou a introdução da suspensão sem formação de agregados no fundo do reservatório. Notaram também que os programas de pressão e temperatura auxiliaram a manutenção da vazão constante e elevada. As colunas assim preparadas mostraram-se de excelente qualidade e o método empregado apresentou boa reprodutibilidade.

Em 1982, Prusiewicz *et al* /99/ descreveram um dispositivo para o empacotamento de colunas preparativas por via seca. Foram comparadas técnicas manuais e mecanizadas para partículas com diferentes diâmetros. Os resultados foram muito dependentes da natureza e do diâmetro das partículas.

Liao e Ponzo /100/ estudaram o emprego de ácidos orgânicos como solventes na preparação da suspensão. Verificaram uma redução na aglomeração das partículas, provavelmente devido ao uso de tais solventes e conseqüente redução na atração de Coulomb entre as partículas. Foram produzidas colunas mais eficientes.

Klawiter *et al* /101 e 102/ investigaram relações entre os métodos de empacotamento e a eficiência de colunas preparativas, comparando vários procedimentos a seco, entre si, e com outros por via úmida.

Halász e Maldener /103/ propuseram uma técnica de empacotamento de colunas que, permitia a posterior conexão de duas ou mais colunas sem perda da eficiência. A técnica consistiu no uso de restritores, tubos muito finos com estrangulamento, que ofereciam grande resistência ao fluxo,

ausando queda de pressão, já durante o empacotamento. Além dos restritores, os autores empregaram também pré e pós-colunas. Foram feitas comparações entre colunas empacotadas sem e com os restritores de diferentes tamanhos. Os testes mostraram que o método proposto para o empacotamento produziu colunas que, praticamente, mantiveram a eficiência ($H \sim 3d_p$) quando acopladas, além de apresentarem excelente estabilidade.

Outros métodos surgiram na literatura, no entanto, nenhuma novidade foi apresentada, apenas modificações das técnicas de densidade balanceada e/ou viscosidade, empregando complexas misturas de solventes /104/.

Majors /105/ publicou uma revista sobre métodos de empacotamento onde ressalta as confusões e contradições encontradas.

Nos últimos anos poucos trabalhos sobre o empacotamento de colunas convencionais têm sido publicados. Aparentemente os pesquisadores se desanimaram diante de tantas dificuldades e controvérsias.

Em 1987, Verzele et al /8/ publicaram um artigo onde apresentam uma análise dos resultados médios obtidos com um grande número de colunas fabricadas para venda, por RSL-Alltech, na Bélgica, durante dois meses. Apenas os valores classificados de "aceitáveis ou muito bons" foram considerados. A tabela II.1.I resume os resultados alcançados nessa pesquisa pelos autores.

Os autores verificaram que partículas irregulares de $10\mu\text{m}$ dão maiores números de pratos que as de forma esférica de mesmo d_p , e que o inverso ocorre com as de $5\mu\text{m}$, ou

seja, N para partículas esféricas é maior que N para as irregulares.

O estudo com diversos d_p revelou que a curva $h \times d_p$ apresenta um mínimo e este ponto depende da forma das partículas. Finalmente os autores sugeriram técnicas de empacotamento ascendentes e solventes de baixa viscosidade para partículas com diâmetro muito,pequenos.

Tabela II.1.I - Números de Pratos Médio das Melhores Colunas Fabricadas por RSL, Alltech, Durante dois Meses, Conforme Ref. /8/.

| | | Eficiência, N/m, em Relação ao Pireno* | |
|----------------------|-------------------------|--|-----------------------|
| Forma das Partículas | Suporte para a FEQL-ODS | $d_p = 5\mu\text{m}$ | $d_p = 10\mu\text{m}$ |
| Esférica | RoSil | 93000 | 38000 |
| | Spherisorb | 92000 | 39000 |
| | Hypersil | 82000 | 36000 |
| | Nucleosil | 74000 | 37000 |
| Irregular | Partisil | 58500 | 35000 |
| | RSil | 58000 | 42000 |
| | LiChrosorb | 49000 | 29000 |

* $k' \sim 5$; Fase Móvel: ACN/H₂O (75/25) à Velocidade Linear Ótima /8/.

2. "MICROCOLUNAS"

A cromatografia líquida (CL) é atualmente, uma técnica bem fundamentada. A instrumentação empregada vem sofrendo profundas modificações, não só com relação à automação mas, principalmente, no sentido de torná-la uma técnica mais rápida e mais econômica, sem, contudo, reduzir sua eficiência ou resolução. Para alcançar tal meta, necessita-se de não apenas uma instrumentação otimizada, mas também de colunas cromatográficas com performance adequada. Até há pouco tempo, a teoria cromatográfica tratava apenas do efeito do comprimento da coluna e do diâmetro da partícula sobre a sua eficiência. Trabalhos mais recentes têm ressaltado a importância do diâmetro das colunas.

Horvath et al/106/ foram os primeiros pesquisadores a empregar, em 1967, colunas empacotadas com diâmetro menor que o convencional. Usaram tubos com diâmetro interno de 1mm ou menos, empregando partículas peliculares ($dp=50\mu m$), com o objetivo de separar misturas complexas, constituídas de nucleotídeos, por CL, com velocidade, resolução e sensibilidade similares às obtidas por cromatografia gasosa (CG). Obtiveram resultados promissores com um número de pratos teóricos superior a 1000 por coluna, quando o comum, na época, eram cerca de 200-300 pratos. Deve-se ressaltar que estas mesmas colunas, se avaliadas com a instrumentação disponível atualmente, teriam fornecido cerca de 10 vezes mais pratos teóricos, pois os equipamentos daquela época possuíam alta dispersão extracoluna, parâmetro que só veio à tona no final da década de 70.

Vários anos depois, em 1973, Wolf/107/ consta-

tuou que a eficiência da coluna diminuiu com a redução do seu diâmetro e estabeleceu que o menor diâmetro prático deveria ser de 2mm. O fenômeno observado ficou conhecido como "efeito das paredes". Sabe-se hoje que esta redução evidenciada por Wolf deve-se ao aumento relativo da dispersão extracoluna.

Em 1976, Scott e Kucera /108/, estudando as propriedades de exclusão da sílica gel, empregaram uma coluna de 10m de comprimento e com diâmetro interno de 1mm, empacotada com partículas de 20µm de sílica gel. Obtiveram 250 mil pratos teóricos. Este valor, comparado aos obtidos até então, mesmo para colunas convencionais, era bastante elevado, e fez com que o interesse dos pesquisadores se voltasse para a redução do diâmetro das colunas. Embora este não tivesse sido um trabalho onde a preocupação maior fosse a variação do diâmetro das colunas, ele contribuiu muito para mudar a direção das pesquisas.

Logo depois Ishi e col. /109/ publicaram uma técnica para a "miniaturização" da HPLC, introduzindo o termo "Micro-HPLC". Os autores ressaltam neste artigo, além do método de empacotamento a seleção do material usado, a preparação de celas de detecção para microfluxo, a adequação do sistema de detecção, a metodologia de vazão reduzida, a injeção de microvolumes de amostras e a realização de eluições por gradiente. Os autores discutem ainda a teoria do "espalhamento" dos componentes da amostra nos tubos conectores. Na parte experimental foram usadas colunas de (50-300) x 0,5mm, preparadas pela técnica de suspensão, com tubos de PTFE de comprimento várias vezes maior que o necessário, posteriormente cortados. A fase esta-

cionária foi suspensa em um solvente adequado e colocada em um pequeno frasco. Conectou-se uma seringa vedada fortemente ao ar ("air-tight"), com cerca de $250\mu\text{l}$, à coluna vazia que foi enchida com o solvente da suspensão. A seguir, a seringa foi mergulhada na suspensão que por sua vez foi "aspirada" até a extremidade superior da coluna, através de operação manual ou elétrica do pistão da seringa. Tampou-se a extremidade inferior da coluna com pequena quantidade de lã de quartzo (menos que 2mm) para evitar a saída da fase estacionária, e acionou-se o êmbolo da seringa para forçar a saída do solvente. Com este procedimento foi obtido um leito denso e homogêneo da fase estacionária no interior da coluna. Este método produziu colunas com boa razão de empacotamento (60 partículas: 40 vacâncias). A semitransparência do tubo de PTFE permitia observar o aspecto do leito formado, e, nos casos de defeito, a seringa era desconectada, enchida com solvente e reconectada à coluna para fazer mais pressão. Após o empacotamento, a coluna foi cortada nos tamanhos necessários, e pequenos "plugs" de lã de quartzo foram colocados na sua extremidade superior deixando um espaço de 1 - 2cm para a conexão ao tubo de saída da fase móvel.

Os autores consideram o método usado adequado para a preparação de quaisquer microcolunas cujo volume seja cerca de 1 a 2% do volume das colunas convencionais, sendo também adequado para tubos de 0,25mm de diâmetro interno. Na época sabia-se que, quando o diâmetro da coluna é diminuído para valores menores que 1mm, há um conseqüente aumento nos valores de H, chamado "efeito das paredes". Contudo, dadas as características dos tubos de PTFE, este efeito foi sensivelmente reduzido.

Ainda com relação aos experimentos de Ishi e colaboradores foram preparadas colunas com partículas esféricas de sílica (5 μ m) e com partículas irregulares de sílica quimicamente ligada a ODS (30 μ m). A coluna de fase reversa foi avaliada com metanol/água e mistura de teste constituída de hidrocarbonetos aromáticos. A detecção foi feita no UV-250nm, fornecendo valores de H entre 0,4-0,8mm. O melhor volume de injeção foi 0,2 μ l. Para colunas de 150 x 0,5mm empregou-se uma vazão de 8 μ l/min, gastando-se cerca de 200 μ l da fase móvel para a eluição dos hidrocarbonetos aromáticos (Benzeno/naftaleno/bifenila e antraceno), com razoável resolução, em 20 min, à temperatura de 15°C. O artigo não cita a pressão de operação.

Os autores determinaram também a dispersão do sistema cromatográfico construído, obtendo valores menores que 0,5 μ l para a dispersão dos tubos conectores, valores estes considerados bem pequenos, se comparados com a dispersão total do pico (alguns μ l em "Micro-HPLC"), passível de ser negligenciada.

Tsuda e Novotny /72/ estudaram um novo tipo de coluna, por analogia à CG, ao qual chamaram de "coluna microcapilar empacotada", com comprimento variando de 3 a 40m, e com diâmetro interno entre 50 e 250 μ m. Empregaram também vários diâmetros de partículas de 10 a 100 μ m. Constataram que há uma razão ótima entre o diâmetro interno da coluna e o diâmetro da partícula, cujo valor é 2. Verificaram ainda que a altura do prato H diminui significativamente com a redução do diâmetro da partícula. Para colunas com diâmetro de 70 μ m, empacotadas com partículas de 30 μ m, usou-se uma vazão da ordem de 10 μ l/min, obtendo

se valores de H em torno de $100\mu\text{m}$, e curvas H versus v com mínimos achatados, permitindo uma razoável faixa útil da vazão. Os autores não conseguiram preparar colunas com partículas menores, ressaltando a necessidade do desenvolvimento de uma tecnologia de empacotamento, por via úmida, para partículas com diâmetros menores. Discutiram ainda as dificuldades enfrentadas perante a CL, lembrando a alta resolução, rapidez e elevada sensibilidade da CG. Concluíram que era necessária uma instrumentação adequada, permitindo maior pressão e menor dispersão, em particular, celas de detecção com volume menor; e que para aumentar a resolução, as colunas deveriam ser ainda mais longas. No entanto, a técnica revelava-se promissora, permitindo a combinação com a espectrometria de massa, em função da baixa vazão empregada. Os autores empregaram apenas alumina como adsorvente (CLS), recomendando o uso de outras fases estacionárias, inclusive as quimicamente ligadas, que já começavam a surgir na época.

Em 1978, Tackeuchi /110/, sugeriu o uso do espectrômetro de massa como sistema de detecção para a "Micro-HPLC", visando à possibilidade do acoplamento direto "on line", o que até então era impossível, dado o grande volume de fase móvel empregado na HPC convencional.

Em 1979, Guiochon /111/ publicou uma extensa discussão teórica relacionada à otimização dos parâmetros cromatográficos envolvidos na preparação e operação de colunas para HPLC. Nesse trabalho, o autor cita as dificuldades relacionadas à tecnologia das colunas de uma maneira geral, principalmente o uso de pressões elevadas. Saliencia as vantagens das

colunas "microbore", apesar das limitações relativas ao espalhamento da banda por fontes extracolunas. Conclui que muitas dificuldades tecnológicas devem ser vencidas antes que as colunas capilares, ou capilares empacotadas, possam competir com as colunas empacotadas convencionais (segundo o autor, mais uma vez evidencia-se a superioridade da CG, por ser muito mais rápida e poderosa que a CL). Guiochon discute ainda os resultados experimentais obtidos por Scott e Kucera /62/ e externa suas dúvidas com relação a qualquer sucesso relacionado à "Micro-HPLC" num futuro próximo, exaltando sempre as vantagens da CG.

Scott e Kucera /62/, no artigo citado por Guiochon /111/, mostraram a possibilidade de preparação de "microcolunas" acopladas com 750 mil pratos teóricos, embora em seus experimentos tivessem usado pressão altíssima e longos tempos de análise. Sugerem a construção de um sistema de injeção de baixo volume morto e de uma cela de detecção com volume de $1\mu\text{l}$.

Em outro trabalho, publicado em 1979, Scott e Kucera /112/ descreveram um sistema de gradiente para uso com colunas "microbore" e ressaltam as vantagens da alta sensibilidade das colunas empregadas na análise de amostras biológicas e separação de compostos com baixa massa molecular, contidos no sangue.

Em 1980, Tesarick /113/ publicou um artigo sobre colunas capilares de vidro, com diâmetro interno de 30 a $200\mu\text{m}$ para HPLC, com base no conhecimento teórico e prático da CG. O autor empregou soluções de amônia e hidróxido de tetra-

metilamônio para o tratamento de vidro, obtendo uma camada de sílica gel de espessura de 0,3 a 50 μ m, o que tornou o capilar de vidro adequado ao emprego como fase estacionária de sílica, ou ao tratamento subsequente, para fixação de grupos orgânicos como fases quimicamente ligadas. Em outra publicação, Tesarick e col./114/estudaram as propriedades destas colunas.

Hermansson /115/descreveu métodos para a construção de microcolunas e "miniaturização" do sistema cromatográfico, enumerando as vantagens de colunas de diâmetro reduzido (\sim 1mm) e comparando-as às convencionais de (100-300) x (3-5)mm. O autor destaca a redução, de cerca de 20 vezes, na quantidade de fase estacionária, bem como a enorme economia de fase móvel. Enfatiza não só a elevada sensibilidade de detecção, a melhor resolução, como também a influência do volume da amostra na eficiência da separação. As colunas empregadas no trabalho experimental por ele realizado eram de 100 ou 200mm de comprimento, e diâmetro interno de 1,0 e 1,6mm, de aço inoxidável 316, tendo sido empacotadas pela técnica de suspensão com densidade equilibrada /84/, rapidamente descrita a seguir. A fase estacionária empregada foi LiChrosorb RP 18,5 μ m), em uma mistura de tetracloreto de carbono: dioxano:tetrabromoetano (15:35:13), cuja suspensão apresentou densidade 1,52g/cm³. A suspensão foi agitada no ultra-som por 5 min e transferida para um reservatório de 50 x 4,5mm, acoplado à coluna de 1mm, e comprimento de 100 a 300mm, através de um conector de baixo volume morto. O reservatório, por sua vez, foi ligado a uma bomba (Waters, modelo 6000), e o empacotamento foi feito a 34MPa (\sim 4860 psi). Produziram-se colunas de 100 x 1,0mm, com valores de H da ordem de 25 μ m para solutos com valores de k' superiores a 5,

na menor velocidade linear empregada, 0,27mm/s, ao ser usada c_{ela} de detecção com volume de 0,67mm³ (0,67µl).

Ishii e Takeuchi /116/ investigaram o efeito do material empregado nos tubos, sobre a "performance" de "ultramicrocolunas" (3-10cm x 0,12-0,15mm) e verificaram que as colunas de vidro "pirex" possuíam maior eficiência, mas eram frágeis e de difícil manipulação. Por outro lado, já se achavam disponíveis, comercialmente, tubos de sílica fundida, flexíveis e mecanicamente resistentes, além de apresentarem uma superfície inerte, possibilitando seu uso na preparação de colunas na "Micro-HPLC".

Em 1980, Scott /117/ publicou um interessante artigo, mostrando as vantagens da "coluna analítica do futuro". Devido ao fato de as colunas "microbore" serem operadas a vazões significativamente mais baixas que as das colunas convencionais, observam-se as seguintes vantagens:

1. A velocidade linear de fase móvel é relativamente alta a vazões razoavelmente baixas, permitindo grandes velocidades de separação;
2. O baixo consumo de solvente torna as colunas "microbore" muito econômicas;
3. Com a redução do diâmetro das colunas, o volume do pico se reduz proporcionalmente, aumentando a sensibilidade de detecção, isto é, pode-se injetar uma quantidade muito menor de amostra e obter-se resposta razoável. Este detalhe é de grande importância quando se trabalha com quantidades limitadas de material, como, por exemplo, nos casos de amo_s

tras biológicas.

O autor faz notar a importância do controle de dispersão extracoluna, descrevendo um sistema cromatográfico adequado ao uso, com colunas de diâmetro reduzido. Aconselha métodos comuns de empacotamento para as colunas "microbore", porém a pressões maiores que 100MPa (cerca de 15000 psi), usando a técnica de "densidade equilibrada" (25% de glicerol em metanol).

Scott verificou que, se os tubos fossem enrolados, o diâmetro da espiral não deveria ser inferior a 12cm, e que o ato de enrolar as colunas após o empacotamento causava queda no número de pratos teóricos da coluna. Além disso, colunas enroladas apresentavam um menor número de pratos teóricos. Notou que as colunas de até 25cm de comprimento eram mais facilmente empacotadas, podendo atingir até 10 mil pratos. Dos diâmetros empregados, 1,27, 1,02 e 0,76mm, com comprimento de 1m e sílica gel como fase estacionária, as colunas de 1,02mm de diâmetro interno foram as que produziram menores valores de H. Diferentes diâmetros de partículas foram empregados e as melhores colunas obtidas foram aquelas com partículas de 20 μ m.

No mesmo ano, Reese e Scott /63/ publicaram um artigo discutindo teoricamente os fatores que determinam o comprimento e o raio de uma coluna cromatográfica. Mostraram que para um dado valor de H e k', a velocidade ótima da fase móvel, o comprimento da coluna, L, é determinado pelo fator de seletividade, α , das espécies a serem separadas, enquanto que o raio da coluna, P_c , depende tanto de α quanto da variância

extracoluna, $\sigma^2_{\text{sist.}}$. Assim, o raio da coluna é o parâmetro usado para compensar as deficiências do equipamento e, ao mesmo tempo, controlar a sensibilidade de massa e economia de solvente. Examinando três cromatôgrafos comerciais, verificaram que, em todos os casos, a variância do sistema era elevada, e que o equipamento era completamente inadequado ao uso com colunas "microbore", sendo também insatisfatório para uso com colunas convencionais de 4,6mm, quando solutos com valores de k' menores que 2 eram empregados. Os autores então sugeriram mudanças no equipamento cromatográfico para reduzir a variância extracoluna a cerca de $0,2\mu\ell^2$, tornando-o adequado ao uso com colunas de 0,5mm de diâmetro interno, aumentando a sensibilidade de massa e, ao mesmo tempo, reduzindo o consumo de solvente.

O artigo é muito bom do ponto de vista teórico, por abordar questões de grande importância, e discutir com detalhes a dispersão e a variância cromatográfica. No entanto, a parte prática é pouca clara, já que mostra valores que não correspondem aos gráficos apresentados, além de fazer uma enorme confusão com relação às unidades. Conforme observação dos autores, uma coluna de 1m x 0,5mm, com 40 mil pratos teóricos requer uma variância extracoluna de $0,2\mu\ell^2$ ou menos, para atingir 90% de eficiência, com um componente com valor de k' igual a 1. A simples redução do volume da cela de detecção não resolve o problema da dispersão extracoluna, sendo necessário também reduzir a um mínimo as dispersões nos tubos conectores, filtros e sistemas de injeção, para se conseguir uma performance ótima. Uma vez solucionados os problemas da dispersão extracoluna, ($\sigma^2_{\text{sist.}} \leq 0,2\mu\ell^2$), torna-se prático o emprego de colunas capilares empacotadas ($d_i = 70\mu\text{m}$), ou até mesmo de tubos

abertos revestidos. O emprego de colunas "microbore" empacotadas com partículas de 8-10 μ m fornece altura de prato reduzida, h , de 3,2 vezes o diâmetro da partícula, à velocidade ótima de 1,5mm/s. Partículas com diâmetro menor poderiam fornecer maior eficiência absoluta, mas seu uso ainda não foi possível devido à reduzida variância da banda, necessitando equipamento com baixíssima dispersão.

Takeuchi e Ishii/118/ publicaram um outro artigo, desta vez descrevendo a aplicação de "microcolunas flexíveis" empacotadas na CL, e sua performance cromatográfica. O material dos tubos achava-se disponível no mercado e já era empregado na época, na CG. A técnica de empacotamento usada assemelhava-se à empregada pelos autores em trabalhos anteriores /116/. Tubos de sílica fundida de (50-300) x 0,25mm foram empregados para o empacotamento, usando sílica ligada quimicamente a ODS, com partículas de 5 μ m. Tubos de PTFE, com diâmetro igual ao da coluna empacotada, foram conectados em ambas as extremidades da coluna, sendo inserida lã de quartzo em uma delas.

A fase estacionária foi dispersa em acetoni-trila, por vibração ultra-sônica, aspirada, a seguir, para o interior do tubo de PTFE, e depois forçada a entrar no tubo de sílica fundida. Este procedimento foi realizado com uma seringa do tipo "air-tight", acoplada a um "micro-feeder". Após o empacotamento, a extremidade aberta da coluna foi preenchida com lã de quartzo, para evitar "sangramentos" da fase estacionária. O uso de menos que 1mm de lã de quartzo fez com que o espalhamento da banda fosse reduzido. As melhores colunas obtidas tinham 100 x 25mm valores de H em torno de 13-14 μ m, e

cerca de 74 mil pratos teóricos por metro, o que é perfeitamente comparável às colunas convencionais. As colunas menores que 50mm apresentaram menor eficiência, provavelmente devido a efeitos extracoluna, e as maiores que 300mm também não tiveram boa performance, certamente devido à não uniformidade no leito, pela dificuldade de empacotamento de colunas muito longas e alta queda de pressão. A vazão ótima para as colunas de 10cm foi da ordem de $2\mu\text{l}/\text{min}$, e o volume de injeção foi o menor possível, ficando em torno de algumas dezenas de nanolitros.

Em 1981, Guiochon/119/ publicou outro artigo, fazendo comparações entre HPLC convencional e "Micro-HPLC". Neste trabalho, destaca-se o fato de que colunas empacotadas e capilares do mesmo comprimento dão aproximadamente o mesmo número de pratos e gastam o mesmo tempo de análise, quando o diâmetro das partículas na coluna empacotada é metade do diâmetro das colunas capilares e ambas são operadas à vazão ótima. Para que as capilares possam competir com as convencionais, seu diâmetro deve ser de apenas alguns micrômetros. Mais uma vez Guiochon mostra-se cético com relação a qualquer sucesso da "Micro-HPLC" e ressalta a enorme dificuldade técnica a ser vencida para se conseguir alta eficiência. Para o autor, a maior permeabilidade da coluna capilar de tubo aberto não faz com que a "Micro-HPLC" se torne mais rápida a ponto de competir com a CG com colunas capilares, dada a negligenciável compressibilidade dos líquidos.

Não só os americanos e japoneses mostraram grande interesse na "Micro-HPLC"; também os chineses preocupa-

ram-se com as colunas de pequenos diâmetros.

Peichang Lu e col. /120/, já conhecidos na área de CG, publicaram um artigo sobre as relações entre eficiência e comprimento das colunas cromatográficas, dando ênfase às colunas com pequeno diâmetro. As colunas de sílica ($5\mu\text{m}$) usadas por eles foram adquiridas de um fabricante chinês. Colunas de vários comprimentos (11 a 250mm) e diâmetro interno de 2mm, foram testadas. A fase móvel empregada foi n-hexano, com vazão em torno de $3\mu\text{l/s}$ ($180\mu\text{l/min}$). A intenção dos autores foi mostrar que há uma relação linear entre W e $V_R\sqrt{L}$ e que, consequentemente, h é proporcional a $\sqrt{L/V_R}$. O artigo é muito sucinto; pouquíssimas informações são fornecidas com relação aos parâmetros escolhidos, e todas as referências citadas são de autores chineses, em revistas a que não temos acesso, com exceção de uma que também não elucida as dúvidas surgidas.

Em 1981, mais uma tentativa de preparação de colunas microcapilares de tubo aberto foi feita por Tsuda et al./121/. Os autores empregaram vidros capilares previamente tratados com solução alcalina sob pressão. A superfície interna modificada pode agir como adsorvente ou ser recoberta por uma fase estacionária líquida. Os autores efetuaram reações para produzir duas diferentes fases estacionárias, uma de etilenocianidrina e outra de octadecilsilano. Os sistemas de injeção e detecção foram modificados para reduzir o volume morto e, consequentemente, a dispersão cromatográfica. Duas diferentes celas de detecção foram usadas, uma de $0,019\mu\text{l}$ e outra de $0,17\mu\text{l}$. As colunas preparadas com etilenocianidrina apresentaram boa resolução para uma mistura de aminas aromáticas e valores de H em torno de $20\mu\text{m}$ para os solutos com valores de k' próximos

de 1, enquanto que a coluna, testada com uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos, apesar de melhor resolução, mostrou valores de H 10 vezes maiores que os das primeiras colunas ($H \sim 200\mu\text{m}$), para solutos com valores de k' próximos de 1. Os autores concluíram que o procedimento de preparação da coluna com ODS deveria ser melhorado.

Kucera e Manius/122/ mostraram teoricamente as possibilidades de se obterem colunas de alta eficiência, através do acoplamento de várias colunas com diâmetro interno de 1mm. Derivaram expressões teóricas para a previsão do máximo número de pratos teóricos e do número máximo de colunas que poderiam ser acopladas sem perda da eficiência. Verificaram que há uma perda de 60% de eficiência em cada acoplamento de colunas convencionais, enquanto que as colunas "microbore" têm sua eficiência mantida e também que, para se obterem sistemas com altíssima resolução, torna-se imperativo o emprego de colunas "microbore". Passando da teoria à prática, os autores prepararam várias colunas de 250 x 4,6mm e de 500 x 1mm com Zorbax ODS, com partículas de diâmetro médio de $8\mu\text{m}$, empacotadas segundo o procedimento descrito previamente /123/. Cada coluna foi avaliada isoladamente. Para as colunas "microbore", o volume da cela empregada na detecção foi de $0,5\mu\text{l}$, enquanto que para as convencionais empregou-se cela de $8\mu\text{l}$. Todas as colunas foram operadas à mesma velocidade linear, $0,07\text{cm/s}$, o que corresponde a uma vazão de $30\mu\text{l}/\text{min}$, para as "microbore" e $0,5\mu\text{l}/\text{min}$, para as convencionais. Os dados foram processados num sistema de computação. Uma mistura de 10 alquilbenzenos, com valores de k' entre 0 e 6, foi utilizada para a avaliação das colunas, tendo sido determinada a eficiência média para os

10 solutos. Dentre as "microbore" foram selecionadas 9 colunas com um número mínimo de pratos em torno de 15000 por coluna, enquanto que, dentre as convencionais foram desprezadas aquelas com menos de 8000 pratos por coluna.

A tabela II.2.I resume os resultados conseguidos pelos autores.

Tabela II.2.I - Comparação entre os Resultados Experimentais Obtidos com as Diferentes Colunas.

| Coluna | L.(cm) | N* |
|-------------|--------|---------|
| 500 x 1mm | 50 | 15.400 |
| | 150 | 47.420 |
| | 300 | 92.800 |
| | 450 | 139.060 |
| 250 x 4,6mm | 25 | 8.350 |
| | 50 | 11.830 |
| | 100 | 16.690 |
| | 150 | 19.500 |

Condições: Metanol/água (85/15); velocidade linear 0,07cm/s ; volume de amostra 0,5 ou 5 μ l; 254nm; Zorbax ODS.

N* = número de pratos médio para todos os solutos com valores de k' entre 0 a 5.

Como pode ser observado na tabela, o acoplamento das colunas "microbore" produziu longas colunas com eficiência igual à soma das várias colunas conectadas, o que não

ocorreu para as colunas convencionais.

Kucera e Manius mostraram ainda as aplicações das colunas acopladas, com 230 mil pratos teóricos, operadas à velocidade linear próxima da ótima ($u = 0,2\text{mm/s}$), na separação de isótopos, com resolução muito boa, além de um cromatograma onde são observados mais de 100 picos dos componentes de um óleo de pinho separados à vazão de $30\mu\text{l}/\text{min}$, num período de 17 horas.

Ishii e Takeuchi /124/continuaram a pesquisa com tubos flexíveis de sílica fundida, acoplando várias colunas de 200mm de comprimento, empacotadas pelo método anteriormente descrito /118/. Os autores empregaram colunas com diâmetro interno de 0,25mm para fase reversa e 0,35mm para permeação em gel, todas com partículas de $5\mu\text{m}$ de diâmetro. O acoplamento das colunas foi feito com tubos conectores de aço inoxidável de 0,13mm de diâmetro interno e 4-5cm de comprimento, encerrando um volume de 0,05-0,06 μl . As colunas empacotadas com sílica quimicamente ligada a ODS apresentaram, em geral, cerca de 12 mil pratos teóricos ($H \sim 14-19\mu\text{m}$), com desvio relativo de 9% para 10 colunas avaliadas, resultado este considerado bom. O acoplamento de até 3 colunas de 20cm de sílica-ODS mostrou-se linear, ou seja, o mesmo valor de H foi obtido para 1, 2 ou 3 colunas acopladas, indicando que a dispersão extracoluna foi negligenciável. A eficiência das colunas de sílica-ODS foi determinada usando-se hidrocarbonetos aromáticos como mistura de teste, acetonitrila-água (7:3) como fase móvel, e vazão da ordem de $1\mu\text{l}/\text{min}$.

A eficiência das colunas de permeação em gel

foi determinada por meio de uma mistura de teste de hidrocarboretos aromáticos e ftalatos. Como fase móvel foi usado o tetra-hidrofurano. Observou-se um pequeno desvio da linearidade com o aumento do número de pratos com o comprimento da coluna. Cerca de 100.000 pratos teóricos foram obtidos para dimetil-ftalato, com uma coluna de 140cm de comprimento ($t_R = 80$ min).

Em 1982, Krien et al /125/ publicaram um artigo falando das vantagens das colunas "microbore" empacotadas, de 1mm de diâmetro interno, vantagens estas devidas à possibilidade de acoplamento direto a espectrômetros de massa, em função do pequeno volume que flui da coluna em vazão da ordem de poucos $\mu\text{l}/\text{min}$. O artigo ressalta a importância do desenvolvimento de novas interfaces "LC-MS" e menciona a possibilidade de detecção direta a nível de traços (10pg) para amostras biológicas, em tempos de análise similares à CL convencional. A elevada eficiência conseguida torna a técnica extremamente sensível, possibilitando a injeção de pequeno volume e análise de amostras em quantidade limitada, como nos casos de soro sanguíneo e extratos de insetos.

Novotny e McGuffin /73/ apresentaram uma discussão teórica sobre a contribuição do sistema de injeção para o alargamento da banda e calcularam o máximo volume de injeção permitido para causar uma contribuição máxima de 5% na variância do pico. Os sistemas de injeção disponíveis no mercado eram adequados às colunas convencionais (vol. máx. = $17\mu\text{l}$) e ainda às colunas "microbore" (vol. máx. = $1,6\mu\text{l}$), mas para as colunas capilares empacotadas e de tubo aberto era necessário um novo sistema de injeção. Assim, os autores propuseram a

construção de um sistema capaz de fornecer volume pequeno, de apenas 1nl , a partir de componentes disponíveis. O sistema de veria, segundo eles, ser automatizado, para melhorar a precisão e simplificar as aplicações rotineiras. A técnica proposta oferece vantagens sobre as existentes, pois tanto serve às colunas capilares quanto às de diâmetro reduzido e as convencionais bastando um controle da vazão e do tempo de injeção.

Em 1984, Takeuchi e Ishii /143/ publicaram um artigo que trata do desenvolvimento de uma instrumentação para se conseguir uma rápida "Micro-HPLC". Com base em seu próprio trabalho anterior com colunas de sílica fundida /118/ por meio do qual os autores constataram que, para este tipo de coluna a dependência de H com a velocidade linear era bastante reduzida, eles escolheram o mesmo material para a confecção das colunas, dos tubos conectores e, inclusive, para a construção da cela de detecção. As colunas empacotadas tinham 100 e 50mm de comprimento, com diâmetro interno de 0,34mm, ao passo que os tubos conectores tinham 57 μm de diâmetro e comprimento minimizado para evitar o alargamento das bandas por efeitos extracolumna. Os volumes da válvula injetora e da cela de detecção foram de 0,02 e 0,05 μl , respectivamente. Os autores conseguiram assim, com o equipamento otimizado e com colunas de 100x0,34mm, empacotadas com sílica quimicamente ligada a ODS, com partículas de 3 μm de diâmetro, a separação de 14 hidrocarbonetos aromáticos em 4 minutos, à vazão de 27 $\mu\text{l}/\text{min}$. Colunas de 50 x 0,34mm, por sua vez, separaram 8 hidrocarbonetos aromáticos, em 45 segundos, à vazão de 32 $\mu\text{l}/\text{min}$, ou uma mistura padrão de cafeína, aspirina e fenacetina, em 30 segundos, à vazão de 51 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Ainda em 1984, Menet **et al** /126/, publicaram um trabalho muito interessante sobre colunas de diâmetro reduzido. Estudaram o procedimento de empacotamento de colunas de aço inoxidável de 1mm de diâmetro interno, empregando fases estacionárias de sílica gel pura, e sílica quimicamente ligada a grupos octil, octadecil e amino. O trabalho discute os principais parâmetros do empacotamento de colunas, tais como a composição da suspensão, o sistema de empacotamento e a seleção do material empregado na preparação das colunas.

Na realização das pesquisas experimentais, observaram-se muitos detalhes e tomaram-se todas as precauções. Por exemplo, para evitar perdas na compressibilidade do solvente durante o empacotamento, o reservatório da suspensão foi colocado bem próximo da bomba, com o mínimo volume morto possível. Após a montagem da bomba, foram feitos testes com mistura de etanol/água (95/5), degaseificada, para verificar possíveis vazamentos. Para a preparação da suspensão, os autores optaram por iodeto de metila, um solvente de alta densidade ($d=2,3\text{g/ml}$) e baixa viscosidade ($\eta = 4.10^{-4}\text{Pa.s.}$). A alta densidade visa minimizar a velocidade de sedimentação (Lei de Stokes), uma vez que a densidade do material de empacotamento é similar. A baixa viscosidade é relacionada à maior facilidade da suspensão em fluir corretamente do reservatório ao interior da coluna. O reservatório foi construído de aço inoxidável com comprimento de 80cm e diâmetro interno de 8mm. Os autores concluíram que há um ângulo ideal para o redutor cônico acoplado entre o reservatório ($d_1 = 8\text{mm}$) e a coluna empacotada ($d_1 = 1\text{mm}$). Por analogia ao fluxo dinâmico, viram que há um

"meio-ângulo" ótimo, em torno de 7° , para um fluxo de perfil homogêneo, sem aglomerações. Concluíram ainda que formas internas com arestas devem ser evitadas. Para o empacotamento de colunas de 1m de comprimento, a suspensão foi preparada a partir de 0,5g de fase estacionária e 30ml de iodeto de metila e homogeneizada, durante 15min, em um banho de ultra-som. A suspensão foi transferida para o reservatório, a banda foi ligada e a pressão foi aumentada, tão rapidamente quanto possível para cerca de 180 MPa (≈ 26000 psi), assim permanecendo durante 2 horas. O solvente propulsor foi etanol/água (95/5). Após a pressão ter voltado a zero, as colunas foram desconectadas. Para a avaliação das colunas foram empregadas duas bombas, uma de pistão e outra tipo seringa de injeção com "loops" internos de 0,5 e 1 μ l. Foram usados diferentes detectores: um espectrofotométrico com cela de 0,5 μ l e outro refratométrico com cela de 10 μ l. Para a cromatografia de adsorção, a mistura de teste foi constituída de tolueno, nitrobenzeno, 1,3-dinitrobenzeno, metilbenzoato e acetofenona (k' entre 0 e 3); e a fase móvel foi diclorometano saturado com 200ppm de água. Para a fase reversa foi empregada uma mistura de benzeno, nafaleno, fenantreno e antraceno (k' entre 0 e 3), com acetonitrila/água (75/25) usada como fase móvel. Os cromatogramas obtidos para as misturas de teste mostraram picos com excelente simetria, e a eficiência foi calculada usando-se a largura da banda a meia altura do pico. Colunas empacotadas com sílica (7-8 μ m) deram $h_{\min} = 3$ a $v_{\text{ótima}} = 1,7$. Os quatro componentes da mistura apresentaram praticamente os mesmos valores de N (≈ 40 mil, indicando serem negligenciáveis os efeitos extracoluna).

As fases quimicamente ligadas, NH_2 e C_8 (7-8 μ m),

produziram colunas com h_{\min} em torno de 4, e as colunas preparadas com C18 (10 μ m) deram $h_{\min} \approx 3$. Para a cromatografia de adsorção, os autores perceberam pouca dependência de h com " v ", acima da velocidade ótima, não ocorrendo o mesmo para a cromatografia com fase normal ou reversa. Testes realizados com diferentes temperaturas mostraram um aumento de h com a temperatura na região próxima da velocidade linear ótima. O procedimento de empacotamento empregado era adequado à preparação de colunas "microbore" com até 1m de comprimento. As colunas mostravam-se estáveis com o tempo e podiam ser operadas se equipamentos adequados estivessem disponíveis. Podiam, além disso, ser acopladas, sem qualquer perda de eficiência, para uso com misturas complexas. Foram conseguidos 270.000 pratos teóricos pelo acoplamento de seis colunas de 1m de comprimento, com número de pratos entre 40 e 50 mil, para cada coluna. Por outro lado, se separações rápidas fossem necessárias, poder-se-iam empregar colunas curtas (10 cm), à vazão similar à da cromatografia convencional (aproximadamente 1ml/min), com excelentes resultados. Acoplando duas colunas, os autores conseguiram a separação de uma mistura complexa de poliestireno, em pouco mais de 1 hora, à vazão de 50 μ l/min. Obtiveram, ainda, a separação de frações do petróleo, com excelente seletividade, e detecção por índice de refração.

Novotny e col./127/ publicaram um trabalho a respeito da separação de frações poliaromáticas neutras, não voláteis, usando CL com "micro-colunas". Em suas experiências, demonstraram que colunas com eficiência superior a 200 mil pratos teóricos eram capazes de resolver mais de 170 picos. A caracterização dos compostos foi feita por espectrometria de

massa, indicando a presença de numerosos isômeros de compostos policíclicos com estruturas contendo de 5 a 9 anéis. A mesma separação não foi possível com colunas convencionais.

Tsuda e col./128/ estudaram a relação diâmetro da coluna/diâmetro da partícula, dc/dp e observaram que os valores ideais ficavam entre 3 e 6. As colunas com esses valores apresentaram boa performance e resistência ao fluxo, ϕ entre 80 e 120. Quando sílica gel, de $10\mu\text{m}$, foi usada como material de empacotamento, tornou-se possível produzir colunas microcapilares empacotadas com razões dc/dp entre 3 e 12. Porém, colunas com razões superiores a 10, embora empacotadas uniformemente, não se mostraram estáveis. O método de empacotamento usado foi o mesmo já descrito anteriormente, por via seca /121/. Os autores concluíram que microcolunas com diâmetros superiores a $0,1\text{mm}$ devem ser empacotadas pela técnica da suspensão/via úmida. Colunas com dc/dp entre 3 e 6, mostraram-se duas vezes melhores que aquelas com razões entre 8 e 9. A micrografia eletrônica da secção de choque das colunas mostrou que o empacotamento foi homogêneo, e também que algumas partículas de sílica gel foram inseridas nas paredes do tubo de vidro microcapilar. A relação $h \times v$ para as colunas estudadas mostrou-se similar à das colunas convencionais.

Mori e Suzuki /129/ usaram a técnica de densidade balanceada para o empacotamento de colunas com diâmetro interno de 1,5 e 1,8mm, com gel de poliestireno, de $10\mu\text{m}$ de diâmetro. O solvente empregado para a suspensão foi uma mistura de tolueno/clorofórmio (52,7/47,3). Usou-se bomba de vazão constante, a $0,35\text{ml}/\text{min}$. As colunas obtidas eram comparã-

veis às de cromatografia por exclusão (GPC) convencionais. Foram obtidos 30 e 36 mil pratos teóricos por metro, para as colunas de 1,5 e 1,8mm de diâmetro interno, respectivamente.

Menet et al/130/ publicaram outro trabalho, onde explicam como acoplaram 23 colunas de 1m de comprimento e 1mm de diâmetro interno. As colunas de sílica gel (7-8 μ m), foram empacotadas e avaliadas pelo método descrito anteriormente /126/. Para o acoplamento foram selecionadas apenas as colunas com mais de 40 mil pratos. As extremidades inferiores foram cortadas para eliminar "finos" que, porventura, tivessem se formado devido à alta pressão usada no empacotamento (180MPa), aumentando a permeabilidade do sistema. Os autores obtiveram uma coluna com 22m e 1 milhão de pratos teóricos, a vazões de 13-15 μ l/min e pressão de quase 10000 psi (60-70MPa).

Reed e Loscombe/131/ estudaram a preparação e a aplicação de colunas que eles chamaram de "semi-microbore" ($d_i = 2$ mm). Empregaram partículas esféricas de 3 e 5 μ m de sílica quimicamente ligada a ODS. A técnica de empacotamento baseou-se no deslocamento ascendente da suspensão, com pressão de 350 bar (~ 35 MPa ~ 5000 psi), conforme descrito por Broquaire /95/, usando metanol-isopropanol (50/50) como solvente, tanto para a suspensão quanto para a propulsão. Para comparação, foram preparadas colunas convencionais de 250 x 5mm, com material de fase reversa de 5 μ m. Na avaliação das colunas, os autores empregaram detecção espectrofotométrica com três diferentes celas, com volumes de 8, 2,5 e 0,5 μ l, e caminho óptico de 10, 3 e 1mm, respectivamente. A válvula de injeção empregada foi mantida com uma alça interna de 1 μ l para a maioria dos

testes. Para testes de capacidade da coluna, usou-se também, uma válvula com alças externas de 20 e 100 μ l. Como fase móvel, empregou-se uma mistura de metanol-água (60/40), sendo que a mistura de teste foi acetona, fenol, 4-metilfenol, 3,5-xilenol e anisol.

As colunas de 150 x 2mm empacotadas com partículas esféricas de sílica quimicamente ligada a ODS, de 3 e 5 μ m, produziram altura de prato reduzido h de 3,8, correspondendo a 13 e 8 mil pratos respectivamente. Os valores médios do fator de assimetria foram na faixa de 1,6 - 1,8 (os autores não explicam estes valores). As tentativas para empacotar colunas de 20 e 25cm ($d_i = 2$ mm) com partículas de 3 μ m não obtiveram sucesso. Os autores concluíram que partículas de 3 μ m poderiam ser empregadas para a preparação de colunas com alta eficiência, pelo método convencional, desde que o comprimento da coluna não ultrapasse 150mm. A vazão ótima para estas colunas situava-se na faixa de 40 a 100 μ l/min, representando uma economia de solvente da ordem de 80% em relação às colunas de 5mm. Ambas as colunas ($d_i = 2$ e 5mm) mostraram limites de detecção similares; contudo, quando a disponibilidade de amostra era um fator limitante, as colunas de 2mm ofereciam vantagens, dada a sua maior sensibilidade. Os autores não foram muito enfáticos com relação à variância do sistema e apenas sugeriram o uso de um detector com cela de pequeno volume, recomendando a válvula de micro-injeção. Finalmente os autores acoplaram duas colunas de 150 x 2mm, tendo 14.300 e 11.900 pratos cada uma, e conseguiram o incrível valor de 28.300 pratos para o conjunto, mesmo tendo usado um tubo conector de 50 x 0,15mm. Outro

detalhe interessante foi que uma coluna de 12.600 pratos perdeu sua eficiência após 100 injeções, ocorrendo uma queda "súbita e drástica" para 6.600 pratos. Contudo, após algumas injeções, a coluna "inexplicavelmente" recuperou parte de sua eficiência, apresentando 8.000 pratos e assim, permaneceu durante o período de aplicação de mais de 160 injeções.

Unger e col./132/ estudaram o acoplamento de colunas de 125 e 250 x 1,0 e 1,6mm, de aço inoxidável, empacotadas pela técnica da suspensão com partículas de 5 e 4 μ m, de sílica quimicamente ligada a grupos C18 e C8, irregulares e esféricas. Os tubos empregados receberam um tratamento prévio até tornarem-se espelhados internamente. A suspensão foi preparada com uma mistura de parafina/tetracloreto de carbono (50/50), em concentrações de 5 a 10%. O solvente propulsor foi n-heptano. O empacotamento foi feito uma vazão constante, e a pressão máxima foi de 100MPa (\sim 14.500 psi). As colunas foram avaliadas em um sistema cromatográfico modular, onde "loops" de 0,5, 1,0 e 5,0 μ l foram empregados. A detecção foi feita em 2 tipos de celas modificadas, com volumes de 0,2, 0,4 e 1,3 μ l. Para a montagem das colunas, também foram usadas duas técnicas diferentes. Cinco colunas foram acopladas, dando um comprimento total de 1250mm, empregando conexões capilares de 60mm de comprimento. As fases móveis empregadas foram metanol/água e acetonitrila / água. Os solutos de teste foram acetona, benzeno, tolueno, nafaleno, bifenil, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno e criseno. O número de pratos foi calculado usando a largura do pico a meia altura e o método do momento estatístico. Este método foi usado também para determinar a assimetria do pi

co. Os autores concluíram que a superfície interna do tubo é um parâmetro de extrema importância, e que a pressão de empacotamento necessária para produzir colunas eficientes e estáveis é mais alta que a exigida para colunas capilares empacotadas. Verificaram que nenhuma diferença existe na "performance" de colunas "microbore" empacotadas com partículas irregulares ou esféricas de sílica de fase reversa. Constataram que, como é mais difícil empacotar colunas mais longas que 250mm, o acoplamento é o único caminho para a obtenção de um maior número de pratos. Nas condições empregadas, quando do acoplamento de 5 colunas, o volume extracoluna foi mantido em torno de $4\mu\text{l}$, e foram obtidos de 100 mil a 120 mil pratos teóricos. Foi constatado que um maior número de pratos poderia ser conseguido com colunas mais longas, mas isto implicaria num aumento proporcional do tempo de análise, e maiores vazões criariam gradientes de temperatura, prejudicando a performance das colunas. Os autores concluíram que volumes de injeção superiores a $2\mu\text{l}$ e celas de fluxo com mais que $1\mu\text{l}$ contribuem para um significativo aumento na dispersão extracoluna, e devem ser evitados. O fator de resistência ao fluxo das colunas, ϕ , variou entre 600-800, indicando boa permeabilidade.

Meyer et al /133/ desenvolveram um procedimento de empacotamento de colunas "microbore" de 1mm de diâmetro interno, usando partículas de $5\mu\text{m}$, irregulares, para cromatografia com fase reversa, através de uma variação sistemática das condições de empacotamento. Examinaram tanto a técnica de pressão quanto a de vazão constante, e observaram, que o procedimento otimizado, a pressão constante, produziu colunas com menores valores de h , $2,7 \pm 0,15$, para um único lote do materi

al empregado. As colunas foram construídas com tubos de aço inoxidável, 316, de 1/16 x 0,04 polegadas (1mm de diâmetro interno). Os reservatórios da suspensão foram feitos com colunas convencionais vazias, de 4,6mm de diâmetro interno, e com 25 e 50cm de comprimento. Os reagentes foram todos de grau HPLC. Todos os experimentos foram feitos em duplicata, usando sempre o mesmo tubo de 10cm de comprimento para reduzir as variáveis, até que este tubo apresentasse falhas, em geral após 10-15 aplicações. As eficiências das colunas assim preparadas mostraram-se comparáveis. Foi empregada a técnica de suspensão, tanto para pressão quanto para vazão constantes. O material de empacotamento, após agitação vigorosa em várias quantidades do solvente da suspensão, foi agitado com ultra-som por 5 min. Um volume da suspensão, equivalente a 100mg do material de empacotamento, foi imediatamente transferido ao reservatório acoplado à coluna "microbore" vazia. O reservatório foi completado com o solvente da suspensão antes de sua conexão à bomba. O empacotamento foi processado até que 10ml do solvente tivesse sido coletado. Foram comparadas as técnicas ascendente e descendente, nas mesmas condições. O empacotamento no sentido descendente produziu melhores colunas sendo o escolhido para os demais testes. Vários solventes propulsores foram experimentados. Metanol puro e mistura de metanol e água (50/50) produziram colunas com igual número de pratos, número este maior que o registrado quando da utilização dos demais solventes. Metanol foi, então, escolhido para os trabalhos restantes. A concentração da suspensão e a pressão do empacotamento também foram testadas e ficou estabelecido que 15.000psi (105 MPa) seria a pressão máxima a ser empregada para suspen-

sões mais concentradas; porém, para suspensões com 65mg/ml em isopropanol, pressões entre 7000 e 9000psi (49 e 63MPa) mostraram-se ideais. Para a preparação da suspensão foram testados isopropanol puro e mistura de tetracloreto de carbono/metanol (95/5). Ambos produziram colunas com eficiência máxima, porém isopropanol o fez a menor pressão.

Para se conseguir eficientes colunas de 250 x 1mm, os autores sugeriram empacotamentos descendentes, à pressão constante de 12000psi (84MPa), usando 3,8ml de suspensão à concentração de 65mg/ml em álcool isopropílico, seguido de cerca de 0,8ml do mesmo solvente, e metanol foi empregado como solvente propulsor. Colunas de 10cm deveriam ser empacotadas a 8000psi (56MPa), e para colunas de 50cm deveriam ser empregadas pressões da ordem de 15000psi (105MPa).

