Lincoln Figueira Marins Coutinho

Desenvolvimento de Instrumentação Dedicada a
Cromatografia Líquida Capilar (cLC)

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos, da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em
Química (Química Analítica).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos
2008

Agradecimentos

Ao Dr. Esmeraldo Aparecido Cappelaro, responsável por todo o projeto mecânico da bomba desenvolvida neste projeto.

Ao Prof. Dr. José Carlos Rodrigues Silva, pela ajuda e sugestões durante a construção do forno desenvolvido.

À doutoranda Alessandra Maffei Monteiro, pela produção das colunas capilares utilizadas neste projeto e também pelo companheirismo em grande parte deste doutorado.

Ao Dr. Álvaro José dos Santos Neto pela grande ajuda nas aplicações dos equipamentos desenvolvidos ao longo do projeto.

À Odete Milão, pela amizade e por sempre buscar a solução de todos os problemas.

À Cláudia, minha esposa, pela paciência e companheirismo, pela colaboração e grande ajuda na elaboração desta tese.

A todos os amigos do CROMA.

À CNPq, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro concedido ao longo deste doutorado.

“Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro e depois perdem o dinheiro para recuperá-la. Por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem o presente, de tal forma que acabam por nem viver no presente nem no futuro. Vivem como se nunca fossem morrer e morrem como se não tivessem vivido...”

Confúcio

Resumo

Desde que foi introduzida por Tswett no começo do século XX, a cromatografia vem sofrendo contínuos avanços. Entretanto, a miniaturização da cromatografia líquida, apesar de seu início promissor, ainda continua bastante lenta e até o presente não alcançou ampla difusão, sendo que o número de grupos trabalhando nesta área é ainda bastante restrito. O motivo deste lento avanço se encontrava na dificuldade em se desenvolver equipamentos adequados, colunas apropriadas e sistemas de tratamento de dados suficientemente rápidos para os sistemas miniaturizados. Apesar de muitos desses problemas atualmente serem de fácil resolução, ainda não se dispõe de equipamentos comercialmente disponíveis que supram satisfatoriamente às condições impostas pelas micro-colunas. Tal carência deve ser suprida antes de nos beneficiarmos de todas as vantagens intrínsecas à miniaturização da cromatografia líquida. Deste modo, o presente projeto visa o desenvolvimento de instrumentação totalmente dedicada aos sistemas miniaturizados de cromatografia líquida incluindo o desenvolvimento de uma bomba de alta pressão, um sistema de injeção a base de tempo, um forno capaz de realizar programação de temperatura e o *software* de controle dos mesmos. Os equipamentos desenvolvidos foram então aplicados em separações de estatinas demonstrando um excelente desempenho.

Abstract

Since the chromatography was introduced by Tswett, in the beginning of the 20th century, the technique has suffered a constant progress. However, the miniaturization of liquid chromatography, instead of its promising start, it is still too slow and this technique has not reached a wide divulgation so far. It is important to mention that the number of groups working in this area is very limited yet. The reason of this slow progress was due to the difficulty in developing suitable equipments, appropriated columns and data treatment systems that are quick enough for the miniaturized systems. Currently, many of these problems are easy to be solved, however, there are no equipments available commercially that supply the conditions imposed by microcolumns satisfactorily. Such lack should be filled before benefiting from all the advantages concerned to the miniaturization of liquid chromatography. In this way, this study aims at the development of instrumentation totally dedicated to the miniaturized systems of liquid chromatography, including the development of a high pressure pump, an time-based injector, an oven that sets the temperature programming and the software that can control all these devices. The developed equipments were then applied in the separation of statins, demonstrating an excellent performance.