As colunas foram avaliadas em um cromatógrafo modular, onde a detecção foi feita em cela de fluxo de 0,5 μ l e com constante de tempo de 0,050s obtida por substituição de resistores do circuito. As colunas foram adaptadas diretamente à cela de fluxo. As injeções foram feitas com "loop" de 0,5 μ l. Como fase móvel foi empregada uma solução aquosa de KH₂PO₄ - 10mM contendo 48% de metanol. A mistura de teste empregada constituiu-se de ácido 2-tiobarbitúrico, fenol, acetofenona, nitrobenzeno e metilbenzoato (k' entre 0,1 e 9,2). Empregou-se vazão de 17 μ l/min ($v \pm 10$) e detecção a 230nm. O número de pratos teóricos foi calculado usando a largura do pico a meia altura e a assimetria dos picos determinada a 10% da altura. Coeficientes de Knox foram determinados em um microcomputador. Para as colunas de 250 x 1mm, a mínima altura

de prato reduzida foi de $2,7 \pm 0,15$, à velocidade reduzida de 4,0. A assimetria média de pico, para benzoato de metila, foi de $1,15 \pm 0,06$. O fator de resistência ao fluxo, θ , foi de 690 ± 74 . As variações na eficiência das colunas dentro de um mesmo grupo de experimentos foram menores que 10%. Colunas estocadas mostraram-se estáveis. Em condições otimizadas, eficiência máxima de 5000 e 15000 pratos teóricos foram obtidas para colunas de 10 e 25cm, respectivamente.

Dezaro et al /66/ publicaram um trabalho com algoritmos para a "otimização do tempo de análise em HPLC". Para a realização deste trabalho, os autores empregaram tubos de aço inoxidável de 1/16 pol (1,6mm) de diâmetro externo x 1mm de diâmetro interno de vários comprimentos. O menor comprimento que pode ser usado para acoplar diretamente a válvula injetora à cela de detecção foi 3,6cm. As colunas foram empacotadas com a técnica descendente a 10000-15000psi (70 a 105MPa). O reservatório consistiu de um tubo de 100 x 4,6mm de aço inoxidável. A suspensão foi preparada com fase estacionária química ligada (C8 e C18) a uma concentração de 65-100mg/ml em isopropanol, e dispersa em banho de ultra-som. O solvente propulsor foi metanol. Para a obtenção dos algoritmos foram considerados a resolução, a performance da coluna, a variância extracoluna, o fator de capacidade e o comprimento da coluna. Para a determinação da variância da coluna foram empregados o segundo momento estatístico e a extrapolação não-linear a comprimento nulo do tubo.

Os autores conseguiram uma redução de 50% no tempo de análise de teofilina, através da aplicação do algo-

ritmo, com corte da coluna (redução no comprimento) e empregando uma técnica de "superposição da injeção" (overlapping injection technique).

Naish et al /74/ descreveram a determinação da variância externa de sistemas "microbore", rápidos e convencionais de CL, pelo "método da coluna". A compatibilidade com as relevantes tecnologias de coluna foi avaliada envolvendo a comparação entre as dispersões interna e externa. A comparação entre cromatogramas de uma mistura de 8 componentes, em um grupo de colunas de várias dimensões, mostrou a relação entre velocidade, economia e sensibilidade obtida na prática. Celas com diferentes volumes foram empregadas no sistema de detecção e vários volumes de injeção também foram usados. O cálculo das variâncias foi feito usando-se o segundo momento estatístico, através da conexão de saída do detector a um sistema de computação, além de um programa BASIC. Misturas de hidrocarbonetos poliaromáticos foram empregadas nos testes, a várias vazões, e metanol/água (75/25) foi empregada como fase móvel.

Niessen et al /134/, preocupados, como a maioria dos pesquisadores na área de colunas de diâmetro reduzido, publicaram um trabalho onde procuram otimizar a performance da CL com colunas capilares, visando minimizar as partes externas que causam alargamento dos picos. Para isto foi feita uma avaliação cuidadosa dos resultados experimentais através do modelo Gaussiano modificado exponencialmente, e comparação com as previsões teóricas.

Em 1985, Gareil e Rosset /135/ estudando o

efeito do fluxo complementar ("make-up flow") sobre a variância devido ao sistema de detecção concluíram que, à medida que a vazão aumenta, predominam as fontes de variância devido às contribuições do volume da cela de fluxo, dos tubos de entrada e do sistema eletrônico do detector. Assim, com o uso do fluxo auxiliar ou complementar, a diminuição na variância era menor que a esperada. Verificaram que o fluxo auxiliar era mais eficiente em detectores em que o tubo de entrada e a constante de tempo eram menores, indicando que não apenas o volume da cela era importante.

A maioria das publicações citadas nesta revisão bibliográfica discute bastante a aplicabilidade das colunas "microbore", os requisitos instrumentais, os aspectos econômicos e até mesmo as considerações teóricas. No entanto pouca informação foi encontrada com relação à metodologia de empacotamento das colunas de pequeno diâmetro. Em 1985, surgiu na literatura um trabalho de Welling et al /136/ devotado à descrição detalhada de um procedimento de preparação de colunas de 1,2 - 1,5mm. Os autores estudaram a influência da pressão e da vazão de empacotamento, bem como do comprimento da coluna sobre sua eficiência. O tempo de vida da coluna também foi estudado. Foram testados dois tipos de bombas para o empacotamento, uma de vazão constante (tipo seringa) e outra de pressão constante. A técnica empregada para o empacotamento foi a da suspensão. O material de empacotamento (300-400mg) foi umedecido com 0,5ml de metanol, e a suspensão preparada com 6,5ml de tetraclorometano. Foram separados "finos e grossos" e a suspensão transferida ao reservatório, que por sua vez foi aco

plado à coluna. A propulsão foi feita à vazão constante e a pressão máxima de 600 bar (60MPa) com metanol. Após passagem de um volume equivalente a 100 vezes o volume da coluna, a bomba foi desligada. Foram esperados 30 min para a remoção da coluna. Após a colocação do filtro, a coluna foi fechada e condicionada usando como fase móvel metanol/água (8:2). A avaliação foi feita com mistura de uracila ($k' = 0$) e tolueno ($k' = 2$). Os cálculos foram processados manualmente por medidas da largura do pico no ponto de inflexão (0,607 da altura). A assimetria foi determinada a 1/10 da altura do pico. A estabilidade da coluna foi testada à pressão de 50 bar (5MPa) e injeções de $20\mu\text{l}$ a cada 60s.

Como os autores não dispunham de um equipamento com cela de baixa dispersão empregou-se um artifício para reduzir o espalhamento da bomba. Aplicou-se um fluxo complementar ("make-up flow") na saída da coluna, isto é, o eluato foi continuamente misturado a um volume adicional da fase móvel antes da entrada do detector, reduzindo o tempo de transporte do pico da saída da coluna à cela de detecção (os autores não citam o volume da cela). Com isto ocorreu uma redução na sensibilidade de massa, uma vez que o pico foi diluído, não invalidando, porém, a possibilidade de se obter resultados pertinentes aos fenômenos de interesse. Testes realizados mostraram que o desvio padrão diminui com o aumento do fluxo, atingindo o valor de $1\mu\text{l}$ quando a razão entre a vazão complementar e a vazão normal é maior que 20. O valor de $1\mu\text{l}$ para o desvio padrão indica ausência de dispersão cromatográfica, ou seja, o equipamento em questão é adequado ao uso com colunas de diâmetro interno de 1,2 - 1,5mm empacotadas com partículas de 7-8 μm

e testadas com solutos com $k' \approx 1$. Nestas condições, uma coluna com $H = 15\mu\text{m}$ tem um desvio padrão de $3,5\mu\text{l}$. Assim, um desvio externo de $1\mu\text{l}$ acarretaria um erro sistemático de 4%. Os autores não constataram diferenças na eficiência das colunas empacotadas com bombas tipo seringa ou membrana. Concluíram que vazões muito baixas para o empacotamento causam perdas, e vazões muito altas provocam quebras no material de empacotamento. Eles estabeleceram $1,2\text{ml}/\text{min}$ como sendo a vazão ótima, tanto para partículas de sílica ODS irregulares, quanto para esféricas. As colunas empacotadas com partículas esféricas mostraram-se melhores. Colunas menores (100 e 200mm) deram, em toda a faixa de velocidade linear testada (u entre 0,4 e 3,5mm/s), mais baixos valores de H que os das colunas maiores (250 e 550mm). A estabilidade das colunas mostrou-se excelente, com uma queda de 40% na eficiência após alguns milhares de injeções (800 injeções), para colunas de 1,2mm. Colunas com diâmetro interno de 1,5mm, empacotadas com sílica ODS, apresentaram uma melhora na eficiência durante as primeiras 4000 injeções, e após isto uma queda no valor de N . Os autores concluíram que o procedimento de empacotamento das colunas "microbore" não é mais complicado que o das colunas convencionais, e que alguns cuidados devem ser tomados, principalmente com relação à superfície interna dos tubos de aço inoxidável, que deve ser polida até mostrar-se brilhante e livre de quaisquer irregularidades. Os autores sugeriram uma vazão ótima de empacotamento para o material empregado de $1,2\text{ml}/\text{min}$, mas ressaltaram que este valor poderia ser diferente quando outros materiais fossem empregados. Os autores enfatizaram que valores de altura de prato reduzida iguais a 2 foram conseguidos nas condições empregadas, e que

estes valores eram, pelo menos, iguais ou até melhores que os obtidos com colunas convencionais. A estabilidade das colunas, segundo os autores, mostrou-se superior à das colunas convencionais.

Apesar da importância crescente da "Micro HPLC", equipamentos adequados a esta técnica tardaram a se tornar disponíveis no mercado.

Em 1986, Bhowan et al/137/, estudando o isolamento, purificação e estruturas de compostos biológicos, tais como proteínas, peptídeos e amino ácidos, aplicaram a "Micro-HPLC". No entanto certos requisitos foram necessários aos equipamentos empregados com colunas "microbore", tais como: precisão nas menores vazões empregadas, capacidade de realização de gradiente a baixas vazões e celas de fluxo para a detecção com pequeno volume. Diante das dificuldades, os autores fizeram uma modificação no sistema de HPLC convencional. A alteração efetuada foi bastante simples e rápida, constando de um conector em T entre a câmara de mistura de solventes e a válvula auto-injetora, cuja saída adicional foi acoplada a uma válvula dosadora de precisão ("fine metering valve") e a um amortecedor de pulsos, em série. As conexões foram feitas com tubos de 0,007 polegadas de diâmetro interno, de aço inoxidável, com comprimento mínimo. As colunas usadas, com di, 4,5 e 2,0mm, foram compradas prontas, ambas de 150mm de comprimento, e empacotadas com partículas esféricas de 5µm, de sílica ODS. Devido à baixa vazão e ao pequeno volume da cela (1µl), foi necessário criar um restritor de pressão na saída da cela do detector para evitar a formação de bolhas de ar. A vazão foi a mesma para

as colunas "micro" e "macro" empregadas, porém para as "microbore" a válvula dosadora foi ajustada para manter a pressão em 2000psi (14MPa), o que correspondeu a uma vazão de $0,320\mu\text{l}/\text{min}$. O excesso de solvente foi eliminado após o amortecedor de pulsos. Os volumes de injeção para as colunas "microbore" foram menores que $25\mu\text{l}$. O sistema "divisor de fluxo" proposto pelos autores mostrou-se reprodutível, podendo ser adaptado a sistemas convencionais de HPLC com uma ou duas bombas, com ou sem auto-injetor, bastando fechar a válvula completamente para que o sistema volte às características convencionais, facilitando a troca de colunas nos trabalhos rotineiros. Os autores enfatizaram que a pressão de trabalho e o programa de gradiente foram os mesmos para ambos os tipos de colunas. Os autores apresentaram ainda, comparações entre as separações de misturas de amino ácidos e peptídeos, com colunas convencionais e "microbore", com excelentes resultados.

Brooks et al /75/ estudaram o efeito do caminho óptico na cela de fluxo sobre a variância de um sistema cromatográfico. Para a realização deste trabalho, publicado em 1987, os autores puderam contar com equipamentos adequados à cromatografia com colunas de diâmetros reduzidos, já disponíveis no mercado. Os autores empregaram um detector de absorbância, com comprimento de onda variável, com celas de fluxo com volume menor que $1\mu\text{l}$. Foram empregados três diferentes comprimentos de cela (10, 5 e 1mm). Usou-se uma bomba do tipo seringa com capacidade de 50ml, vazão mínima de $0,08\mu\text{l}/\text{min}$ e pressão máxima de 10000psi (70MPa). A válvula injetora empregada possuía uma alça interna de $0,1\mu\text{l}$. As colunas foram acopladas diretamente à válvula injetora e à cela de detecção pa

ra minimizar a dispersão do sistema cromatográfico. Três diferentes diâmetros de coluna foram empregados (0,2, 0,5 e 1mm). As colunas de 1mm foram compradas prontas. Duas colunas de 0,5mm de aço inoxidável, foram empacotadas com sílica ODS, 3 μ m. Uma de 300 x 0,5mm, reta, foi revestida internamente com uma camada de sílica ("glass-lined") e a outra de 840 x 0,5mm de aço polido foi enrolada com um diâmetro de 16cm, e depois empacotada. Ambas foram empacotadas à pressão de 15000 psi (105MPa) usando a técnica da suspensão, mistura de metanol-tetraclorometano (1:13), empregando uma bomba pneumática. As colunas de 0,2 mm foram preparadas com tubos de sílica fundida usando uma bomba tipo seringa, a 6000psi (42MPa), à vazão constante. O reservatório de empacotamento foi de 500 μ l. Uma suspensão de 50mg do material de empacotamento foi preparada em 200 μ l do solvente, e agitada em banho de ultra-som por 10 min. A coluna foi encheida com o solvente propulsor. A suspensão foi transferida ao reservatório e este completado com o mesmo solvente, até que qualquer bolha de ar tivesse sido eliminada. Após a montagem do sistema aplicou-se uma pressão de 6000psi (42MPa), rapidamente, empregando metanol como solvente propulsor. A coluna foi mantida sob esta pressão durante uma noite. A válvula, então, foi fechada, e a pressão caiu para zero, sendo assim mantida por 5 horas. A coluna foi lavada com fase móvel durante uma noite antes do uso. As colunas foram avaliadas e vários parâmetros calculados e comparados. O valor de σ^2 ficou entre 1 e 14 μ l², para os três tipos de celas empregados, quando foi usada a coluna de 300 x 0,5mm, cujo valor de h era 3,0. A sensibilidade de massa da coluna de 1000 x 0,2mm era 13,2 vezes melhor que para a coluna de 250 x 1mm. O uso da cela de 5mm de

comprimento, em vez da detecção "on-column" com comprimento de 0,2mm, aumentou muito a sensibilidade de massa. A geometria da cela de detecção e seu volume mostraram-se mais importantes para colunas menores. Alguns dos resultados obtidos pelos autores, com caminho óptico de 5mm, são resumidos na tabela II.2.II.

Tabela II.2.II - Resumo dos Resultados Experimentais Obtidos para as Diversas Colunas por Detecção com Cella de 5mm.

| Dimensões das Colunas (mm) | N/m | h | L.D.* | $\sigma^2_{col.}$ (μl^2) |
|----------------------------|-------|-----|-------|---------------------------------|
| 250 x 1 | 34000 | 2,4 | 111 | 1,62 |
| 300 x 0,5 | 33000 | 3,0 | 48 | 0,45 |
| 840 x 0,5 (espiral) | 56000 | 4,9 | 63 | 1,71 |
| 1000 x 0,2 | 80000 | 4,1 | 8,4 | 0,03 |

* L.D. - Limite de detecção

** $\sigma^2_{col.}$ - Variância da coluna à vazão de $10\mu l/min$

Os autores concluíram que a cela de detecção de $1\mu l$ exibiu menor efeito sobre a eficiência de quaisquer das colunas estudadas, contudo a de 5mm foi a que produziu melhor sensibilidade de massa, embora com razoável perda de eficiência para a coluna de $1000 \times 0,2mm$ ($N_{ef}/N = 0,48$ - cálculos feitos para soluto com $k' = 2$). Assim, dependendo da aplicação desejada, podem se escolher colunas mais curtas ou mais longas. Embora estas apresentem tempo de análise maior, podem separar misturas mui

to complexas.

Schlabach e Wilson /138/ empregaram colunas "microbore" para a separação e caracterização de proteínas, por fase reversa, obtendo uma sensibilidade 10-20 vezes maior que com colunas convencionais, operadas à mesma velocidade linear. Os autores empregaram colunas de 2,1 e 1mm de diâmetro interno e investigaram a dependência do volume do pico com a vazão, concluindo que a vazão afeta muito mais o volume do pico do que propriamente o diâmetro da coluna ou mesmo seu comprimento. Constataram que uma redução de 4 vezes no valor da vazão resulta uma diminuição de, no mínimo, 50% no volume do pico, para vazão de 25 a 400 $\mu\text{l}/\text{min}$. Para os biólogos a recuperação das proteínas em volume reduzido é de vital importância para a metodologia de caracterização subsequente, bem como o pequeno volume de injeção empregado na "Micro-HPLC", pois deparam com muitas limitações com relação à quantidade de amostra disponível. Os autores concluíram que a "Micro-HPLC" é uma técnica altamente promissora, sobretudo pelas suas altas resolução e sensibilidade.

Novotny e col./139/ publicaram, em 1987, um artigo onde ressaltaram os aspectos quantitativos da "Micro-HPLC", enfatizando a reprodutibilidade da retenção, a performance da coluna e as medidas da área do pico para colunas capilares, empacotadas com fase estacionária do tipo C18, empregadas na cromatografia com fase reversa. Para o empacotamento de colunas de 250 μm de diâmetro interno foram preparadas suspensões de 50-60mg do material de empacotamento, partículas de 5 μm , esféricas, de sílica ODS, para cada metro de coluna, em

0,19 - 0,23ml de acetonitrila, contendo 1,5% de um surfatante não iônico. As suspensões foram transferidas para um pequeno reservatório de 1/16 pol. de diâmetro interno. O empacotamento foi iniciado à pressão de 50atm (5MPa). A pressão foi aumentada a 450atm (45MPa), com incrementos de 100atm (10MPa) a cada 5 segundos. Após a coluna estar empacotada, esperou-se 30-60 min para desligar a bomba. Quando a pressão voltou a zero, o solvente foi trocado, e passou-se água durante uma noite. Esta etapa mostrou-se importante para a completa compactação do leito da coluna. A avaliação das colunas foi feita usando-se um sistema modificado, consituído de uma bomba tipo seringa operada a pressão constante e um detector UV, com cela modificada de 10nl, a 254nm. Uma válvula de injeção com alça interna de 0,2 μ l foi usada empregando a técnica "moving-injection" descrita por Harvey e Stearns /140/, para redução da variância. Com esta técnica apenas uma fração de volume da alça é injetada e a válvula é imediatamente fechada. Se for injetado todo o volume, ocorre um perfil de decaimento exponencial, devido ao fluxo laminar de deslocamento da fase móvel, provocando um arraste da amostra através das paredes da alça. . O máximo volume injetado foi cerca de 170nl, correspondendo a um tempo de injeção de 6,6s, sem que ocorresse a indesejável cauda do pico. Além disto a contribuição deste volume de amostra à altura de prato teórico foi de 10%, para um soluto com $k' = 1$. Uma vez que a maioria dos solutos analisados apresentava $k' > 1$, o volume usado foi considerado um bom compromisso entre a eficiência e sensibilidade das microcolunas empregadas. A mistura de teste foi constituída de m-cresol, nitrobenzeno, difenilamina e fenantreno dissolvidos em acetonitrila-água (75/25)

que também foi a fase móvel. Acetona foi empregada para a de-
terminação do volume morto. A dependência de h com v foi gra-
ficada e comparada à curva teórica pela equação de Knox. Os
resultados mostraram que boas colunas foram produzidas com o
método de empacotamento empregado. Colunas de 1m de comprimen-
to apresentaram eficiência na faixa de 70 a 90 mil pratos teó-
ricos. Os autores obtiveram valores médios de h , para as nove
colunas preparadas, da ordem de 2,5. Foi calculada também a
porosidade para uma das colunas e encontrado o valor de 0,751,
além de outros parâmetros de interesse, tais como resistência
do fluxo e impedância das colunas. A contribuição da coluna à
variância cromatográfica foi de $1,09 \cdot 10^{-1} \mu l^2$, correspondendo a
92,7% do alargamento total da banda, e a contribuição do inje-
tor foi de 6,6%. Finalmente o artigo discute a importância da
precisão e da exatidão dos volumes injetados e a influência do
sistema de bombeamento e da estabilidade da vazão, ressaltando
a melhor reprodutibilidade com bombas recentemente desenvolvi-
das para trabalhos com microcolunas.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

A revisão bibliográfica dos métodos de empacotamento de colunas empregadas na HPLC induz a uma falsa concepção de que a técnica já foi exaustivamente estudada e está muito bem estabelecida. Uma análise mais profunda conduz à conclusão de que os métodos propostos por diferentes pesquisadores como "simples", "rápidos", "eficazes" ou "ótimos" são, na verdade, contraditórios e levam a evidências irreais dos processos envolvidos. Há, sem dúvida, um único ponto em comum entre todos: "as micro partículas devem ser filtradas a partir de uma suspensão, sob pressão, para dar origem ao leito da coluna", mas apenas este.

A coluna cromatográfica é o componente de maior importância num equipamento de HPLC. De nada adiantarão excelentes detectores, bombas de alta pressão e precisão, injetores especiais, ou quaisquer outros sofisticados dispositivos, se a coluna não for de boa qualidade.

Muitos pesquisadores têm concentrado suas atenções na obtenção de fases estacionárias mais seletivas e no desenvolvimento de tecnologia adequada à preparação de colunas cada vez mais eficientes.

O interesse crescente em métodos analíticos de alta resolução e a importância atual dos fatores econômicos têm levado ao desenvolvimento de colunas com dimensões mais reduzidas que as convencionais, em especial com relação ao diâmetro interno, originando colunas para aplicação na técnica denominada

Micro-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Micro-HPLC.

O objetivo deste projeto é, justamente, contribuir ao desenvolvimento dos métodos de preparação de colunas cromatográficas para HPLC e Micro-HPLC, visando à obtenção de colunas a um preço acessível e compatível às necessidades e realidade de de nosso país.

Como as exigências relacionadas ao equipamento cromatográfico crescem com a redução do diâmetro interno das colunas, o projeto dá ênfase a aqueles em torno de 2mm, que proporcionam uma economia de cerca de 80% nas quantidades empregadas de fases móvel e estacionária, sem, contudo, requerer transformações onerosas no sistema.

A escolha do material de empacotamento é, também, fundamentada em fatores econômicos. As fases estacionárias quimicamente ligadas empregadas na cromatografia por partição são ligeiramente mais caras que as de sílica gel pura aplicadas na cromatografia por adsorção; entretanto, a técnica resultante é economicamente vantajosa, já que emprega solventes muito mais baratos e, muitas vezes, em misturas com grande proporção de água. Assim, são empregadas, durante todo o trabalho, as fases estacionárias apolares, à base de micropartículas porosas de sílica gel, ligadas a octadecilsilano, aplicadas à cromatografia com fase reversa. Além das vantagens econômicas, a técnica caracteriza-se por grande versatilidade, sendo responsável por quase 90% das aplicações atuais da HPLC.

Para se alcançar o objetivo proposto foram necessárias as seguintes etapas:

1. Preparação das colunas vazias

2. Montagem e otimização do sistema de empacotamento.

3. Montagem e otimização dos sistemas de HPLC e Micro-HPLC.

4. Desenvolvimento da metodologia de empacotamento através de variações sistemáticas dos parâmetros relevantes.

5. Avaliação das colunas empacotadas.

6. Estabelecimento de correlações entre os vários métodos de empacotamento, a performance cromatográfica e a eficiência das colunas.

7. Comparação entre as colunas convencionais e as de diâmetro reduzido levando-se em consideração o custo por coluna e por análise, as condições de empacotamento, os requisitos para a avaliação e aplicação, e o tempo de análise.

8. Comparação entre as colunas obtidas e aquelas disponíveis no mercado ou citadas na literatura.

9. Avaliação da influência do diâmetro da partícula e do comprimento da coluna sobre sua eficiência.

10. Acoplamento das colunas.

11. Apresentação de um exemplo de aplicação das colunas de diâmetro reduzido, na resolução de mistura complexa, comparando-se às colunas convencionais.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. PREPARAÇÃO DAS COLUNAS

A preparação de colunas para HPLC envolve uma série de etapas e cada uma delas exige cuidados e precauções especiais.

a) Preparação dos tubos vazios

A primeira etapa é a escolha do material a ser empregado. Os tubos vazios, bem como seus encaixes, terminais e conectores, podem influenciar tanto na performance, quanto na aplicação das colunas. O material escolhido deve resistir ao ataque químico das fases empregadas e a altas pressões. O aço inoxidável 316, sem costura, é o material preferido. A superfície das paredes internas deve ser polida, brilhante e espelhada. Para isso os tubos são cortados nas dimensões desejadas e seu interior tratado com um abrasivo para eliminação de micropartículas, empregando um fio de tecido especial, ligado a um fio de nylon, ou um barbante grosso, impregnado com uma pasta abrasiva. São feitos movimentos de vai-e-vem puxando o fio nas extremidades do tubo várias vezes. A seguir o tubo deve ser lavado com água e detergente e, novamente, deve-se usar o barbante, agora sem a pasta. O barbante deve ser passado até sair limpo do interior do tubo. Este deve ser lavado novamente com água e detergente (ácidos diluídos também podem ser usados); a seguir várias vezes com água, depois com água destilada, etanol e finalmente com acetona. Se, ao serem cortados, surgirem

bordas cortantes na secção transversal dos tubos, estas devem ser eliminadas, com auxílio de lixas bem finas, antes da limpeza da superfície interna. Feitos estes tratamentos, os tubos devem ser observados contra a luz, num ângulo de 45° , e girados lentamente. Se alguma imperfeição for detectada, o tratamento deve ser repetido e, se persistir, o tubo deve ser descartado. Apenas os tubos lisos e espelhados internamente devem ser empregados. Deve-se medir, com paquímetro, o diâmetro interno em ambas as extremidades dos tubos, para se constatar sua homogeneidade e verificar se, durante o corte, não houve qualquer estrangulamento.

b) Colocação dos terminais

A segunda etapa é a colocação dos terminais. A figura IV.1 mostra alguns tipos de terminais existentes. Eles são constituídos de várias peças, e todas elas devem se encaixar com precisão para que não haja volume morto nem vazamentos, ou seja, as peças devem ser compatíveis entre si. Em geral, cada fabricante tem um conjunto destas peças que, embora semelhantes, não podem ser misturadas. Qualquer diferença mínima pode causar danos irreparáveis. Escolhido o conjunto de peças, deve-se verificar se os filtros fazem parte delas. Se não, eles devem ser colocados no interior das peças antes das conexões serem apertadas. Os filtros, geralmente, são de aço inoxidável poroso ou uma tela de PTFE. O diâmetro do filtro deve ser compatível com a peça onde ele vai ser inserido, e o diâmetro de seu poro deve ser menor que o das partículas com as quais vai ser usado.

Observados todos os detalhes, o conjunto deve

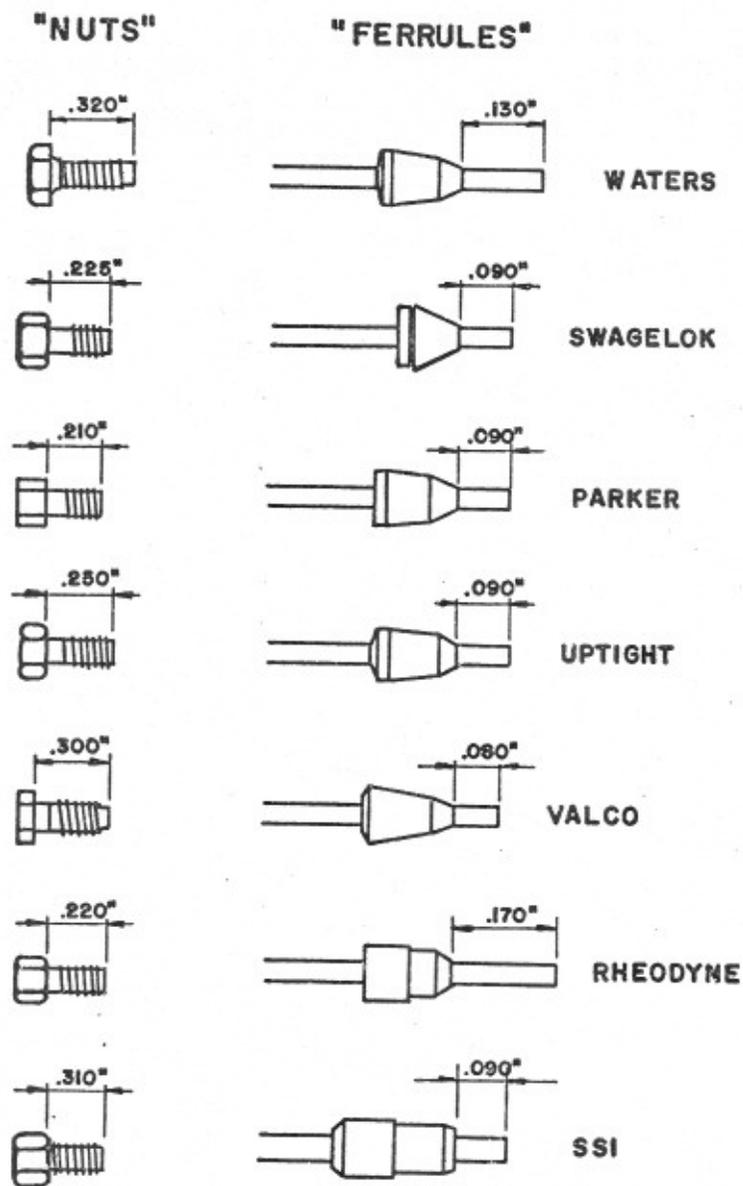


Figura IV.1 - Alguns Tipos de Terminais Existentes e seus Respective Fabricantes. As Distâncias x Variam Conforme a Marca, Evidenciando a Incompatibilidade entre as Diversas Peças.

ser adaptado ao tubo vazio e deve-se dar o "aperto" segundo as especificações do fabricante. Conforme o tipo das peças e o diâmetro do tubo empregado, dá-se um determinado número de voltas ou uma fração delas, para se conseguir uma conexão perfeita. Assim, fica pronta a coluna vazia.

Ao se escolherem os terminais, deve-se levar em consideração sua compatibilidade com o sistema cromatogrâfico e com a bomba de empacotamento evitando problemas posteriores.

c) Seleção do método de empacotamento

A seleção do método de empacotamento depende, principalmente, do tipo de material a ser empregado. Partículas rígidas, porosas, à base de sílica gel, são empacotadas por via úmida. Esta técnica baseia-se na preparação de uma suspensão (slurry) do material em um solvente ou em uma mistura de les, de forma a obter uma dispersão adequada que permaneça estável à temperatura ambiente, livre de corrente de ar, pelo menos por um período de tempo suficiente para a transferência da suspensão ao reservatório da bomba e início do empacotamento. Basicamente são dois os métodos empregados no empacotamento de colunas por via úmida.

O primeiro deles controla a **densidade** do solvente empregado. Quanto mais próxima ela estiver da densidade do material de empacotamento, menor será a velocidade de sedimentação das partículas na suspensão. Em geral, os solventes usados nesta técnica são tóxicos e caros e podem, inclusive, reagir com as fases empregadas e, até mesmo, atacar os tubos. A proporção entre os solventes é determinada por "ensaio e erro".

O segundo método baseia-se na viscosidade dos solventes. A sedimentação das partículas é mais lenta em solventes com alta viscosidade; contudo tais solventes aumentam a resistência ao fluxo, exigindo alta pressão de empacotamento, o que causa quebra das partículas tornando o processo lento. Partículas grandes são mais pesadas e exigem maiores cuidados; no entanto as partículas de 5 μ m, ou menos, têm uma velocidade de sedimentação bastante reduzida e podem ser empacotadas com solventes de viscosidade mais baixa.

Uma vez escolhido o solvente ou estabelecida a composição da mistura a ser empregada, a suspensão deve ser preparada usando vigorosa agitação, se possível com ultra-som. Em nosso trabalho foi usado o Agitador Ultra-sônico Branson, modelo Sonifier B-12. Deve-se considerar também a natureza e polaridade dos solventes empregados. No empacotamento de colunas para a cromatografia com fase reversa, devem ser preferidos solventes polares ou solventes que sejam facilmente eliminados ou "lavados" através do solvente propulsor e/ou da fase móvel a ser empregada na avaliação das colunas.

A seleção do solvente de propulsão, é também importante. Deve ser previamente degaseificado (com ultra-som) e filtrado em filtros de porosidade reduzida, menor ou igual àquela a ser empregada nas colunas, e deve estar nos frascos correspondentes da bomba de empacotamento (reservatórios de solventes).

d) Preparação da bomba de empacotamento

Todas as colunas deste projeto foram empacota

das usando-se uma bomba específica para empacotamento de colunas para HPLC, marca Shandon, modelo HPLC(RR-025), que opera a pressão constante, cuja vista frontal é mostrada na figura IV.2 . Antes de ser colocada em funcionamento, a bomba deve estar com todas as conexões preparadas. Deve-se verificar se as conexões são compatíveis com as da coluna a ser empacotada. Uma vez preparada, colocam-se todos os solventes, degaseificados, nos respectivos reservatórios e liga-se a bomba para a passagem dos solventes através de todas as tubulações. Em geral usa-se a ordem inversa a ser empregada durante o processo de empacotamento. Nesta etapa a coluna vazia deve ser acoplada ao sistema para se verificarem possíveis vazamentos e eliminar bolhas de ar no equipamento. Uma das extremidades da coluna deve ser acoplada ao reservatório através de conexões especiais, e a outra deve estar montada já com os terminais definitivos, inclusive como filtro. A pressão deve ser aumentada lentamente até atingir o valor necessário. Com este procedimento, todos os tubos adaptadores, o reservatório e a própria coluna ficam cheios de solvente. Se nenhum vazamento for detectado, a bomba deve ser desligada, e espera-se um período para que a pressão volte a zero. A seguir separa-se o reservatório da coluna cuidadosamente, para que permaneça cheia de solvente. O reservatório deve ser invertido para retirar o solvente, que deve ser medido sempre, por precaução, pois pode ocorrer a permanência de solvente no seu interior, pois sua outra extremidade fica fechada.

Quanto ao procedimento de empacotamento, propriamente dito, podem-se considerar ainda alguns detalhes. A pressão pode ser mantida constante durante todo o processo e,

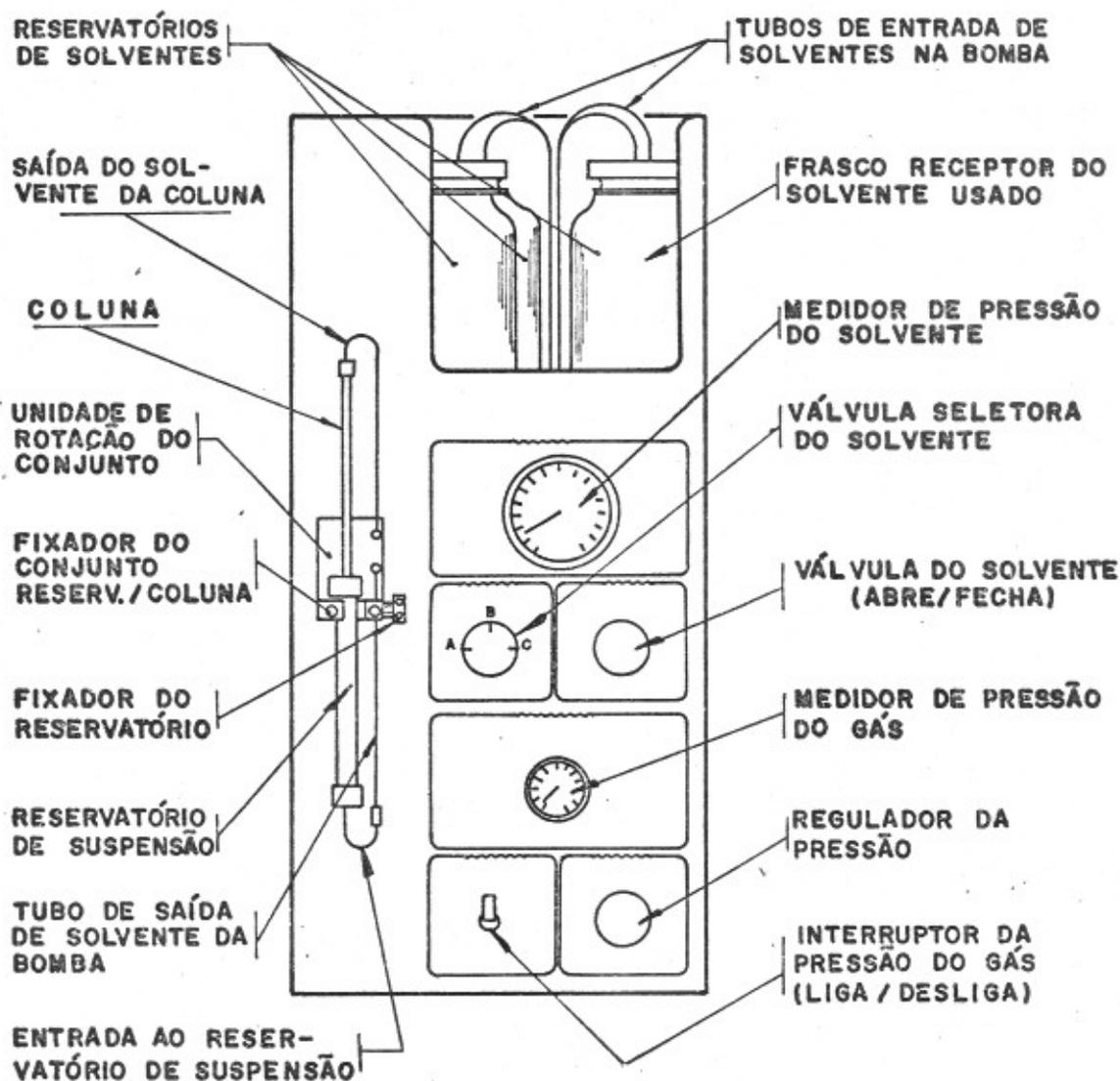


Figura IV.2 - Vista Frontal da Bomba de Empacotamento de Colunas, Marca Shandon, Modelo HPLC (RR-025), Movida a Gás (N_2), Com Identificação de seus Diversos Componentes.

conseqüentemente, a vazão do solvente propulsor, que impulsiona a suspensão para o interior da coluna onde as partículas são retidas pelo filtro localizado em sua extremidade oposta, diminui até tornar-se constante, o que indica o final do processo. Pode-se usar ainda vazão constante e pressão variável. Além disso, o sentido do empacotamento pode ser ascendente ou descendente, conforme seja a localização do reservatório de suspensão em relação à coluna a ser empacotada.

Finalmente, para o empacotamento à pressão constante, a bomba deve ser pré-pressurizada, com a pressão a ser empregada. Para isso, deve-se ligar a bomba, mantendo a válvula de solvente fechada, e acionar a válvula de pressão do gás até o valor necessário. Este procedimento é importante, pois ao dar início ao empacotamento, a pressão pré-estabelecida deve ser atingida tão rapidamente quanto possível.

e) Empacotamento das colunas

Finalizadas todas as etapas anteriores, pode-se então processar o empacotamento das colunas propriamente dito.

A suspensão, após homogeneização por ultra-som, deve ser transferida ao reservatório através de um funil ou com auxílio de uma seringa.

O reservatório da suspensão deve ser acoplado à coluna (ver fig. IV.2), previamente cheia de solvente (pode ser o solvente propulsor ou a mistura empregada na preparação da suspensão). A bomba deve ser ligada, com a válvula de solvente aberta, para que imediatamente ocorra a pressurização do solvente propulsor que flui através do sistema, impulsionando

a suspensão que penetra na coluna, onde é filtrada; deixando passar apenas o solvente. As partículas ficam retidas pelo filtro e vão se acomodando uniformemente, formando o "leito" da coluna. Deve-se fazer um controle da vazão do solvente que flui da coluna. Nos empacotamentos a pressão constante observa-se que a vazão, inicialmente alta, vai se reduzindo, à medida que as partículas da fase estacionária vão se compactando no interior da coluna, até tornar-se constante, o que indica o término do processo.

Se forem adotados os dois sentidos de empacotamento, ascendente e descendente, deve-se inverter o sentido do conjunto reservatório/coluna durante o empacotamento, o que é facilitado pela configuração da própria bomba, pois o conjunto é fixado em um suporte que permite o giro de 180° . Com isso, pode-se ter a coluna posicionada acima ou abaixo do reservatório. Embora o fluxo do solvente seja num único sentido-do reservatório para a coluna - a inversão do conjunto permite que o fluxo seja, ora de baixo para cima - ascendente - ora de cima para baixo - descendente. O sentido ascendente é vantajoso no início do processo, pois impede que partículas maiores se sedimentem, produzindo um leito mais homogêneo. Quando a vazão se torna constante - uma indicação de que o empacotamento está em sua fase final - deve-se passar mais solvente propulsor (quantidade equivalente a 100 vezes o volume da coluna). A seguir, sem se desligar a bomba, muda-se o solvente, através da válvula seletora de solventes (ver fig. IV.2). Esta mudança depende, fundamentalmente, do solvente empregado na propulsão. Se este apresentar polaridade semelhante à da fase móvel, pode-se mudar diretamente para a própria fase móvel; caso contrário deve-se

variar-se a polaridade lentamente até que esta se aproxime ou se iguale à polaridade da fase móvel. Só então muda-se para a fase móvel, que deve passar pelo menos por 5 minutos através da coluna, após o que a bomba é desligada. Deve-se esperar cerca de 5 a 10 minutos, até que a pressão do gás volte a zero e então separa-se a coluna da bomba e adapta-se o terminal com o filtro. A coluna está pronta para a avaliação.

2. AVALIAÇÃO DAS COLUNAS

Torna-se necessário tomar uma série de precauções para a avaliação das colunas, com relação aos testes, às características do sistema cromatográfico e ao método empregado nos cálculos. Devem-se então considerar as seguintes etapas para a avaliação das colunas.

a) Aperfeiçoamento do sistema cromatográfico

A figura IV.3 apresenta um esquema dos principais componentes de um sistema de HPLC. Quando o equipamento é comprado, geralmente possui longos tubos unindo injetor-coluna-detector. Nem sempre estes tubos apresentam orifícios capilares. Tais equipamentos necessitam de certas modificações para serem empregados com colunas analíticas, mesmo que nas dimensões convencionais. A variância de um equipamento cromatográfico é função das características da coluna, ou seja, seu valor deve ser desprezível comparado à variância da coluna; caso contrário, todos os resultados produzidos estarão seriamente comprometidos. Para se atingir tal meta, deve-se, antes de quaisquer testes, determinar a variância total do sistema cromatográfico. Se o valor encontrado for significativo, devem-se reduzir as dimensões dos tubos e conexões através do emprego

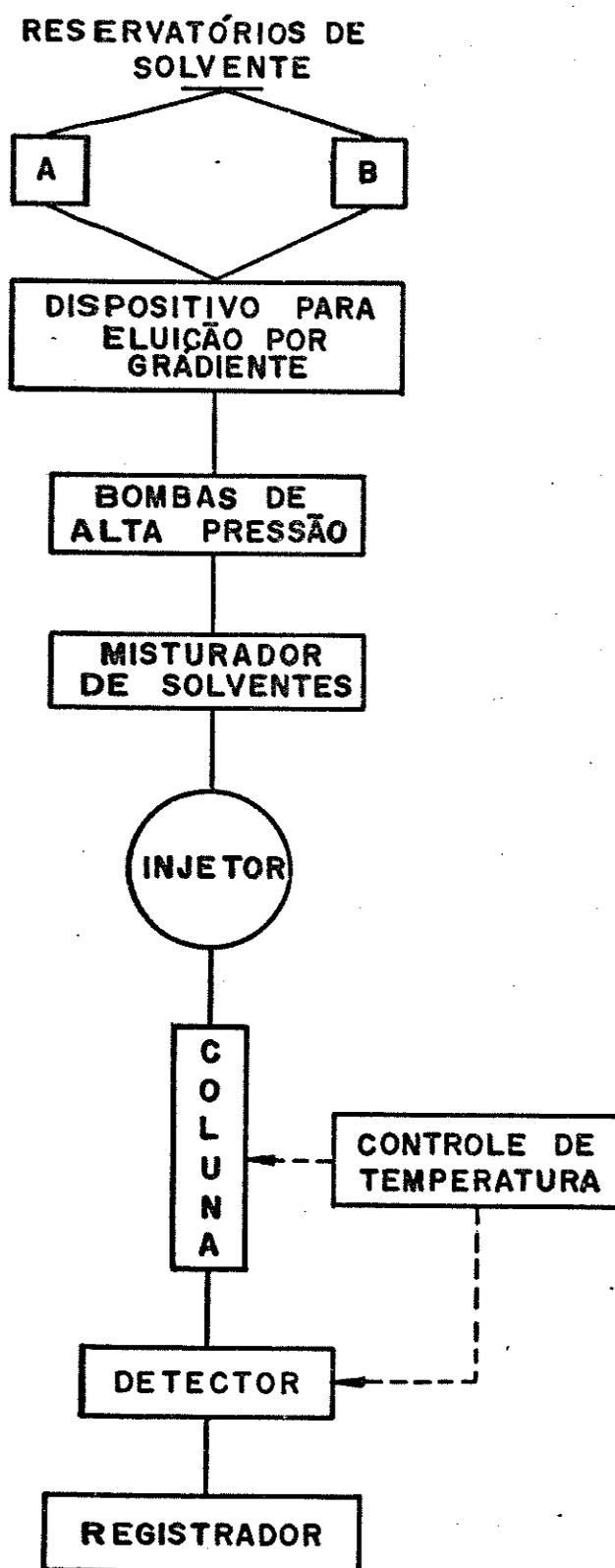


Figura IV.3 - Esquema Típico de um Equipamento para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

de tubos com reduzíssimo diâmetro interno (capilar) e minimizar seu comprimento. É claro que o diâmetro é limitado pelas disponibilidades no mercado e o comprimento, pela disposição física dos vários componentes.

Após estes cuidados aparentemente simples, novos testes devem ser realizados para se constatar a eficácia das mudanças realizadas.

Outros detalhes importantes concernem aos volumes de amostra a serem injetados, ao tamanho da cela e ao tempo de resposta do detector. Estes parâmetros devem ser verificados e otimizados. Para colunas convencionais, sua importância é relativa, no entanto com microcolunas é crucial.

Finalmente deve-se verificar a adequação dos terminais da coluna aos do equipamento cromatográfico para se garantir vedação perfeita e dispersão reduzida.

b) Condicionamento das colunas e seleção da fase móvel

O condicionamento de uma coluna faz-se mister para que ocorra um perfeito equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. Deve ser feito de maneira gradual, isto é, a polaridade dos solventes empregados no condicionamento deve variar lentamente desde o valor da polaridade do solvente propulsor até ao da fase móvel a ser empregada nos testes. Se esta variação já tiver sido realizada durante o processo de empacotamento, pode-se então empregar diretamente a fase móvel após a adaptação da coluna ao cromatógrafo.

A escolha da fase móvel depende da técnica

cromatográfica empregada, da mistura a ser separada e, é claro, da disponibilidade. Além do requisito de baixa viscosidade, que é importante para reduzir a queda de pressão durante o procedimento cromatográfico, deve-se evitar o uso de solventes tóxicos e altamente inflamáveis. Como isto é difícil, de vem-se minimizar os riscos trabalhando em ambientes bem ventila dos e evitando a colocação de dispositivos, como bombas, em lo cais que possam coletar vapores de solventes. Deve-se veri ficar a miscibilidade dos solventes em água ou em outros sol ventes, em todas as proporções, principalmente quando se preten de usar eluições por gradiente.

A reati-
vidade dos solventes com a fase estacionária e com a própria amostra também deve ser evitada. Finalmente deve-se considerar a pureza dos solventes e sua compatibilidade com o sistema de detecção. Para a cromatografia com fase reversa, as fases móveis usadas são polares ou, pelo menos, mais polares que a fase estacionária. São constituídas de solventes orgânicos misturados com água em diferentes proporções. Os solventes mais empregados são o metanol, devido à sua alta polaridade e baixo custo; a acetonitrila, de polaridade intermediária; e o tetra-hidrofurano, o menos polar e mais caro em comparação aos anteriores. Muitas vezes, dadas as características da mistura a ser separada é preciso um solvente menos polar ou eluições com gradiente envolvendo misturas ternárias ou até mesmo quaternárias, e então podem-se usar todos eles, inclusive a água e variar suas proporções, conforme as necessidades.

Em nosso trabalho, como a preocupação maior foi o fator econômico, a fase móvel empregada foi, quase sempre, uma mistura de metanol e água. Uma vez estabelecida a nature-

za da fase móvel deve-se procurar, entre seus componentes, a melhor proporção que satisfaça as necessidades. Foi usado um programador de solventes para o estabelecimento da melhor composição metanol-água para a fase móvel. Iniciou-se com metanol puro e aumentou-se o teor de água em 5% de cada vez e realizaram-se eluições isocráticas a cada novo incremento. Procurou-se um compromisso entre máxima resolução e mínimo tempo de análise, sem, contudo, esquecer o fator econômico, isto é, tentou-se a máxima porcentagem de água. Concluiu-se que a proporção 70/30 (v/v) para a mistura metanol/água apresentava-se ideal, além do que maiores proporções de água não só aumentavam o tempo de análise, como também provocavam maiores quedas de pressão.

O condicionamento deve ser realizado percolando a fase móvel através da coluna, com uma vazão 2 a 3 vezes a vazão ótima, e acompanhando, através do sistema de registro, o comportamento da linha de base. Quando esta se mantém estável por cerca de 5 minutos, podem-se iniciar os testes. Em geral o tempo de condicionamento varia um pouco de coluna para coluna, mas, se todos os equipamentos estiverem em ordem e não houver flutuações na rede elétrica, cerca de 30 minutos será suficiente. Se, durante o empacotamento não houver passagem de fase móvel, serão necessárias, pelo menos, duas horas para que haja um equilíbrio perfeito. Não se deve esquecer que o tempo não é crítico para o equilíbrio, mas sim o volume de fase móvel empregado; no entanto, não se devem usar vazões muito mais altas que aquelas a serem empregadas nos testes, para reduzir o tempo de condicionamento, pois submeter desnecessariamente as colunas a elevadas pressões além de grandes riscos po

dem-se causar danos irreversíveis tanto à coluna quanto ao equipamento. Uma prática empregada é deixar durante a noite, a vazão bem pequena, porém isto só deve ser feito quando se tem certeza da estabilidade da voltagem da rede elétrica e quando há dispositivos de segurança nos equipamentos usados; por exemplo, a bomba desliga-se automaticamente se a pressão atingir um valor crítico.

Outra prática muito importante, é o início do condicionamento da coluna sem o seu acoplamento ao sistema de detecção. Esta é uma forma de evitar que partículas penetrem na cela de detecção causando obstruções, muitas vezes irreversíveis. Tais partículas podem ser provenientes da própria coluna, por emprego de filtros não adequados, ou por variações bruscas da fase móvel que podem solubilizar a fase estacionária ou arrastar solutos que tenham ficado retidos no leito da coluna, quando do emprego de outras fases móveis. Estes solutos podem reprecipitar dentro da cela de detecção ou na tubulação de entrada ou saída do detector conforme as condições ali encontradas, provocando obstruções, que serão detectadas através de aumento "inexplicável" da pressão, ou até mesmo a ruptura das janelas da cela. Outra fonte de micropartículas são os tubos e conexões empregados. Estes devem ser "lavados" na linha de fluxo antes de serem acoplados ao detector por um bom tempo (~15 min) com alta vazão (~5ml/min na ausência da coluna).

O uso de filtros é indispensável nos reservatórios, injetores e conexões empregadas, mesmo que os solventes já tenham sido filtrados. Finalmente deve-se lembrar, que para avaliações das colunas, as eluições devem ser isocráticas e a composição da fase móvel facilmente reproduzida. Os solventes devem ser previamente degaseificados. O critério de pureza dos reagentes, solventes orgânicos e água deve ser rigoroso. Em nosso projeto foram

empregados solventes grau PA, porém filtrados previamente em filtros com baixíssima porosidade ($0,2\mu\text{m}$), durante os trabalhos com colunas convencionais. Para as microcolunas foram empregados solventes grau HPLC. Durante todo o projeto foi utilizado água purificada no sistema Milli-Q (Millipore).

c) Determinação do volume morto da coluna

Para se chegar aos parâmetros de interesse de uma coluna, deve-se conhecer seu volume morto, V_0 , o tempo de retenção de um soluto não retido. Isto é feito experimentalmente por injeção de um soluto cuja interação com a fase estacionária seja nula, isto é, o valor de V_0 deve ser independente da vazão, da composição da fase móvel e da concentração do soluto injetado.

Na cromatografia com fase reversa a escolha do soluto de teste apresenta alguns problemas, pois a maioria dos compostos orgânicos apresenta alguma partição com a fase estacionária e resultam valores de V_0 mais altos que os reais. Compostos iônicos em eluentes não tamponados são excluídos dos poros das partículas por repulsão eletrostática levando a resultados mais baixos, o mesmo acontecendo com solutos de alta massa molar.

Alguns sais como o nitrito e o nitrato de sódio e o brometo de potássio já foram empregados para este fim, porém sua detecção é um fator limitante.

Em nosso projeto, foi empregada uma técnica radioanalítica, através da injeção de água tritiada e detecção da radiação beta em um sistema de cintilação líquida, que será descrita oportunamente em detalhes.

d) Escolha da mistura de teste e sua detecção

A constituição da mistura a ser empregada na avaliação das colunas é extremamente importante. Seus componentes devem possuir comportamentos que levem à determinação das características físicas e químicas do leito da coluna.

Assim, para um determinado sistema de teste (soluto/solvente) certos parâmetros cromatográficos devem ser constantes e quaisquer variações indicam problemas específicos com a coluna ou com a fase estacionária propriamente dita.

A mistura deve conter compostos que caracterizem adequadamente a coluna em termos cinéticos e termodinâmicos. Em geral escolhem-se solutos com valores de k' entre 2 e 10. Para a cromatografia com fase reversa devem-se evitar solutos com características ácidas ou básicas, para que não ocorram mecanismos múltiplos, como nos casos de silanóis livres na fase estacionária, devido a fraco recobrimento do suporte pela fase líquida. Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares com massas molares relativamente baixas são ideais.

Durante o nosso projeto, foi empregada, para a avaliação das colunas, uma mistura constituída de acetona, benzeno, benzonitrilo, tolueno e naftaleno. Antraceno também foi usado algumas vezes, porém tem um tempo de retenção muito longo, causando muita demora nas análises; por isso foi descartado. A escolha desta mistura foi baseada nas considerações anteriores e disponibilidades de nosso laboratório, além de coincidir com misturas empregadas por alguns fabricantes de colunas, o que facilita nossa comparação com as colunas existentes no mercado.

Em geral, a mistura de teste é dissolvida na

própria fase móvel. Em nosso caso, foram preparadas soluções-estoque em metanol puro, pois a solubilidade dos componentes da mistura diminui com o aumento do teor de água na fase móvel (exceção feita à acetona). As misturas de teste foram preparadas por adições de gotas das soluções estoque em cerca de 20ml de fase móvel e rápidas injeções para verificar a altura dos picos no cromatograma (ensaio e erro). Não houve, portanto, uma preocupação quantitativa, e sim um interesse em obter picos com alturas similares, de forma a ocupar cerca de 70 a 80% do papel de registro. Este procedimento foi adotado para minimizar os erros nas medidas manuais para o processamento dos cálculos. Além disto a concentração destes solutos varia de coluna para coluna. A mistura assim preparada pode ser usada durante 1 semana ou 2, após o que deve ser novamente preparada, a partir das soluções estoque, que podem ser guardadas bem tampadas durante meses, preferivelmente em refrigeradores.

Outro detalhe a ser observado, na seleção da mistura de teste, é com relação à detecção. A maioria dos sistemas cromatográficos opera com detecção através de espectrofotômetros com celas de fluxo, e os solutos são detectados na região do ultravioleta e raras vezes no visível. Assim, há um compromisso entre a máxima absorção dos solutos e a mínima absorção da fase móvel. Os solventes orgânicos mais empregados na HPLC em geral começam a absorver na região de 250-240nm; a 220nm já ocorre cerca de 20% de absorvância e, abaixo deste valor, a detecção do soluto é impraticável. Em geral o comprimento de onda de 254nm é empregado, pois a maioria dos compostos orgânicos tem excelente absorvância neste valor em contraposi

ção à transparência dos solventes empregados. Uma boa prática é verificar sempre, após a troca dos reagentes, o seu comportamento na faixa do espectro eletromagnético de interesse. Muitos detectores são de comprimento de onda variável e isto facilita muito, pois a verificação pode ser feita por injeção do soluto, ou solvente de interesse, diretamente na cela de fluxo e uma varredura na faixa de comprimentos de onda de interesse. Quando se conhece soluto e coluna, e se sabe que ele é totalmente separado ($R_s > 1,2$) pode-se fazer tal varredura por interrupção do fluxo da fase móvel no momento em que o soluto se encontra no interior da cela, obtendo, assim, facilmente seu espectrograma (técnica conhecida como "stop-flow scanning").

Se outros detectores forem empregados, os mesmos cuidados devem ser observados, isto é, o compromisso entre a máxima detecção dos solutos com mínima interferência da fase móvel.

e) O sistema de injeção

A apropriada introdução da amostra na coluna cromatográfica é um importante fator na obtenção da sua performance. A amostra deve ser injetada através de um sistema constituído de tubos muito finos e com volume morto nulo para que o espalhamento do pico seja negligenciável. Quando a coluna fornece picos com volumes muito pequenos, a injeção da amostra é crítica. De uma maneira geral, um injetor para HPLC deve introduzir a amostra na coluna através de tubos muito estreitos, ser reprodutível, operar a altas quedas de pressão e apresentar manuseio conveniente.

Em nossos trabalhos, foram empregadas válvulas

injetoras manuais, marca Rheodyne, especiais para micro-amostragem e aplicações em sistemas de HPLC. Com estas válvulas amostradoras, amostras podem ser introduzidas com alta reprodutibilidade (ou repetibilidade) em colunas pressurizadas (até 7000 psi ~ 50MPa, segundo especificações do fabricante), sem significantes interrupções do fluxo e, até mesmo, a elevadas temperaturas.

Outra vantagem destas válvulas é que a amostragem pode ser variada por simples troca da alça ("loop") e não necessita de seringas de precisão para as injeções. Um volume maior de amostra é introduzido, de tal forma a encher toda a alça (posição "load") eliminando bolhas que possam existir e o excesso é descartado automaticamente. O rotor de válvula é acionado e apenas o volume da alça é injetado (posição "inject"). Dois cuidados devem ser tomados, um com relação ao movimento sempre de forma suave e com a mesma velocidade, e outro com relação à lavagem da alça. Entre duas injeções consecutivas a alça deve ser lavada com a própria fase móvel, em ambas as posições.

Em todos os nossos trabalhos, a válvula foi mantida na posição "inject" após a injeção e durante toda a eluição. Alguns pesquisadores preferem voltar à posição "load" poucos segundos após a injeção, sob a alegação de alargamento da banda por contínua lavagem da alça durante a eluição, no entanto não se constatou, em nosso trabalho, diferenças entre as 2 maneiras de injeção, a não ser variações nas alturas dos picos quando foi empregada a técnica de voltar à posição "load". Então optou-se por deixar a alça na posição "inject" até o final da eluição, quando se deve lavá-la com a fase móvel, e só

depois voltar à posição "load" e novamente proceder à lavagem antes de nova introdução de amostra.

Uma das válvulas "Rheodyne" empregadas, a modelo 7010, permite a troca de alças e foram empregadas em nosso trabalho alças de 20, 10, 5 e $1\mu\ell$ para a injeção de amostras nos sistemas convencionais. A outra válvula, empregada no sistema "Micro-HPLC", também da marca Rheodyne, modelo 7413 apresenta alça interna de $1\mu\ell$, a qual foi usada em todos os trabalhos com as microcolunas.

f) O sistema de bombeamento

Além da bomba propriamente dita, pode-se considerar como sistema de bombeamento a válvula de verificação, os controladores da vazão, a câmara de mistura, os amortecedores de pulsos e os conversores de pressão.

Para a cromatografia com colunas convencionais as bombas empregadas devem ser capazes de fornecer vazões, pelo menos, na faixa de 0,5 a 3 ml/min e pressões máximas da ordem de 5000psi ($\approx 35\text{MPa}$). A vazão deve ser estável, apresentar uma precisão razoável (algumas unidades por cento) e, portanto, deve ser reprodutível. O fluxo produzido pela bomba deve apresentar reduzida pulsação. Outros requisitos a serem observados na seleção de uma bomba são, além do preço, a resistência química à corrosão por solventes, facilidade de operação e o tempo necesário para a troca de solventes. Evidentemente apenas uma bomba caríssima irá preencher todos os requisitos acima. Em geral os sistemas comerciais representam um compromisso entre os diferentes fatores.

Para o sistema convencional, em nosso projeto,

foram usadas duas bombas marca Altex, modelo 110, do tipo reci
procante. Estas bombas não são muito caras e operam continua-
mente a vazão constante e podem ser usadas em sistemas com gra
diente. Porém apresentam pulsação e, durante uma parte do pro
jeto, empregou-se um longo tubo espiralado (amortecedor) entre
a bomba e o injetor para reduzir os pulsos. Não são adequadas
ao uso com solventes voláteis, pois pode ocorrer cavitação. A
manutenção não é muito complexa. Em alguns testes foi empre
gado também um programador de solventes Master LDC, modelo 1600
e um misturador de solventes, também marca Master LDC, modelo
1000, para a variação da composição da fase móvel, porém ape
nas em programas isocráticos.

Para a "Micro-HPLC" faz-se mister uma bomba com
capacidade de produzir vazões bem mais reduzidas, da ordem de
poucos $\mu\text{l}/\text{min}$, e, conseqüentemente, com precisão mais elevada. A
ausência de pulsações é um requisito importante.

Em nosso projeto empregou-se uma bomba marca
ISCO, modelo $\mu\text{-LC}$ 500, para vazões de 0,02 a $600\mu\text{l}/\text{min}$,
com uma precisão de 1 % e pressão máxima de 10000 psi ($\approx 70\text{MPa}$).
Trata-se de uma bomba tipo seringa, movida a pistão, com veloci-
dade fixa, com um cilindro (reservatório de solventes) de 50ml.
As únicas desvantagens desta bomba são a troca de solventes que é
muito trabalhosa e demorada, pois exige sucessivas lavagens do
cilindro, e, evidentemente, o preço.

g) O sistema de detecção

Na HPLC as separações ocorrem de forma contí
nua, tornando necessária a detecção dos componentes isolados à
medida que eles vão deixando a coluna. Há, basicamente, dois ti

pos de detectores: aqueles que medem as propriedades como um todo, ou seja, a diferença entre alguma propriedade física do soluto na fase móvel e a da fase móvel pura, e aqueles que determinam a propriedade do próprio soluto.

Detectores que medem a propriedade como um todo, em geral, são quase universais, mas têm baixa sensibilidade e limitada faixa dinâmica, sendo afetados por pequenas variações na composição e vazão da fase móvel e da temperatura. Como exemplos, temos os detectores de índices de refração, constante dielétrica e condutividade.

Detectores que respondem às propriedades físicas ou químicas do soluto, idealmente, independem da fase móvel. Exemplos destes são os detectores espectrofotométricos, eletroquímicos e os de fluorescência. Embora a independência da fase móvel seja relativa, as variações são suficientemente pequenas permitindo operar com mudanças em sua composição como eluições por gradiente, fornecendo alta sensibilidade e ampla faixa de resposta linear.

Em nosso projeto foram empregados detectores espectrofotométricos com comprimentos de onda variáveis nas regiões visível (lâmpada de tungstênio) e ultravioleta (lâmpada de deutério).

Para as colunas convencionais foi usado o detector marca Schoeffel, modelo 770. A detecção, durante a avaliação das colunas, foi efetuada a 254nm. Este detector fornece excelente reprodutibilidade, porém deve-se verificar sempre a amperagem da lâmpada, pois se estiver fora das especificações do fabricante a reprodutibilidade cai bastante. Há

inclusive uma tabela de confiabilidade dos resultados em função do número de horas de uso da lâmpada de deutério, fornecida pelo próprio fabricante da lâmpada (tabela IV.I). Países desenvolvidos sugerem a troca das lâmpadas entre seis meses e um ano de uso; porém esta prática é impossível no Brasil. Portanto todas as precauções devem ser tomadas, e deve-se lembrar que ligar e desligar uma lâmpada, muitas vezes, pode ser mais prejudicial que manter a lâmpada ligada durante um dia inteiro, se ela for necessária várias vezes durante este dia.

A cela de fluxo deste detector possui janelas de quartzo, facilmente substituíveis e volume de 8 μ l, sendo adequado ao uso com colunas convencionais, porém muito grande para colunas com diâmetro menor.

Durante os trabalhos, devem ser tomadas todas as precauções; por exemplo, após o uso, devem-se lavar bem as células deixando passar fase móvel e depois o solvente puro por vários minutos, para não acumular impurezas e não ocorrer obstruções na cela de fluxo, o que exigiria uma limpeza constante da cela. Porém, com certos cuidados e prática, a manutenção pode ser feita pelo próprio operador. Além da cela de amostra, este detector possui também uma cela de referência, mas, como há uma compensação eletrônica interna, nós nunca usamos esta cela, ou seja, ela foi mantida sempre vazia, mas seu alinhamento óptico, assim como o da cela de amostra, é importante e deve ser verificado caso haja qualquer anomalia no registro dos cromatogramas.

O tubo que liga o fim da coluna à cela de fluxo neste detector é longo e passa através de um trocador de ca

Tabela IV.I - Relação Entre a Confiabilidade da Resposta do Detector e o Tempo de Uso da Lâmpada de Deutério, Fonte de Radiação Ultravioleta, Fornecida pelo Fabricante da Fonte: Kratos Analytical Instruments.

| Tempo de Uso (Horas) | Credibilidade |
|---------------------------------|----------------------|
| 0 a 200 | 100% |
| 201 a 300 | 80% |
| 301 a 400 | 70% |
| 401 a 500 | 60% |
| 501 a 600 | 50% |
| 601 a 700 | 40% |
| 701 a 800 | 30% |
| 801 a 900 | 20% |
| 901 a 1000 | 10% |
| Mais de 1000 | 0% |

lor, tendo cerca de 30cm. Como nosso propósito era reduzir a dispersão extra-coluna, este tubo, juntamente com o trocador de calor, foi retirado. Com isto o comprimento do tubo foi reduzido a 10cm, permitindo a conexão da coluna à cela de detecção com menor dispersão.

Como se trata de um detector de comprimento de onda variável, é possível registrar espectrogramas dos compostos de interesse por interrupção do fluxo e varredura na faixa de comprimentos de onda que se deseja. Esta prática ("stop-flow scanning") foi muito empregada durante os nossos trabalhos, para verificar a transparência da fase móvel ou o coeficiente de extinção molar de alguns solutos.

Para os trabalhos com as colunas de diâmetros reduzidos, a cela de $8\mu\ell$ é muito grande e foi usado um outro detector marca LDC, modelo Spectro Monitor D - 481. Este detector, também espectrofotométrico, ultravioleta e visível, possui uma cela de fluxo de $1\mu\ell$ e permite ligar a coluna diretamente à cela de fluxo, com o emprego de um adaptador de volume morto nulo; nos casos das colunas com roscas externas, ou diretamente, se o terminal da coluna possuir rosca interna. Este detector exige maiores precauções durante o uso e maior tempo para a estabilização. Os cuidados com as lâmpadas e a cela de detecção são os mesmos citados anteriormente para o detector Schoeffel.

Um outro detalhe importante é a constante de tempo de um detector, isto é, o tempo que o sistema gasta para enviar a resposta ao sistema de registro. Para que a dispersão cromatográfica devido ao sistema de detecção seja minimiza

da, a resposta deve ser praticamente instantânea; daí ambos os detectores terem sido operados com constantes de tempo mínimas, 1 e 0,05s para os sistemas convencional e micro, respectivamente.

h) O sistema de registro dos cromatogramas

O tempo de resposta do sistema de registro é também muito importante. De nada adiantam detectores sofisticados ou otimizados, se o sistema de registro não corresponder. Um registrador de boa qualidade é essencial na HPLC, uma vez que muitas separações envolvem picos agudos e requerem rápido e preciso monitoramento.

As características preferidas de um registrador para HPLC incluem tempos de resposta iguais ou menores que um segundo (o que equivale a uma constante de tempo, C , menor ou igual a 0,3 segundos), alta impedância de entrada (>1 Mohm), boa rejeição a ruídos, várias voltagens de entrada ("floating input") e velocidades do papel variáveis.

Durante nosso trabalho foram usados os registradores potenciométricos marca ECB, modelo 102. Como a saída de nossos detectores é de 10mV, os registradores foram mantidos com esta voltagem de entrada, embora possuíssem várias outras.

Para a realização das medidas dos parâmetros experimentais, feitas manualmente, é importante obter picos largos e grandes distâncias de retenção, para que os erros percentuais sejam minimizados. Como os registradores oferecem a possibilidade de várias velocidades do papel de registro, esta foi largamente explorada de forma a obter sempre cromatogramas similares, com relação à largura dos picos, em todas as vazões empregadas, o que facilitou muito durante as medidas dos parâ-

metros experimentais. Assim, quando se empregam baixas vazões, o que implica em maiores tempos de retenção, a velocidade do papel foi menor do que para as vazões mais altas. Com este procedimento, pode-se uniformizar as medidas e, conseqüentemente, reduzir os erros relativos, o que é primordial para efeitos comparativos.

Como as características destes registradores correspondem às necessidades, eles também foram empregados na Micro-HPLC sem problemas.

i) A metodologia empregada nos cálculos

Para se descrever efetivamente a performance de uma coluna, seu número de pratos teóricos, N , deve ser precisamente determinado. A forma do pico não só afeta o valor calculado de N , como também é importante por si só. Como se discutiu na parte introdutória, há muitos métodos disponíveis para a determinação de N . O método do soluto pode ser empregado para diferentes formatos de picos, porém exige cálculos de momentos estatísticos e, conseqüentemente, auxílio de técnicas computadorizadas.

Se os picos forem simétricos ou apresentarem baixa assimetria, podem-se empregar as expressões derivadas da equação . Entre elas, a mais comumente usada, devido às facilidades relativas às medidas experimentais e reprodutibilidade é:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{eq. I.18})$$

onde t_R é o tempo de retenção, tomado no ápice do pico e $w_{1/2}$ é

a largura do pico a 50% de sua altura, em unidades de tempo.

Deve-se lembrar sempre que esta equação é derivada através de considerações feitas ao pico Gaussiano e, se for empregada para picos distorcidos, os valores de N perdem sua validade. Como nosso interesse foi sempre o de considerar apenas as colunas com picos simétricos ou com baixíssima assimetria, esta expressão foi empregada durante todo o nosso trabalho experimental, e os fatores de assimetria dos picos foram sempre determinados.

Há vários caminhos para a obtenção da assimetria dos picos; entretanto o mais empregado, inclusive pela maioria dos fornecedores de colunas, é o método que considera a razão a 10% da altura. A figura IV.4 apresenta um cromatograma, destacando os parâmetros experimentais de interesse e indicando a forma para se calcular o fator de assimetria, As .

Além da determinação do número de pratos teóricos, N , e do fator de assimetria, As , outros parâmetros cromatográficos podem ser obtidos e são muito úteis na avaliação das colunas; entre eles destacam-se:

- a altura equivalente a um prato teórico - H ,
- a altura de prato reduzida - h ,
- a velocidade linear da fase móvel - u ,
- a velocidade linear reduzida - v
- o fator de resistência ao fluxo - β
- ou a permeabilidade específica da coluna - K_0 ,
- a razão de Knox-Parker - I ,
- a porosidade total - ϵ_t ,

e aqueles mais comuns como:

- o fator de capacidade - k' ,
- a resolução - R_s
- e o fator de seletividade - α

Todos estes parâmetros já foram discutidos na parte introdutória juntamente com as equações que permitem obter seus valores.

Deve-se destacar ainda que, ao se registrar um cromatograma, cuidados simples como anotar a data, as condições de operação e as características da coluna não devem ser menos prezados, pois podem comprometer a avaliação e comparação posteriores. Então, sugere-se uma seqüência para este procedimento, lembrando que é melhor excesso do que falta de informação. Inicia-se pela data de análise, podendo, inclusive, constar o horário do teste, pois, às vezes, pode ser relevante, por exemplo, se foi o primeiro teste do dia e houve qualquer problema, questões de equilíbrio etc, ou se foi no final do dia, quando os equipamentos estavam superaquecidos, ou num momento em que houve queda de energia, e assim por diante.

A seguir, deve-se registrar a marca e o modelo dos equipamentos utilizados e anotar detalhes como amperagem da lâmpada, constante de tempo etc., pois, se outras pessoas usarem o aparelho ou se os testes forem repetidos após algum tempo, é importante reproduzir todas as características.

Passa-se então aos detalhes de aplicação mais imediata, que podem ser subdivididos como segue:

- Identificação da Coluna

- Número, nome ou marca da coluna
- Comprimento, L (mm)

- Diâmetro interno , d_i (mm)
- Material usado no empacotamento (detalhes)
- Diâmetro da partícula, d_p (μm)
- Método usado no empacotamento

- Condições de Operação

- Temperatura , T (K)
- Composição da fase móvel, % (v/v)
- Composição da mistura de teste
- Método de injeção
- Volume da amostra injetado, V_i (μl)
- Método de detecção , λ (nm)
- Sensibilidade de detecção (UA)
- Queda de pressão ΔP (MPa)
- Vazão da fase móvel, F (ml/min ou $\mu\text{l}/\text{min}$)
- Velocidade do papel, v_p (cm/min)

Resolvidas todas estas peculiaridades e obtidos os cromatogramas, devem-se fazer as medidas das distâncias inerentes. Em nosso trabalho, as medidas foram feitas com auxílio de uma régua, com precisão de 0,5mm, procurando sempre reproduzir a mesma sistemática, relatada a seguir. O primeiro passo é a obtenção das tangentes, para se chegar ao tempo de retenção. Para isto posiciona-se a régua no ponto de inflexão e a partir daí tangencia-se a linha do pico. Isto feito, nas posições "frontal e caudal", obtém-se sua intersecção no ápice do pico. Este é o ponto correspondente ao tempo de retenção daquele pico (ver figura IV.4). A seguir determinam-se as posições correspondentes a 10 e 50% da altura do pico. A altura do pico, 100%, não corresponde ao ponto de intersecção das tangentes e sim ao cume do próprio pico. Esta é uma confusão comum aos principian

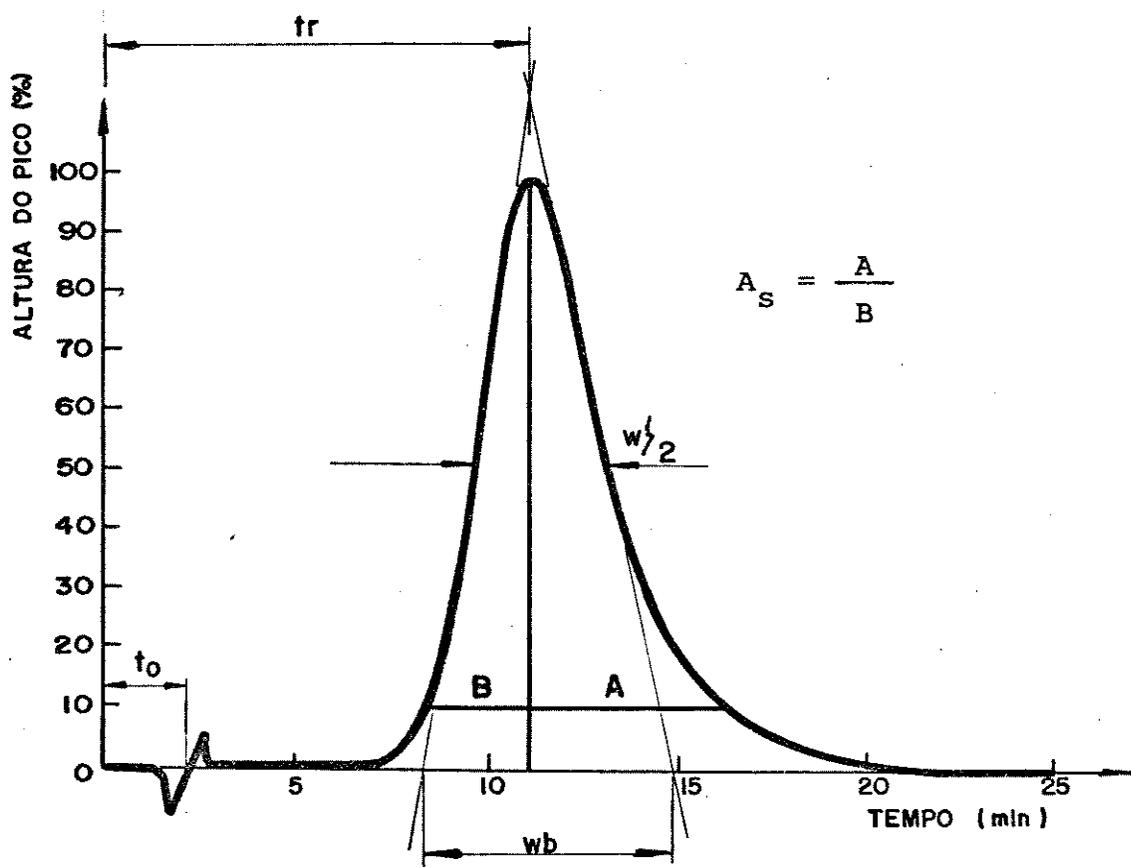


Figura IV.4 - Cromatograma com os Parâmetros Experimentais de Interesse aos Cálculos do Número de Pratos Teóricos, N ; Fator de Assimetria, A_s ; Fator de Capacidade, k' ; Resolução, R_s , Entre Outros.

tes na área cromatográfica. Em seguida, traça-se a linha de base e tira-se uma perpendicular a ela passando pela intersecção das tangentes. Esta perpendicular determina os dois segmentos de reta, A e B, a 10% da altura, que serão usados para o cálculo do fator de assimetria, A_s (Fig. IV.4). Mede-se a largura do pico a 50% da sua altura, $w_{1/2}$. Esta largura, assim como os segmentos a 10% da altura, devem ser tomados entre as linhas do pico e não das tangentes. Este também é um ponto de confusão.

Feito isto para um pico, repete-se o procedimento para os demais picos e, inclusive, para o pico do soluto não retido, para a obtenção do valor de t_0 ou V_0 .

Quando se deseja obter a resolução, R_s , deve-se determinar também a largura do pico na altura da linha de base, e, neste caso, a medida é feita entre as tangentes e não entre as linhas do pico.

Deve-se lembrar que todas as medidas são feitas em unidades de distância e, para se obterem os tempos de retenção, deve-se usar a velocidade do papel para a transformação em unidades de tempo. Se se desejarem os volumes de retenção, emprega-se a vazão da fase móvel e tem-se o resultado em unidades de volume. Não esquecer também que, ao processar os cálculos, as unidades devem ser coerentes. Então, se na equação IV.1 t_R estiver em unidades de tempo, $w_{1/2}$ deve ser usado em unidades de tempo e assim por diante. Logo, as equações deveriam ser expressas como:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,54 \left(\frac{d_R}{w_{1/2}} \right)^2,$$

porém o uso de $t_R/w_{1/2}$ já é consagrado devido à sua simplicidade. Basta lembrar que N é adimensional. Para se obterem outros

parâmetros cromatográficos, além das medidas feitas, basta usar as dimensões da coluna, diâmetro das partículas e algumas das condições de operação. Alguns parâmetros exigem propriedades da fase móvel, como a viscosidade, e propriedades do soluto, tais como, a massa molar e o coeficiente de difusão do soluto na fase móvel. Estes dados são encontrados na literatura.

Finalizando deve-se ressaltar que todos os cuidados devem ser tomados com relação aos cálculos, principalmente a forma dos picos, para que os resultados possam ser relevantes, e que todos os dados devem ser anotados durante os trabalhos experimentais para que não causem problemas futuros. Se possível, os cálculos devem ser feitos logo após o procedimento experimental, pois acumular muitos cromatogramas pode ser causa de grandes confusões. Durante o nosso trabalho, cada coluna empacotada foi testada a um grande número de vazões, e estas precauções precisaram ser tomadas, principalmente com relação às condições de operação que eram constantemente alteradas.

Nosso objetivo foi sempre o de obter os valores de altura equivalente a um prato teórico, H , e colocar em gráficos versus a velocidade linear, u . Desse modo, os valores medidos e calculados foram sempre tabelados e, a seguir, os gráficos foram feitos, como se pode observar nos resultados experimentais.

A colocação dos resultados em gráficos permite uma melhor visualização e facilita as comparações entre as várias colunas preparadas e aquelas da literatura ou disponíveis no mercado.

CAPÍTULO V

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo, dedicado aos Resultados e Discussão, na verdade, pretende muito mais que isto, pois, dadas as características peculiares ao nosso trabalho, deverá relatar cada etapa e, em seguida, apresentar os resultados tecendo os comentários cabíveis.

Julgamos muito difícil, além de enfadonho, descrever todos os nossos experimentos, para só no final vir a fazer os comentários. Teríamos que, a todo momento, fazer alusões a determinados testes para podermos comentá-los. Além disso, cada nova etapa de nosso trabalho só se justifica após a discussão da anterior.

Assim, para não tornar o texto repetitivo e cansativo aos leitores, passaremos à descrição dos experimentos, seguindo uma ordem quase cronológica dos acontecimentos. Para isto dividiremos o capítulo em duas partes; a primeira deverá relatar todos os trabalhos realizados com as colunas convencionais; a segunda tratará da otimização cromatográfica e das colunas com diâmetro reduzido.

1. COLUNAS CONVENCIONAIS

a) Escolha das Condições de Operação

Nossa primeira preocupação foi com relação à montagem do sistema cromatográfico, o que não foi muito simples, considerando a complexidade dos módulos e nossa inexperiência na época. Uma vez em funcionamento, procuramos estabele-

cer as condições de operação, empregando uma coluna já disponível em nosso laboratório (LiChrosorb RP-18, 10 μ m, de 200x4,6mm).

Conforme já descrevemos em Considerações Gerais Capítulo IV, a seleção da Fase Móvel e da mistura de teste foi feita levando-se em consideração os fatores econômicos e nossa disponibilidade. Evidentemente isto ocorreu após uma extensa revisão bibliográfica e uma série de experimentos realizados em nosso sistema. Decidimos pela composição de 70/30 metanol/água, pois maiores concentrações de água provocavam a elevação da pressão do sistema, além de ocasionarem grandes tempos de retenção para os solutos orgânicos da mistura de teste. Menores proporções de água, além de anti-econômicas, provocavam perdas na resolução e diminuição nos valores do fator de capacidade, k' , dos solutos empregados. Além disto, com 30% de água pode-se variar a vazão sem grande preocupação com a pressão.

Para a escolha dos componentes da mistura de teste, também observamos os critérios econômicos, nossa disponibilidade e sugestões encontradas na literatura. Após uma série de testes com solutos disponíveis em nosso instituto, optamos por acetona, benzeno, benzonitrilo, tolueno, naftaleno e antraceno. Como antraceno apresenta um valor de fator de capacidade muito alto, principalmente para colunas com partículas de diâmetro muito pequeno ($\leq 5\mu$ m), este soluto só foi empregado algumas vezes. Outras vezes só empregamos 3 solutos: acetona, benzonitrilo e naftaleno. Para facilitar, as tabelas e gráficos, em sua maioria, só apresentam os resultados para o naftaleno, que é um excelente soluto para a avaliação de colunas, dadas as suas características físicas e químicas, como baixa massa molar e caráter neutro, evitando mecanismos múltiplos durante as separações.

b) Determinação do Volume Morto

Uma das dificuldades encontradas no início deste trabalho foi a determinação do tempo de retenção de um soluto não retido, t_0 . Vários solutos foram experimentados e constatou-se que os de menores tempos de retenção eram o metanol e a água. O cromatograma mostrado na figura V.1 ilustra os picos típicos destes componentes.

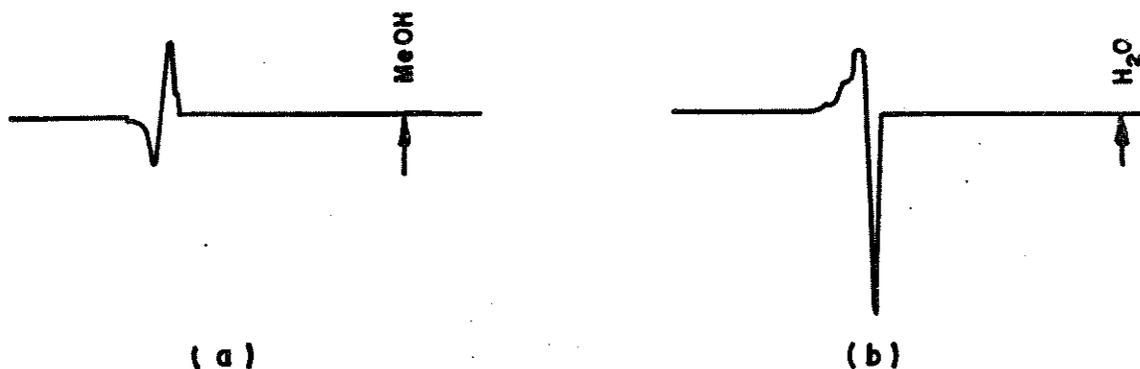


Figura V.1 - Cromatogramas típicos obtidos com coluna de LiChrosorb RP-18, 10 μ m, 200x4,6mm; Detecção : 220nm; Fase Móvel: MeOH/Água-70/30; Vazão 1ml/min; a) Metanol; b) Água.

Observa-se na figura V.1 um pico negativo seguido de outro positivo para a água e o contrário para o metanol. O aspecto dos picos deixou dúvidas quanto à posição exata do soluto, ou seja, qual dos picos deveria ser considerado, se o positivo ou o negativo.

Para se obter a posição exata da água no cromatograma, lançou-se mão de uma técnica radiométrica. Usou-se água tritiada- $^3\text{H}_2\text{O}$. Injetou-se $20\mu\text{l}$ de solução contendo teoricamente 11000cpm de $^3\text{H}_2\text{O}$ e coletaram-se frações do eluído, com cerca de seis gotas cada (12 segundos), em frascos contendo 2ml de um coquetel preparado conforme Collins e col./141/.

A contagem das radiações Beta do decaimento do trítio, usando cintilação líquida, foi realizada empregando um programa de contagem de 1 min com 2% de erro. Os resultados finais são apresentados na tabela V.I. Nota-se um máximo de atividade radiativa no tubo de número 18. Determinou-se o volume do tubo de teflon à saída do detector (tubo que liga o detector ao frasco coletor) e constatou-se que seu volume correspondia a 2 vezes o volume coletado em cada frasco. Como a enumeração dos frascos começou ao se fazer a injeção, descon-taram-se dois frascos, chegando-se à conclusão de que a máxima atividade de radiação Beta encontrava-se no tubo de número 16, ou seja, correspondia ao volume de 3,2ml. A análise do cromatogra-ma revela que o volume de 3,2ml corresponde praticamente, à intersecção com a linha de base, isto é, ao ponto onde há a inversão do pico negativo para positivo. Fato curioso é que este valor coincide ao ponto de intersecção também no cromato-grama do metanol, só que na inversão de positivo para negativo. Isto facilita muito a determinação do valor do tempo de reten-ção de um soluto não retido, t_0 , sem que haja a preocupação de se injetar água ou metanol em cada novo teste, pois em ge-ral, quando se emprega a técnica cromatográfica com fase rever-sa, observa-se este pico negativo. Assim, na prática basta prolongar a linha de base até que ocorra a intersecção com a par-

Tabela V.I - Resultados da Contagem de Radiação β proveniente do decaimento de $^3\text{H}_2\text{O}$ na determinação de Vo. Sistema de Cintilação Líquida.

| Identificação | | cpm ($\pm 2\%$) |
|----------------------------------|----------------|-------------------|
| Branco Sem Fase Móvel | | 43 |
| Branco com 6 Gotas de Fase Móvel | | 48 |
| Padrão Sem Fase Móvel | | 11910 |
| Padrão com 6 Gotas de Fase Móvel | | 11850 |
| Amostra nº 1 | Volume (ml): 0 | 28 |
| 2 | 0 | 46 |
| 3 | 0,2 | 54 |
| 4 | 0,4 | 44 |
| 5 | 0,6 | 26 |
| 6 | 0,8 | 48 |
| 7 | 1,0 | 43 |
| 8 | 1,2 | 33 |
| 9 | 1,4 | 48 |
| 10 | 1,6 | 63 |
| 11 | 1,8 | 63 |
| 12 | 2,0 | 43 |
| 13 | 2,2 | 29 |
| 14 | 2,4 | 71 |
| 15 | 2,6 | 59 |
| 16 | 2,8 | 70 |
| 17 | 3,0 | 2560 |
| 18 | * 3,2 | 7800 |
| 19 | 3,4 | 3700 |
| 20 | 3,6 | 1125 |
| 21 | 3,8 | 180 |
| 22 | 4,0 | 106 |
| 23 | 4,2 | 95 |
| 24 | 4,4 | 62 |
| 25 | 4,6 | 73 |
| 26 | 4,8 | 54 |

* Resultados médios de 2 determinações

te de inversão dos picos e considerar este valor para a obtenção de t_0 .

c) Escolha do Método de Empacotamento

Estabelecidos todos os detalhes podemos agora descrever e comparar as várias colunas preparadas.

Inicialmente foram empacotadas três colunas (1, 2 e 3), de 151x4,6mm com LiChrosorb RP-18, 5 μ m. Este material foi recuperado de outras colunas usadas anteriormente em nosso laboratório e foi apenas homogeneizado antes do uso. Os parâmetros experimentais empregados no empacotamento destas colunas são listados na tabela V.II. A tabela V.III apresenta os resultados obtidos na avaliação destas colunas. A fig. V.2 mostra cromatogramas típicos obtidos com a coluna 2.

Tabela V.II - Parâmetros Experimentais Empregados no Empacotamento das Colunas 1, 2 e 3.

| | |
|---|-------------------------------|
| Material de empacotamento | LiChrosorb RP-18 (recuperado) |
| Diâmetro das partículas | 5 μ m (irregulares) |
| Dimensões das colunas (Lxd ₁) | 151 x 4,6mm |
| Massa gasta | 2g (\pm 5%) |
| Suspensão | \sim 2,5g/30ml de MeOH |
| Tempo de ultra-som | 30 min (vel. 5) |
| Solvente propulsor | MeOH PA |
| Pressão de solvente | 5000psi (\sim 35MPa) |
| Tempo de propulsão ascendente | 7 min |
| Tempo de propulsão descendente | 5 min |
| Vazão final(para as col.1 e 2*) | 7 ml/min (\pm 5%) |

* Ocorreu vazamento durante o empacotamento da coluna 3, não sendo possível medir a vazão.

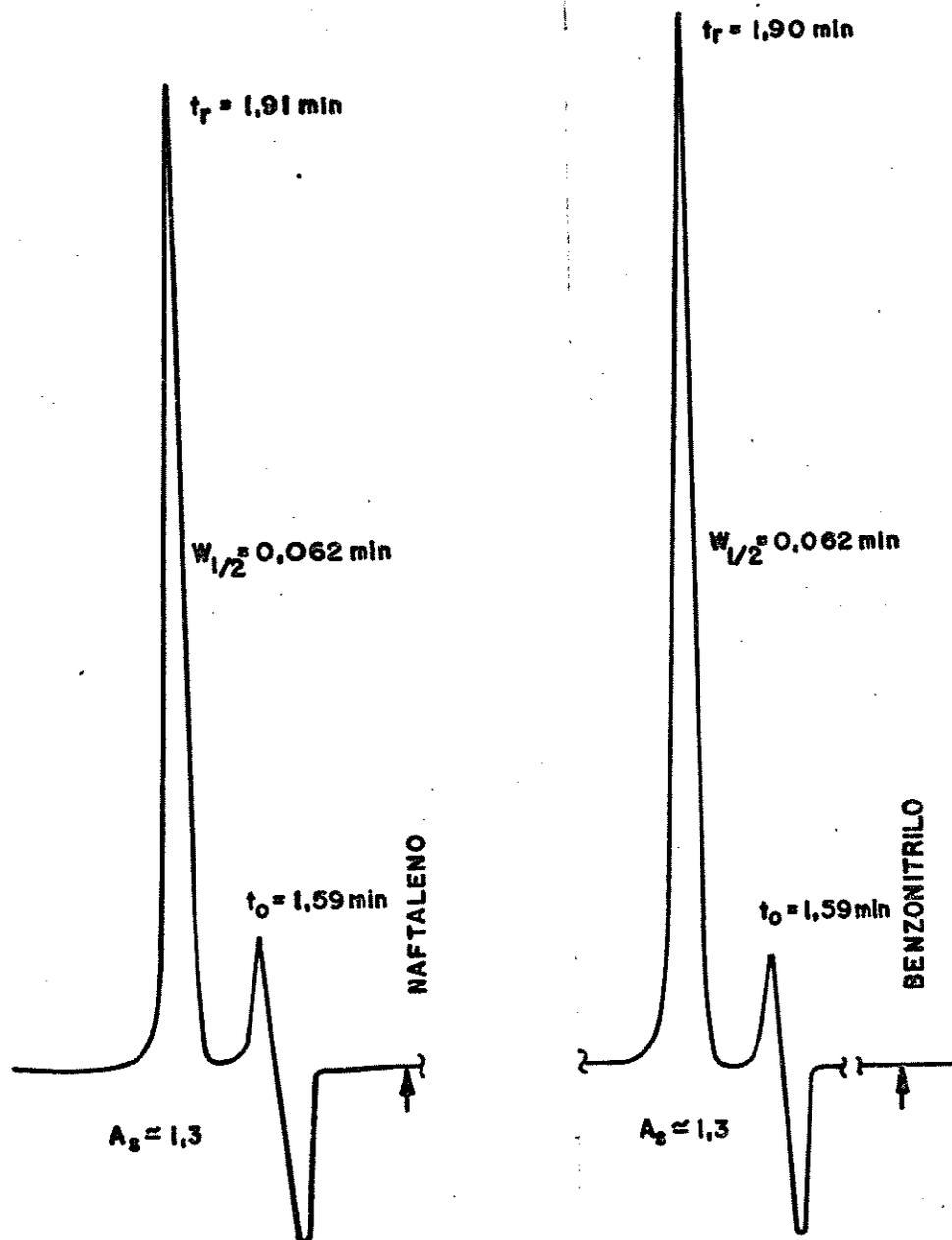


Figura V.2 - Cromatogramas Típicos Obtidos com a Coluna 2. Testes Feitos no Sistema Convencional. Vazão: $0,8 \text{ mL/min}$; Pressão: 1500 psi ($\approx 10,5 \text{ MPa}$); Volume Injetado: $20 \mu\text{l}$; Detecção: 254 nm .

Tabela V.III - Resultados Experimentais Obtidos na Avaliação das Colunas 1, 2 e 3. Eficiência Calculada em Relação ao Naftaleno. Vol. Injetado: $20\mu\text{l}$; Detecção UV: 254nm (média de 6 determinações feitas em 3 dias diferentes - 2 por dia). $d_p = 5\mu\text{m}$

| Vazão (ml/min) | u (mm/s) | Coluna 1 | | Coluna 2 | | Coluna 3 | |
|-------------------|-------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|------------------------|
| | | N/m (m^{-1}) | H (μm) | N/m (m^{-1}) | H (μm) | N/m (m^{-1}) | H (μm) |
| 0,2 | 0,21 | * 45600 | * 21,9 | * 45700 | * 21,9 | 19400 | 51,5 |
| 0,4 | 0,44 | 37700 | 26,5 | 32100 | 31,2 | 21100 | 47,4 |
| 0,5 | 0,54 | 30800 | 32,5 | 29400 | 34,0 | * 23500 | * 42,6 |
| 0,6 | 0,67 | 32300 | 31,0 | 33700 | 29,7 | 23000 | 43,5 |
| 0,8 | 0,89 | 29600 | 33,7 | 34000 | 29,1 | 22900 | 43,7 |
| 1,0 | 1,14 | 28300 | 35,3 | 30900 | 35,1 | 26600 | 37,6 |
| 1,2 | 1,36 | 25900 | 38,6 | 28000 | 35,7 | 21300 | 46,9 |
| 1,5 | 1,70 | 24500 | 40,8 | 26800 | 38,8 | 18000 | 55,6 |
| 2,0 | 2,21 | 23800 | 42,0 | 24900 | 40,2 | 16300 | 61,3 |
| 2,5 | 2,90 | 23500 | 42,6 | 21600 | 46,3 | 15500 | 64,5 |

A análise da figura V.2 revela que ambos os compostos, naftaleno e benzonitrilo, apresentaram picos similares e praticamente o mesmo valor de número de pratos teóricos nas condições empregadas. Isto seria uma indicação de dispersão cromatográfica negligenciável; porém verifica-se também que

ambos os solutos tiveram o mesmo tempo de retenção, ou seja, a resolução da coluna em questão foi nula para estes dois compostos. O mesmo comportamento foi observado com as colunas 1 e 3.

Observando a tabela V.III, nota-se que as colunas 1 e 2 apresentaram resultados razoavelmente similares, no entanto bem diferentes dos resultados da coluna 3. Como todas elas foram preparadas através do mesmo método, a única explicação encontrada é que vazamentos ocorridos durante o procedimento de empacotamento da coluna 3 afetaram enormemente sua qualidade (houve problemas com a rosca de saída da coluna, o que causou vazamento durante todo o processo, inclusive não permitindo medir a vazão de saída, ou seja, em média coletou-se 2ml/min do solvente no final do tubo e cerca de 4,5ml/min onde ocorria o vazamento).

Concluimos assim que, muito provavelmente, vazamentos durante o empacotamento devem prejudicar a qualidade das colunas.

Quanto às colunas 1 e 2, cuja preparação ocorreu normalmente, os resultados foram considerados até razoáveis para as primeiras tentativas ($H_{\text{mín.}} \sim 22\mu\text{m}$); no entanto, embora tivessem apresentado picos com um bom formato e com assimetria relativamente baixa (cerca de 1,3), não mostraram nenhuma capacidade em resolver os solutos empregados. Provavelmente isso se deve às características da fase estacionária empregada. Tratava-se de um material já usado em uma coluna preparativa, cuja vida útil já se esgotara, e nós apenas a desempacotamos, homogeneizamos o material, após separação de partes visualmente sujas e/ou aglomeradas, e empregamos nestes

primeiros testes.

Além dos valores baixos da eficiência da coluna 3, os picos também apresentaram uma certa distorção. Na verdade a cauda ficou pequena, porém apresentaram uma "subida" muito rápida na parte frontal, do que resultaram picos com fatores de assimetria em torno de 1,7. Sendo assim, a coluna mostrou-se de péssima qualidade.

Antes de quaisquer outras providências, tentou-se a preparação de uma outra coluna, empregando-se o mesmo método de empacotamento, o mesmo tipo de fase estacionária (LiChrosorb RP-18, 5µm); porém desta vez o material foi novo, adquirido de E. Merck.

A coluna assim preparada, denominada 4, conseguiu resolver uma mistura de benzonitrilo, tolueno e naftaleno muito bem, porém os picos apresentaram elevados fatores de assimetria ($A_s \sim 3$) e a coluna foi descartada após algumas tentativas inúteis para a redução da cauda dos picos.

Pensou-se em mudar o método de empacotamento, procurar outras alternativas. Empregaram-se diversos solventes para a preparação da suspensão e propulsão. Fizeram-se tentativas preparando-se a suspensão com algumas gotas de glicerina, outras vezes com agentes tensoativos, tais como emulsionantes e mesmo detergentes concentrados. Usaram-se ainda gotas de amônia ou ácidos orgânicos. No entanto os resultados permaneceram frustrantes. A melhor coluna conseguida nesta etapa, a coluna denominada 5, ainda ficou pior que as colunas 1 e 2. Para a coluna 5, foi empregado o mesmo material recuperado, usado nas três primeiras colunas. O método de empacotamento,

contudo, foi diferente. A suspensão foi preparada com LiChrosorb RP-18, 5 μ m, previamente seco a 80°C, por 2 horas, em uma mistura de iso-propanol e n-heptano (50/50). O n-heptano foi também empregado como solvente propulsor. Como se descreveu em Considerações Gerais, antes de iniciar o empacotamento todas as tubulações da bomba devem ser enchidas com o solvente propulsor, no caso o n-heptano. Após o empacotamento, o solvente propulsor deve ser "lavado", variando-se lentamente a polaridade dos solventes, até se chegar ao valor da polaridade da fase móvel. Com isto o emprego de um solvente polar, ou de polaridade muito diferente da fase móvel, torna o procedimento muito trabalhoso e demorado. A tabela V.IV resume as condições empregadas no empacotamento da coluna 5. A tabela V.V resume os resultados obtidos, calculados para os picos do naftaleno, na avaliação desta coluna. Tentou-se a injeção de uma mistura de compostos. Entre naftaleno e benzonitrilo houve boa resolução ($R_s = 3$), porém tolueno, benzeno e benzonitrilo apresentaram o mesmo tempo de retenção.

Observou-se ainda uma variação no valor do número de pratos para naftaleno e benzonitrilo. Para baixas vazões, N , em relação ao benzonitrilo, apresentou-se menor que para o naftaleno, ficando similar em torno de 2,0 ml/min. Acima desta vazão, houve uma inversão: N , em relação ao benzonitrilo, foi maior que N em relação a naftaleno. Este comportamento indica uma alteração na transferência de massa do soluto, sugerindo defeitos no leito da coluna, o que foi corroborado pelo alto fator de assimetria, em torno de 1,8, para a maioria dos picos. Diante dos resultados obtidos sentimos nos estar, novamente no ponto de partida, embora com alguma experiência

Tabela V.IV - Parâmetros Experimentais Empregados no Empacotamento da Coluna 5.

| | |
|---------------------------------|--|
| Material de empacotamento | LiChrosorb RP-18 (recuperado) previamente seco a 80°C (2h). |
| Diâmetro da partícula | 5 µm (irregular) |
| Dimensões da coluna | 151 x 4,6mm |
| Suspensão | 2g em 30ml da mistura n-heptano/iso-PrOH (50/50). |
| Tempo de agitação com ultra-som | 4 min |
| Solvente propulsor | n-heptano |
| Pressão do solvente | 7200 psi (~ 50MPa) |
| Propulsão ascendente | até 100ml de n-heptano |
| Propulsão descendente | mais 50ml de n-heptano 150ml de iso-PrOH 150ml de MeOH |
| Vazão final (MeOH) | 8ml/min |

Tabela V.V - Resultados Obtidos na Avaliação da Coluna 5.
 Eficiência Calculada em Relação ao Naftaleno.
 Vol. Injetado: 20 μ l; Detecção: 254nm

| Vazão (mL/min) | u (mm/s) | N - | N/m (m ⁻¹) | H (μ m) |
|-------------------|-------------|--------|---------------------------|-----------------|
| 0,5 | 0,53 | 3960 | 26200 | 38,2 |
| 1,0 | 1,13 | 5400 | 35800 | 28,0 |
| 1,5 | 1,67 | 5450 | 36100 | 27,8 |
| 2,0 | 2,31 | 4140 | 27500 | 36,4 |
| 2,2 | 2,47 | 3660 | 24200 | 41,3 |
| 2,5 | 2,80 | 3430 | 22700 | 44,0 |

Resultados médios de, no mínimo, 2 determinações.

acumulada. Até o momento, empregávamos colunas vazias montadas por nós, à maneira como foi exposta no capítulo IV - Considerações Gerais. Decidimos, então, empregar uma coluna vazia adquirida de Hewlet Packard, de 200 mm de comprimento e mesmo diâmetro das colunas anteriores (4,6mm). O material empregado também foi novo, fornecido por Whatman, Partisil 10 ODS, com as mesmas características dos anteriores, partículas irregulares de sílica ligada a 18 átomos de carbono, porém com diâmetro de 10 μ m. A coluna foi denominada 6. A coluna vazia foi apenas lavada adequadamente e o empacotamento foi processado usando apenas isopropanol, tanto para a preparação da suspensão quanto para a propulsão. A tabela V.VI resume todos os pa

râmetros experimentais usados neste empacotamento.

Tabela V.VI - Parâmetros Experimentais Empregados no Empacotamento da Coluna 6.

| | |
|-----------------------------|---|
| Material de empacotamento | Partisil 10-ODS (novo) (5% de recobrimento) |
| Diâmetro das partículas | 10 μ m |
| Dimensões da coluna | 200 x 4,6mm |
| Massa usada | 3 g |
| Suspensão | 3 g/30ml iso-PrOH |
| Tempo de agitação ultra-som | 3 min (vel. 5) |
| Solvente propulsor | iso-PrOH PA |
| Pressão do solvente | 7200 psi (\sim 50MPa) |
| Tempo propulsão ascendente | 15 min |
| Tempo propulsão descendente | 10 min c/ iso-PrOH 10 min c/ MeOH |
| Vazão final (iso-PrOH) | \sim 8ml/min |
| Vazão final (MeOH) | \sim 15ml/min |

A figura V.3 mostra um cromatograma obtido com a coluna 6. Observa-se razoável resolução dos componentes da mistura injetada; no entanto, os valores de k' ainda foram bastante baixos (menores que 1). A tabela V.VII resume os resultados obtidos, para os 5 solutos, à vazão de 2,5ml/min, e a tabela V.VIII apresenta os resultados da avaliação da coluna 6, cal

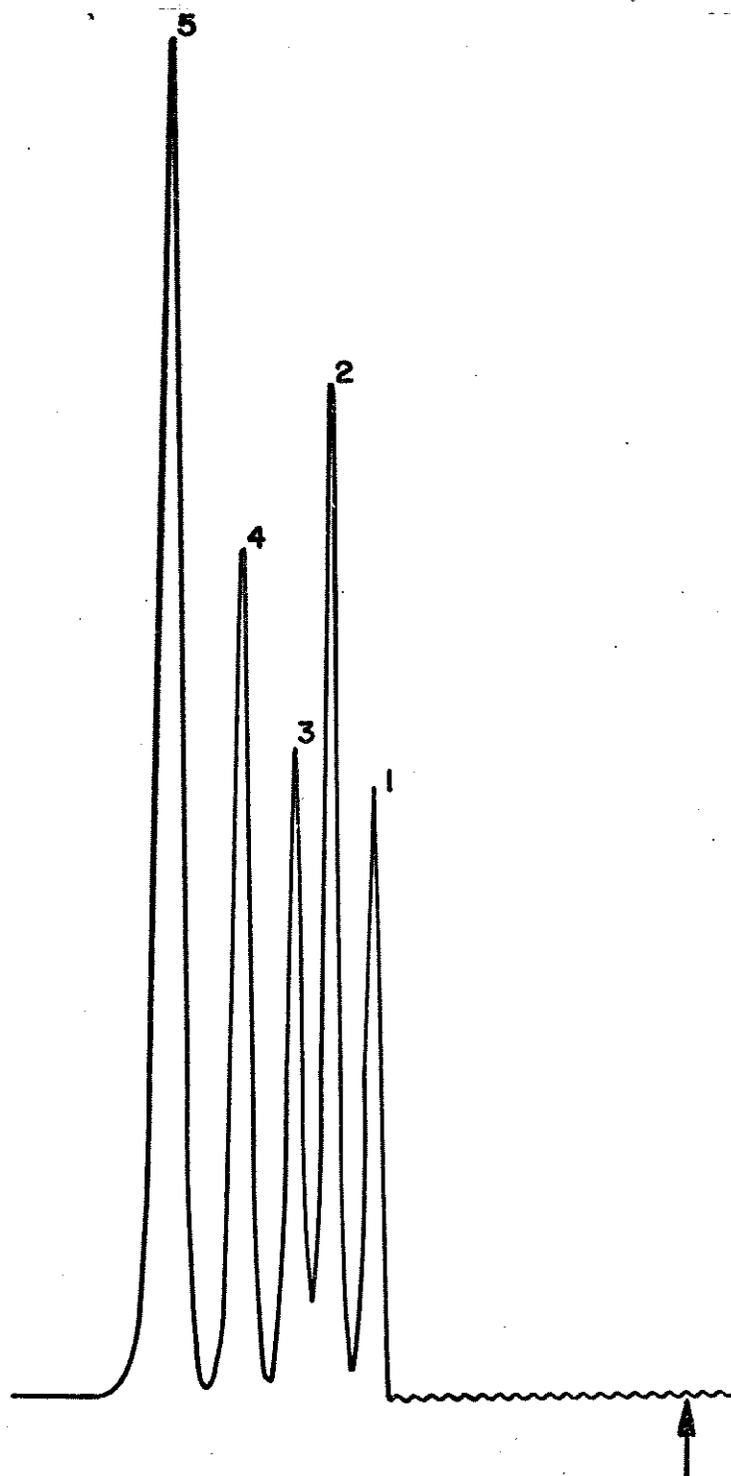


Figura V.3 - Cromatograma Obtido com a Coluna 6. Sistema Convencional; Vazão: 2,2ml/min; Pressão: 1500psi (~10,5MPa); Volume Injetado: 20µl; Detecção 254nm; Componentes da Mistura: 1=Acetona, 2=Benzonitrilo; 3=Benzeno, 4=Tolueno e 5=Naftaleno.

culados para o naftaleno, nas diferentes vazões utilizadas.

Tabela V.VII - Resultados Obtidos por Injeção de 20 μ l de Cada Solução, Individualmente, à Vazão de 2,5ml/min e Detecção a 254nm, com a Coluna 6.

| Soluto | k' | R _s | N/m (m ⁻¹) | H (μ m) | |
|--------------|------|----------------|---------------------------|-----------------|-------|
| Acetona | 0,16 | 1,5 | 17300 | 57,8 | |
| Benzonitrilo | 0,31 | | 1,1 | 16000 | 62,5 |
| Benzeno | 0,45 | 1,7 | | 17800 | 56,2 |
| Tolueno | 0,65 | | | 1,6 | 17400 |
| Naftaleno | 0,91 | | 17700 | | 56,5 |

Observou-se que os resultados obtidos na eluição dos solutos isoladamente foram similares àqueles conseguidos por injeção da mistura.

Foi feita a injeção individualmente para facilitar as medidas das larguras dos picos na altura da linha de base, para o cálculo da resolução, uma vez que a separação não ocorreu totalmente. Assim, os valores de R_s são estimativos.

A análise da tabela V.VIII revela que os resultados obtidos com a coluna 6 foram melhores que os conseguidos

Tabela V.VIII - Resultados Experimentais Obtidos na Avaliação da Coluna 6. Eficiência Calculada em Relação ao Naftaleno. Vol. Injetado: 20 μ l, Detecção: 254nm.

| Vazão (ml/min) | u (mm/s) | N * | N/m (m ⁻¹) | H (μ m) |
|-------------------|-------------|------|---------------------------|-----------------|
| 0,4 | 0,48 | 6420 | 32100 | 31,2 |
| 0,5 | 0,52 | 5630 | 28200 | 35,5 |
| 1,0 | 1,17 | 4890 | 24500 | 40,9 |
| 1,2 | 1,42 | 4410 | 22000 | 45,4 |
| 1,5 | 1,75 | 4250 | 21200 | 47,1 |
| 2,2 | 2,71 | 3880 | 19400 | 51,5 |
| 2,5 | 3,24 | 3530 | 17600 | 56,7 |

* Resultados médios de, no mínimo, 3 determinações.

com as colunas 1 e 2, pois a coluna 6 apresentou valores mínimos de altura de prato, H_{\min} , de aproximadamente 3 vezes o diâmetro da partícula (10 μ m), enquanto que os valores obtidos com as colunas anteriores, 1 e 2, foram cerca de 4 vezes o diâmetro da partícula (5 μ m). Além disto, a coluna 6 apresentou uma resolução razoável para os solutos empregados (fig. V.3) contra a resolução nula das colunas 1 e 2 e resolução parcial da coluna 5.

A tabela V.VII também mostra que todos os solutos, com diferentes k' , apresentaram número de pratos teóricos

similares, uma indicação de dispersão cromatográfica negligenciável.

A forma dos picos nas diferentes vazões empregadas, foi semelhante, e os fatores de assimetria também apresentaram valores em torno de 1,3.

Notamos ainda que a linha de base apresentava flutuações a cada dia mais acentuadas. Fomos obrigados a reduzir a sensibilidade de detecção. Ainda assim, a reprodutibilidade dos resultados caiu muito durante os últimos trabalhos. Aumentamos mais a velocidade do papel de registro dos cromatogramas e repetimos pelo menos 5 vezes cada eluição para poder obter resultados coerentes.

Não tardou muito e ocorreu o inevitável. a vida útil da lâmpada de deutério (fonte de luz ultravioleta) se esgotara.

d) Uso da Região Visível

Fizemos algumas tentativas de trabalho na região visível, pois necessitávamos aguardar a importação da lâmpada queimada. Contudo, não conseguimos bons resultados. A tabela V.IX resume os resultados finais obtidos com os compostos experimentados. Mais uma vez a escolha destes compostos baseou-se em nossa disponibilidade. Obtiveram-se seus espectogramas no próprio sistema cromatográfico, pela técnica de interrupção do fluxo e, através deles, escolheu-se o comprimento de onda para a detecção cromatográfica. As tentativas foram baseadas nas vantagens que poderiam advir, se bons resultados fossem conseguidos, não só com relação à substituição da lâmpada de deutério pela de tungstênio (fonte de

luz visível) como também com relação às facilidades na seleção de solventes para o emprego na região visível, pois, sendo os solventes incolores, não teríamos os inconvenientes de absorção em algumas regiões, como ocorre no ultravioleta.

Os resultados do naftaleno incluídos na tabela V.IX, para comparação, foram conseguidos anteriormente com a mesma coluna.

Tabela V.IX - Resumo dos Resultados Obtidos Através de Testes de Solutos que Absorvem na Região Visível do Espectroeletrromagnético, com a Coluna de LiChrosorb RP-18,5 μ m, 151x4,6mm (Coluna 5), Comparados ao Naftaleno (Resultados Obtidos Anteriormente), à Vazão de 1,0ml/min e Injeção de 20 μ l. Detecção: Vários Comprimentos de Onda, λ .

| Soluto | λ (nm) | N/m (m^{-1}) | H (μ m) |
|----------------------|-------------------|---------------------|-----------------|
| Naftaleno | 254 | 35800 | 28 |
| 2-Nitrofenol | 345 | 18700 | 53 |
| Vermelho de Metila | 500 | 11100 | 90 |
| Alaranjado de Metila | 430 | 5600 | 180 |
| Ácido Pícrico | 345 | 5100 | 200 |
| 2,4-Dinitro-naftol | 430 | 4600 | 220 |

A análise da tabela V.IX revela que os compostos empregados não foram adequados ao cálculo do número de pratos teóricos, ou seja, não servem para a avaliação de colunas dentro dos padrões que conhecemos. É possível que uma seleção mais adequada dos compostos venha a resolver o problema, pois concluímos pela existência de mecanismos múltiplos na eluição dos compostos usados, o que fez, inclusive, que alguns apresentassem tempo de residência na coluna até mesmo inferior ao do soluto "não retido". No entanto, após estes experimentos, recebemos a lâmpada nova e voltamos aos trabalhos anteriores. Apenas deixamos registradas aqui nossas tentativas, pois julgamos que possam ser retomadas no futuro e que, inclusive, levem a resultados vantajosos.

e) Algumas Alterações no Sistema Cromatográfico

Susbtituída a lâmpada de deutério, outras alterações foram feitas em nosso sistema cromatográfico. Uma delas foi a eliminação do programador de solventes com consequente emprego de uma única bomba. Daí passamos à preparação prévia da fase móvel (MeOH/H₂O - 70/30) seguida de sua homogeneização e desgaseificação com ultra-som. Empregaram-se frascos de 5l, para se obter uma quantidade razoável ao uso durante algum tempo, reduzindo quaisquer variáveis com relação à fase móvel. Com isto, retiramos também do sistema cromatográfico o misturador de solventes.

Novas tentativas de empacotamento e avaliação de colunas foram feitas e constatou-se que a reprodutibilidade do sistema cromatográfico melhorou muito após a troca da lâmpa

da, e as flutuações da linha de base e os constantes "spikes" ve rificados nos últimos cromatogramas desapareceram. A pressão na bomba apresentou-se bem menor e mais estável após as altera ç ões realizadas.

Além disto, colunas empacotadas com apenas me tanol como solvente de suspensão e de propulsão, com materi al de empacotamento novo, mostraram-se similares à coluna 6 , que foi preparada com isopropanol. Como metanol é também o principal constituinte da fase móvel, o procedimento de empaco tamento com metanol torna-se bem mais rápido e econômico, do que quando se emprega isopropanol.

Passou-se ao estudo de uma série de colunas de diferentes comprimentos e diâmetros de partículas, empregan do metanol em sua preparação.

f) Efeito do Comprimento da Coluna e do Diâme t ro das Partículas

Para esta nova etapa do trabalho, dispôs-se de material de empacotamento novo, com partículas esféricas, de 10, 5 e 3 μ m de diâmetros, também à base de sílica ligada à 18 átomos de carbono. As colunas empacotadas foram todas de 4,6mm de diâmetro, e o comprimento variou de 50 a 200mm.

Nossa meta nesta etapa do trabalho foi estu dar a influência do comprimento da coluna sobre sua eficiência e a dependência desta com relação ao tamanho da partícula em pregada, visando à economia de solventes e fase estacionária.

Dados da literatura revelam que a eficiência de colunas empacotadas com partículas esféricas é similar à de

partículas irregulares /142/ embora o empacotamento daquelas seja mais fácil, isto é, obtêm-se leitos mais homogêneos e compactos com partículas esféricas muito mais facilmente que com partículas irregulares. Na prática, isto resulta em melhores colunas, principalmente com relação à permeabilidade, ou seja, as partículas esféricas oferecem menor resistência ao fluxo.

Dez diferentes colunas foram empacotadas. O método de empacotamento foi basicamente o mesmo descrito anteriormente, variando apenas o tempo de empacotamento em função do comprimento das colunas e do tamanho das partículas, visando à passagem de um volume de metanol equivalente a 50 vezes o volume da coluna, no sentido ascendente. A pressão de empacotamento também variou um pouco conforme as características das colunas, ficando entre 5000 e 6000 psi (35 e 42MPa). Metanol foi usado tanto para a suspensão quanto para a propulsão. Após a inversão do sentido da coluna, deu-se continuidade à passagem de metanol até que a vazão permanecesse constante, cerca de 20, 8 e 4ml/min para as partículas de 10, 5 e 3 μ m, respectivamente, (notou-se pequena variação com o comprimento da coluna). A seguir, percolou-se fase móvel até um volume equivalente a 50 vezes o volume da coluna.

A passagem de fase móvel durante o empacotamento facilita muito o condicionamento das colunas, permitindo grande redução no tempo de equilíbrio das colunas no sistema cromatográfico.

As massas empregadas na preparação das suspensões variaram em função do comprimento das colunas (tabela V. X) e foram empregadas com um excesso de cerca de 20% para ga

rantir o empacotamento total das colunas. O volume de metanol empregado na preparação da suspensão foi sempre de 30ml; quantidade correspondente ao volume do reservatório da bomba. Não houve, portanto, preocupação com a concentração da suspensão e sim com o emprego de um pequeno excesso de fase estacionária garantindo o empacotamento total e a sobra de pequena quantidade do material empregado.

Tabela V.X - Massas Usadas para a Preparação das Suspensões das Colunas 7 a 16 em Função de seu Comprimento, L.

| | | | | |
|--------|-----|-----|-----|-----|
| L (mm) | 49 | 100 | 151 | 200 |
| m (g) | 0,9 | 1,6 | 2,3 | 3,2 |

A avaliação das colunas foi feita com uma mistura de acetona, benzeno e naftaleno, cuja concentração variou de coluna para coluna, visando sempre manter a altura dos picos entre 60 e 80% da altura do papel de registro. Todas as colunas mostraram excelente resolução para os solutos em questão. Calculou-se o número de pratos teóricos, em relação ao naftaleno, para todas as vazões empregadas. Os valores da altura equivalente a um prato teórico, H , foram colocados em gráficos contra a velocidade linear da fase móvel, u , para todas as colunas preparadas. As figuras V.4 a V.10 exibem as curvas $H \times u$ obtidas para as colunas 7 - 16.

Das figuras V.4 a V.6 mostra-se o efeito do comprimento sobre a eficiência das colunas para as partículas de 3, 5 e 10 μ m, respectivamente.

Das figuras V.7 a V.10 mostra-se o efeito do diâmetro da partícula sobre a eficiência para as colunas de 49, 100, 150 e 200mm.

A análise da figura V.4 revela que é mais fácil empacotar colunas mais curtas quando se emprega partículas de $3\mu\text{m}$ de diâmetro, pois a eficiência se reduz com o aumento do comprimento das colunas. Além disto, observa-se uma inclinação bastante suave para a curva da menor coluna (49mm), o que permite seu emprego numa larga faixa de vazão sem substancial perda na eficiência. O uso da coluna com vazão reduzida possibilita grande economia de solvente, ao passo que seu emprego com alta vazão proporciona análises bastante rápidas, permitindo economia no tempo de análise.

A figura V.5 apresenta os resultados obtidos com as colunas empacotadas com partículas de $5\mu\text{m}$ e, neste caso, nota-se que o comprimento ideal é o de 100mm.

Já a figura V.6 também leva à conclusão de que tanto as colunas muito curtas quanto as muito longas ficaram piores que a intermediária de 151mm.

Foi feita também a análise do efeito do diâmetro das partículas sobre a eficiência das colunas. As figuras V.7 e V.10 que correspondem, respectivamente, ao menor e maior comprimento das colunas que foram preparadas, mostram, como já era esperado, que partículas de menor diâmetro produzem colunas com maior eficiência.

A tabela V.XI resume os resultados obtidos para as 10 colunas preparadas nesta etapa do trabalho (colunas 7-16). Nesta tabela, foram incluídos os valores da altura de prato reduzida, h , que facilitam a comparação entre colunas

com diferentes diâmetros de partículas. Observa-se que as colunas empacotadas com partículas de $5\mu\text{m}$ de diâmetro, em geral, ficaram similares às preparadas com partículas de $10\mu\text{m}$ e melhores que aquelas empacotadas com partículas de $3\mu\text{m}$.

Tabela V.XI - Resumo dos Resultados Obtidos com as Colunas 7 a 16 Evidenciando os Valores da Eficiência Máxima, N/m , e Altura de Prato Reduzida, h , e Velocidade Linear Ótima, u .

| Coluna | d_p (μm) | L (mm) | N/m (m^{-1}) | H_{min} (μm) | h - | u (mm/s) |
|--------|----------------------------|-------------|------------------------------|---------------------------------------|----------|---------------|
| 7 | 3 | 49 | 55200 | 18,1 | 6,0 | 1,5 |
| 8 | | 100 | 55500 | 18,0 | 6,0 | 1,6 |
| 9 | | 151 | 55000 | 18,2 | 6,1 | 1,6 |
| 10 | 5 | 49 | 39800 | 25,2 | 5,1 | 1,3 |
| 11 | | 100 | 56700 | 17,6 | 3,5 | 1,5 |
| 12 | | 151 | 49400 | 18,9 | 3,8 | 0,3 |
| 13 | | 200 | 44400 | 22,5 | 4,5 | 1,5 |
| 14 | 10 | 100 | 25700 | 38,9 | 3,9 | 0,13 |
| 15 | | 151 | 28400 | 35,2 | 3,5 | 0,13 |
| 16 | | 200 | 19500 | 51,2 | 5,1 | 0,13 |

As figuras V.8 e V.9 sugerem que colunas de 100 e 150mm de comprimento são muito longas para o empacotamento com partículas de $3\mu\text{m}$, produzindo colunas com baixa eficiência. Por outro lado, 100mm é um comprimento pequeno para ser usado com partículas de $10\mu\text{m}$, pois a curva para tal coluna en

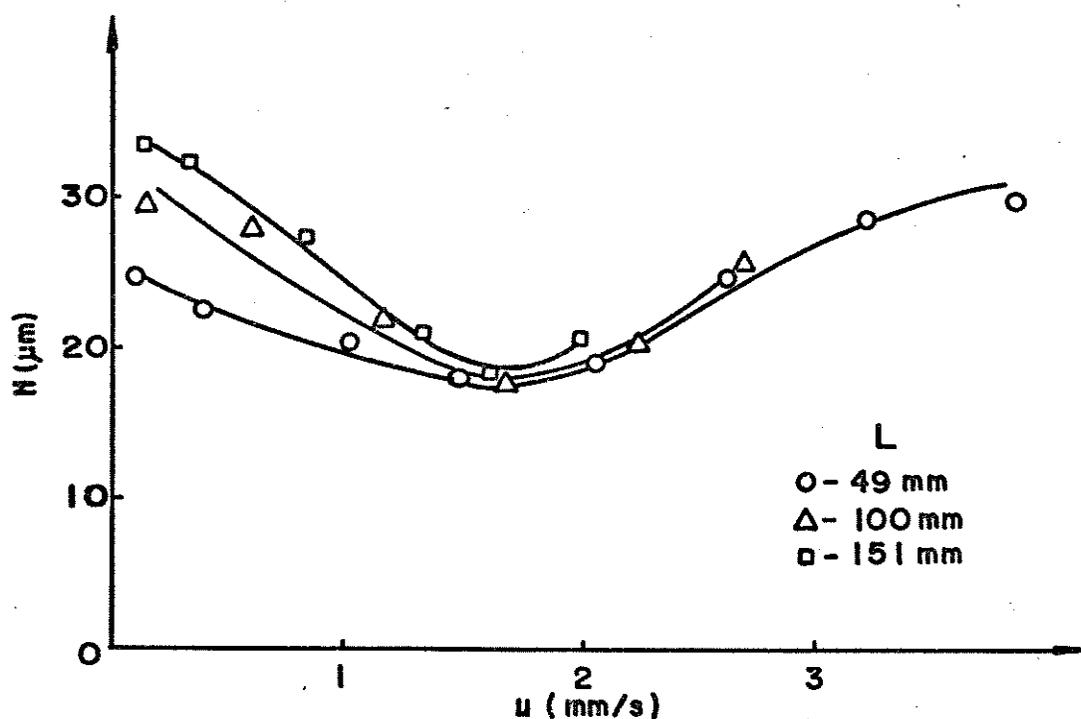


Figura V.4 - Efeito do Comprimento Sobre a Eficiência da Coluna, para Partículas de $3\mu\text{m}$.

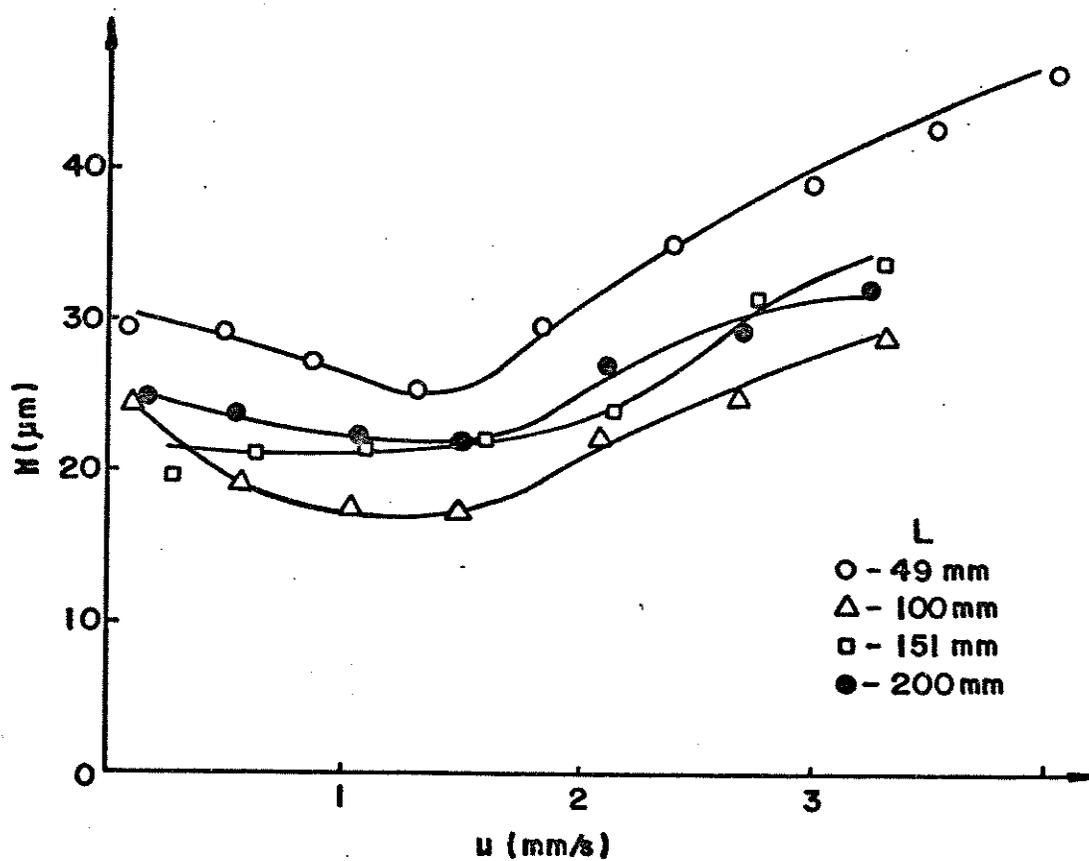


Figura V.5 - Efeito do Comprimento da Coluna Sobre a Eficiência, para Partículas de $5\mu\text{m}$.

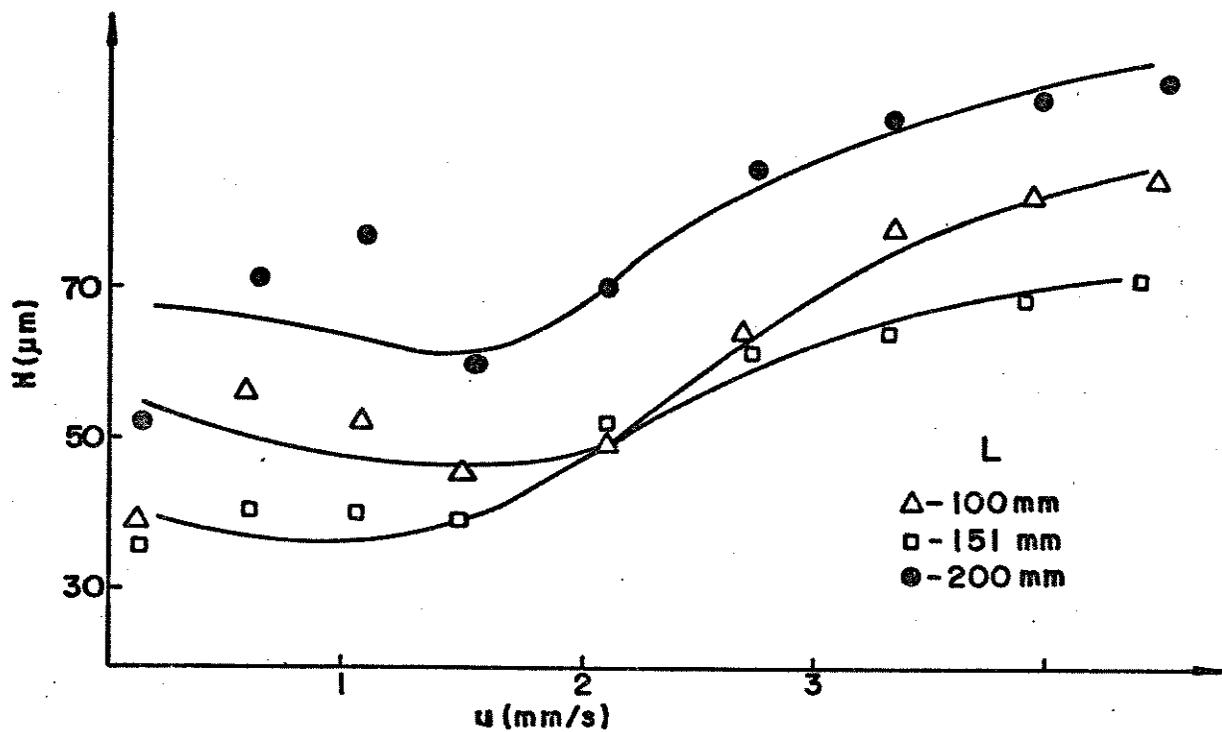


Figura V.6 - Efeito do Comprimento da Coluna Sobre sua Eficiência, para Partículas de $10\mu\text{m}$.

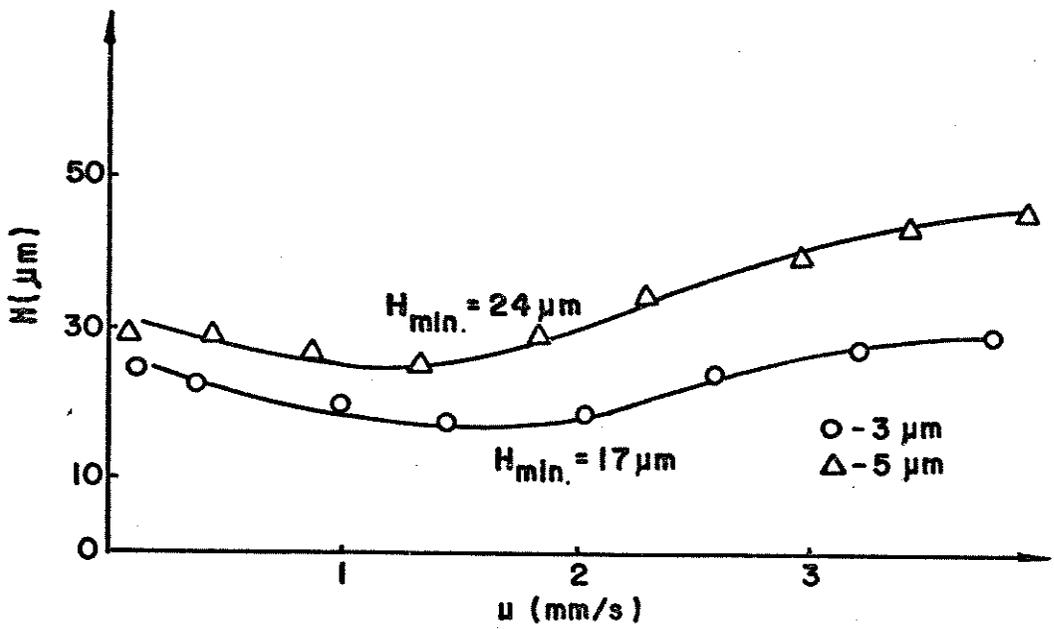


Figura V.7 - Efeito do Diâmetro da Partícula Sobre a Eficiência para Colunas de $49 \times 4,6\text{mm}$.

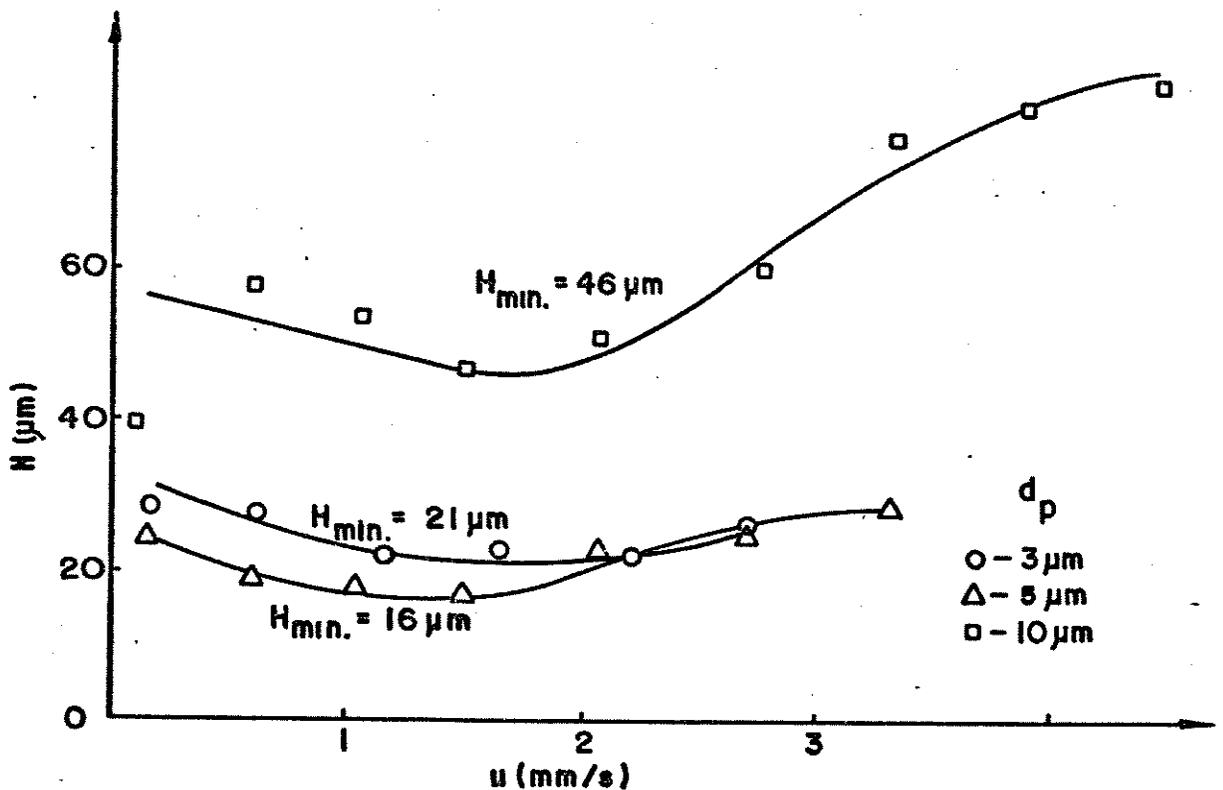


Figura V.8 - Efeito do Diâmetro da Partícula Sobre a Eficiência para Colunas de $100 \times 4,6\text{mm}$.

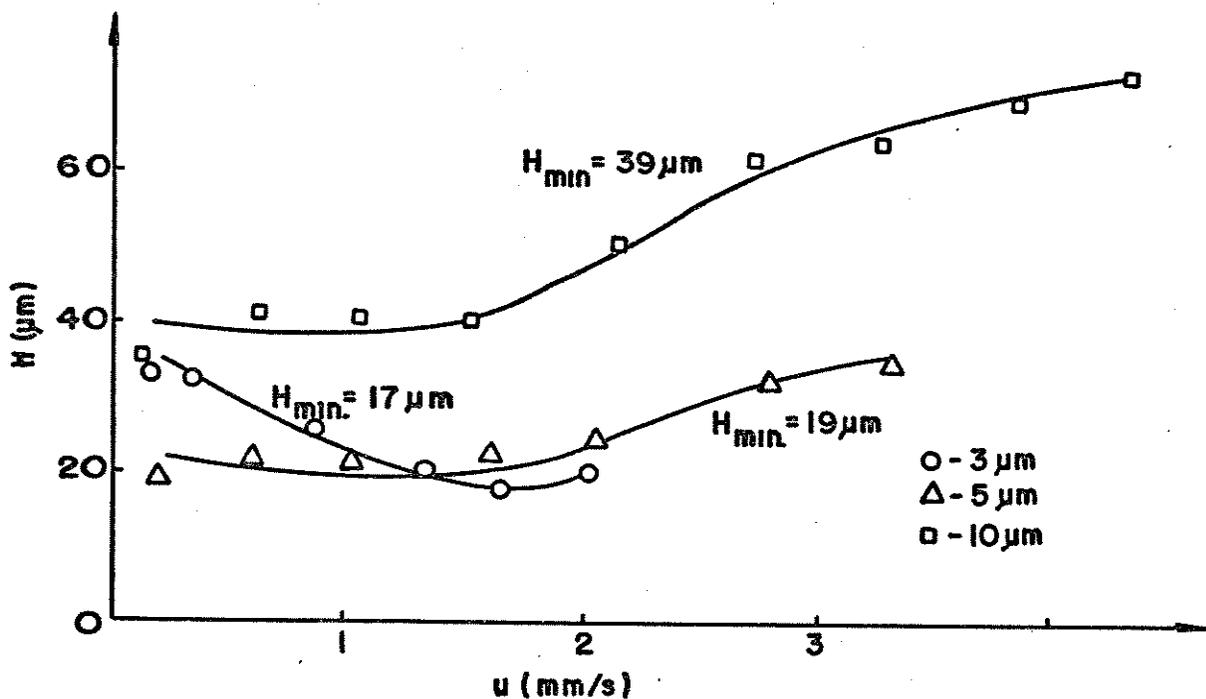


Figura V.9 - Efeito do Diâmetro da Partícula Sobre a Eficiência, para Colunas de $150 \times 4,6\text{mm}$.

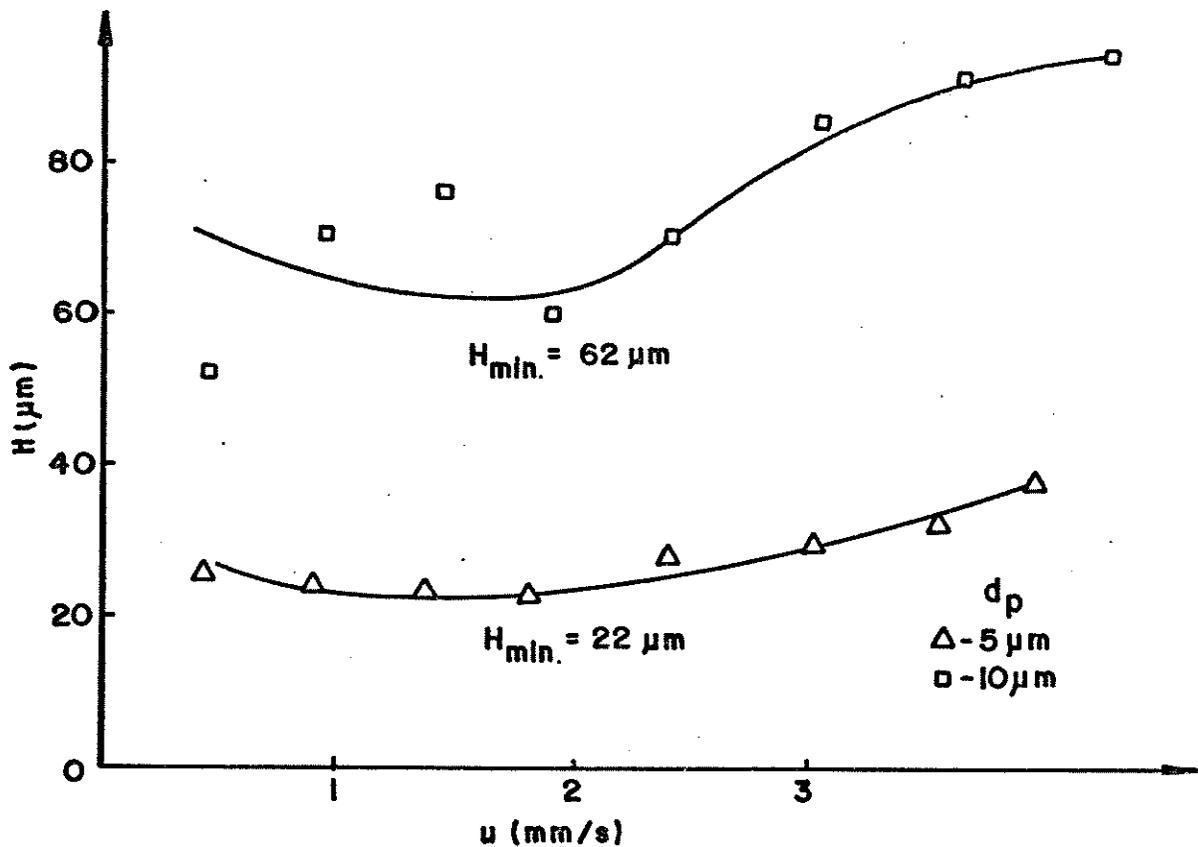


Figura V.10 - Efeito do Diâmetro da Partícula Sobre a Eficiência, para Colunas de $200 \times 4,6\text{mm}$.

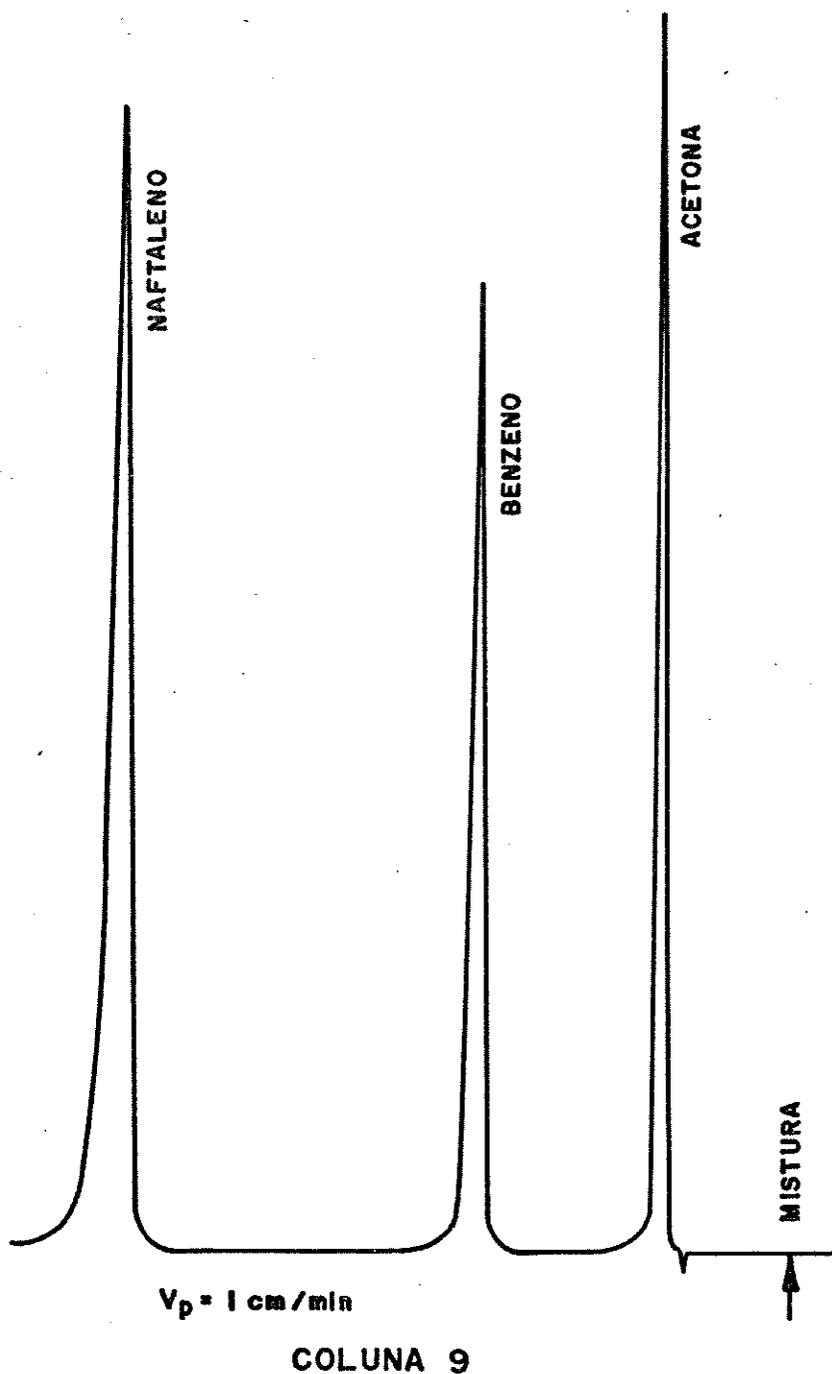


Figura V.11 - Cromatograma Obtido no Sistema Cromatográfico Convencional.

Coluna 9 - Spherisorb ODS - 3 μ m (151 x 4,6mm)

Vazão: 1,0ml/min; Pressão: 24 MPa

H = 20 μ m - u = 1,6mm/s

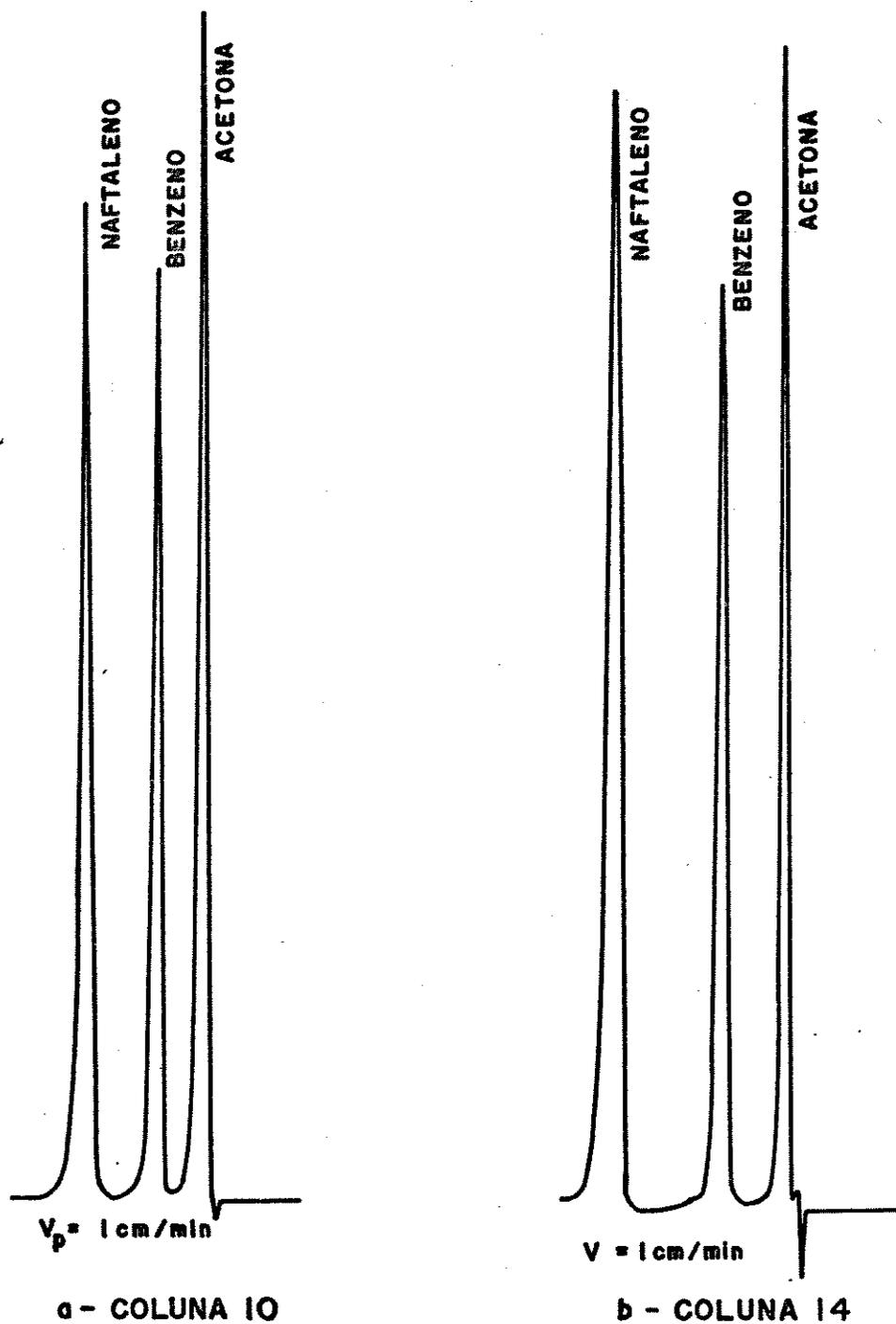


Figura V.12 - Cromatogramas Obtidos no Sistema Cromatográfico Convencional.

| | |
|---|---|
| a) Coluna 10-Spherisorb ODS-5 μm 49 x 4,6mm; Vazão:0,7ml/min; Pressão = 1,8MPa; H = 26,9 μm u = 0,94mm/s | b) Coluna 14-Spherisorb ODS-10 μm 100 x 4,6mm; Vazão:1,0ml/min; Pressão \sim 0; H = 46,9 μm e u = 1,5mm/s |
|---|---|

contra-se deslocada para cima em relação à coluna com partículas de 5 μ m e mesmo comprimento. Já a coluna de 150mm com partículas de 10 μ m apresenta excelente curva e ótimos resultados, se comparados à coluna de mesmo comprimento empacotada com partículas de 5 μ m.

As figuras V.11 e V.12 ilustram a separação de acetona, benzeno e naftaleno obtida com algumas das colunas preparadas nesta etapa, e pode-se constatar a melhor resolução da coluna de 3 μ m em relação às de 5 e 10 μ m. Deve-se ressaltar que estes foram alguns dos cromatogramas típicos conseguidos nesta etapa do trabalho.

g) Aperfeiçoamento do Sistema de Empacotamento

Após a etapa anterior, deparamo-nos com alguns problemas na bomba de empacotamento. Para os reparos, o equipamento foi praticamente desmontado e, com isto, passamos a conhecê-lo um pouco melhor.

Decidimos realizar algumas alterações, visando otimizar a preparação das colunas em três pontos que julgamos de grande importância e que passaremos a descrever a seguir.

g.1) O conector reservatório/coluna

A figura IV.2 apresenta a vista frontal da bomba de empacotamento de colunas para HPLC, usada em nosso projeto. Agora daremos ênfase ao conjunto reservatório/coluna.

Um esboço deste conjunto conforme recebido de seu fornecedor pode ser visto na figura V.13.a.

Nossa prática na preparação de colunas levou-

nos a suspeitar que a brusca redução do diâmetro do reservatório (8mm) ao diâmetro da coluna (4,6mm) pudesse estar provocando a aglomeração das partículas, produzindo colunas com baixa eficiência.

Para substituir a peça original, foi construída uma peça de interior cônico de politetrafluoretileno (PTFE) e adaptada a um conector adequado, cujo esboço é mostrado na figura V.13.b. Com esta peça, foi preparada uma coluna denominada coluna 19 para comparação com a coluna 18 preparada com a mesma fase estacionária e de mesma dimensão, porém antes da substituição da conexão. (O reservatório foi cortado, ficando com um volume de 25ml). A seguir, preparou-se a coluna 20, porém usou-se pressão um pouco maior, o que acabou danificando a peça de PTFE.

Construiu-se, então, uma peça similar, porém de aço inoxidável 316, que foi empregada para o empacotamento das colunas 21, 22 e 23, sem problemas de deformação.

g.2) O uso de pré-coluna durante o empacotamento

Quando se separava a coluna do reservatório de suspensão, quase sempre era observado um "sulco" ou defeitos no topo do leito da coluna. Na tentativa de evitar este problema em nosso projeto, optou-se pelo uso de uma pré-coluna, ou seja, o emprego de uma pequena coluna (L = 50mm) com diâmetro igual ao da coluna, entre esta e o reservatório. Esta técnica facilitou o trabalho, pois a partir daí, primeiro desconectou-se a pré-coluna do reservatório e, a seguir, sobre a mesa e com muito cuidado, separou-se a coluna da pré-co

luna, para a colocação do terminal com o filtro

As colunas 22 e 23 foram empacotadas com o emprego da pré-coluna.

g.3) A velocidade do fluxo do solvente propul
sor

Embora as partículas empregadas na preparação das colunas para HPLC sejam rígidas, sempre que possível de-ve-se evitar submetê-las a pressões excessivas.

Nossos experimentos realizados até o momento mostraram que o valor da pressão empregada no processo de empacotamento não é, por si só, tão relevante quanto a vazão do solvente. De nada adiantam pressões altíssimas se, por algum motivo, o solvente propulsor não flui livremente.

Um dos principais requisitos para o sucesso na preparação de colunas é a pré-pressurização da bomba, para que o solvente possa fluir com elevada velocidade de fluxo, imediatamente após a bomba ter sido ligada.

A rapidez na preparação das colunas é importante tanto para que não ocorra a sedimentação das partículas, quanto para provocar seu choque com o leito da coluna com alta velocidade de impacto, antes mesmo que as partículas anteriores tenham tempo de se alojar, resultando maior homogeneidade do leito formado.

Nossa bomba de empacotamento possuía uma espécie de "restritor" de pressão entre a saída da coluna e o frasco coletor de solventes, que impedia uma vazão maior do solvente propulsor. A eliminação deste "restritor" permitiu a obtenção, a 4000 psi (\sim 28MPa), de uma vazão 3 vezes maior que aque

la conseguida, a 7200 psi (\sim 50MPa), com a peça na tubulação.

A coluna 23 foi empacotada após a eliminação do obstrutor no sistema. A tabela V.XII resume os resultados obtidos com as colunas 18-23, evidenciando as alterações realizadas no sistema de empacotamento, de forma a facilitar a comparação entre os resultados conseguidos antes e depois de cada modificação realizada. Deve-se observar que a coluna 18 foi empacotada antes de qualquer mudança.

A figura V.14 apresenta a vazão do solvente propulsor para o grupo das seis colunas preparadas nesta etapa do trabalho. Através da tabela V.XII constata-se que a coluna 18 foi empacotada com o dobro da pressão empregada para a coluna 23, embora esta tenha ficado pronta em 2/3 do tempo gasto na primeira. As colunas 20-22 foram preparadas à mesma pressão e a pequena diferença observada na inclinação das 3 curvas deve-se a diferenças nos filtros empregados nas colunas.

Foram feitos testes com os filtros antes do empacotamento. Muitos foram desprezados pois, mesmo sem a fase estacionária, ofereceram certa resistência ao fluxo. Apenas aqueles filtros "permeáveis" foram usados, mas não foram idênticos, resultando diferenças na vazão final.

h) Aperfeiçoamento do sistema cromatográfico

Simultaneamente às alterações realizadas na bomba de empacotamento, foram feitas modificações também no sistema cromatográfico.

No início do nosso projeto, já havíamos reduzido as dimensões dos tubos e conexões em nosso cromatógrafo (foram usados tubos de 0,010 pol \sim 0,25mm), mas nesta etapa do tra

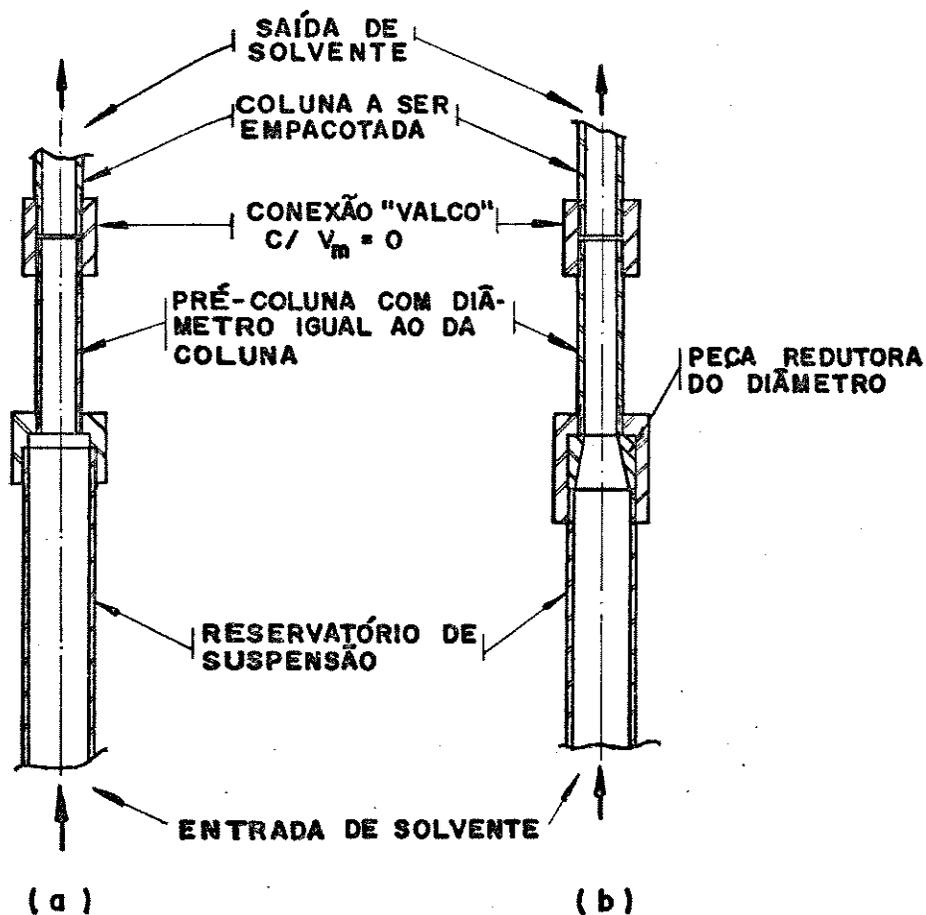


Figura V.13 - Esquema da Parte do Sistema de Empacotamento que Sofreu as Alterações.

a) Antes das Modificações

b) Após as Modificações

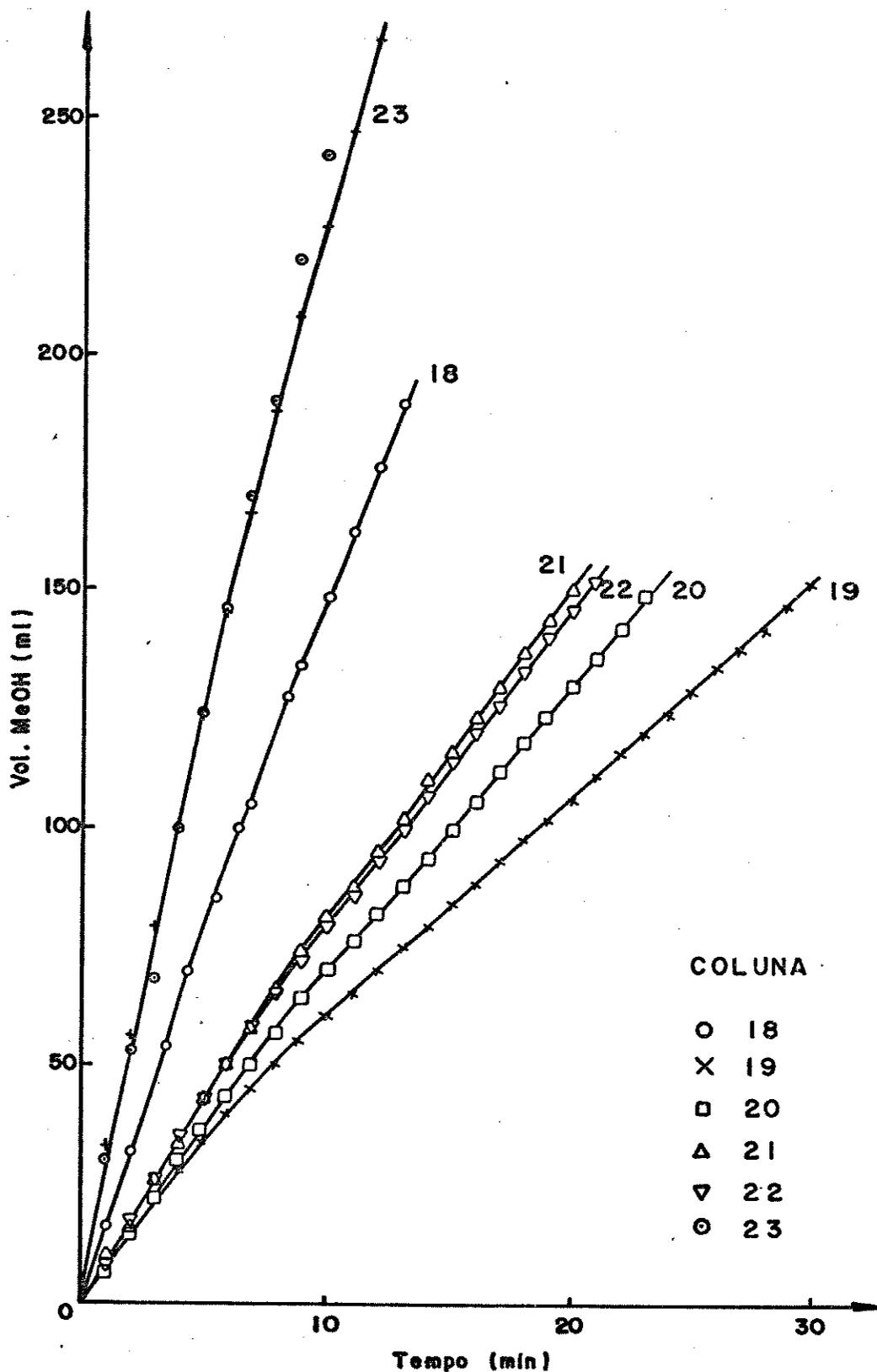


Figura V.14 - Variação do Volume do Solvente Propulsor (Metanol) em Relação ao Tempo de Empacotamento, para as Colunas 18 a 23.

Tabela V.XII - Resultados Obtidos na Avaliação das Colunas 18-23, Relacionados às Modificações Realizadas na Bomba de Empacotamento.

| | Coluna 18 | Coluna 19 | Coluna 20 | Coluna 21 | Coluna 22 | Coluna 23 |
|--------------------------------------|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| Conexão | Comum | PTFE | PTFE (danos) | Aço Inox. | Aço Inox. | Aço Inox. |
| Pré-Coluna | Sem | Sem | Sem | Sem | Com | Com |
| Obstrutor | Com | Com | Com | Com | Com | Sem |
| Pressão (MPa) | 60 | 42 | 50 | 50 | 50 | 28 |
| Tempo de Empacotamento (min) | 15 | 30 | 23 | 20 | 20 | 10 |
| Vazão do Solvente Propulsor (ml/min) | 14 | 5 | 6 | 7 | 7 | 24 |
| $N_{\text{máx.}}/m$ (m^{-1}) | 16800 | 23700 | 16500 | 23650 | 28800 | 27600 |
| $H_{\text{mín.}}$ (μm) | 59,5 | 42,2 | 60,7 | 42,3 | 34,7 | 36,3 |

Obs.: As colunas preparadas nesta série de experimentos foram todas de 100x4,6mm, com fins Valco, e com fase estacionária de sílica ODS, com partículas irregulares de 10 μm . Os métodos de preparação e avaliação foram aqueles descritos no capítulo IV deste trabalho (Solvente de suspensão e propulsão: MeOH; Fase Móvel: 70MeOH/30 Água. Cálculos feitos em relação ao Naftaleno.

Volume de amostra injetado: 10 μl

balho recebemos tubos de aço inoxidável com diâmetro interno ainda menor ($0,0045 \text{ pol} \simeq 0,114 \text{ mm}$). Estes novos tubos foram usados para a preparação de conexões, tão curtas quanto possível, visando minimizar a dispersão cromatográfica. Além da substituição das conexões fizemos também a troca da alça de amostragem de $20 \mu\text{l}$, por outra de $10 \mu\text{l}$.

A avaliação das colunas 18 a 23 já foi realizada com estas modificações no sistema cromatográfico. A figura V.15 ilustra a diferença obtida nos cromatogramas de uma mesma coluna (coluna 20) onde a única diferença nas condições empregadas na avaliação foi o volume de amostra injetado. Observa-se uma sensível melhora tanto na forma dos picos, quanto na resolução dos componentes da mistura injetado, o que evidencia que a alça empregada anteriormente apresentava um volume excessivo, pelo menos para as colunas de $100 \times 4,6 \text{ mm}$ mostradas na figura V.15.

A coluna 23, empacotada com pressão bem menor que as anteriores, embora em menor tempo devido à alta velocidade de fluxo empregada, mostrou excelente resolução para os solutos empregados, além de valores de número de pratos teóricos similares para os 3 solutos. Já a coluna 18, embora tenha apresentado uma resolução razoável, apresentou enorme variação nos valores do número de pratos teóricos para os diferentes solutos da mistura de teste. (Veja tabela XVIII)

A tabela V.XIII ilustra os resultados obtidos com as colunas 18 e 23, evidenciando que as modificações realizadas no sistema de empacotamento levaram quase à duplicação dos valores de N e que as alterações feitas no sistema

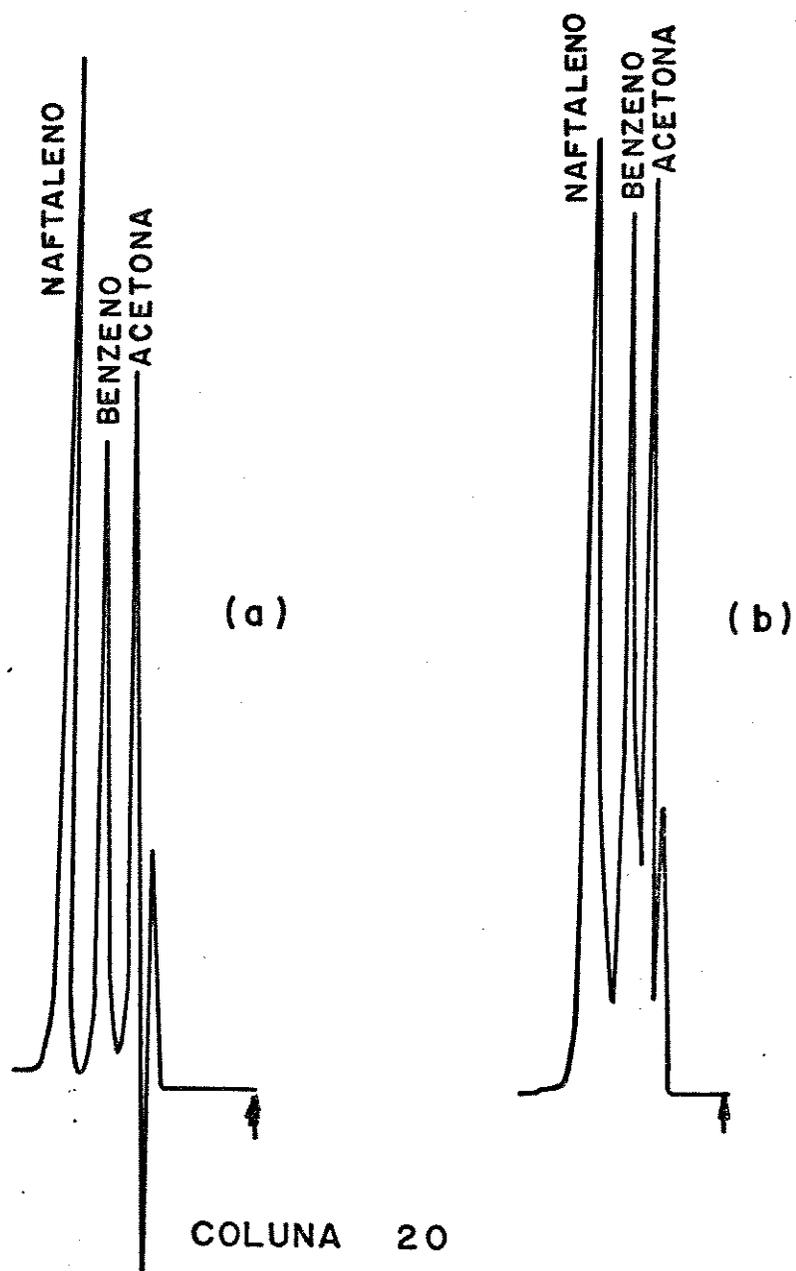


Figura V.15 - Cromatogramas Típicos Obtidos com a Coluna 20 à Vazão de 1,0ml/min no Sistema Cromatográfico Convencional.

a) Volume Injetado: 10µl

b) Volume Injetado: 20µl

cromatográfico realmente reduziram a dispersão dos picos, resultando valores similares de N para solutos com diferentes valores de k' .

Tabela V.XIII - Comparação Entre os Valores de N para Solutos com Diferentes Valores de k' , Para as Colunas 18 e 23 Preparadas, Respectivamente, Antes e Após Todas as Alterações Realizadas nos Sistemas de Empacotamento e Avaliação das Colunas.

| Solutos | VALORES DE N/m (m^{-1}) | | |
|-----------|-------------------------------|---------|-----------|
| | Acetona | Benzeno | Naftaleno |
| Coluna 18 | 6600 | 12800 | 16800 |
| Coluna 23 | 24100 | 24300 | 25800 |

Quanto aos fatores de assimetria, observamos uma grande redução, de cerca de 2,3, para as primeiras colunas empacotadas nesta etapa, para valor em torno de 1,5 nas últimas.

A redução no fator de assimetria nesta série de colunas evidencia a eficácia das alterações realizadas na bomba, no entanto, o registro de valores de 1,5 indica a necessidade de maiores precauções ainda. Devemos ressaltar aqui que este grupo de colunas apresentou maiores valores para os fatores de assimetria que as colunas das etapas anteriores, fato explicado pela redução na dispersão cromatográfica, ou seja, nosso cromatógrafo nesta etapa do trabalho apresentou melhor perfor-

mance, sendo capaz de "detectar" ou "sentir" mais as verdadeiras características das colunas avaliadas.

i) Tentativas de Redução do Fator de Assimetria, As.

Os resultados obtidos com a série de colunas anterior foram realmente animadores, restando apenas a questão do fator de assimetria que, embora se tenha reduzido bastante no decorrer da última etapa, ainda estava elevado para os nossos propósitos.

Decidiu-se, então, pela preparação de um grupo de colunas com partículas de 5 μ m de diâmetro. Empregaram-se partículas irregulares.

As características e as dimensões dos tubos vazios foram mantidas constantes. Usou-se tubos de 100x4,6 mm com terminais Valco, preparados por nós.

O método de empacotamento usado também foi o mesmo da etapa anterior, empregando metanol como solvente propulsor e no preparo da suspensão. As condições empregadas no empacotamento bem como todos os parâmetros relevantes são resumidos na tabela V.XIV. As colunas foram identificadas pelos números 24 a 28. Parte do material de empacotamento usado para a coluna 24 foi recuperado de colunas anteriores.

Não se fez a passagem de fase móvel durante o empacotamento da coluna 28 para se certificar da eficácia ou não desta prática, mas fez-se o condicionamento no cromatógrafo normalmente. A tabela V.XV apresenta os resultados obtidos com estas colunas.

Tabela V.XIV - Parâmetros Experimentais Empregados no Empacotamento das Colunas 24-28. Dimensões: 100 x 4,6mm; Partículas Irregulares, (Após Todas as Alterações Feitas na Bomba Shandon).

| Coluna | Fase Estacionária | Condições da Fase Estacionária | Pressão (psi) | Temperatura Ambiente (*) | Passagem de Fase Móvel | Vazão Final (ml/min) |
|--------|----------------------------|--------------------------------|---------------|--------------------------|------------------------|----------------------|
| 24 | LiChrosorb RP 18-5 μ m | 30% Recuperada | 6000 (42MPa) | Normal | Sim | 4,0 |
| 25 | LiChrosorb RP 18-5 μ m | Novo | 6000 (42MPa) | Elevada | Sim | 4,0 |
| 26 | LiChrosorb RP 18-5 μ m | Novo | 6000 (42MPa) | Normal | Sim | 4,0 |
| 27 | LiChrosorb RP 18-5 μ m | Novo | 6000 (42MPa) | 20°C | Sim | 4,0 |
| 28 | LiChrosorb RP 18-5 μ m | Novo | 6000 (42MPa) | 20°C | Não | 4,0 |

(*) Houve problemas com o ar condicionado do laboratório nos dias em que foram preparadas as 3 primeiras colunas. A temperatura ambiente estava alta, especialmente no dia do empacotamento da coluna 25; notou-se um superaquecimento e um aspecto estranho na suspensão ao retirá-la do ultrassom, como se houvesse ocorrido a sua decomposição.

Tabela V.XV - Resultados Obtidos na Avaliação das Colunas 24 a 28. Dimensões: 100x4,6mm - LiChrosorb RP-18 (5 μ m); Volume da Amostra Injetado: 10 μ l Detecção a 254nm; Cálculos de N em Relação ao Naftaleno (Após a Otimização do Cromatógrafo)

| Coluna | u (mm/s) | N _{max} /m (m ⁻¹) | H _{min} (μ m) | As - |
|--------|-------------|---|--------------------------------|---------|
| 24 | 0,59 | 34000 | 29,4 | 1,04 |
| 25 | 0,60 | 39700 | 25,2 | 1,5 |
| 26 | 0,60 | 42400 | 23,6 | 1,2 |
| 27 | 0,60 | 49300 | 20,3 | 1,4 |
| 28 | 0,60 | 37300 | 26,8 | 1,4 |

Por analogia às colunas empacotadas com partículas de 10 μ m, da etapa anterior, esperávamos conseguir mais de 50 mil pratos teóricos para as colunas 24-28. No entanto apenas o resultado obtido com a coluna 27 aproximou-se de nossas expectativas e ainda assim com um fator de assimetria relativamente alto. Constatou-se que a passagem de fase móvel durante o empacotamento é uma prática importante, pois a coluna 28 (sem fase móvel) mostrou menor número de pratos que a 27.

Além do uso de parte do material recuperado para a coluna 24 e dos problemas relacionados à temperatura ambiente enfrentados nos dias em que algumas destas colunas foram preparadas, nós observamos ainda, ao tentar empacotar outras colunas, que havia problemas mecânicos na bomba. Os problemas foram confirmados através da detecção de vazamento no pistão da bomba e, conseqüentemente, a pressão deve ter sofrido flutuações durante o empacotamento das últimas colunas, o que pode justificar a grande variação observada nos resultados apresentados na tabela V.XV e, inclusive, os altos valores do fator de assimetria obtidos.

Mais uma vez necessitamos aguardar a chegada de peças de reposição para realizar os reparos.

j) Finalização do Estudo das Colunas Convencionais

Recebidas as peças de reposição da bomba Shandon foram feitas as substituições necessárias e deu-se continuidade aos trabalhos para a finalização dos testes com as colunas convencionais.

Preparou-se uma série de colunas empregando partículas irregulares e esféricas de 5 e 10 μ m de diâmetro.

O método de empacotamento empregado para estas colunas foi o mesmo do anterior. Usou-se metanol como solvente e a pressão foi mantida constante em 5000 psi (35MPa) para as colunas com partículas de 10 μ m de diâmetro e 6000 psi (42MPa) para as colunas com partículas de 5 μ m de diâmetro.

O empacotamento foi inicialmente ascendente ,

até passagem de cerca de 100ml de metanol, e depois descendente até passagem de aproximadamente mais 50ml de metanol. Sem desligar a bomba, o metanol foi substituído pela fase móvel que percolou durante cerca de 5 minutos, após o que a bomba foi desligada.

A figura V.16 apresenta uma comparação entre as vazões típicas obtidas durante o empacotamento de colunas com diferentes tipos de fases estacionárias. Observa-se que a 6000 psi (42MPa) uma coluna de partículas esféricas, de 10 μ m, fica pronta em menos de 4 minutos, portanto, pode-se reduzir a pressão de empacotamento para 5000 psi (35MPa), mantendo alta velocidade de impacto das partículas, o que resulta em colunas de excelente qualidade.

Foram preparadas 4 colunas de cada tipo de fase estacionária, e os resultados médios são apresentados na tabela V.XVI.

Agora com todos os equipamentos funcionando perfeitamente, observou-se excelente reprodutibilidade nos resultados. Obteve-se uma variação inferior a 5% para os resultados de colunas similares, e um desvio médio inferior a 2% na avaliação de uma mesma coluna, resultados estes considerados muito bons.

A análise da tabela V.XVI revela que os resultados conseguidos com as colunas 29-32 superam as expectativas, pois mesmo a maioria das colunas disponíveis no mercado não alcançam valores de N tão elevados. Além disso, os fatores de assimetria mostraram-se excelentes, principalmente para as colunas empacotadas com partículas de 5 μ m de diâmetro.

Tabela V.XVI - Resultados Médios Obtidos na Avaliação das Colunas Identificadas pelos Números 29 a 32. Dimensões 100x4,6mm; Terminais Valco; Volume da Amostra: 10 μ l; Detecção a 254nm.

| Coluna | Fase Estacionária(*) | u (mm/s) | N _{max} /m (m ⁻¹) | H _{min} (μ m) | h _{min} | As |
|--------|-------------------------------------|-------------|---|--------------------------------|------------------|------------------|
| 29 | LiChrosorb RP 18-10 μ m | 0,70 | 37400 (\pm 1,5%) | 26,8 | 2,7 | 1,2 (nova) |
| 30 | Spherisorb S10 ODS 10 μ m | 0,30 | 37500 (\pm 1,2%) | 26,9 | 2,7 | 1,3 (recup.) |
| 31 | LiChrosorb RP 18-5 μ m | 0,90 | 57800 (\pm 1,6%) | 17,3 | 3,5 | 1,01 (recup.) |
| 32 | Spherisorb S 5 ODS 5 μ m | 0,65 | 71000 (\pm 1,1%) | 14,1 | 2,8 | 1,10 (recup.) |

(*) LiChrosorb RP-18 é fornecido por E.Merck (Part.irregulares)
Spherisorb S ODS é obtido de Phase Sep. (Part.esféricas)

A figura V.17 mostra cromatogramas obtidos com as colunas 29 e 30 empacotadas com partículas de 10 μ m, irregulares e esféricas, respectivamente.

A figura V.18 apresenta os cromatogramas obtidos com as colunas 31 e 32, preparadas com partículas de 5 μ m, nas mesmas condições, vazão e velocidade do papel, para facilitar a comparação. Observa-se que os resultados são semelhantes, embora a coluna 32, empacotada com partículas es-

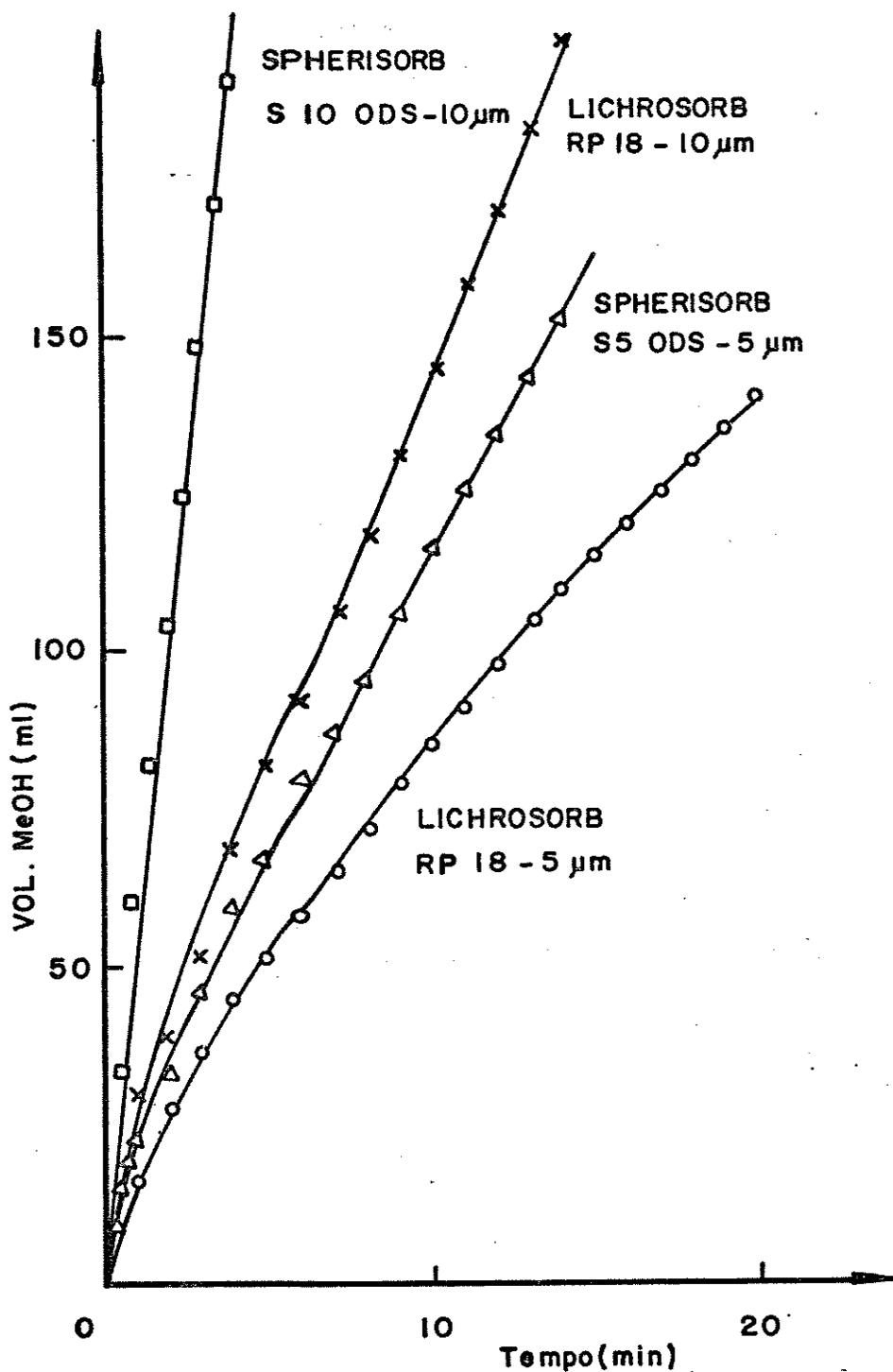


Figura V.16 - Variações Típicas do Volume do Solvente Propulsor (Metanol) em Relação ao Tempo de Empacotamento das Colunas com Diferentes Fases Estacionárias, Após todas as Alterações Feitas na Bomba Shandon, a Pressão do Solvente de 6000 psi (42MPa) e Pressão do Gás (N₂) de 95psi (6,7MPa)

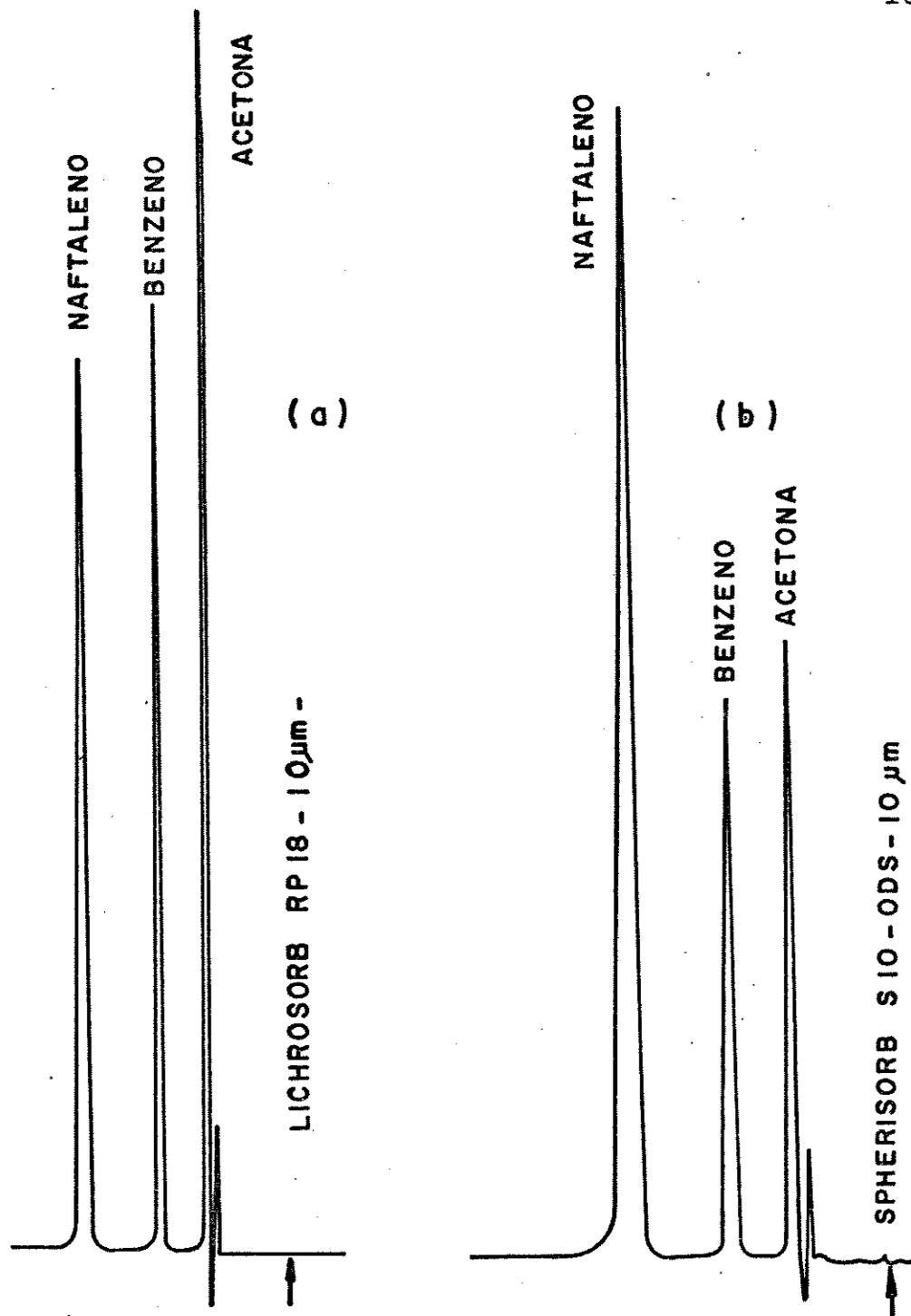


Figura V.17 - Cromatogramas Obtidos com:

- a) Coluna 29 - LiChrosorb RP 18-10 μm (Merck) Fase Estacionária Nova. Vazão 1,0 ml/min; P ~ 200 psi; Velocidade do Papel: 0,5 cm/min.
- b) Coluna 30 - Spherisorb S10-ODS - 10 μm (Phase Sep.) Fase Estacionária Recuperada. Vazão: 1,4 ml/min; P ~ 250 psi; Velocidade do Papel: 2 cm/min.

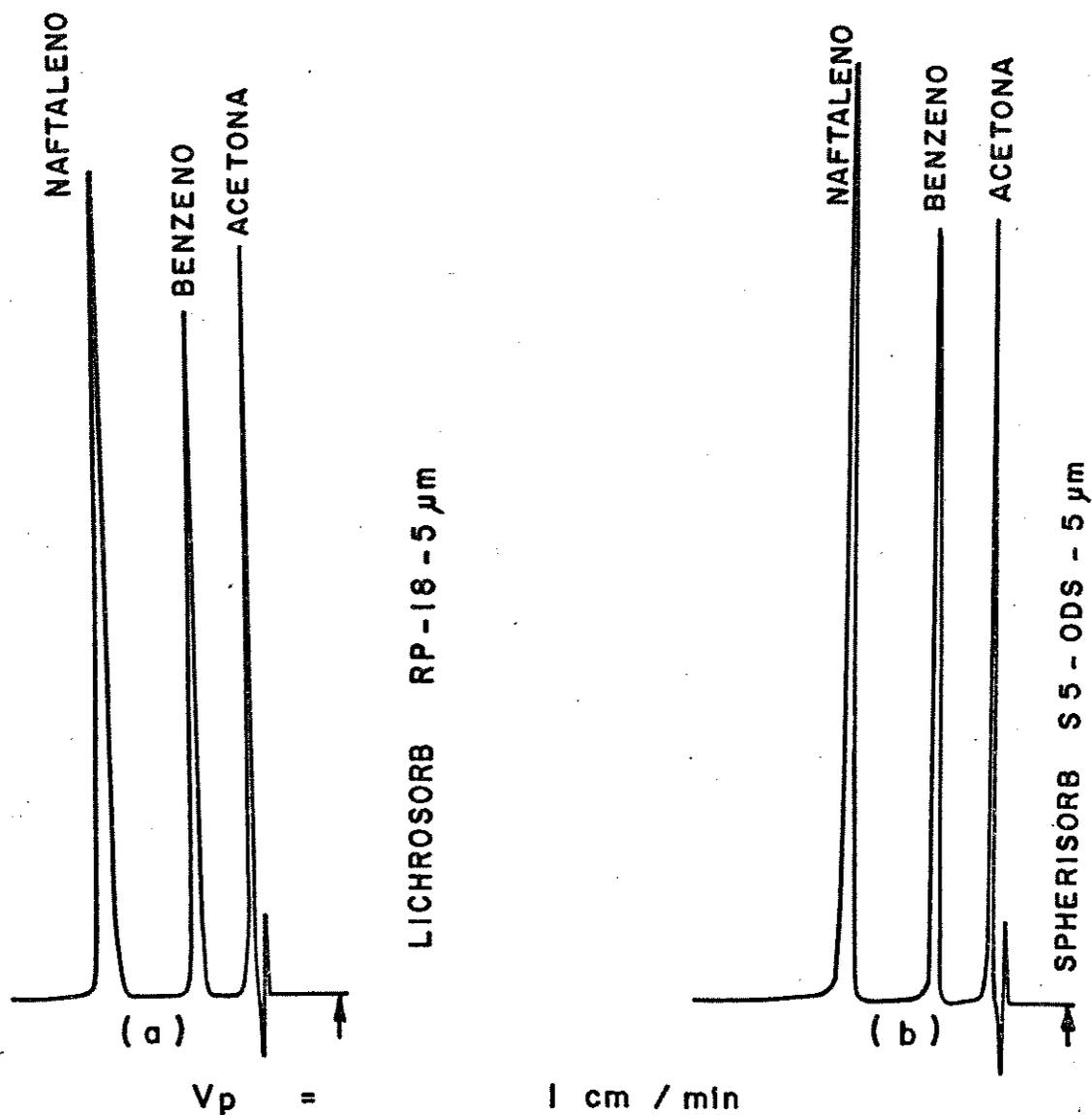


Figura V.18 - Cromatogramas Típicos Obtidos no Sistema Cromatográfico Convencional, Empregando-se as mesmas Condições. Vazão: 1,0ml/min; V_i : 10 μ l e Detecção: 254nm.

a) Coluna 31 - LiChrosorb RP 18-5 μ m; 100x4,6mm

$$N_{\text{máx}} = 57800 \text{ Pratos/m}$$

b) Coluna 32 - Spherisorb S5 ODS-5 μ m; 100x4,6mm

$$N_{\text{máx}} = 71000 \text{ Pratos/m}$$

Tabela V.XVII - Dados Experimentais e Calculados Referentes à Coluna 11, de 100 x 4,6 mm Empacotada com Spherisorb S-5 ODS, Novo (Ver Capítulo V.1.f) Cálculos em Relação ao Naftaleno

| Vazão (ml/min) | Pressão (psi) | t_o (min) | t_R (min) | $W_{1/2}$ (min) | N/m (m ⁻¹) | H (μ m) | u (mm/s) | A/B - |
|-------------------|------------------|----------------|----------------|--------------------|---------------------------|-----------------|-------------|----------|
| 0,1 | 200 | 12,93 | 46,53 | 1,70 | 41500 | 24,1 | 0,13 | 1,2 |
| 0,4 | 300 | 2,80 | 10,05 | 0,33 | 53000 | 18,9 | 0,60 | 1,2 |
| 0,7 | 400 | 1,58 | 5,60 | 0,18 | 55500 | 18,0 | 1,1 | 1,2 |
| 1,0 | 550 | 1,11 | 4,00 | 0,13 | 56700 | 17,6 | 1,5 | 1,3 |
| 1,4 | 800 | 0,80 | 2,82 | 0,10 | 44100 | 22,7 | 2,1 | 1,3 |
| 1,8 | 1000 | 0,62 | 2,20 | 0,08 | 40900 | 24,5 | 2,7 | 1,2 |
| 2,2 | 1250 | 0,50 | 1,79 | 0,07 | 34200 | 29,2 | 3,3 | 1,2 |

Obs.: 1000 psi \sim 7MPa

féricas, tenha fornecido picos mais finos e, conseqüentemente, maior número de pratos teóricos que a coluna 31, de partículas irregulares.

k) Comparação das Colunas Similares

As partículas esféricas empregadas nesta etapa do trabalho foram recuperadas daquelas colunas usadas no "Estudo do efeito do comprimento da coluna sobre sua eficiência" descrito no ítem f deste capítulo. Apesar de recuperados os resultados conseguidos agora, após todas as alterações feitas nos equipamentos, foram bem melhores que aqueles obtidos anteriormente, indicando que, se tivéssemos usado material de empacotamento novo, provavelmente teríamos conseguido eficiência ainda maior.

Para deixar bem clara a diferença obtida entre os resultados conseguidos nesta etapa do trabalho e aqueles descritos no ítem f deste capítulo, as tabelas V.XVII e V.XVIII apresentam os resultados conseguidos com as colunas 11 e 32, respectivamente. Deve-se lembrar que a coluna 11, de características similares à coluna 32 quanto às dimensões e fase estacionária, foi empacotada com material novo, antes das modificações realizadas na bomba **Shandon**, e avaliada antes da otimização do sistema cromatográfico. Já a coluna 32 foi preparada e testada após todas as alterações.

A análise das tabelas V.XVII e V.XVIII revela que o número máximo de pratos teóricos para a coluna 11 foi de 56700 à vazão de 1,0ml/min, enquanto que a coluna 32 ultrapassou os 70 mil pratos teóricos e à vazão ainda menor, 0,4ml/min, o que permite, inclusive, maior economia de fase móvel.

Tabela V.XVIII - Dados Experimentais e Calculados Referentes à Coluna 32, 100x4,6mm, Empacotada com Spherisorb S-5 ODS, 5 μ m, Recuperado.

| Vazão (mL/min) | Pressão (psi) | t ₀ (min) | t _R (min) | W _{1/2} (min) | N/m (m ⁻¹) | H (μ m) | u (mm/s) | A/B - |
|-------------------|------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------|-------------|----------|
| 0,1 | 400 | 12,10 | 45,42 | 1,70 | 39600 | 25,3 | 0,14 | 1,10 |
| 0,2 | 600 | 5,02 | 20,95 | 0,63 | 61300 | 16,3 | 0,33 | 1,22 |
| 0,4 | 800 | 2,58 | 10,03 | 0,28 | 71000 | 14,1 | 0,65 | 1,19 |
| 0,6 | 900 | 1,71 | 6,63 | 0,19 | 68700 | 14,6 | 0,97 | 1,16 |
| 1,0 | 1100 | 1,06 | 3,96 | 0,12 | 63500 | 15,8 | 1,57 | 1,07 |
| 1,4 | 1700 | 0,75 | 2,85 | 0,09 | 53900 | 18,6 | 2,21 | 1,16 |
| 1,8 | 2100 | 0,58 | 2,18 | 0,08 | 47600 | 21,0 | 2,87 | 1,11 |

Obs.: 1000 psi \sim 7MPa

Além da coluna 11, que é similar à coluna 32, temos também a coluna 30, de partículas de 10 μ m de diâmetro, similar à coluna 14. As figuras V.19 e V.20 apresentam as curvas de H versus u para as colunas 30 e 32 respectivamente, permitindo compará-las às figuras V.5 e V.6 do capítulo V.1.f, correspondente às colunas 11 e 14.

ℓ) Apresentação dos Resultados Sob Outra Forma

Os resultados obtidos na avaliação de uma colu

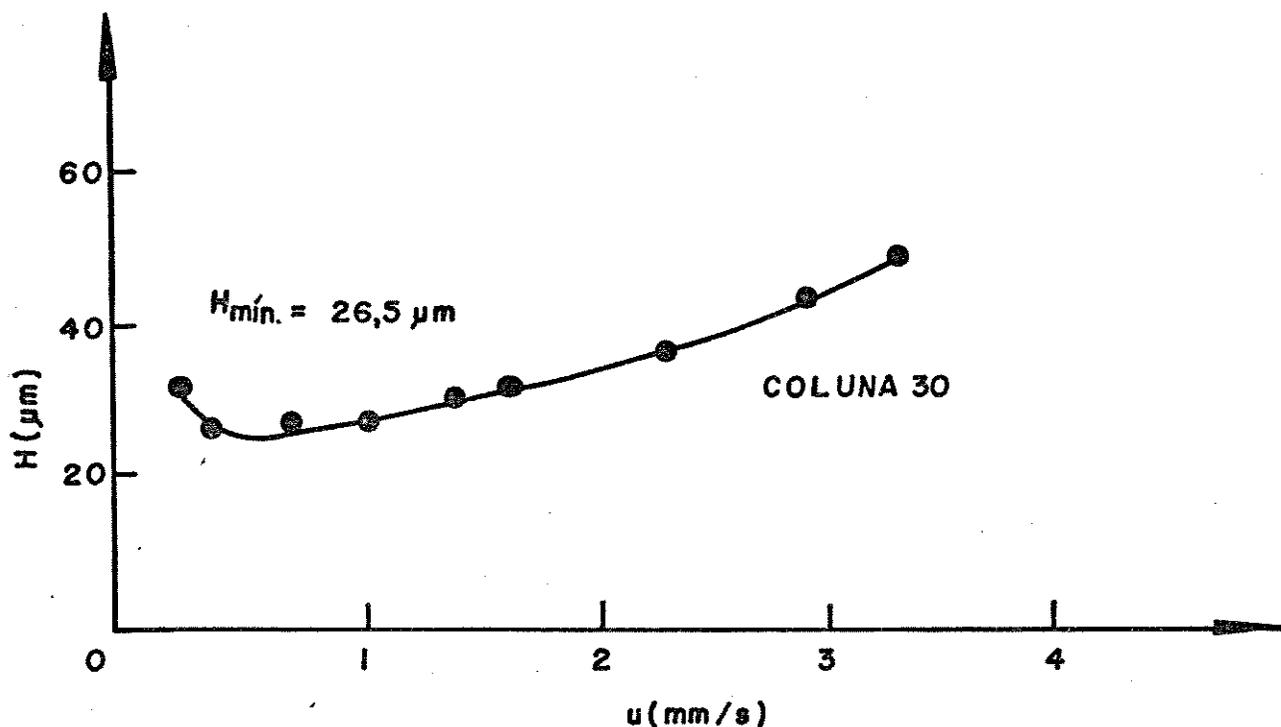


Figura V.19 - Dependência da Altura do Prato com a Velocidade de Linear para a Coluna 30. ($d_p = 10\mu\text{m}$)

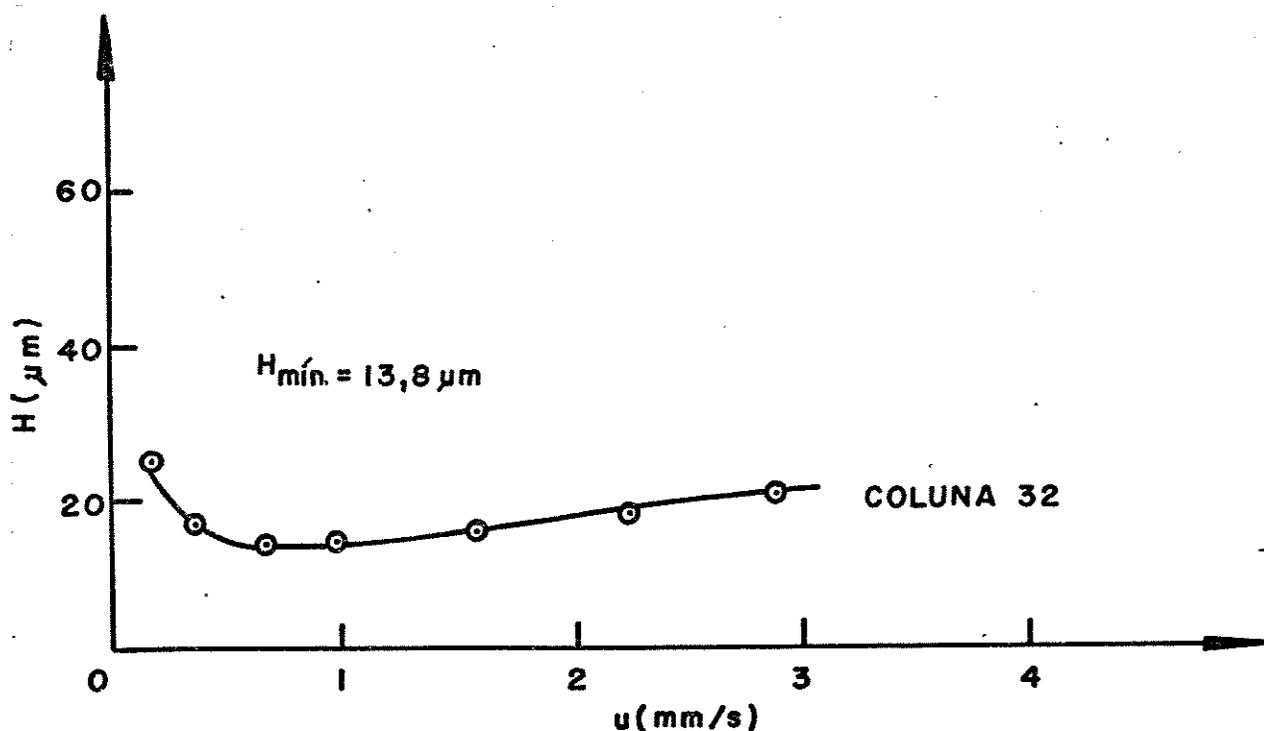


Figura V.20 - Dependência da Altura do Prato com a Velocidade de Linear para a Coluna 32. ($d_p = 5\mu\text{m}$)

na cromatográfica podem ser expressos de várias formas. Neste trabalho, já o apresentamos em forma de gráficos e tabelas; porém alguns usuários preferem utilizar-se de relatórios. Existem programas simples para microcomputadores que já fornecem os resultados na forma de um relatório, como apresentado com resultados completos para a coluna 32. (pág. 171)

É evidente que o relatório apresentado é bastante detalhado, e, dependendo das necessidades, pode-se resumí-lo, ou até mesmo acrescentar outros parâmetros que possam interessar, como por exemplo, a Impedância da coluna (E), a Razão de Knox-Parcher (I), a Resolução (R_s) ou o Fator de Seletividade da coluna (α), entre outros.

m) Resultados do Acompanhamento da Eficiência da Coluna 32

A coluna 32 foi avaliada periodicamente. A tabela V.XIX apresenta os resultados obtidos por estas avaliações. Durante o período de 2 anos a coluna foi usada para vários testes em nosso projeto e inclusive em outros projetos de nosso grupo de trabalho.

A avaliação da coluna 32 em outros equipamentos só foi feita após 2 anos, pois estes não eram disponíveis anteriormente.

Para nossa surpresa, os resultados obtidos com a coluna 32 no sistema Micro-HPLC (ISCO/LDC), mostraram-se superiores aos resultados alcançados com a mesma coluna, logo após seu empacotamento, no cromatógrafo empregado para os testes das colunas convencionais, embora já otimizado. Isto mostra que, se forem disponíveis equipamentos de alta precisão e baixa dis

Tabela V.XIX - Resultados Obtidos na Avaliação Periódica da Coluna 32.

| Período (meses) | Equipamento Cromatográfico | | | Vazão (mL/min) | N/m (m ⁻¹) |
|--------------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------|---------------------------|
| | Bomba Marca/Tipo | Injetor Marca/Volu- me alça | Detector Marca/Volu- me cela | | |
| 0 | Altex/ pistão | Rheodyne/ 10 µl | Schoeffel/ 8 µl | 0,4 | 71000 |
| | | | | 1,0 | 63300 |
| 6 | Altex/ pistão | Rheodyne/ 10 µl | Schoeffel/ 8 µl | 1,0 | 62300 |
| 12 | Altex/ pistão | Rheodyne/ 10 µl | Schoeffel/ 8 µl | 1,0 | 54800 |
| 18 | Altex/ pistão | Rheodyne/ 10 µl | Schoeffel/ 8 µl | 1,0 | 46100 |
| 24 | Altex/ pistão | Rheodyne/ 10 µl | Schoeffel/ 8 µl | 1,0 | 38700 |
| 24 | Waters/ pistão | Rheodyne/ 5 µl | Waters/ 1 µl | 1,0 | 42400 |
| 24 | ISCO/ seringa | Rheodyne/ 1 µl | LDC/1 1 µl | 0,6 | 80600 |

persão, podemos desfrutar de altíssima performance cromatográfica.

Relatório de Teste de Coluna

- Coluna 32

Comprimento : 100 mm
Diâmetro interno : 4,6 mm
Fase estacionária : Spherisorb S-5 ODS
Diâmetro das partículas : 5 μ m

Data do Empacotamento : 23/10/85

Data da avaliação : 24/10/85

- Condições de Avaliação

Cromatógrafo Modular

Bomba - Altex
Injetor - Rheodyne
Detector - Shoeffell - UV/V
Registrador - ECB

Temperatura da coluna : Ambiente ($\sim 25^{\circ}\text{C}$)
Fase móvel : MeOH/Água (70/30)
Vazão da fase móvel : 1,0 ml/min
Pressão de teste : 7,7 MPa (1100 psi)
Volume de amostra : 10 μ l
Mistura injetada : Acetona

Benzonitrilo

Benzeno

Tolueno

Naftaleno

Detecção : 254 nm

Sensibilidade : 0,2 UA

Velocidade do papel : 1 cm/min

- Parâmetros Medidos

| | | |
|---|---|---------|
| Tempo morto (t_o) | : | 63,6s |
| Tempo de retenção (t_R) | : | 237,6s |
| Largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) | : | 7,02s |
| A | : | 1,07 cm |
| B | : | 1,00 cm |

- Parâmetros Calculados (em relação ao naftaleno)

| | | |
|--|---|-----------------------|
| Nº pratos teóricos p/coluna (N/col.) | : | 6.350 |
| Nº pratos teóricos p/metro (N/m) | : | 63500 m ⁻¹ |
| Altura equivalente a 1 prato teórico (H) | : | 15,8 µm |
| Altura reduzida do prato (h) | : | 3,15 |
| Velocidade linear da fase móvel (u) | : | 1,57 mm/s |
| Velocidade reduzida da fase móvel (v) | : | 10,5 |
| Permeabilidade | : | 28590 µm ² |
| Resistência ao fluxo (Ø) | : | 874 |
| Fator de capacidade (k') | : | 2,74 |
| Razão de retenção | : | 0,27 |
| Fator de assimetria (A/B) | : | 1,07 |

- Constantes usadas

| | | |
|---|---|---|
| Viscosidade da fase móvel (25°C) | : | 1,36.10 ⁻³ Ns/m ² |
| Coeficiente de difusão do naftaleno na fase móvel | : | 0,74m ² /s |
| Massa molar do naftaleno | : | 128 g |

- Obs.: Para os cálculos foi empregado o formulário da parte introdutória.

Para finalizar nossa discussão sobre colunas convencionais apresentam-se os resultados obtidos com a coluna 32, 2 anos após seu empacotamento, no sistema Micro-HPLC, com maiores detalhes.

A tabela V.XX resume os resultados experimentais e calculados para as diferentes vazões empregadas. Deve-se notar que a máxima vazão registrada foi de $600\mu\text{l}/\text{min}$ ($0,6\text{ml}/\text{min}$), devido à limitações do equipamento. No entanto, foram obtidos resultados até $10\mu\text{l}/\text{min}$ ($0,01\text{ml}/\text{min}$), o que não é possível com os equipamentos convencionais.

A tabela V.XXI mostra os resultados obtidos à vazão de $600\mu\text{l}/\text{min}$ para os 5 solutos injetados. Pode-se observar a excelente concordância dos resultados, o que demonstra que a dispersão cromatográfica é nula nas condições empregadas.

A figura V.21 mostra o cromatograma correspondente aos dados apresentados na tabela V.XXI, evidenciando a maneira empregada no processamento dos cálculos bem como os resultados obtidos. A figura V.22 apresenta o mesmo cromatograma da figura V.21, porém obtido à velocidade do papel de $1\text{cm}/\text{min}$. Nota-se a excelente simetria dos picos de todos os solutos e constata-se que todos os solutos foram muito bem resolvidos (observe os tempos de retenção).

A velocidade do papel de registro usada para obtenção do cromatograma da figura V.21 foi de $6\text{cm}/\text{min}$, um valor bastante alto, mas necessário para se ter picos mais largos, permitindo as medidas dos parâmetros de interesse. Em geral, a largura observada na figura V.21 é a mínima usada na prática; o ideal é ter larguras de pico a meia altura de cerca de 1cm ,

Tabela V.XX - Resultados Obtidos com a Coluna 32, 2 Anos Após sua Preparação. Testes Realizados com o Sistema Micro-HPLC; Injeção de $1\mu\text{l}$; Detecção a 254nm. (Em Relação ao Naftaleno)

| Vazão ($\mu\text{l}/\text{min}$) | P(psi) (MPa) | t_o (min) | t_R (min) | $W_{1/2}$ (min) | N/m m^{-1} | H (μm) | u (mm/s) | A/B - |
|---------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|--------------------|------------------------|------------------------|-------------|----------|
| 600 | 580 (4,1) | 1,68 | 5,72 | 0,15 | 80600 | 12,4 | 0,99 | 1,0 |
| 500 | 460 (3,2) | 2,04 | 7,00 | 0,19 | 75200 | 13,3 | 0,82 | 1,0 |
| 400 | 330 (2,3) | 2,57 | 8,82 | 0,24 | 74800 | 13,4 | 0,65 | 1,08 |
| 300 | 240 (1,7) | 3,40 | 11,85 | 0,35 | 63500 | 15,8 | 0,49 | 1,0 |
| 100 | ~ 0 | 10,40 | 36,30 | 1,20 | 50800 | 19,7 | 0,16 | 1,0 |
| 50 | ~ 0 | 21,00 | 72,60 | 3,20 | 28500 | 35,1 | 0,08 | 1,0 |
| 10 | ~ 0 | 96,00 | 263,2 | 15,60 | 15800 | 63,3 | 0,02 | 1,0 |

ou mais, para que sejam minimizados os erros das medidas/143/.

A estimativa do desvio médio obtida para o cálculo do número de pratos teóricos para os diferentes solutos da mistura de teste foi de 0,32%, valor considerado extre

Tabela V.XXI - Resultados Experimentais Obtidos com a Coluna 32 (Após 2 Anos) para os 5 Solutos da Mistura Injetada no Sistema Micro-HPLC à Vazão de 600 $\mu\text{l}/\text{min}$ ($P \approx 580 \text{ psi}$ (4,1MPa). Volume de Amostra: 1 μl ; Detecção a 254nm(Ver Cromatograma da Figura V.21).

| Soluto | t_R (min) | $W_{1/2}$ (min) | N/m (m^{-1}) | H (μm) | A/B - |
|-------------------|----------------|--------------------|-----------------------|------------------------|----------|
| Acetona | 1,96 | 0,05 | 80000 | 12,5 | 1,26 |
| Benzoni- trilo | 2,55 | 0,07 | 81000 | 12,4 | 1,24 |
| Benzeno | 3,48 | 0,09 | 80400 | 12,4 | 1,20 |
| Tolueno | 4,45 | 0,12 | 80700 | 12,3 | 1,10 |
| Naftaleno | 5,72 | 0,15 | 80600 | 12,4 | 1,00 |

Obs.: Número de pratos teóricos médio: 80500/m ($\pm 0,32\%$)

mamente baixo, ou seja, pode-se afirmar que não houve variação do número de pratos, N , com o aumento do fator de capacidade, k' . Esta constância no valor de N indica que a dispersão cromatográfica é totalmente negligenciável para a coluna empregada.

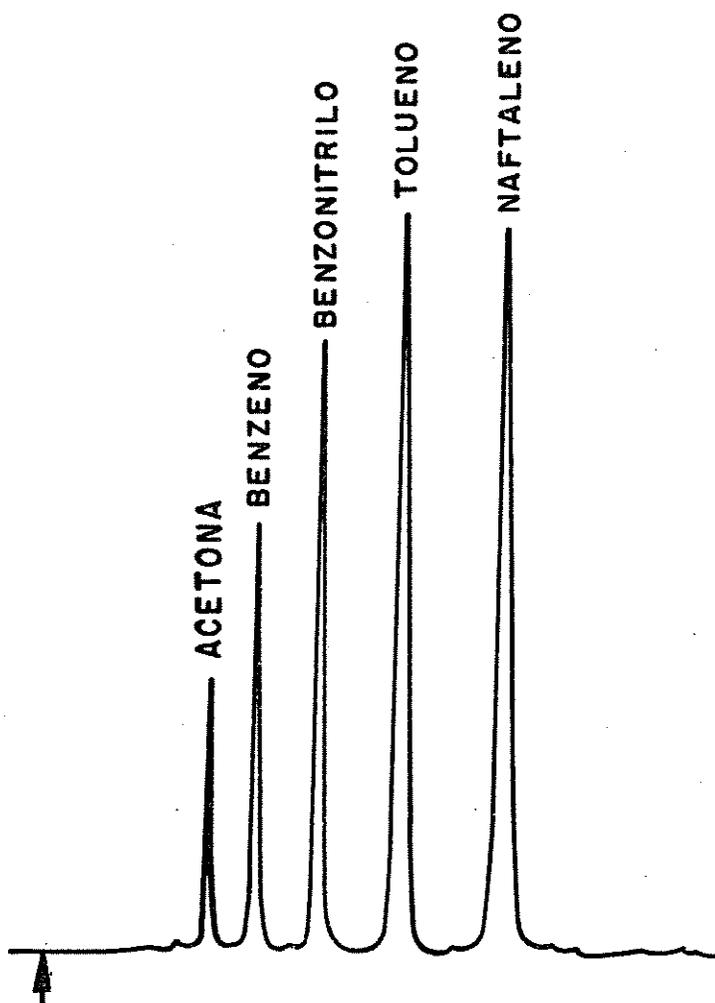


Figura V.22 - Cromatograma Obtido com a Coluna 32 (Após 2 Anos) no "Micro-HPLC"; Velocidade do Papel 1cm/min; Demais Condições como Fig. V.21.

2. AVALIAÇÃO DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO

A figura V.23 apresenta um diagrama esquemático do equipamento empregado nos testes que denominamos "Avaliação da Dispersão Cromatográfica".

Inicialmente empregamos o equipamento convencional constituído de:

- Bomba Altex, modelo 110-A, com vazão de 0,1 a \sim 5,0ml/min (dependendo da pressão).

- Injetor Rheodyne, modelo 7010, com alça de 10 μ l.

- Detector Schoeffel, modelo 770, com cela de 8 μ l, operado a 254nm e constante de tempo mínima de 1s.

Depois foi usado um sistema considerado de baixa dispersão, devido às características de sua válvula injetora e volume da cela de detecção. A bomba empregada foi a mesma, pois aguardávamos a importação da bomba do sistema Micro-HPLC.

O sistema de "baixa dispersão" foi assim constituído:

- Bomba Altex, modelo 110-A (foi empregado um tubo de 0,5mm de diâmetro interno e 2m de comprimento, espiralado com diâmetro de cerca de 10cm, para a redução dos pulsos provenientes da bomba).

- Micro-injetor Rheodyne, modelo 7413, com alça interna de 1 μ l.

- Detector LDC, Milton Roy, com cela de 1 μ l, operado a 254nm e constante de tempo mínima de 0,05s.

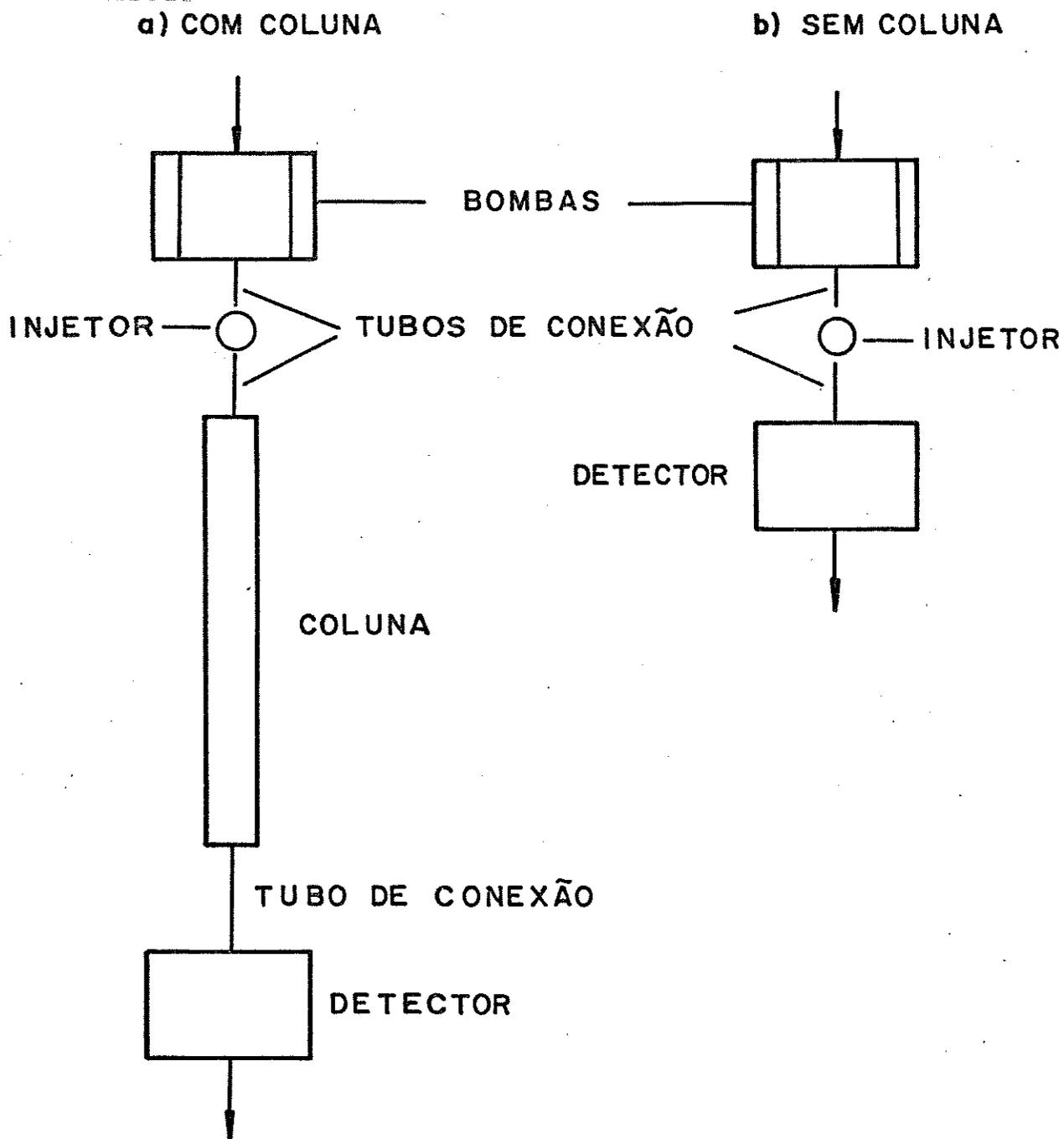


Figura V.23 - Diagrama Esquemático do Equipamento Empregado no Estudo da Dispersão Cromatográfica.

a) Sistema Cromatográfico Completo

b) Sistema Cromatográfico Sem Coluna

As configurações representadas na figura V.23 correspondem ao emprego (a) ou não (b) da coluna cromatográfica na realização dos testes.

A coluna empregada nos testes foi a coluna 32, de Spherisorb S-5 ODS, 5 μ m, preparada na etapa anterior.

O comprimento dos tubos conectores variou entre 100 e 1400mm e três diferentes diâmetros internos foram usados: 0,02 pol (0,5mm), 0,01 pol (0,25mm), e 0,0045 pol (0,11mm).

A coluna foi conectada diretamente ao detector através de um micro-adaptador especial, ao qual foi acoplada uma conexão de "Kel-F". A ligação ao injetor foi feita por meio de um tubo com o mínimo comprimento permitido pela configuração do sistema (50mm) e com o menor diâmetro disponível (0,11mm).

Para os experimentos "sem coluna" os tubos empregados foram conectados diretamente ao injetor e o mesmo adaptador foi usado para o acoplamento ao detector.

Todas as peças empregadas, anilhas (ferrules) e peças de conexão (fittings), foram de volume morto nulo e compatíveis entre si, como por exemplo, conexões Rheodyne para o injetor e Valco para a coluna.

A parte prática foi simples, embora bastante trabalhosa, pois envolveu a troca constante de módulos, tubos e conexões, além do que todos os tubos foram cortados e montados por nós.

Fez-se a injeção de uma solução de naftaleno em metanol (\sim 0,01%) e sua eluição com MeOH/água - 70/30.

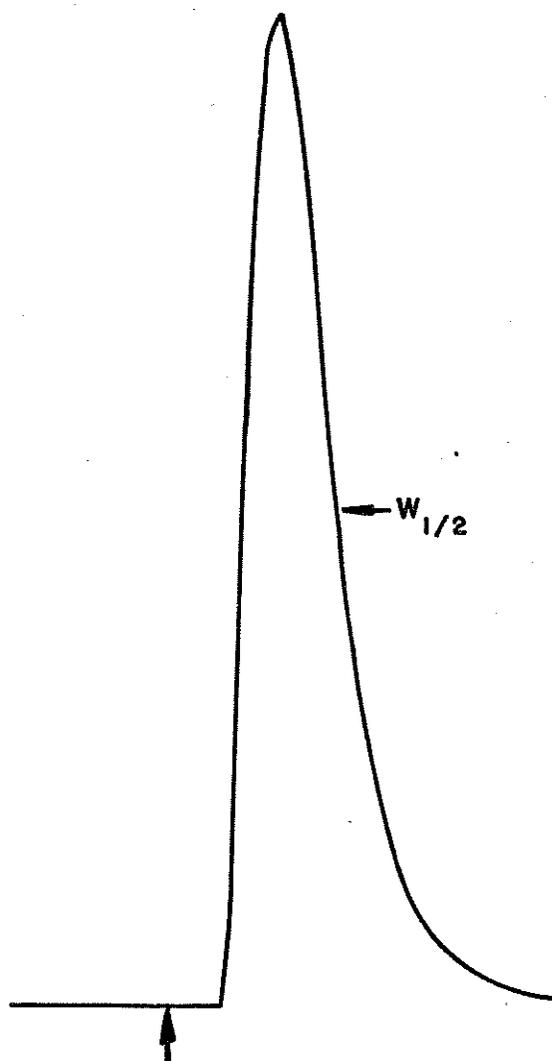


Figura V.24 - Cromatograma Típico Obtido pela Injeção de $1\mu\text{l}$ de Solução de Naftaleno em Metanol, com um T_u bo de $400 \times 0,25\text{mm}$ no Sistema de Baixa Dispersão. Detecção a 254nm com Cela de $1\mu\text{l}$.

A figura V.24 mostra um cromatograma típico obtido nestas condições, no caso na ausência da coluna, o que justifica a rápida ascensão e a grande cauda observadas.

O conceito básico envolvido nestes experimentos é proveniente da equação

$$\sigma^2 = \sigma^2_{\text{instr.}} + \sigma^2_{t/c} + \sigma^2_{\text{col}} \quad (\text{eq. 35})$$

onde $\sigma^2_{\text{instr.}}$, a variância devido aos fatores instrumentais (detector/injetor), $\sigma^2_{t/c}$, a variância devido aos tubos e conectores e σ^2_{col} , a variância devido à coluna, correspondem às contribuições dos vários componentes do sistema cromatográfico à variância total, σ^2 .

A partir do cromatograma pode-se obter o valor da variância total observada, $\sigma^2_{\text{obs.}}$ através da equação:

$$\sigma^2_{\text{obs.}} = \frac{W_{1/2}^2}{8 \ln 2} \quad (\text{eq. 36})$$

onde $W_{1/2}$ é a largura do pico a meia altura em unidades de volume (μl).

Na ausência da coluna, pode-se obter a variância instrumental, se eliminados os tubos e conexões; ou pode-se obter a variância devido aos tubos, se por exemplo, for empregado um equipamento de baixa dispersão, minimizando os volumes de injeção e da cela de detecção, e o volume morto do injetor e do detector. Desse modo, pode-se considerar $\sigma^2_{\text{instr.}} = 0$.

Empregando a coluna e subtraindo as demais con

tribuições, obtêm-se a variância da coluna propriamente dita.

Com base nestas considerações foram feitos os testes experimentais.

Além da variação das dimensões dos tubos, em pregaram-se diversas vazões durante as eluições.

A figura V.25 apresenta a dependência da variância, σ^2 , com o comprimento, para tubos com 2 diferentes diâmetros internos, 0,5 e 0,25mm, bastante empregados na HPLC convencional. Estes testes foram feitos com ambas as configurações da figura V.23, com e sem a coluna cromatográfica, em vazão de 1ml/min e no sistema convencional.

A intersecção da curva $\sigma^2 \times L$ com o eixo das ordenadas (σ^2) fornece a variância a comprimento nulo do tubo. Considerando os resultados dos testes com a configuração (b), sem coluna, o valor encontrado corresponde à variância instrumental, devido aos sistemas de injeção e detecção, já que o valor foi obtido por extrapolação a comprimento zero do tubo e na ausência da coluna.

Para a figura V.25 o valor encontrado foi de $300\mu\text{l}^2$, correspondendo então à variância instrumental do sistema convencional empregado (detector e injetor). A equação 37 pode, então, ser escrita como:

$$\sigma^2_{\text{obs.}} = \sigma^2_{\text{instr.}} = 300\mu\text{l}^2 \quad (\text{eq.37})$$

Agora, considerando as curvas obtidas quando do uso da configuração (a), com coluna, o valor de σ^2 na intersec

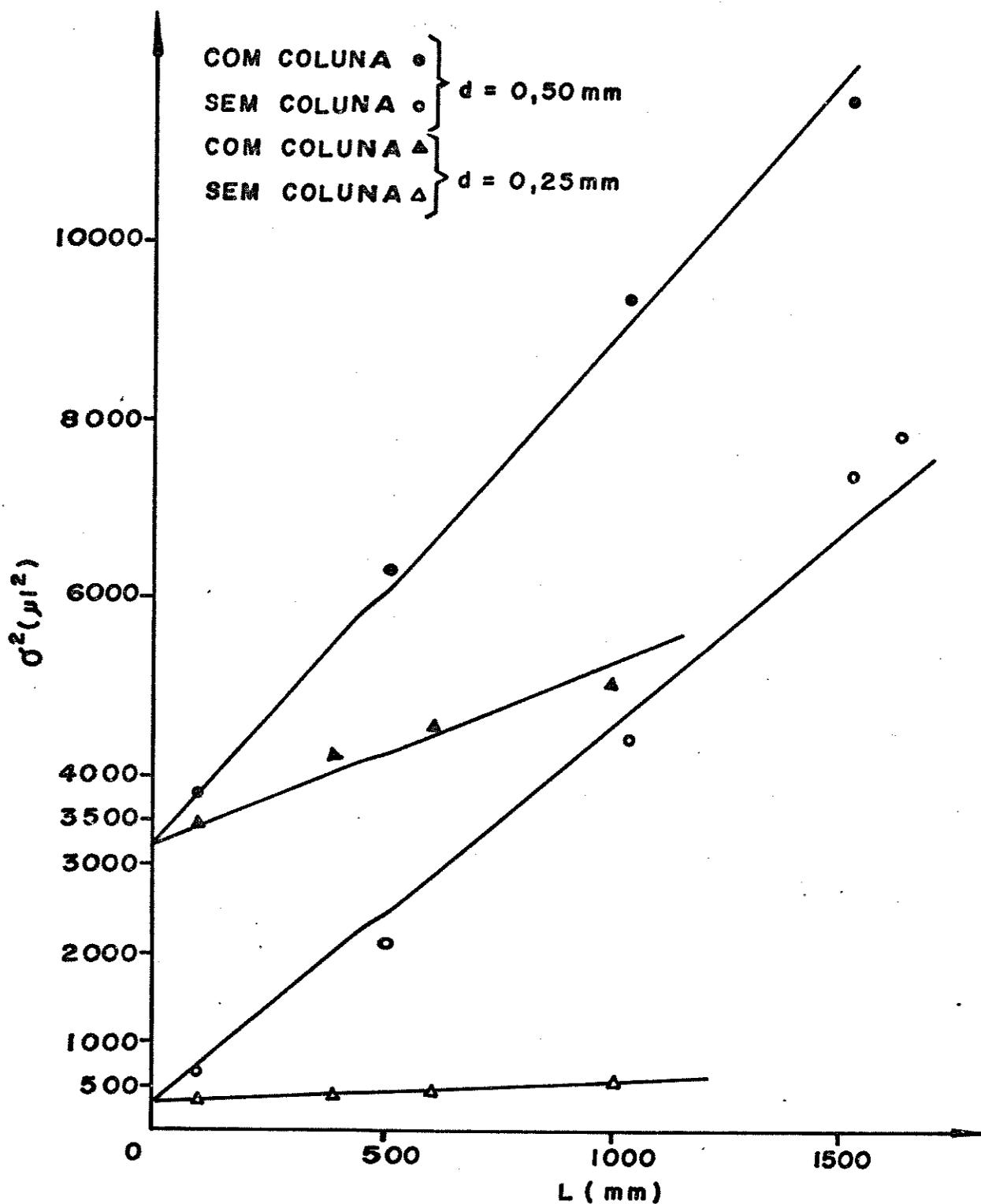


Figura V.25 - Dependência da Variância, σ^2 , com o Comprimento do Tubo de Conexão, L. Testes Feitos no Sistema Convencional. Vazão: 1,0ml/min; V_1 : 10 μ l; V_{cela} : 8 μ l e Detecção a 254nm.

ção das curvas com o eixo das ordenadas é $3200\mu\ell^2$, o que cor responde à variância total do sistema com coluna, excetuando a contribuição dos tubos. Logo,

$$\sigma^2_{\text{obs.}} = \sigma^2_{\text{instr.}} + \sigma^2_{\text{col.}} = 3200\mu\ell^2 \quad (\text{eq.38})$$

Portanto, a diferença $2900\mu\ell^2$, é a contribuição da coluna à variância total dos sistema, $\sigma^2_{\text{col.}}$. Observe que os resultados independem do diâmetro dos tubos, já que $\sigma^2_{t/c} = 0$. ($L = 0$)

A figura V.26 apresenta a variação de σ^2 com a vazão da fase móvel para vários comprimentos do tubo de conexão de 0,25mm de diâmetro interno, obtida no sistema de baixa dispersão, sem o emprego da coluna cromatográfica. Neste caso a equação pode ser reescrita como:

$$\sigma^2_{\text{obs.}} = \sigma^2_{t/c} \quad (\text{eq.39})$$

A figura V.26 mostra uma dependência "parcialmente" linear da variância com a vazão. Alguns trabalhos da literatura, entre eles Reese e Scott / 63/ e Hanggi e Carr/67/, defendem uma relação linear entre σ^2 e F. Porém uma análise detalhada destes trabalhos revela que Hanggi e Carr /67/ fizeram estudos simulados dos dados sobre embasamentos teóricos, enquanto que Scott e Reese /63/ apresentaram um gráfico onde a vazão máxima é $500\mu\ell/\text{min}$, além de possuir apenas três pontos por onde passa a reta. Nenhum outro trabalho foi localizado com o emprego de uma vasta faixa de vazão nem com tantos pontos co

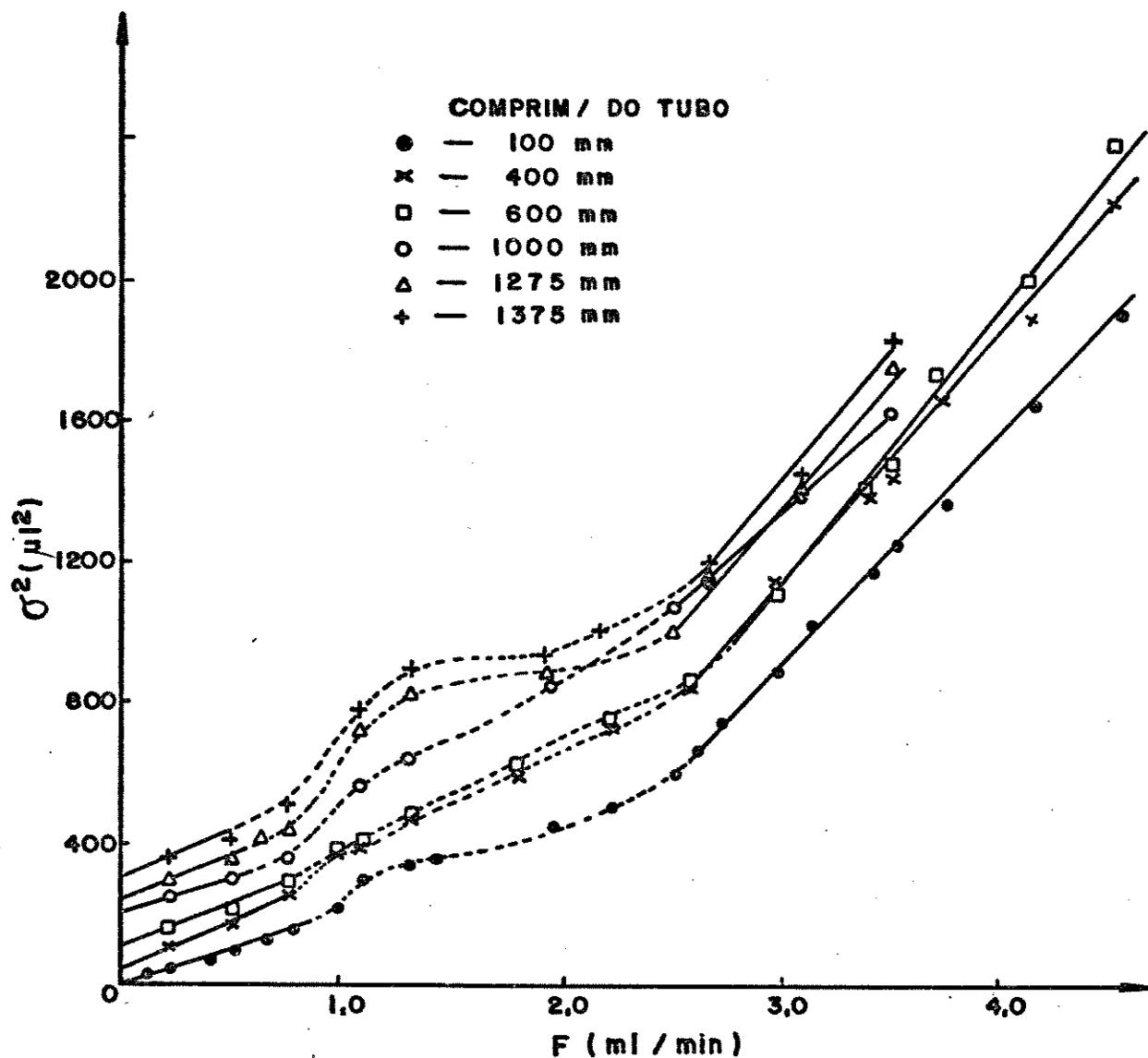


Figura V.26 - Relação entre a Variância, σ^2 , e a Vazão da Fase Móvel, F . Testes Feitos no Sistema de Baixa Dispersão, Sem Coluna. Diâmetro Interno do Tubo de Conexão: 0,25mm; $V_i = 1\mu l$; $V_{cela} = 1\mu l$ e Detecção: 254nm

mo o nosso. Ainda assim, conferimos a vazão da bomba. Após nos certificarmos da precisão da vazão da bomba, repetimos os testes e constatamos uma grande coerência nos resultados.

Testes realizados com tubo de 0,11mm de diâmetro interno mostraram a mesma tendência observada com tubos de 0,25mm. A figura V.27 apresenta os resultados obtidos com um tubo de 100 x 0,11mm e os compara aos resultados do tubo de 0,25mm, de igual comprimento, da figura V.26.

Observa-se uma faixa linear para vazões baixas (menores que 0,7ml/min) e uma tendência à linearidade acima de 2ml/min em ambas as figuras V.26 e V.27.

Diante deste novo fato, podemos sugerir que, possivelmente, efeitos parabólicos do perfil da velocidade do fluxo sejam os responsáveis pela não linearidade, causando evidências que vão contra as previsões teóricas, o que não ocorre para pequenas vazões, onde há menos perturbações, e o fluxo apresenta um perfil laminar. Entretanto, vazões maiores podem provocar efeitos que geram fluxo com turbulência. No entanto, o que mais nos interessa no momento são as vazões reduzidas, para o emprego do sistema Micro-HPLC, e com certeza nesta região ocorre a linearidade da curva $\sigma^2 \times F$, permitindo as extrapolações desejadas.

A intersecção das curvas das figuras V.26 e V.27 com o eixo σ^2 , por extrapolação à vazão nula, fornece a variância estática resultante da diluição logarítmica ou de efeitos wash out /63/. A inclinação das curvas corresponde à dependência da variância com a vazão, resultante do perfil do fluxo da fase móvel no sistema de tubos do equipamento e tende a

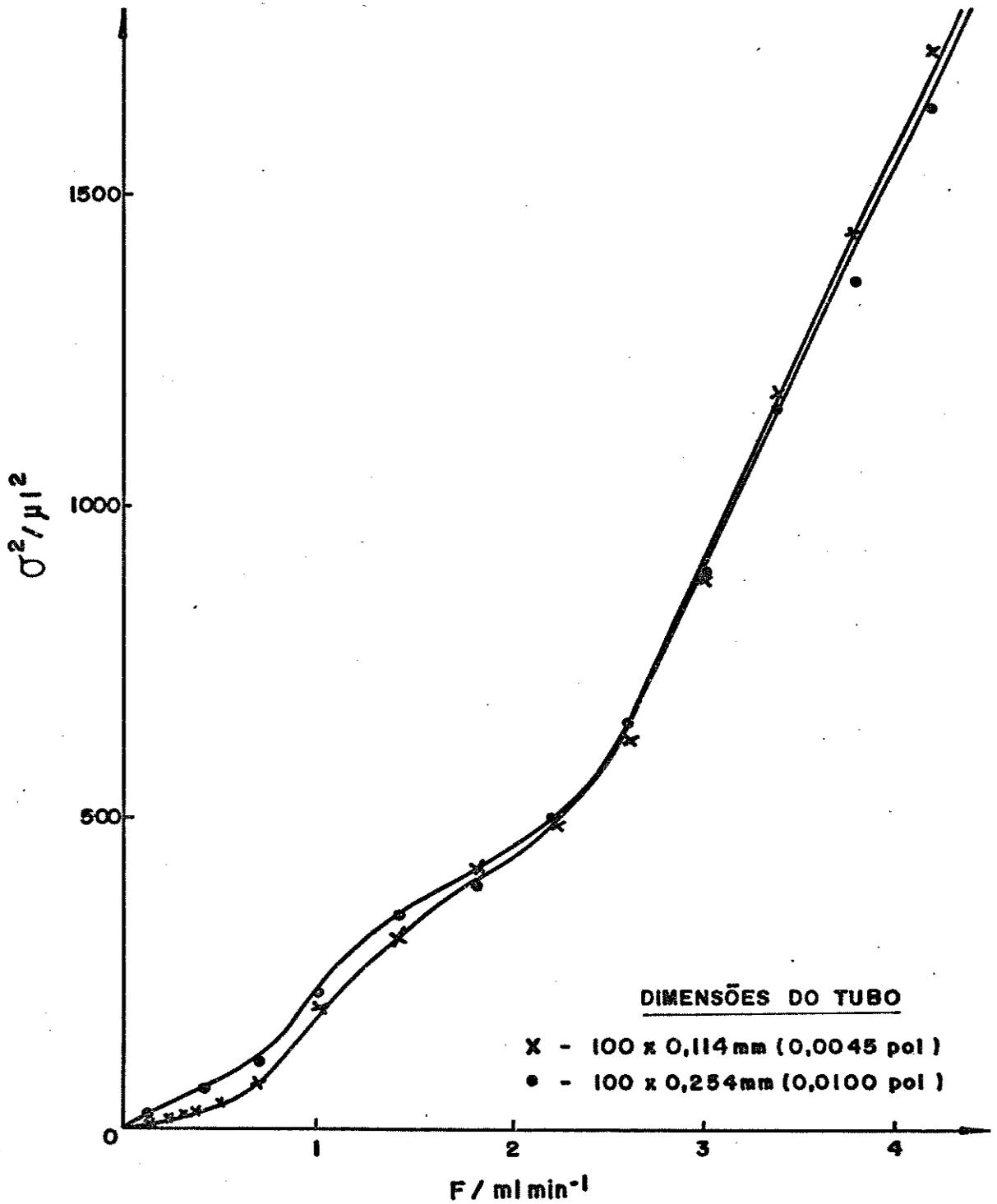


Figura V.27 - Relação entre a Variância, σ^2 , e a Vazão da Fase Móvel, F. Testes Feitos no Sistema de Baixa Dispersão, sem Coluna. Tubos de Conexão de 100mm de Comprimento. $V_i=1\mu l$; $V_{cela}=1\mu l$ e Detecção a 254nm.

ser similar para os diferentes tubos usados.

A variância estática determinada através da figura V.26 é resumida na tabela V.XXII. As curvas da figura V.27 também tendem para a origem, resultando uma dispersão estática muito pequena.

Tabela V.XXII - Relação entre a Variância e o Comprimento do Tubo ($d_i = 0,25\text{mm}$); Sistema de Baixa Dispersão (σ). Resultados Obtidos por Extrapolação da Curva $\sigma^2 \times F$ à Vazão Nula (Fig. V.24).

| | | | | | | |
|---------------------------------------|------|-----|-----|------|------|------|
| Comprimento Tubo L (mm) | 100 | 400 | 600 | 1000 | 1275 | 1375 |
| Variância: σ^2 ($\mu\ell^2$) | < 5 | 70 | 140 | 200 | 260 | 290 |
| Dispersão: σ ($\mu\ell$) | <2,2 | 8,4 | 12 | 14 | 16 | 17 |

A dispersão estática é, portanto, função das dimensões dos tubos empregados.

Os dados experimentais obtidos podem ainda ser manipulados para fornecer uma relação entre a variância e o comprimento dos tubos para as diversas vazões empregadas. A figura V.28 ilustra os resultados obtidos, levando a uma relação entre a variância e a vazão empregada, a comprimento nulo do tubo, que é resumida na tabela V.XXIII. Este estudo também foi feito no sistema de baixa dispersão, empregando tubos para conexões

com diâmetro interno de 0,25mm. Observa-se que, para vazões in

Tabela V.XXIII - Relação entre Variância e Vazão. Sistema de Baixa Dispersão. Resultados Obtidos por Extrapolação da Curva $\sigma^2 \times L$ a Comprimento Nulo do Tubo ($d_i = 0,25\text{mm}$) (Fig. V.28)

| | | | | | |
|---------------------------------------|---------|-----|-----|------|--------|
| Vazão: F (ml/min) | (0,1) * | 0,2 | 0,5 | 0,8 | (1,0)* |
| Variância: σ^2 ($\mu\ell^2$) | (< 8) | 22 | 70 | 128 | (~200) |
| Dispersão: σ ($\mu\ell$) | (<2,8) | 4,7 | 8,4 | 11,3 | (14) |

(*) Dados entre parênteses são estimativos

feriores a 1,0ml/min os pontos da curva $\sigma^2 \times L$ da figura V.28 são lineares; porém, à medida que a vazão aumenta os pontos no gráfico mostram-se cada vez mais dispersos, razão por que não foram conseguidos dados acima de 0,8ml/min, além do nosso maior interesse por vazões reduzidas. No entanto, seguindo a tendência apresentada na figura V.28, pode-se inferir que a variância, para comprimento nulo do tubo, à vazão de 1,0ml/min, deve situar-se em torno de $200\mu\ell^2$. Como era de se esperar, trata-se de um valor inferior ao encontrado no sistema convencional ($300\mu\ell^2$) nas mesmas condições. A variação de σ^2 com L mostra-se similar para as diferentes vazões empregadas, ou seja, as retas têm praticamente o mesmo coeficiente angular. Observa-se, através da fig. V.28, que, quando se quadruplica o comprimento do tubo, de 100 para 400mm, ocorre um incremento de cer-

ca de 70-80 unidades no valor de σ^2 , independentemente da vazão ou mesmo do sistema empregado. No entanto, este aumento tem uma importância relativa muito diferente para cada caso estudado. Por exemplo: para o sistema convencional corresponde a cerca de 20% de aumento em σ^2 , enquanto que para o sistema de baixa dispersão significa quase 30%, à mesma vazão. Considerando a menor vazão testada corresponde a cerca de 150%. Como na Micro-HPLC as vazões são da ordem de 30-60 $\mu\text{l}/\text{min}$, o máximo cuidado deve ser tomado e não só o comprimento do tubo deve ser minimizado, mas também o seu diâmetro, que é um fator ainda mais crítico que o comprimento.

Nossos estudos levaram-nos à conclusão de que a variância do sistema Micro-HPLC empregado é inferior a 5 μl^2 correspondendo a uma dispersão da ordem de 2 μl , se forem empregados tubos de 100 x 0,25mm. Utilizando tubos de 0,11mm de diâmetro interno este valor cai um pouco mais, tornando-se mínimo com uma conexão de 50 x 0,11mm.

Resumindo, nosso sistema convencional apresentou uma variância de 300 μl^2 ($\sigma \cong 17\mu\text{l}$) para o conjunto detector/injetor, cerca de 10% da contribuição da coluna, enquanto que a dispersão para tubos e conexões pode ser tão pequena quanto 2 μl , se todas as precauções forem tomadas.

Estes resultados são considerados muito bons. Segundo a literatura /65/ a dispersão instrumental ($\sigma_{\text{instr.}}$) deve ser igual ou menor que 1/3 (um terço) da dispersão da coluna cromatográfica, para que a perda máxima em N, devido às contribuições do detector e injetor ao espalhamento da banda, seja de 10%. Por outro lado, a contribuição de tubos e conexões

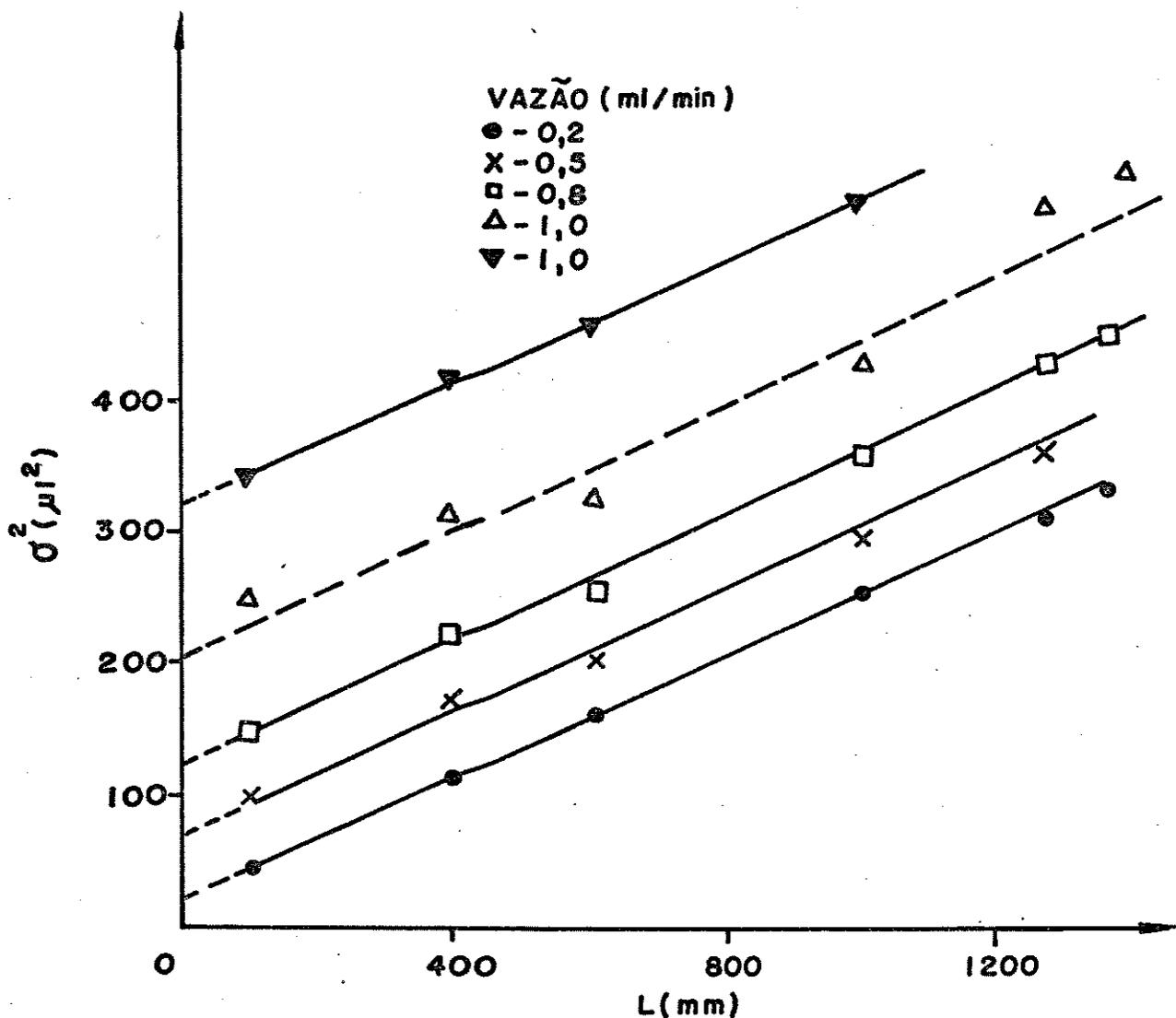


Figura V.28 - Relação entre a Variância, σ^2 , e o Comprimento do Tubo (L) para Algumas das Vazões Testadas. Sistema de Baixa Dispersão, Sem Coluna. Diâmetro Interno dos Tubos: 0,25mm. A Curva "▽", do Sistema Convencional, foi Plotada para Comparação.

pode gerar uma dispersão de 30 a 60 μ l no sistema convencional e cerca de 1 μ l para o sistema Micro-HPLC.

Devemos ressaltar que o diâmetro do tubo mostrou ser um parâmetro muito mais crítico que seu comprimento. Observamos que para se duplicar a variância de um sistema com conexão de 100 x 0,25mm, seu comprimento deve ser aumentado em 100 vezes, enquanto que seu diâmetro basta ser duplicado. Além disto, se for empregada uma conexão de 0,5mm de diâmetro interno, qualquer aumento em seu comprimento corresponderá a um aumento proporcional na variância. Outro ponto que deve ser enfatizado é que, para vazões reduzidas, as dimensões dos tubos de conexão devem ser minimizadas.

Além da redução no volume da cela do detector, deve-se, sempre que possível, empregar pequeno volume de amostra, observando sempre um compromisso entre a quantidade de amostra e a sensibilidade desejada.

3. MICROCOLUMNAS

a) Primeiras Tentativas

Inicialmente foi montada uma coluna vazia de 250 x 1,8mm com terminais Valco de volume morto nulo. Calculou-se o volume da coluna ($V=\pi r^2 h$), encontrando-se o valor de 0,64ml. Para garantir um excesso, foi empregado cerca de 800mg do material de empacotamento, Spherisorb S5-ODS, com partículas de 5 μ m, já usado anteriormente.

Em função da reduzida quantidade do material de empacotamento, tentou-se o emprego de um reservatório menor, com um volume de 6ml e com uma entrada lateral para o solvente propulsor independente do local de introdução da suspensão. Este tipo de reservatório permite o empacotamento no sentido descendente, sem necessitar a sua inversão no início do processo, além de ser mais rapidamente fechado.

A suspensão foi preparada com 6ml de metanol (800mg/6ml), agitada com ultra-som por 3 min e rapidamente transferida ao reservatório. A bomba, pré-pressurizada a 4000 psi (28MPa), foi logo ligada, dando início ao empacotamento.

A vazão mostrou-se demasiado lenta, tornando necessário um tempo maior de empacotamento -cerca de 20 min - para a passagem de apenas 5ml de metanol.

A coluna assim preparada foi identificada com a letra A.

Para o empacotamento da coluna B foi empregada a mesma técnica; porém fez-se a prévia separação de "finos e grossos". Partiu-se de 1g do material de empacotamento que

foi proveniente do mesmo lote usado na coluna A.

Após a pressurização da bomba, fez-se um teste da vazão do solvente propulsor, usando a coluna vazia com filtro, quando se obteve um valor de 126ml/min. No entanto, durante o empacotamento, conseguiu-se apenas uma ligeira melhora em relação à coluna A. A vazão final ficou em torno de 0,5ml/min.

A avaliação destas colunas foi tentada no sistema convencional, já que ainda não havíamos recebido a bomba tipo seringa, e a lâmpada de deutério do detector com microcela havia queimado. Aguardávamos as importações...

Os desastrosos resultados obtidos na avaliação das colunas A e B podem ser observados na tabela V.XXIV, juntamente com os resultados das colunas C e D, cujo procedimento de empacotamento foi ligeiramente diferente. Na expectativa de aumentar a velocidade do fluxo do solvente propulsor, empregaram-se pressões de 6000psi, além de se ter voltado ao antigo reservatório de 25ml, proporcionando a obtenção de suspensões mais diluídas (900mg/25ml de metanol). Os demais parâmetros foram mantidos, com a exceção da passagem de fase móvel para a coluna D, prática não realizada com as colunas A, B e C.

Conseguiu-se um pequeno aumento na vazão do solvente propulsor, alcançando cerca de 1ml/min no final do empacotamento.

Para facilitar a comparação dos resultados, a tabela V.XXIV ressalta alguns detalhes de interesse empregados no empacotamento. Nota-se que os resultados deixam a desejar, apesar de melhores resolução e simetria dos picos

Tabela V.XXIV - Resultados Obtidos na Avaliação das Colunas A, B, C e D associados às Condições de Empacotamento. Coluna de 250 x 1,8mm de Spherisorb S5-ODS, 5 μ m; Avaliação feita no Sistema Convencional: Vazão: 0,1ml/min; Volume de Injeção: 1 μ l (alça externa); Detecção a 254nm: Cella de 8 μ l

| Coluna | Condições Empregadas no Empacotamento | | | | | Resultados da Avaliação | | |
|--------|---------------------------------------|-----------------|---------------------------|-------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------|-------------------|
| | Pressão (psi) | Finos e Grossos | Conc. da Susp. (mg/ml) | Vazão Final (ml/min) | Vol. de Fase Móvel (ml) | N/m (m ⁻¹) | H (μ m) | Pressão (psi) |
| A | 4000 (28MPa) | - | 134 | 0,3 | 0 | 4960 | 200 | 800 (5,6MPa) |
| B | 4000 (28MPa) | Separados | 167 | 0,5 | 0 | 6680 | 150 | 800 (5,6MPa) |
| C | 6000 (42MPa) | Separados | 36 | 0,7 | 0 | 6300 | 160 | 1600 (11,2MPa) |
| D | 6000 (42MPa) | Separados | 36 | 1,0 | 20ml | 8050 | 120 | 2000 (14MPa) |

observadas para a coluna D ($A_s = 1,16$), pois as três colunas anteriores mostraram picos bastante distorcidos.

Os resultados obtidos com as quatro colunas descritas vêm corroborar nossa concepção de que, embora adequado ao uso com colunas convencionais analíticas (250 x 4,6mm), o equipamento não se presta aos trabalhos com colunas de diâme-

tro reduzido. Além do mais, pareceu-nos que a tecnologia de em pacotamento também necessitava de uma otimização. No entanto, preferiu-se não arriscar quaisquer conclusões quanto aos parâmetros variados nestes primeiros testes, com exceção da eficácia da passagem da fase móvel no próprio sistema de empacotamento que, mais uma vez, forneceu melhores resultados.

b) Montagem do Sistema "Micro-HPLC"

Recebido o equipamento que faltava, nossa prática na época permitiu que o novo sistema fosse logo montado, ficando constituído dos seguintes módulos:

- Bomba ISCO, modelo Micro LC-500, com capacidade de 50ml, vazão de 0,02 a 600 μ l/min, precisão de 0,1%, pressão máxima de 10000psi (70MPa), com repetibilidade de 1% e volume morto de 0,76ml, acoplada a um reservatório de fase móvel com capacidade de 5l com um filtro de porosidade de 0,2 μ m.

- Válvula micro-injetora Rheodyne, modelo 7413, com alça interna de 1 μ l.

- Detector espectrofotométrico UV-V, LDC, Milton Roy, com cela de 1 μ l, operado a 254nm e constante de tempo mínima de 0,05s.

- Registrador potenciométrico, ECB, modelo 110-A, com entrada de 10mV e velocidade do papel variável.

A coluna foi acoplada diretamente ao detector através de uma conexão com volume morto nulo. A ligação ao injetor foi feita com um tubo de 50 x 0,11mm com terminais Rheodyne para o injetor e um adaptador de Kel-F para a coluna, ambos proporcionando conexões sem volume morto.

Os primeiros testes realizados com o novo sistema foram para a coluna B da etapa anterior, quase um ano após seu empacotamento. Observou-se um aumento de cerca de 30% no valor do número de pratos teóricos obtido na primeira avaliação, além de uma melhora na simetria dos picos, para testes realizados à mesma vazão (100 μ l/min).

c) O Emprego de Partículas de 10 μ m de Diâmetro

Como a questão da vazão reduzida durante o empacotamento persistiu nas últimas tentativas, apesar do aumento da pressão, da mudança do reservatório da suspensão e da separação de "finos e grossos", decidiu-se pela substituição do material de empacotamento, de 5 μ m, por outro similar, porém com partículas com maior diâmetro.

Empregou-se LiChrosorb RP-18 com partículas de 10 μ m, recuperado, para as três primeiras colunas, identificadas pelas letras E, F e G. Tanto a técnica de empacotamento quanto o reservatório da suspensão foram mantidos iguais aos das colunas C e D. A dimensão das colunas e também seus terminais foram variados de acordo com nossa disponibilidade.

A tabela V.XXV fornece os detalhes empregados na preparação das três colunas citadas, e a tabela V.XXVI apresenta os melhores resultados obtidos através da avaliação destas colunas.

A figura V.29 dá uma visão melhor dos resultados conseguidos por eluição a diferentes vazões, permitindo uma comparação global entre as colunas E, F e G através das curvas H versus u, Observa-se uma dispersão maior dos pontos

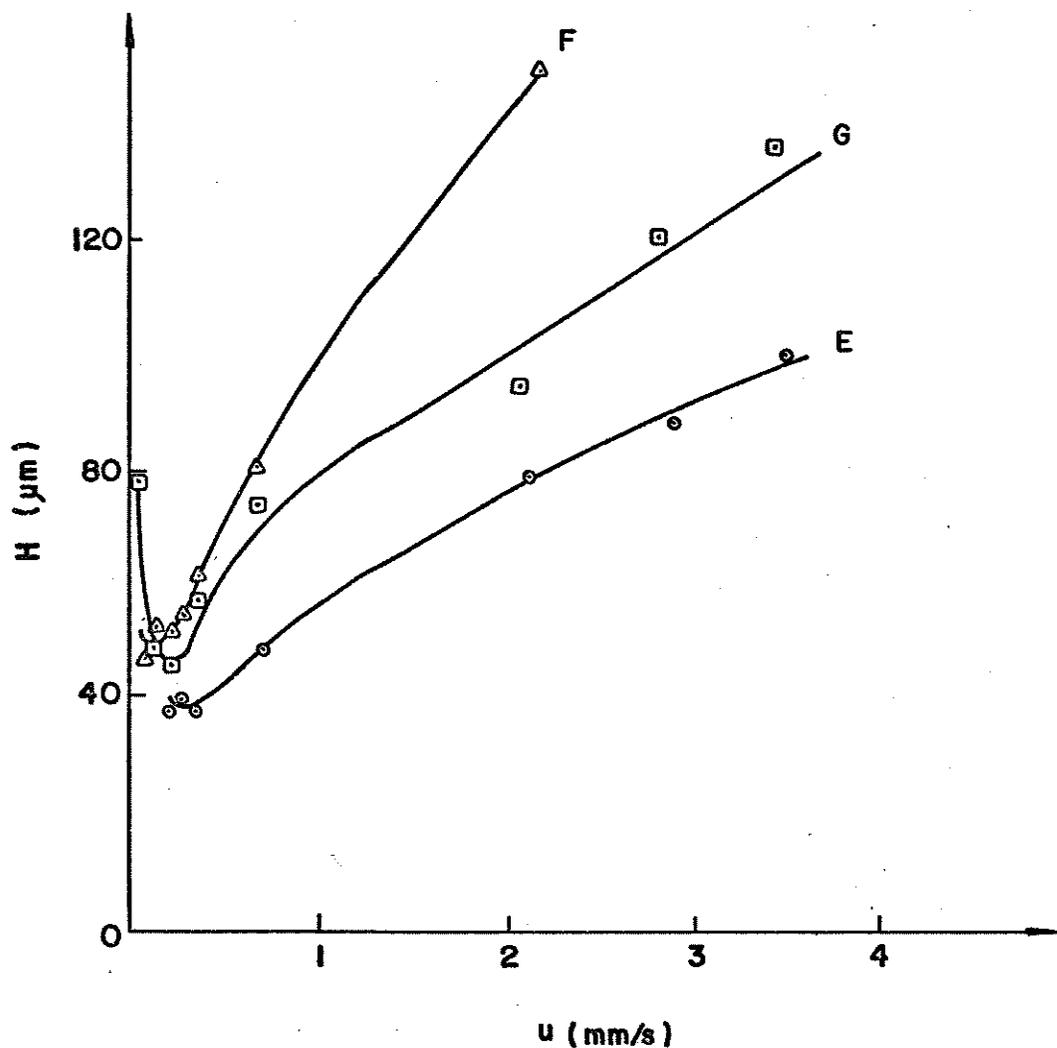


Figura V.29 - Dependência da Altura de Prato (H) com a Velocidade Linear (u); Colunas E, F e G: LiChrosorb RP-18, $10\mu\text{m}$. Testes Feitos no "Micro-HPLC"

Tabela V.XXV - Condições Empregadas no Empacotamento das Colunas E, F e G. Parâmetros Comuns às Três Colunas: Material de Empacotamento LiChrosorb RP-18, 10 μ m (Recuperado); Separados "Finos e Grossos"; Tempo de Agitação com Ultra-Som - 3min; Passagem da Fase Móvel - 5min.

| Coluna | Dimensões (mm) e Terminais | Composição da Susp. (mg/mL) Solvente | Volume (mL) e Sentido do Solv. Propulsor | Pressão de Empacotamento (psi) | Vazão Final (mL/min) | Tempo de Empacotamento (min) |
|--------|----------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------------|----------------------|------------------------------|
| E | 250x1,8 Valco | 44 MeOH | 27 \uparrow asc. 23 \downarrow desc. | 6000 (42MPa) | 2,5 | 15 |
| F | 252x1,8 Swagelock | 40 MeOH | 28 \uparrow asc. 17 \downarrow desc. | 6000 (42MPa) | 3,0 | 12 |
| G | 221x1,9 Swagelock | 48 MeOH | 22 \uparrow asc. 20 \downarrow desc. | 8000 (56MPa) | 4,0 | 10 |

na curva correspondente à coluna G, cujo empacotamento foi feito com pressão mais alta, de 8000 psi (56MPa). Embora a coluna E tenha fornecido maior eficiência, seus picos mostraram-se mais assimétricos ($A_s \sim 1,3$).

Como na realidade estes foram os primeiros resultados obtidos com o novo sistema, preferiu-se não arriscar conclusões precipitadas, além da indicação de que 8000 psi (56MPa) foi uma pressão demasiado alta para o empacotamento das partículas com diâmetro de 10 μ m. No entanto, constatou-se que a velocidade de fluxo do solvente propulsor melhorou bastante

Tabela V.XXVI - Resultados Experimentais Obtidos na Avaliação das Colunas E, F e G, à Vazão Ótima. Testes Realizados no Sistema Micro-HPLC. (Em Relação ao Naftaleno).

| Coluna | F ($\mu\text{l}/\text{min}$) | P (psi) | $u_{\text{ót.}}$ (mm/s) | N/col (máx) - | N/m (máx) (m^{-1}) | $H_{\text{mín}}$ (μm) | As - |
|--------|-----------------------------------|------------|----------------------------|---------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------|
| E | 30 | 0 | 0,21 | 6430 | 25700 | 38,9 | 1,30 |
| F | 10 | 0 | 0,07 | 5290 | 21000 | 47,6 | 1,07 |
| G | 30 | 0 | 0,21 | 4760 | 21550 | 46,4 | 1,10 |

em relação aos primeiros testes com partículas de $5\mu\text{m}$.

d) O Emprego de Material de Empacotamento Novo e os Testes com Diferentes Solventes

Partiu-se, então, para uma nova série de colunas, mantendo o uso das partículas de $10\mu\text{m}$, que nos pareceu promissor, uma vez que os resultados não ficaram muito aquém daqueles obtidos com material similar para as colunas convencionais

Seis novas colunas foram preparadas com LiChrosorb RP-18, $10\mu\text{m}$ (E. Merck), novo. A pressão foi variada em função das características da suspensão. Para suspensões mais viscosas, usou-se uma pressão maior, enquanto que para outras de maior fluidez, manteve-se a pressão em 4000 psi (28MPa).

O parâmetro variado nestes testes foi a constituição do solvente da suspensão e da propulsão.

Nos casos em que foram empregadas misturas de solventes, a proporção entre eles foi estabelecida por ensaio e erro, visando obter uma mistura cuja densidade fosse a mais similar possível da densidade do material de empacotamento empregado.

A tabela V.XXVII resume os parâmetros empregados durante o empacotamento das seis colunas, identificadas pelas letras do alfabeto H a N, bem como a composição da mistura das suspensões.

Deve-se salientar que o mesmo material de empacotamento foi empregado para todas as colunas desta etapa. Inicialmente a massa pesada foi em torno de 1g; porém como o material apresentou-se homogêneo e livre de aglomerados ou impurezas, não se fez mister a separação de "finos e grossos" e a massa foi reduzida, passando a cerca de 0,7g para as demais colunas. Em média, a massa recuperada do desempacotamento das colunas foi cerca de 0,5-0,6g.

O volume da suspensão foi igual ao do reservatório, 25ml. As suspensões foram agitadas no ultra-som por 3min, com exceção daquelas das colunas M e N, cujo aspecto mostrou-se coloidal, homogêneo e estável.

A suspensão da coluna L preparada com acetona e 1,1, 2, 2 tetrabromoetano, 1:10 (v/v), sofreu um grande aumento na temperatura durante a agitação com ultra-som, tendo atingido cerca de 60°C (normalmente é observado um ligeiro aquecimento, não ultrapassando os 40°C). Outras anomalias foram ob

Tabela V.XXVII - Resumo dos Parâmetros Empregados no Empacotamento das Colunas H a N. Material de Empacotamento: LiChrosorb RP-18 10 μ m-Novo (E.Merck)

| Coluna | Dimensões (mm) e Terminais | Composição do Solvente da Susp. (Proporção) | Volume (ml) e Sentido do Solvente Propulsor * | Pressão do Empacotamento (psi) | Vazão Final (ml/min) | Tempo de Empacotamento (min) |
|--------|----------------------------|---|---|--------------------------------|----------------------|------------------------------|
| H | 170x1,9 Valco | Metanol Puro | 27 \uparrow Metanol 12 \downarrow Metanol | 4000 (28MPa) | 3 | 10 |
| I | 250x1,8 Valco | n-Heptano/ Isopropanol (1:1) | 29 \uparrow n-Heptano 27 \downarrow n-Heptano 20 \downarrow Isopropanol 20 \downarrow MeOH | 6000 (42MPa) | 4 | 30 |
| J | 252x1,8 Swagelock | Isopropanol Puro | 25 \uparrow Isopropanol 7 \downarrow Isopropanol 20 \downarrow MeOH | 6000 (42MPa) | 1 | 23 |
| L | 250x1,8 Valco | Acetona/ Tetrabromoetano (1:10) | 11 \uparrow Metanol 20 \downarrow Metanol | 4000 (28MPa) | 1,2 | 23 |
| M | 170x1,9 Valco | Metanol/ Iodeto de Metila (3:7) | 35 \uparrow Metanol 35 \downarrow Metanol | 4000 (28MPa) | 4 | 16 |
| N | 252x1,8 Swagelock | Acetona/ Iodeto de Metila (1:1) | 30 \uparrow Metanol 15 \downarrow Metanol | 4000 (28MPa) | 2 | 16 |

*

As setas acima indicam o sentido do empacotamento: \uparrow Ascendente
 \downarrow Descendente

servadas com a coluna L. Por exemplo, o empacotamento foi mais lento que o das demais colunas e o material do desempacotamento mostrou-se amarelado e com aspecto estranho, não secou quando exposto ao ar, como ocorreu normalmente com o material retirado das demais colunas. Porém, aparentemente, estes detalhes não alteraram o comportamento da coluna propriamente dita.

O tempo de empacotamento de cada coluna variou em função da vazão e da complexidade do solvente da suspensão. Quando se empregaram solventes diferentes da fase móvel, procedeu-se a uma exaustiva lavagem da coluna, variando gradativamente a polaridade dos solventes até à da fase móvel. A seguir, sem desligar a bomba, fez-se o intercâmbio do solvente para a fase móvel que percolou, por pelo menos 5 minutos, após o que desligou-se a bomba e esperam-se mais 5 minutos para a desconexão das partes.

Após a adaptação dos terminais adequados, com os respectivos filtros, as colunas foram acopladas ao sistema de "Micro-HPLC", previamente descrito, e exaustivamente avaliadas. Tentou-se o emprego de vazões inferiores a $10\mu\text{l}/\text{min}$; no entanto, nosso equipamento sofria interferências da rede elétrica do laboratório e não se conseguiu uma linha de base estável. Além disso, estes testes eram extremamente demorados, chegando a 6 horas para uma eluição (testes a $30\mu\text{l}/\text{min}$ gastavam cerca de 90 minutos).

A tabela V.XVIII apresenta os resultados obtidos na avaliação das 6 colunas nas diferentes vazões empregadas. Os valores da pressão e da velocidade linear listados são os valores médios obtidos com as 6 colunas.

Tabela V.XXVIII - Resultados Obtidos na Avaliação das Colunas H a N, nas Diferentes Vazões (F) Empregadas. Testes Feitos no Sistema "Micro-HPLC"; Volume Injetado 1µl; Detecção a 254nm. Cálculos do Nº de Pratos em Relação ao Naftaleno. Os Valores Listados para a Pressão (P) e a Velocidade Linear (u) são os Resultados Médios Obtidos com as 6 Colunas.

| Coluna | | H | | I | | J | | L | | M | | N | |
|----------|------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| F | P | N/m | H |
| (µl/min) | atm (psi) | (m ⁻¹) | (µm) |
| 10 | 0 | 17820 | 56,1 | 21640 | 46,2 | 22610 | 44,2 | 28190 | 35,4 | 27350 | 36,6 | 33000 | 30,3 |
| 20 | 0 | 26900 | 37,2 | 29590 | 33,8 | 30520 | 32,8 | 35570 | 28,1 | 27200 | 36,8 | 36900 | 27,1 |
| 30 | 0 | 27550 | 36,3 | 36780 | *27,2 | 33990 | *29,4 | 39700 | *25,2 | 32500 | *30,8 | 40330 | 24,8 |
| 50 | 0 | 39690 | *32,6 | 33530 | 29,8 | 31420 | 31,8 | 33200 | 30,1 | 30100 | 33,2 | 42800 | *23,4 |
| 100 | 60 (0,4MPa) | 24980 | 40,0 | 30590 | 32,7 | 24860 | 40,2 | 29850 | 33,5 | 26920 | 37,2 | 39950 | 25,0 |
| 300 | 600 (4MPa) | 14030 | 71,3 | 15500 | 64,5 | 15050 | 66,4 | 16100 | 62,1 | 20420 | 49,0 | 20170 | 49,6 |
| 400 | 1000 (7 MPa) | 13740 | 72,8 | 15340 | 65,2 | 12630 | 79,2 | 13260 | 75,2 | 16400 | 61,1 | 15730 | 63,4 |
| 500 | 1100 (8 MPa) | 11460 | 87,3 | 14250 | 70,2 | 12120 | 82,5 | 12790 | 78,2 | 13940 | 71,7 | 13830 | 72,3 |
| 600 | 1400 (10 MPa) | - | - | 12710 | 78,7 | 10680 | 93,6 | 12160 | 82,2 | 12580 | 79,5 | 13000 | 77,0 |

Observou-se excelente repetibilidade nos resultados, principalmente para vazões inferiores a $100\mu\text{l}/\text{min}$. A estimativa do desvio médio da velocidade linear das várias colunas preparadas calculada para a mesma vazão, foi cerca de 2 a 3%. Obteve-se uma estimativa do desvio médio inferior a 5% para os resultados de 3 eluições consecutivas para uma única coluna, nas mesmas condições.

A linha de base dos cromatogramas mostrou excelente estabilidade, mesmo com alta sensibilidade. A pressão de teste mostrou-se constante durante toda a eluição. Notou-se um pequeno aumento na pressão, em testes com a mesma coluna, em diferentes dias. Este aumento ocorria proporcionalmente para todas as vazões, o que mostrava que, após vários testes, a coluna oferecia maior resistência ao fluxo, mas esta variação era bastante reduzida, da ordem de poucos décimos de MPa.

As figuras V.30 a V.35 apresentam a dependência da altura equivalente a um prato teórico, H , com a velocidade linear da fase móvel, u , para as colunas H a N. Uma análise detalhada destas figuras permite colocar as 6 colunas em ordem crescente de sua eficiência, relacionando-as com os solventes usados no empacotamento e uma estimativa do custo do solvente por coluna, conforme pode ser observado na tabela V.XXIX.

Dados da literatura /36/, sugerem que uma variação de $\pm 10\%$ entre os resultados de colunas preparadas com a mesma metodologia é perfeitamente aceitável.

Manipulando os resultados obtidos, listados na tabela V.XXIX, encontra-se um valor médio de 36.100 para a eficiência das 6 colunas. Considerando variação de $\pm 10\%$, tem-

Tabela V.XXIX - Resumo dos Resultados Obtidos com as Colunas H a N, Relacionados ao Custo e Composição da Mistura da Suspensão, em Ordem Crescente de Eficiência, N.

| Coluna | Solvente da Suspensão | | $H_{\text{mín}}$ (μm) | $N_{\text{máx/m}}$ (m^{-1}) |
|--------|--------------------------------|---------------|---------------------------------------|---|
| | Proporção (V/V) | Preço (Dólar) | | |
| H | Metanol (puro) | 0,03 | 32,6 | 30700 |
| M | Metanol/Iodeto de Metila (3:7) | 12,43 | 30,8 | 32500 |
| J | Isopropanol (puro) | 0,09 | 29,4 | 34000 |
| I | n-Heptano/Iso-propanol (1:1) | 0,59+2,50 | 27,8 | 36000 |
| L | Acetona/Tetrabromoetano (1:10) | 9,51 | 25,2 | 39700 |
| N | Acetona/Iodeto de Metila (1:1) | 8,24 | 23,4 | 42800 |

se uma faixa de 32500 a 39700. Isto elimina, praticamente, apenas as colunas H e N. Na verdade, não é este o raciocínio que se pretende fazer, uma vez que se obteve uma reprodutibilidade melhor que 5% para as várias colunas preparadas de forma similar, durante todo o trabalho. Apenas sugere-se que, de uma forma geral, as diferenças obtidas com os vários solventes empregados não foi tão grande.

Constatou-se que dos solventes empregados, a mistura que forneceu melhor resultado foi a de acetona e iodeto de metila (1:1), e não foi só pelo menor valor de $H_{\text{mín}}$:

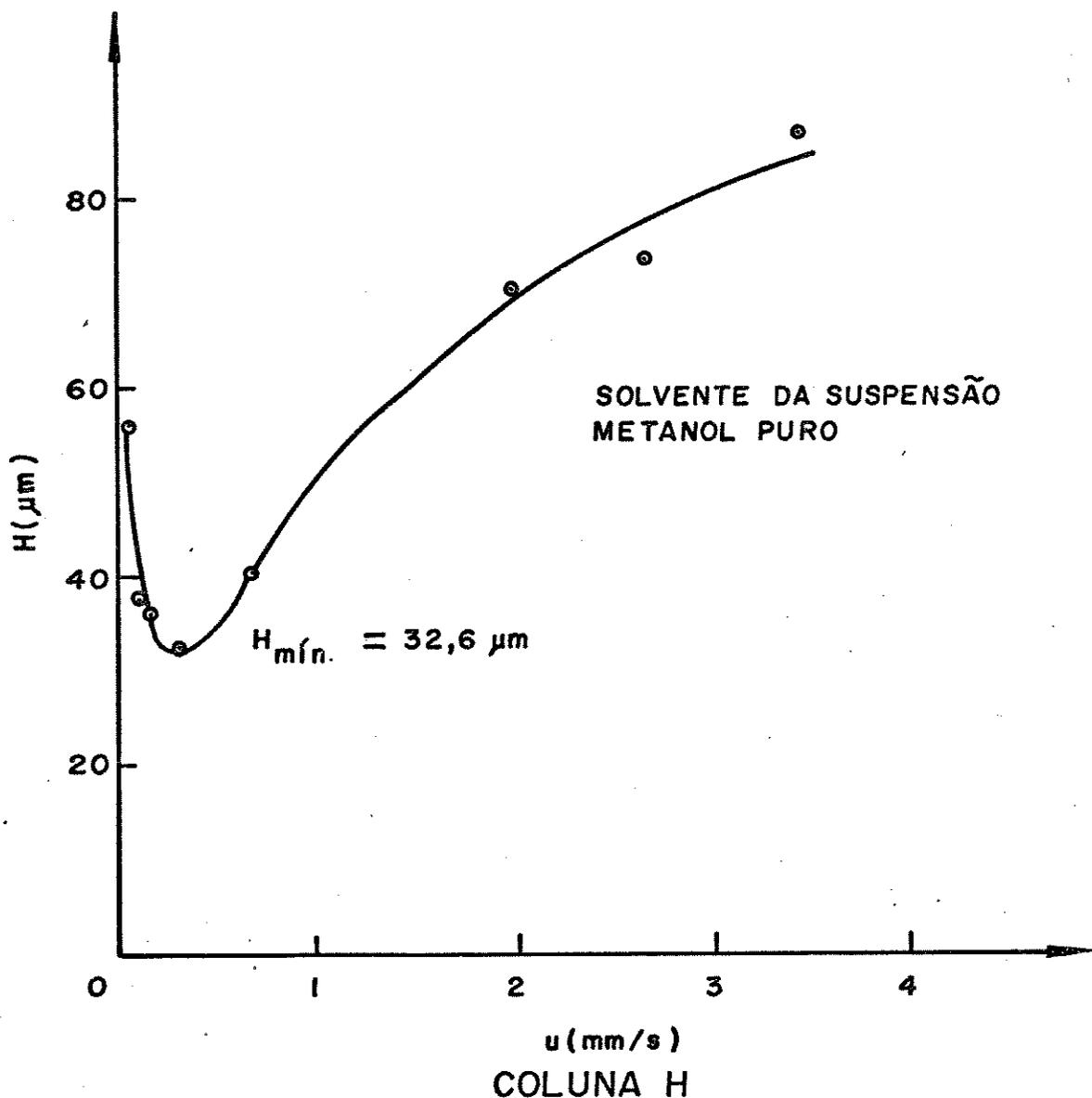


Figura V.30 - Dependência da Altura do Prato (H) com a Velocidade Linear (u); Coluna H : LiChrosorb RP 18,10 μm . Dimensões: 170 x 1,9mm (Valco) Testes Feitos no "Micro-HPLC" Conforme Condições da Tabela V.XXVIII.

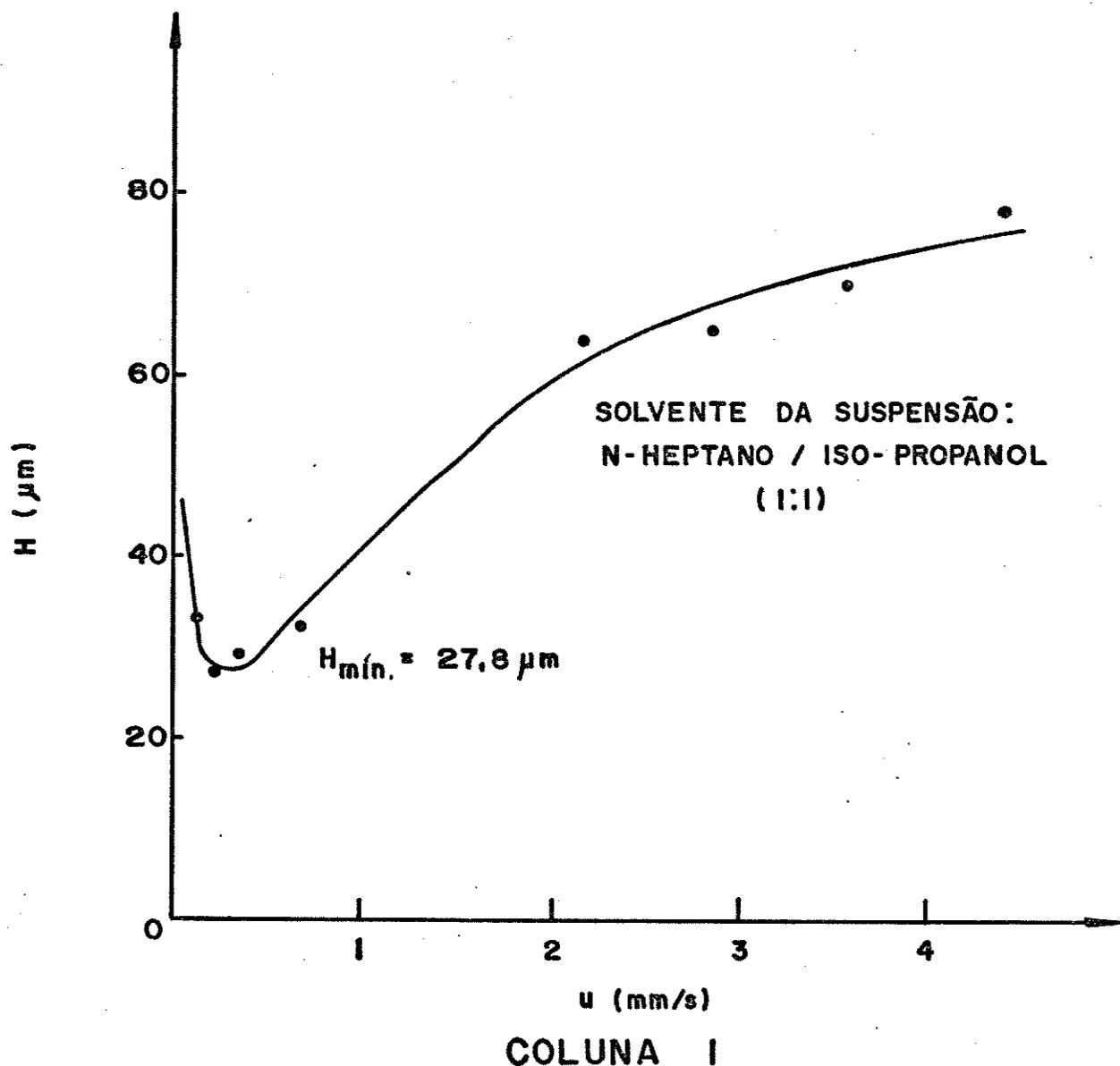


Figura V.31 - Dependência da Altura de Prato (H) com a Velocidade Linear (u). Coluna I : LiChrosorb RP 18,10 μm , Dimensões: 250 x 1,8mm (Valco). Testes no "Micro-HPLC" Conforme Tabela V.XXVIII.

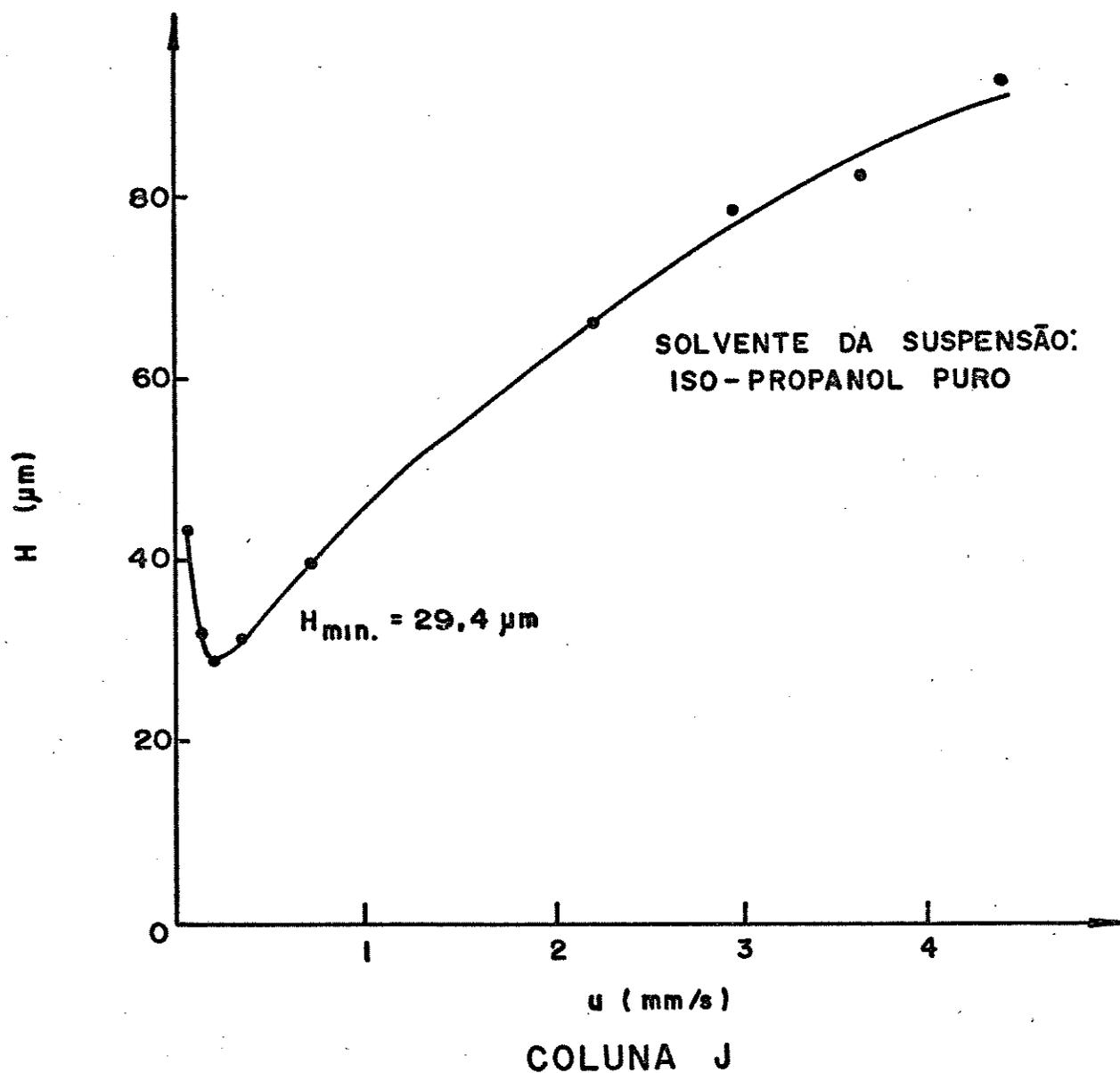


Figura V.32 - Dependência da Altura do Prato (H) com a Velocidade Linear (u); Coluna J: LiChrosorb RP 18,10 μm . Dimensões 252 x 1,8mm (Swagelock) Testes Feitos no Micro-HPLC Conforme Condições da Tabela V.XXVIII.

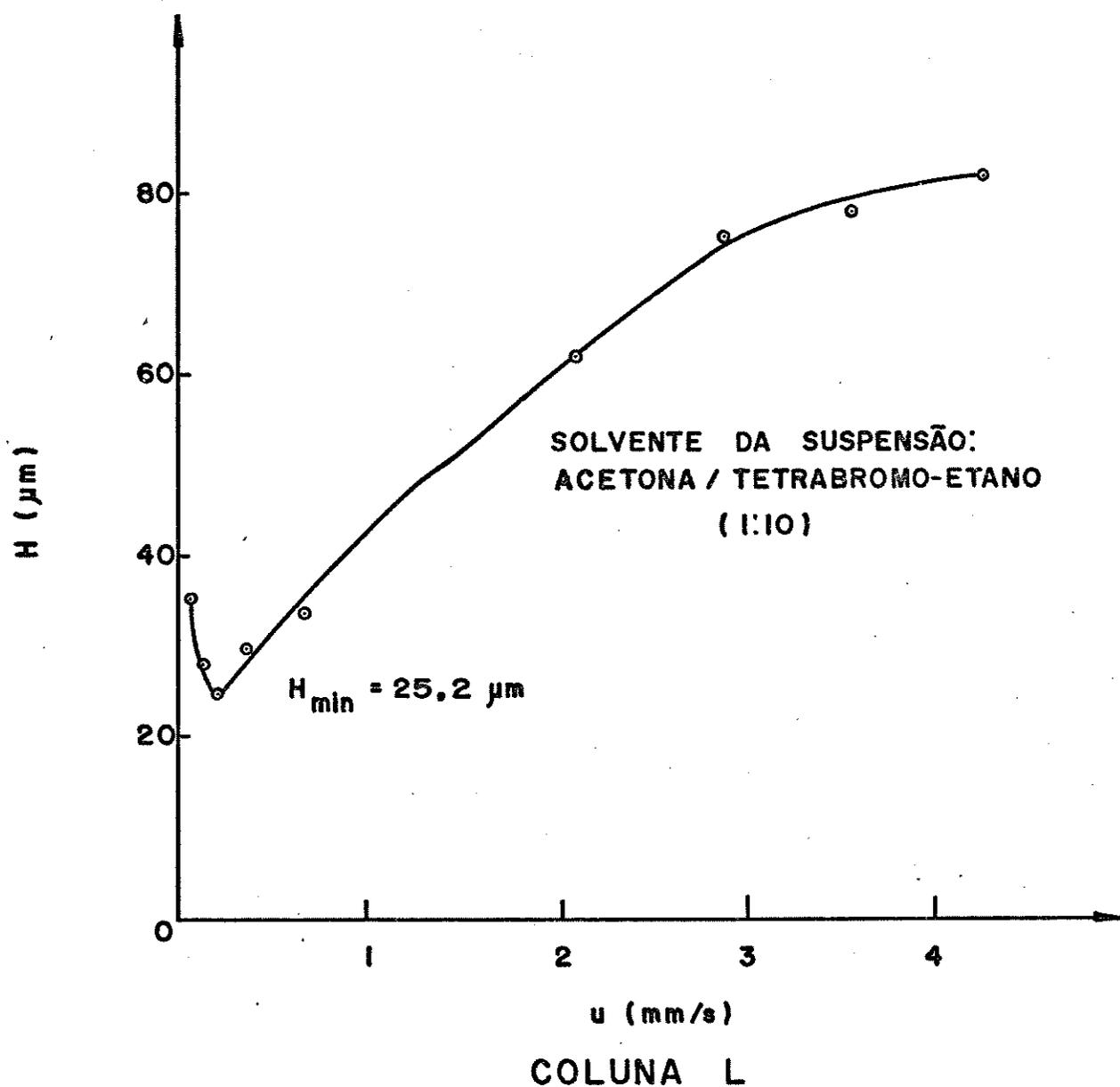


Figura V.33 - Dependência da Altura de Prato (H) com a Velocidade Linear (u); Coluna L: LiChrosorb RP 18,10µm. Dimensões 250 x 1,8mm (Valco) Testes Feitos no "Micro-HPLC". Condições Conforme Tabela V.XXVIII.

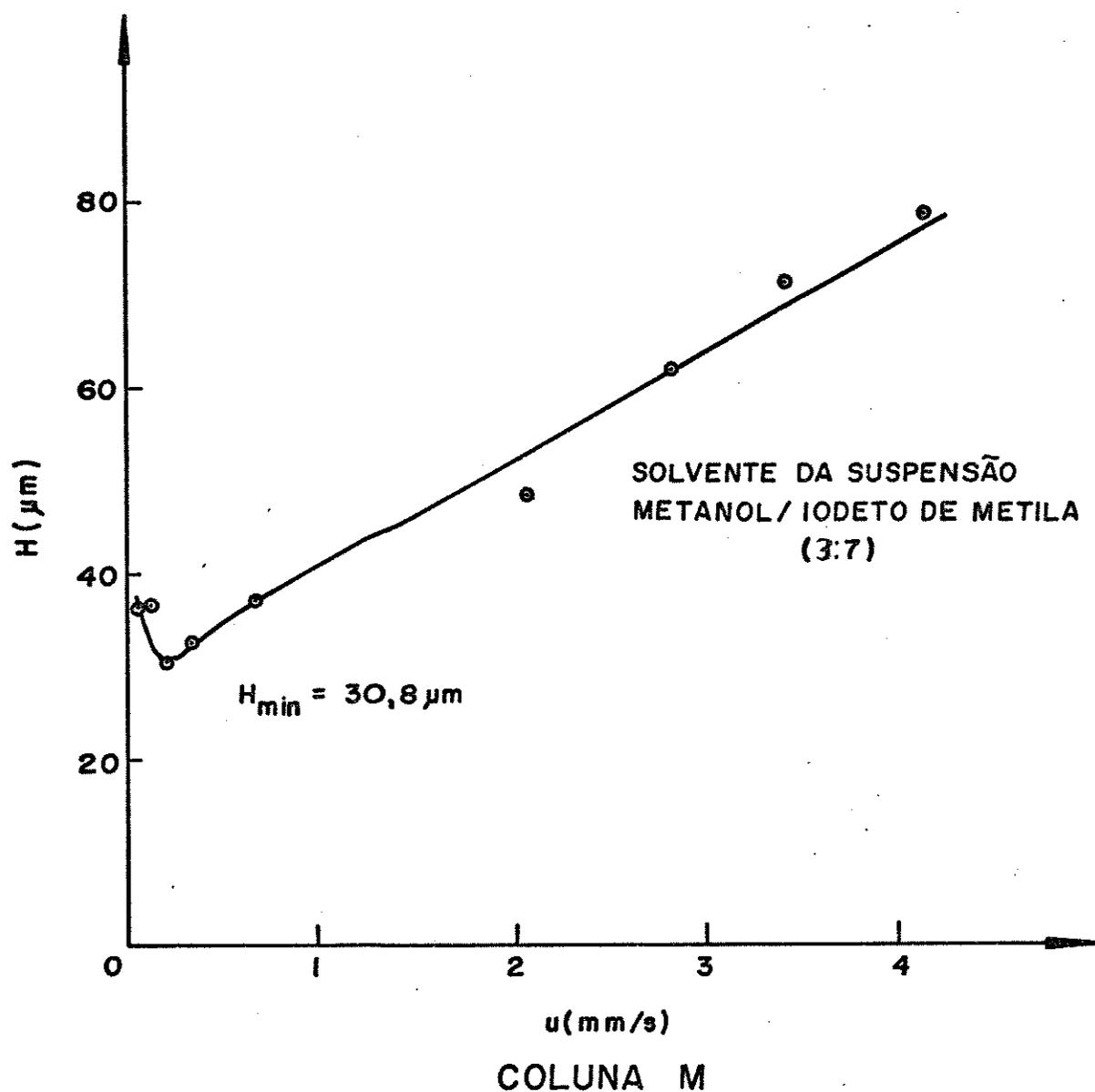


Figura V.34 - Dependência da Altura do Prato (H) com a Velocidade Linear (u); Coluna M : LiChrosorb RP 18,10μm. Dimensões 170 x 1,9mm (Valco) Testes Feitos no "Micro-HPLC" Conforme Condições da Tabela V.XXVIII.

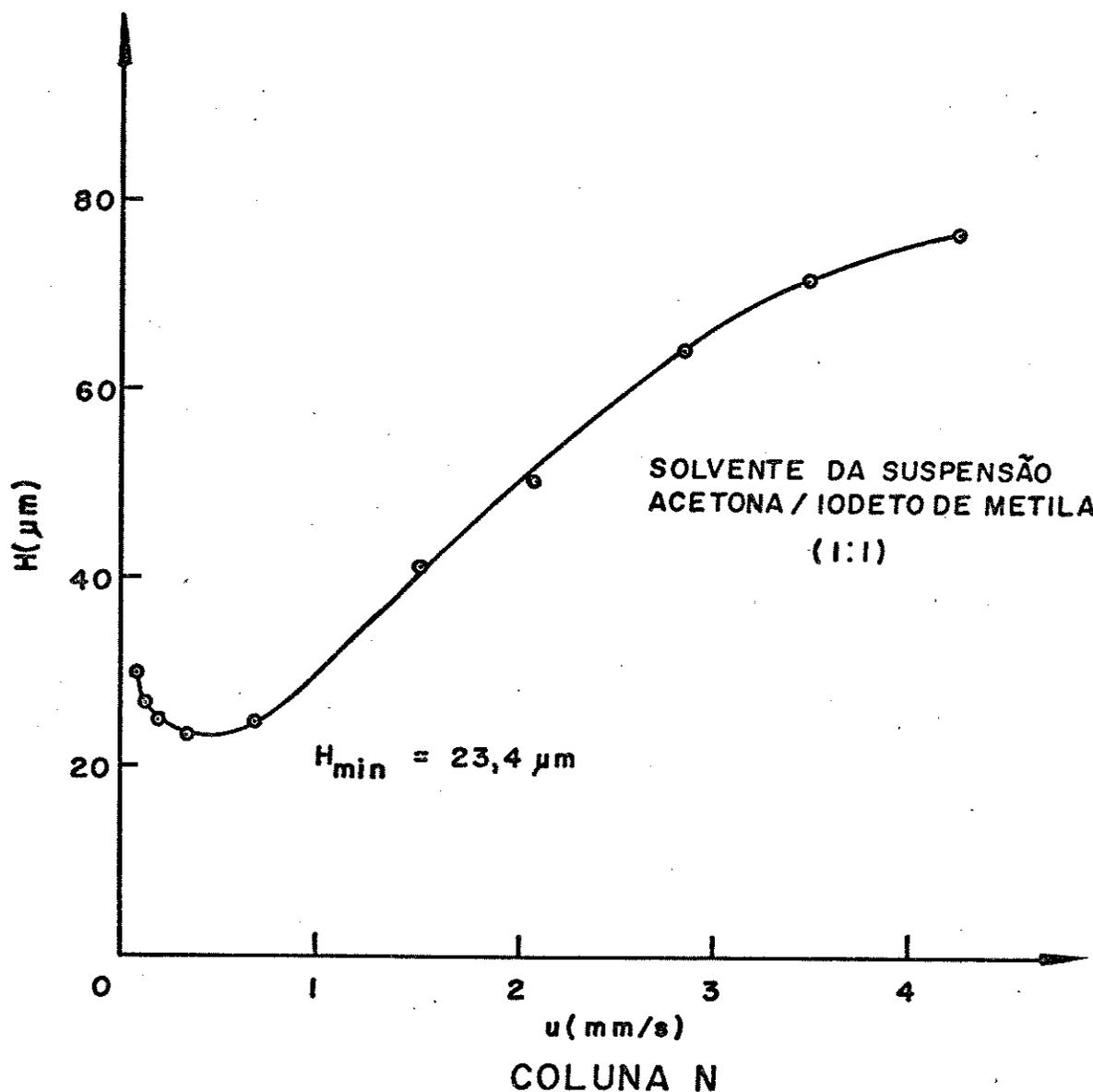


Figura V.35 - Dependência da Altura do Prato (H) com a Velocidade Linear (u); Coluna N: LiChrosorb RP 18,10μm. Dimensões 252 x 1,8mm (Swagelock) Testes Feitos no "Micro-HPLC" Conforme Condições da Tabela V.XXVIII.

Pode-se verificar isto através da curva H versus u da figura V.35. Nota-se uma excelente coerência dos pontos, além de um formato de curva que indica que a coluna pode ser empregada, sem considerável perda de eficiência, em uma larga faixa de vazão (até $140\mu\ell/\text{min}$).

Não se deve esquecer de que estas 6 colunas foram preparadas com partículas irregulares, com diâmetro médio de $10\mu\text{m}$. Para este material, 42800 pratos teóricos por metro já é um número bastante alto, mesmo para colunas convencionais (ver coluna 30) e como se trata de uma coluna de 1,8 mm de diâmetro interno, pode-se considerar o resultado conseguido um sucesso absoluto.

Há apenas um inconveniente nesta metodologia, principalmente com relação aos nossos propósitos. A nível de Brasil, deve-se considerar um compromisso entre a necessidade e a disponibilidade, ou seja, o fator econômico é crítico. Para ilustrar, a tabela V.XXX fornece uma comparação dos preços dos diferentes solventes empregados nesta etapa do trabalho, o que, associado à composição do solvente leva à conclusão de que a coluna N só não apresenta maior custo que as colunas L e M, sendo muito mais cara que as colunas H e J. (ver tabela V.XXIX).

Através da tabela V.XXIX pode-se comparar os preços das misturas empregadas na suspensão de cada coluna. Para a coluna I foi computado um adicional de 2,50 dólares, por considerar relevante, pois o n-heptano foi também um dos solventes propulsores. Nos demais casos, os solventes propulsores foram metanol e iso-propanol ocasionando um consumo adicional máximo da ordem de apenas 0,10 dólares.

Tabela V.XXX - Comparação entre os Preços dos Solventes Empregados no Empacotamento das Colunas H a N.

| Solvente (Grau para Análise) | Preço/l (No Brasil) | |
|---------------------------------|----------------------|--------|
| | Cruzados (Agosto/88) | Dólar |
| Iodeto de Metila | 184.000,00 | 657.00 |
| Tetrabromoetano | 117.000,00 | 418.00 |
| n-Heptano | 12.300,00 | 44,00 |
| Iso-propanol | 938,00 | 3.40 |
| Acetona | 532,00 | 1.90 |
| Metanol | 364,00 | 1.30 |

Quanto à coluna L, preparada com acetona e tetrabromoetano, conforme já se comentou, foram observadas algumas anomalias durante a sua preparação; porém a coluna apresentou um valor de $H_{\text{mín}}$ bastante reduzido, mostrando-se similar à coluna N para velocidades lineares inferiores a 0,2mm/s. No entanto, acima deste valor, a coluna apresentou uma ascensão na curva H versus u, mostrando praticamente uma única velocidade ótima para uso ou uma faixa muito estreita de vazão. Além disto, notou-se uma certa dispersão nos pontos, embora não tão grande quanto aquela observada para a coluna M.

A coluna M, sem dúvida, foi a pior de todas as colunas, além da mais cara. A curva H versus u foi traçada apenas para dar uma noção da possível tendência. A coluna M comparada às colunas H e J, apesar do valor intermediário de $H_{\text{mín}}$ pode ser, de longe, descartada, não só pelo preço, mas também pelas características apresentadas por sua curva.

Quanto à coluna I, empacotada com mistura de iso-propanol e n-heptano, verificou-se um bom valor de $H_{\text{mín}}$, uma ascensão relativamente suave da curva, porém uma razoável dispersão dos pontos, apesar de uma boa tendência. Esta coluna, contudo, apresentou um empacotamento bastante trabalhoso e não muito econômico, se considerarmos que n-heptano foi usado também na maior parte da propulsão, dando um custo total superior a 3 dólares. Pode-se verificar, pela tabela V.XXVII que foi a coluna que gastou maior tempo de preparação, apesar de se ter empregado pressão elevada.

Resta agora comparar as colunas cuja metodologia é a mais econômica, as colunas H e J, preparadas com metanol e iso-propanol, respectivamente. O posicionamento dos pontos nas curvas H versus u apresentou uma tendência similar, para as duas colunas para as maiores vazões testadas. No entanto, para as vazões próximas da ótima, a coluna J, empacotada com iso-propanol puro, apresentou menores valores de altura do prato para as mesmas velocidades lineares que a coluna empacotada com metanol puro, H, embora esta tenha mostrado uma faixa de vazão próxima da ótima ligeiramente maior que a coluna J, isto é, a curva da coluna J apresentou uma inclinação mais acentuada, não permitindo o uso de muitas vazões perto da óti-

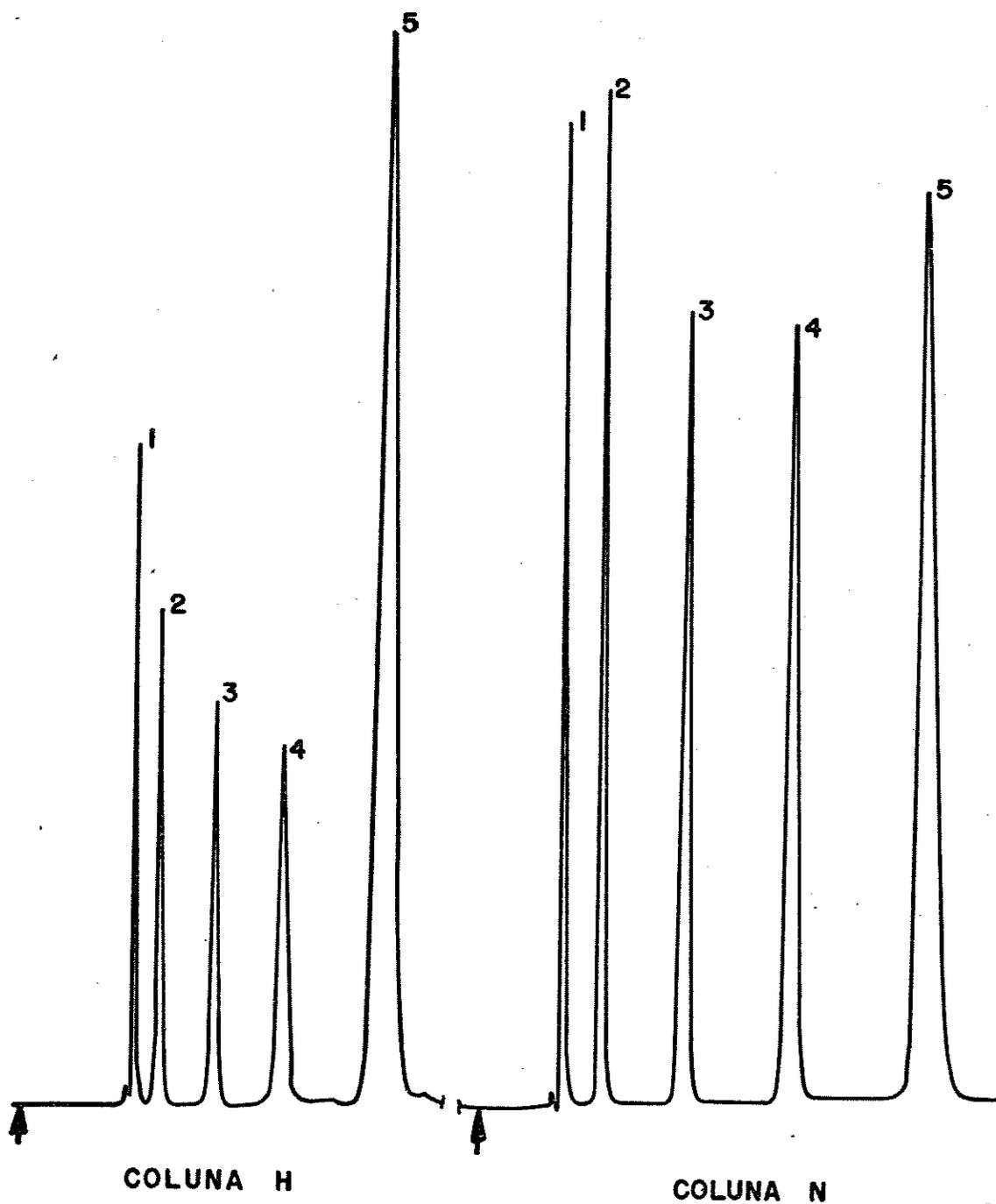


Figura V.36 -Cromatogramas Obtidos com as Colunas H e N -
LiChrosorb RP 18, 10 μ m Sistema "Micro-HPLC" ;
Vazão: 500 μ l/min; Velocidade do Papel=1cm/min;
Detecção a 254nm; Volume de Amostra=1 μ l; Compo
nentes de Amostra:1-Acetona; 2-Benzeno; 3-Ben-
zonitrilo; 4-Tolueno e 5-Naftaleno.

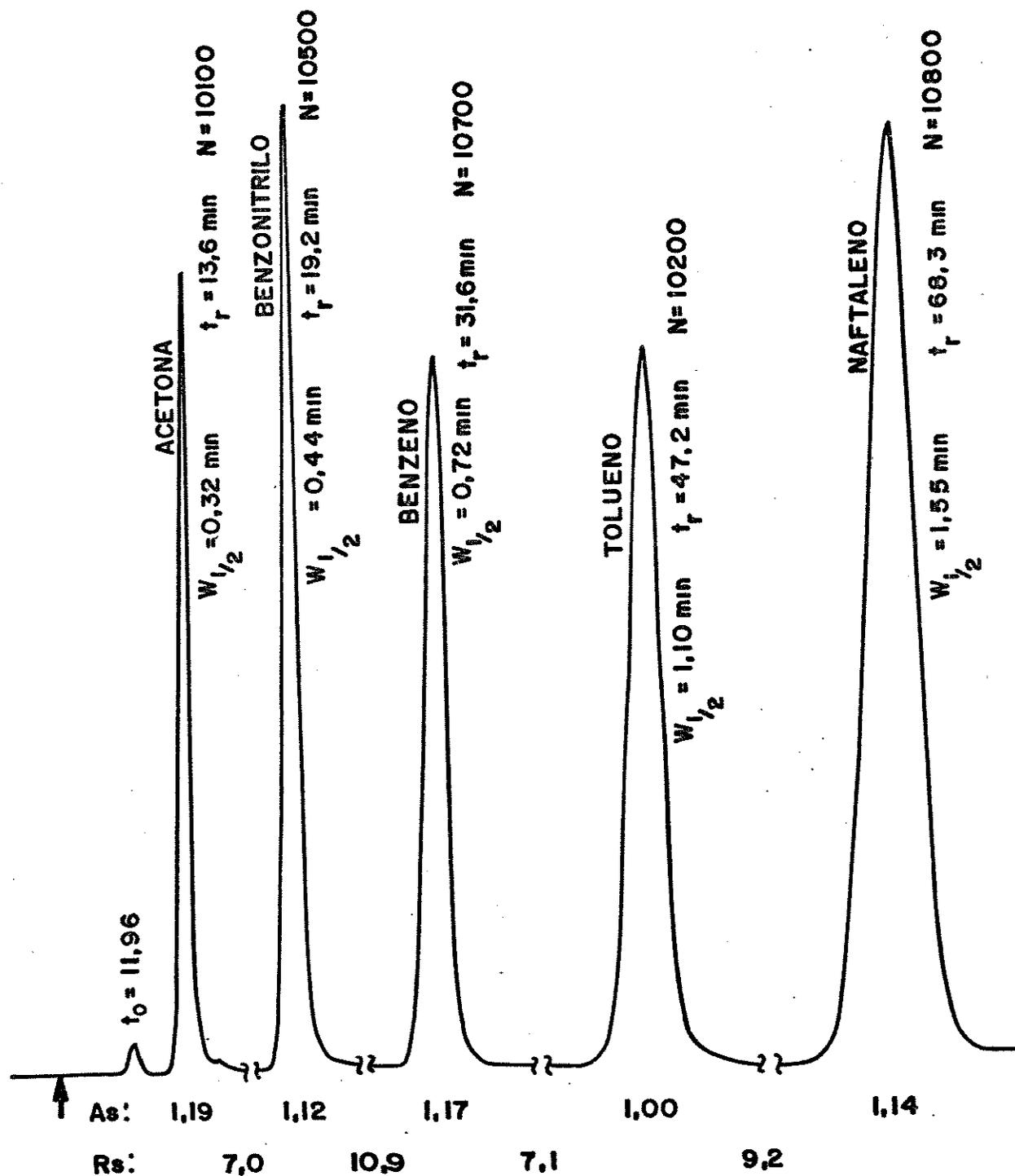


Figura V.37 - Cromatograma Obtido com a Coluna N ã Vazã Oti ma ($50\mu\ell/\text{min}$) no Sistema Micro-HPLC; Velocidade do Papel $0,5\text{cm}/\text{min}$; Detecção a 254nm ; Volume de Amostra: $1\mu\ell$

ma, sem uma razoável perda da eficiência.

Finalmente, pode-se concluir que, se não for necessária uma eficiência muito alta, e se os fatores econômicos forem predominantes, iso-propanol e, até mesmo, metanol podem ser empregados na preparação de colunas para a "Micro-HPLC". O empacotamento com metanol é muito mais rápido, pois este solvente apresenta baixíssima viscosidade, fluindo livremente, além de ser o solvente mais empregado na composição da fase móvel. Tudo isto facilita muito o processo de preparação, permitindo que a coluna fique pronta em menos de 10 minutos.

Por outro lado, se houver necessidade de maior número de pratos teóricos, o "solvente" ideal para a preparação da suspensão deverá ser constituído de uma mistura com 50% de iodeto de metila em acetona.

A figura V.36 apresenta cromatogramas típicos obtidos com as colunas H e N, nas mesmas condições experimentais, para facilitar a comparação entre as 2 colunas. Observa-se a melhor resolução da coluna N em relação à coluna H; no entanto ambas as colunas mostram picos com um bonito formato e com elevada simetria.

A figura V.37 apresenta um cromatograma obtido com a coluna N, à vazão ótima, em sua dimensão normal, onde foi empregada uma razoável velocidade do papel, permitindo a obtenção de bandas mais largas para facilitar os cálculos manuais. Em geral, a velocidade do papel empregada foi ainda maior durante os trabalhos práticos. Pode-se notar a excelente performance da coluna N e a forma perfeita dos picos com fatores de assimetria muito próximos da unidade. Os parâmetros medi-

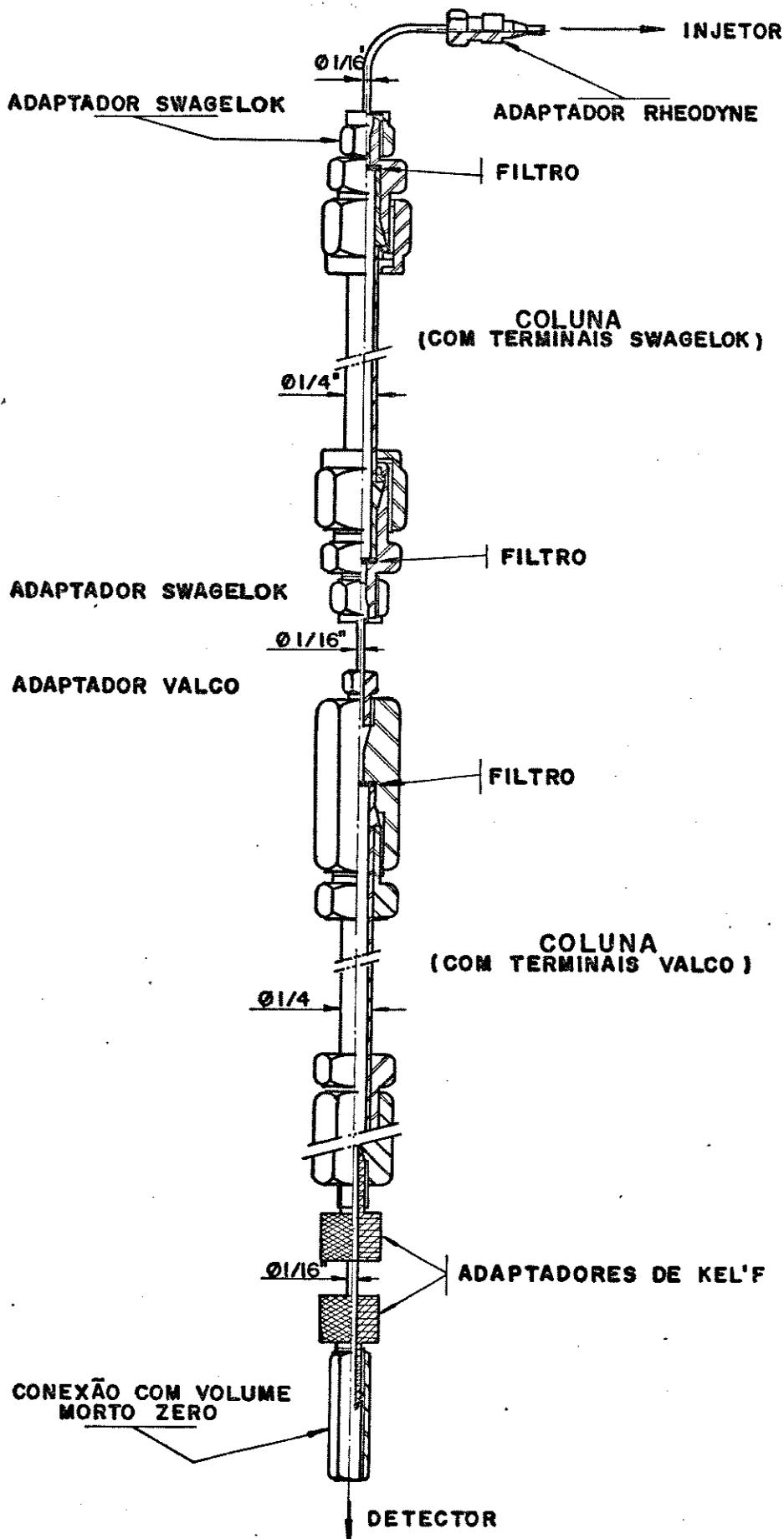


Figura V.38 - Esquema do Acoplamento de duas Microcolunas

dos e calculados foram transcritos para o cromatograma para facilitar a visualização dos resultados obtidos.

e) O Acoplamento de Microcolunas

Durante nosso trabalho com colunas convencionais, tentou-se o acoplamento sem qualquer sucesso; já com as microcolunas conseguiu-se, após algumas tentativas, a concatenação entre duas colunas com resultados considerados muito bons, mostrando que é possível obter colunas mais longas com número de pratos igual ou, pelo menos, próximo da soma do número de pratos das colunas concatenadas.

A conexão empregada entre as colunas é um dos fatores críticos. As primeiras tentativas foram feitas com uma conexão, marca Valco, "sem volume morto"; porém foram necessários dois filtros porosos superpostos para que não houvesse "sangramento" da fase estacionária. Mesmo assim, não se conseguiu estabilização da linha de base e houve redução do número de pratos teóricos.

A seguir empregou-se uma conexão construída com um tubo de mínimo comprimento possível e menor diâmetro interno disponível (30 x 0,11mm). Os terminais da conexão foram compatíveis com as colunas empregadas. Em uma das extremidades empregaram-se peças Swagelok e na outra usaram-se peças Valco para a adaptação das colunas Swagelok e Valco, respectivamente. A figura V.38 apresenta um esquema da montagem feita desde a ligação com o injetor (Rheodyne) à conexão com o detector (LDC) através de plugs de Kel'F (Kel'F é marca registrada da 3M Co. Trata-se de um polímero de clorotrifluoretileno - CTFE).

A tabela V.XXXI resume os resultados consegui

dos, a $50\mu\text{l}/\text{min}$, com as colunas L e N acopladas, comparando-os aos resultados obtidos, nas mesmas condições, quando estas colunas foram avaliadas isoladamente.

A análise dos resultados apresentados na tabela V.XXXI revela que ocorreu uma perda de apenas 5% da eficiência através do acoplamento das duas colunas, ou seja, praticamente manteve-se o valor do número de pratos teóricos por metro. Este resultado mostra que o acoplamento de microcolunas é uma prática viável, permitindo resoluções de misturas complexas. A figura V.39 ilustra uma aplicação das colunas acopladas (L+N) na resolução de uma mistura de nove compostos per-halogenados do carbono, à vazão de $100\mu\text{l}/\text{min}$.

Tabela V.XXXI - Comparação entre Resultados Obtidos com as Colunas N e L Separadamente e Após o Acoplamento, à Vazão de $50\mu\text{l}/\text{min}$. Testes Feitos no Sistema "Micro-HPLC" nas Mesmas Condições.

| | Coluna N Swagelok 252x1,8mm | Coluna L Valco 250x1,8mm | Colunas N+L Acopladas 502x1,8mm |
|----------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| N/col. | 10780 | 8300 | 18150 |
| N/m (m^{-1}) | 42760 | 33200 | 36150 |
| H (μm) | 23,4 | 30,1 | 27,6 |

A figura V.40 apresenta a separação da mesma mistura de compostos obtida por Leone/145/, com uma coluna adquirida de Alltech, partículas esféricas de $5\mu\text{m}$.

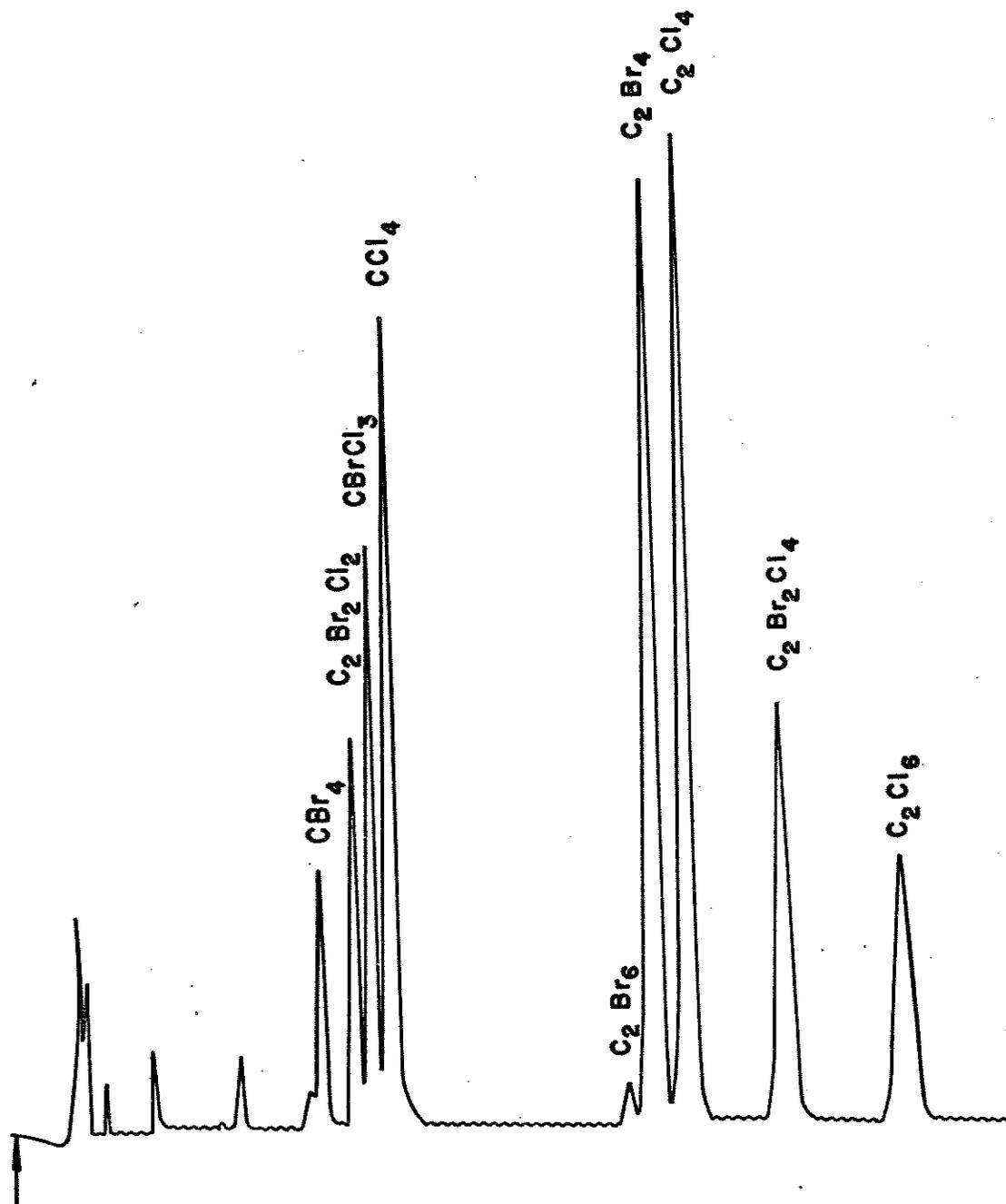


Figura V.39 - Cromatograma Obtido com as Colunas L+N, Aco-
pladas. LiChrosorb RP-18, 10 μ m. Dimensões :
502x1,8mm; Sistema Micro-HPLC; Injeção: 1 μ l ;
Detecção 220nm; Sensibilidade: 0,05UA; Vazão:
100 μ l/min; Pressão: 2430psi (16,7MPa); Fase
Móvel: MeOH/H₂O (70/30); V_p: 0,5cm/min; Mistu-
ra de 9 Compostos Per-halogenados.

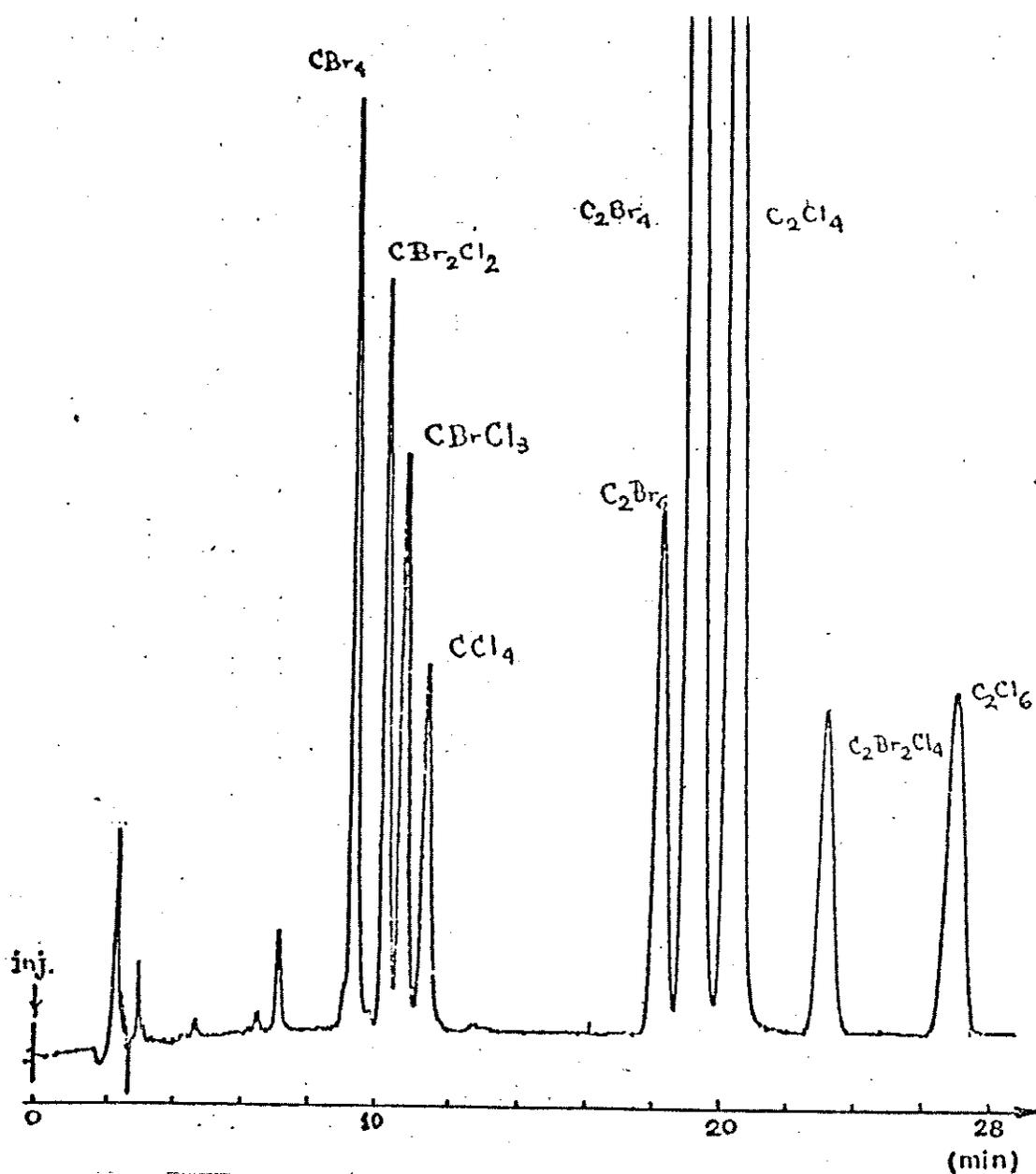


Figura V.40 - Cromatograma Obtido com a Coluna Alltech - Ultrasphere ODS-5 μ m. Dimensões: 250x4,6mm ; Sistema Convencional; Injeção: 10 μ l; Detecção: 220nm; Vazão: 1,0ml/min; Fase Móvel : MeOH/H₂O (70/30); N \sim 70 mil/m. Extraído com Permissão da Ref.145, fig.5.18).

CAPÍTULO VI

CONCLUSÕES

A análise dos resultados alcançados revela que:

- Problemas ocorridos durante o empacotamento, tais como vazamentos ou interrupção brusca da pressão, causam redução na eficiência da coluna, produzindo picos com elevada assimetria.

- Fases estacionárias deterioradas ou aglomeradas, mesmo que bem empacotadas, não fornecem boas colunas, provocando redução ou, até mesmo, ausência de resolução.

- A prática de percolar fase móvel através da coluna durante o processo de empacotamento mostrou-se de grande eficácia, além de facilitar o condicionamento antes da avaliação ou uso.

- A temperatura apresentou-se como um parâmetro crítico e devem-se tomar precauções, pois a simples elevação da temperatura do ambiente pode causar danos à fase estacionária durante a agitação ultra-sônica, cujo tempo, também não deve ser excessivo.

- Tentativas de uso de aditivos como líquidos viscosos ou tensoativos e soluções ácidas ou básicas, tão proclamas na literatura, não originaram qualquer melhora na qualidade das colunas.

- Quando se empregaram diferentes solventes, entre eles etanol, tetraclorometano, acetona, ciclohexanol, n-heptano e iso-propanol, apenas os 2 últimos produziram colunas com

razoável número de pratos e alguma resolução.

- Metanol comportou-se como o melhor solvente para o empacotamento das colunas convencionais, podendo ser empregado tanto como solvente propulsor como na preparação da suspensão, fornecendo colunas com excelente eficiência.

- O empacotamento de colunas com partículas de $3\mu\text{m}$ de diâmetro mostrou-se mais difícil, não tendo sido possível obter colunas com o mesmo valor de altura de prato reduzida que aquele alcançado com as partículas de 5 e $10\mu\text{m}$, mesmo assim, a resolução daquelas colunas mostrou-se superior à destas.

- O estudo da influência do diâmetro da partícula e do comprimento da coluna sobre sua eficiência revelou que há uma relação linear entre o tamanho da partícula e o comprimento ideal da coluna, com diâmetro interno de 4,6mm, a ser empacotada. Esta relação pode ser expressa por: $L = f dp$, onde f é um fator em torno de 15 a 18 mil. Valores fora desta faixa produzirão colunas com menor eficiência.

- As alterações realizadas na bomba de empacotamento mostraram-se de grande importância, permitindo a obtenção de colunas mais eficientes, a pressão bem mais baixa e em um tempo muito menor, o que demonstra a maior relevância da alta energia cinética em relação à pressão durante o processo.

- As modificações feitas no sistema cromatográfico levaram a uma sensível redução na dispersão, tornando-o adequado ao uso com colunas convencionais.

- Testes de estabilidade realizados levaram à conclusão de que o método de empacotamento, não só forneceu colunas de alta eficiência, mas também, produziu colunas com longa vida e picos com excelente simetria, mesmo após muito tempo

de uso.

● Os esforços dispensados no desenvolvimento da metodologia de empacotamento de colunas foram compensadores, levando a resultados reprodutíveis, similares ou até mesmo superiores aos encontrados na literatura e aos de colunas disponíveis no mercado.

● Foram obtidos valores de altura de prato reduzida, h , tão baixos quanto 2,7 para colunas convencionais, empacotadas com partículas esféricas e irregulares de $10\mu\text{m}$.

● As colunas empacotadas com partículas de $5\mu\text{m}$ esféricas ($h=2,8$) mostraram-se melhores que as irregulares de mesmo diâmetro ($h=3,5$).

● Microcolunas empacotadas com a mesma técnica (metanol) produziram $h \sim 3,3$, comparáveis às convencionais; no entanto, se necessário, podem-se empregar outras técnicas, chegando a valores de h tão baixos quanto 2,3 (Acetona: Iodeto de Metila, 1:1).

● O equipamento de Micro-HPLC empregado mostrou-se adequado às colunas empregadas, indicando que nenhuma sofisticação é necessária para se alcançar uma economia da ordem de 80% com relação às fases móvel e estacionária empregadas.

Finalmente, pesquisas realizadas junto ao mercado de colunas cromatográficas deixam claro que, entre as colunas disponíveis, as mais baratas custam, no Brasil, em torno de US\$ 700.00, chegando, as mais caras, a quase US\$ 2 000.00.

Com a tecnologia proposta neste projeto, cálculos demonstram que, mesmo importando as fases estacionárias e comprando a coluna vazia pronta que custa mais de US\$ 100.00, ainda seria compensador empacotar suas próprias colunas. Por

outro lado, se a coluna vazia for montada ou construída em nosso país (existem projetos em nosso laboratório para a confecção destes acessórios), o custo da coluna não chegaria a 30% do valor em que ela é vendida, mesmo importando a fase estacionária.

Se o Brasil dispusesse de tecnologia de preparação das fases estacionárias, então poderíamos preparar nossas próprias colunas de HPLC ao preço daquelas encontradas no exterior, tão barato quanto US\$ 200.00 ou US\$ 300.00.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Leitch, R.E. e DeStefano, J.J.; J. Chromatogr. Sci. 11 (1973) 105.
- 2 Majors, R.E.; J. Chromatogr. Sci. 15 (1977) 334.
- 3 Goetz, H.; Mueller, H.; Roumeliotis, P. e Unger, K.; J. Chromatogr. 202 (1980) 3.
- 4 Majors, R.E.; J. Chromatogr. Sci. 18 (1980) 488.
- 5 Ciccioli, P.; Tappa, R.; Corcia, A. e Liberti, A.; J. Chromatogr. 206 (1981) 35.
- 6 Verzele, M. e Dewaele, C.; Chromatographia 18 (1984) 84.
- 7 Karuhn, R.; Wood, R.D. e Wyatt, S.D.; LC-GC 4 (1986) 1072.
- 8 Verzele, M.; Dewaele, C. e Duquet, D.; J. Chromatogr. 391 (1987) 111.
- 9 Kirkland, J.J. e DeStefano, J.J.; J.Chromatogr. Sci. 8 (1970) 309.
- 10 Locke, D.C.; Schmermund, J.T. e Banner, B.; Anal. Chem. 44 (1972) 90.
- 11 Engelhardt, H. e Ahr, G.; Chromatographia 14 (1981) 227.
- 12 Haas, A.; Köhler, J. e Hemetsberger, H.; Chromatographia 14 (1981) 341.
- 13 Holstein, W. e Hemetsberger, H.; Chromatographia 15 (1982) 187.
- 14 Hemetsberger, H. e Ricken, H.; Chromatographia 15 (1982) 236.
- 15 Jinno, K.; Chromatographia 15 (1982) 667.
- 16 Boumahraz, M.; Davidov, V.Ya. e Kiselev, A.V.; Chromatographia 15 (1982) 751.
- 17 Majors, R.E.; LC-GC 4 (1986) 304.
- 18 Köhler, J. e Kirkland, J.J.; J. Chromatogr. 385 (1987) 125.

19. Coppi, S.; Blo, G. e Belli, A.; J. Chromatogr. 388 (1987) 135.
20. Shah, P.; Rogers, L.B. e Fetzer, J.C.; J. Chromatogr. 388 (1987) 411.
21. Jones, K.; J. Chromatogr. 392 (1987) 1.
22. Jones, K.; J. Chromatogr. 392 (1987) 11.
23. Morel, D.; Tabar, K.; Serpinet, J.; Claudy, P. e Letoffe, J.M.; J. Chromatogr. 395 (1987) 73.
24. Walczak, B.; Allory, L.M.; Lafosse, M.; Dreux, M. e Chrétien, J.R.; J. Chromatogr. 395 (1987) 183.
25. Verzele, M. e Dewaele, C.; J. Chromatogr. 282 (1984) 341.
26. Halasz, I. e Horvath, C.; Anal. Chem. 60 (1977) 186.
27. Rehak, V. e Smolkova, E.; Chromatographia 9 (1976) 219.
28. Horvath, C. e Melander, W.; J. Chromatogr. Sci. 15 (1977) 393.
29. Grushka, E. e Kikta, J.; Anal. Chem. 49 (1977) 1005A.
30. Verzele, M.; Lammens, J. e Roelenbosch, M.V.; J. Chromatogr. 178 (1979) 463.
31. Poole, C.F. e Schuette, S.A.; "Contemporary Practice of Chromatography", Elsevier, New York, N.Y., (1984).
32. Jandera, P.; Colin, H. e Guiochon, G.; Anal. Chem. 54 (1982) 435.
33. Otto, M. e Wegscheider, W.; J. Chromatogr. 258 (1983) 11.
34. Hearn, M.T.W. e Grego, B.; J. Chromatogr. 266 (1983) 75.
35. Horvath, C.; LC, Liq. Chromatogr. HPLC Mag. 1 (1983) 552.
36. Snyder, L.R. e Kirkland, J.J.; "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2^a ed., John Wiley & Sons, New York, (1979).
37. Andreoline, F.; Borra, C.; Wiesler, D. e Novotny, M.; J. Chromatogr. 406 (1987) 375.
38. Hamilton, P.B.; Anal. Chem. 30 (1958) 914.
39. Tesarik, K. e Necasova, M.; J. Chromatogr. 75 (1973) 1.

- 40 Kirkland, J.J.; J. Chromatogr. Sci. 10 (1972) 593.
- 41 Kirkland, J.J.; Antle e Antle, P.E.; J. Chromatogr. Sci. 15 (1977) 137.
- 42 Verzele, M.; J. Chromatogr. 295 (1984) 81.
- 43 Delley, R.; Chromatographia 15 (1982) 167.
- 44 Bidlingmeyer, B.A. e Warren Jr, F.V.; Anal. Chem. 56 (1984) 1583A.
- 45 Colmsjö, A. e Ericsson, M.W.; J. Chromatogr. 398 (1987) 63.
- 46 Bristow, P.A. e Knox, J.H.; Chromatographia 10 (1977) 279.
- 47 Klinkenberg, A.; "Gas Chromatography 1960"; Buttersworth Scientific Publishers, Londres (1960) 194.
- 48 Van Deemter, J.J.; Zuiderweg, F.J. e Klinkenberg, A.; Chem. Eng. Sci. 5 (1956) 271.
- 49 Giddings, J.C.; J. Chromatogr. 5 (1961) 46.
- 50 Giddings, J.C.; Anal. Chem. 35 (1963) 1338.
- 51 Huber, J.F.K. e Hulsman, J.A.R.J.; Anal. Chim. Acta. 38 (1967) 305.
- 52 Huber, J.F.K.; J. Chromatogr. Sci. 7 (1969) 85.
- 53 Knox, J.H. e Kenneth, G.H.; J. Chromatogr. Sci. 10 (1972) 549.
- 54 Knox, J.H. e Done, J.N.; J. Chromatogr. Sci. 10 (1972) 606.
- 55 Horvath, Cs. e Lin, H.J.; J. Chromatogr. 126 (1976) 401.
- 56 Horvath, Cs. e Lin, H.J.; J. Chromatogr. 149 (1978) 43.
- 57 Kirkland, J.J.; Anal. Chem. 43 (1971) 36A.
- 58 Knox, J.H. e Scott, H.P.; J. Chromatogr. 282 (1983) 297.
- 59 Scott, R.P.W. e Kucera, P.; J. Chromatogr. Sci. 9 (1971) 641.
- 60 Martin, M.; Eon, C. e Guiochon, G.; J. Chromatogr. 108 (1975) 229.
- 61 Kirkland, J.J.; J. Chromatogr. Sci. 15 (1977) 303.
- 62 Scott, R.P.W. e Kucera, P.; J. Chromatogr. 169 (1979) 51.

- 63 Reese, C.E. e Scott, R.P.W.; J. Chromatogr. Sci. 18 (1980) 479.
- 64 Low, G.K.C. e Haddad, P.R.; J. Chromatogr. 198 (1980) 235.
- 65 Freebairn, K.W. e Knox, J.H.; Chromatographia 19 (1984) 37.
- 66 Dezaro, D.A.; Dvorn, D.; Horn, C. e Hartwick, R.A.; Chromatographia, 20 (1985) 87.
- 67 Hanggi, D.A. e Carr, P.W.; LC, Liq. Chromatogr. HPLC Mag. 3 (1985) 414 .
- 68 Dolan, J.W.; LC-GC 4 (1986) 1086.
- 69 Scott, R.P.W.; "Small Bore Liquid Chromatography Columns: Their Properties and Uses"; John Wiley & Son, New York (1984).
- 70 Giddings, J.C.; J. Chromatogr. 13 (1964) 301.
- 71 Grushka, E.; Snyder, L.R. e Knox, J.H.; J. Chromatogr. Sci. 13 (1975) 25.
- 72 Tsuda, T. e Novotny, M.; Anal. Chem. 50 (1978) 271.
- 73 Mc. Guffin, V.L. e Novotny, M.; Anal. Chem. 55 (1983) 580.
- 74 Naish, P.J.; Goulder, D.P. e Perkins, C.V.; Chromatographia 20 (1985) 335..
- 75 Brooks, H.B.; Thrall, C. e Tehrani, J.; J. Chromatogr. 385 (1987) 55.
- 76 Verzele, M.; De Weerd, M.; Dewaele, C.; Di Jong, G.J.; Lammers, N. e Spruit, F.; LC-GC 4 (1986) 1162.
- 77 Novotny, M.; Anal. Chem. 60 (1988) 550A.
- 78 Novotny, M.; Anal. Chem. 53 (1981) 1294A.
- 79 Basey, A. e Oliver, R.W.A.; J. Chromatogr. 251 (1982) 265.
- 80 Knox, J.H.; J. Chromatogr. Sci. 15 (1977) 352.
- 81 Kirkland, J.J.; J. Chromatogr. 15 (1964) 429.
- 82 Majors, R.E.; J. Chromatogr. Sci. 8 (1970) 338.
- 83 Kirkland, J.J.; J. Chromatogr. Sci. 9 (1971) 206.

- 84 Majors, R.E.; Anal. Chem. 44 (1972) 1722.
- 85 Asshaner, J. e Halasz, I.; J. Chromatogr. Sci. 12 (1974) 139.
- 86 Endeke, R.; Halasz, I. e Unger, K.; J. Chromatogr. 99 (1974) 377.
- 87 Cassidy, R.M.; LeGay, D.S. e Frei, R.W.; Anal. Chem. 46 (1974) 340.
- 88 Coq, B.; Gonnet, C. e Rocca, J.L.; J. Chromatogr. 106 (1975) 249.
- 89 Webber, T.J.N. e Mc Kerrell, E.H.; J. Chromatogr. 122 (1976) 243.
- 90 Delly, R.; Chromatographia 9 (1976) 303.
- 91 Keller, H.P.; Erni, F.; Linder, H.R. e Frei, R.W.; Anal. Chem. 49 (1977) 1958.
- 92 Bristow, P.A.; Brittain, P.N.; Riley, C.M. e Williamson, B.F.; J. Chromatogr. 131 (1977) 57.
- 93 Little, C.J.; Dale, A.D.; Ord, D.A. e Marten, T.R.; Anal. Chem. 49 (1977) 1311.
- 94 Bristow, P.A.; J. Chromatogr. 149 (1978) 13.
- 95 Broquaire, M.; J. Chromatogr. 170 (1979) 43.
- 96 Yamauchi, Y.; Oshima, R. e Kumanotani, J.; J. Chromatogr. 198 (1980) 49.
- 97 Yamauchi, Y. e Kumanotani, J.; J. Chromatogr. 210 (1981) 512.
- 98 Kuwata, K.; Uebori, M. e Yamazaki, Y.; J. Chromatogr. 211 (1981) 378.
- 99 Prusiewicz, K.; Kaminski, M. e Klawiter, J.; J. Chromatogr. 238 (1982) 232.
- 100 Liao, J.C. e Ponzo, J.L.; J. Chromatogr. Sci. 20 (1982) 32.
- 101 Klawiter, J.; Kaminski, M. e Kowalczyk, J.S.; J. Chromatogr. 243 (1982) 207.

- 102 Kaminski, M.; Klawiter, J. e Kowalczyk, J.S.; J. Chromatogr. 243 (1982) 225.
- 103 Halasz, I. e Maldener, G.; Anal. Chem. 55 (1983) 1842.
- 104 Kuwata, K. e Yamazaki, Y.; Chromatographia 22 (1986) 319.
- 105 Majors, R.E.; LC-Liq. Chromatogr. HPLC Mag. 2 (1984) 502.
- 106 Horvath, C.G.; Preiss, B.A. e Lipsky, S.R.; Anal. Chem. 39 (1967) 1422.
- 107 Wolf, J.P.; Anal. Chem. 45 (1973) 1248.
- 108 Scott, R.P.W. e Kucera, P.; J. Chromatogr. 125 (1976) 251.
- 109 Ishii, D.; Asai, K.; Hibi, K.; Jonokuchi, T. e Nagaya, M.; J. Chromatogr. 144 (1977) 157.
- 110 Takeuchi, T.; Anal. Chem. 50 (1978) 659.
- 111 Guiochon, G.; J. Chromatogr. 185 (1979) 3.
- 112 Scott, R.P.W. e Kucera, P.; J. Chromatogr. 185 (1979) 27.
- 113 Tesarick, K.; J. Chromatogr. 191 (1980) 25.
- 114 Tesarick, K.; Pajured, J. e Krejci, M.; J. Chromatogr. 191 (1980) 17.
- 115 Hermansson, J.; Chromatogr. 13 (1980) 741.
- 116 Ishii D. e Takeuchi, T.; J. Chromatogr. 190 (1980) 150.
- 117 Scott, R.P.W.; J. Chromatogr. Sci. 18 (1980) 49.
- 118 Takeuchi, T. e Ishii, D.; J. Chromatogr. 213 (1981) 25.
- 119 Guiochon, G.; Anal. Chem. 53 (1981) 1318.
- 120 Zhang, Y.; Zhou, G.; Bao, M.; Li, X. e Lu, P.; Chromatographia 14 (1981) 135.
- 121 Tsuda, T.; Tsuboi, K. e Nakagawa, G.; J. Chromatogr. 214 (1981) 283.
- 122 Kucera, P. e Manius, G.; J. Chromatogr. 216 (1981) 9.
- 123 Kucera, P.; J. Chromatogr. 198 (1980) 93.
- 124 Takeuchi, T. e Ishii, D.; J. Chromatogr. 238 (1982) 409.

- 125 Krien, P.; Devanti, G. e Hardy, M.; J. Chromatogr. 251
(1982) 129.
- 126 Menet, H.; Gareil, P.; Caude, M. e Rosset, R.; Chromatographia 18 (1984) 73.
- 127 Novotny, M.; Hirose, A. e Wiesler, D.; Anal. Chem. 56
(1984), 1243.
- 128 Tsuda, T.; Tanaka, I. e Nakagawa, G.; Anal. Chem. 56 (1984)
1249.
- 129 Mori, G. e Suzuki, T.; Anal. Chem. 56 (1984) 1708.
- 130 Menet, H.; Gareil, P. e Rosset, R.; Anal. Chem. 56 (1984)
1770.
- 131 Reed, G.D. e Loscombe, C.R.; Chromatographia 18 (1984) 165.
- 132 Roumeliotis, P.; Chatziathanassiou, M. e Unger, K.K.; Chromatographia 19 (1984) 145.
- 133 Meyer, R.F. e Hartwick, R.A.; Anal. Chem. 56 (1984) 2211.
- 134 Niessen, W.M.A.; van Uliet, H.P.M. e Poppe, H.; Chromatographia 20 (1985) 357.
- 135 Gareil, P. e Rosset, R.; Chromatographia, 20 (1985) 367.
- 136 Welling, P.; Poppe, H. e Kraak, J.C.; J. Chromatogr. 321
(1985) 450.
- 137 Bhowan, A.S.; Wayland, J. e Bennett, J.C.; J. Chromatogr.
370 (1986) 508.
- 138 Schlabach, T.D. e Wilson, K.J.; J. Chromatogr. 385 (1987)
65.
- 139 Borra, C.; Han, S.M. e Novotny, M.; J. Chromatogr. 385
(1987) 75.
- 140 Harvey, M.C. e Stearns, S.D.; J. Chromatogr. Sci. 21 (1983)
473.
- 141 Collins, K.E.; Farris, M.G.; Yoshikawa, O.A.E.; Cruz, P.E.N.

- e Collins, C.H.; *Ciência e Cultura* 32 (1980) 1242.
- 142 Ball, D.L.; Harris, W.E. e Habgood, H.W.; *Anal. Chem.* 40 (1968) 129
- 143 Takeuchi, T. e Ishii, D.; *J. Chromatogr.* 285 (1984) 96.
- 144 Miller, J.M.; "Separation Methods in Chemical Analysis"; John Wiley & Sons, New York (1975).
- 145 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, UNICAMP, Instituto de Química, Campinas, 1988.