Lista de Figuras

Figura 1 – Cromatogramas simulados ilustrando o ganho de sensibilidade em colunas de diversos diâmetros interno: a) 0,320 mm; b) 2,1 mm; c) 4,6 mm.....	31
Figura 2 – Gráfico de <i>van Deemter</i> para colunas empacotadas. Colunas: 4,6 mm x 15 cm (convencional) e 0,32 mm x 15 cm (capilar de sílica fundida); fase estacionária: 5- μ m ROSil-C18-D; fase móvel: 75:25 (v/v) acetonitrila/água; detector: UV (254 nm); composto: pireno. Adaptado da referência 36.....	34
Figura 3 – Esquemas de diversos modelos de bombas de pressão constante. Adaptado da referência 63.....	44
Figura 4 – Esquema de uma bomba de pressão constante com amplificação pneumática.....	45
Figura 5 – Bomba de pressão constante com amplificação pneumática. a) Ciclo de bombeamento, b) acionamento da válvula, c) ciclo de reabastecimento e d) acionamento da segunda válvula.....	46
Figura 6 – Esquema de uma bomba do tipo seringa.	47
Figura 7 – Efeito da compressibilidade do líquido no fluxo gerado por 3 bombas seringa com diferentes tamanhos de câmara: a) 20 mL; b) 100 mL; c) 500 mL. Adaptado da referência 64.....	48
Figura 8 – Esquema de uma bomba do tipo recíprocante de simples pistão.....	49
Figura 9 – Esquema de uma bomba do tipo recíprocante de duplo pistão em paralelo.	50
Figura 10 – Esquema de uma bomba do tipo recíprocante de duplo pistão em série.	51
Figura 11 – Esquema de uma bomba do tipo recíprocante com diafragma.....	52
Figura 12 – Esquema do sistema de bombeamento de nano-fluxo da série 1200 da Agilent.....	54
Figura 13 – Esquema do sistema de bombeamento LPG-3400M+FLM da Dionex.....	55
Figura 14 – Esquema do sistema de bombeamento DGP-3600M+FLM da Dionex.	55
Figura 15 – Esquema do sistema de bombeamento LC-20ADnano da Shimadzu.	56
Figura 16 – Esquema do sistema de bombeamento Cap-LC da Waters.....	57
Figura 17 – Vista interna da bomba desenvolvida.	59
Figura 18 – Vista interna esquemática de um motor de passo de relutância variável de três fases com rotor de quatro dentes.	62
Figura 19 – Funcionamento de um motor de passo.....	63
Figura 20 – Vistas internas do motor utilizado.	64

Figura 21 – Vista interna de uma caixa de redução do tipo planetária. Adaptado da referência 66.....	65
Figura 22 – Ilustração do funcionamento das caixas de redução planetárias. a) Condição inicial, b) após uma revolução completa da engrenagem sol, c) após duas revoluções completas da engrenagem sol.....	66
Figura 23 – Vista interna da caixa de redução do tipo planetária utilizada neste projeto. Adaptado da referência 66.	67
Figura 24 – Tipos de fusos: a) fusos de esferas, b) fusos convencionais com rosca trapezoidal.	68
Figura 25 – Fuso de esferas.	68
Figura 26 – Ilustração do funcionamento de um fuso. a) Movimento circular aplicado ao fuso, b) movimento circular aplicado à castanha.....	69
Figura 27 – Ilustração do fuso de esferas utilizado neste projeto.	70
Figura 28 – Rolamento.....	70
Figura 29 – Vista interna dos três tipos de rolamentos utilizados neste projeto. a) rolamento rígido de esferas, b) rolamento de contato angular e c) rolamento de rolos cônicos.....	71
Figura 30 – Rolamentos utilizados neste projeto: a) 16003 2Z, b) 7203 BEP, c) 32006 X/Q, d) 7205 BECBM e e) 619/6 2Z.	72
Figura 31 – Vista interna de uma <i>check valve</i> passiva.	73
Figura 32 – Conjuntos de esferas e assentos utilizados nas <i>check valves</i> passivas. As esferas vermelhas são de rubi e seus assentos de safira. Já as esferas brancas, assim como seus assentos, são de cerâmica.....	73
Figura 33 – Funcionamento de uma <i>check valve</i> passiva. a) Passagem do líquido no sentido direto, b) momento da inversão do sentido do fluxo e c) válvula fechada.	74
Figura 34 – Vista interna de uma <i>check valve</i> passiva com fechamento facilitado.....	75
Figura 35 – Foto dos dois tipos de <i>check valves</i> desmontadas.....	75
Figura 36 – Vista esquemática da válvula utilizada com <i>ckeck valve</i> : a) posição de reabastecimento, b) posição para descarte, c) posição para pressurização, d) posição de bombeamento.....	76
Figura 37 – Pistões utilizados por diversos fabricantes de equipamentos de HPLC: a) Agilent; b) Dionex; c) Jasco; d) Perkin-Elmer; e) Shimadzu; f) Varian e g) Waters	77
Figura 38 – Ilustração do pistão utilizado neste projeto.	77
Figura 39 – Principais tipos de selos utilizados na HPLC: a) mola em “V”, b) mola de espirais inclinadas e c) mola helicoidal.....	78

Figura 40 – Selo utilizado neste projeto.	79
Figura 41 – Fixação do motor à bomba utilizando celeron como isolante elétrico.....	80
Figura 42 – Conjunto motor/caixa-planetária fixado ao corpo da bomba.....	81
Figura 43 – Detalhe do isolamento elétrico do motor.....	81
Figura 44 – Vista explodida da engrenagem pequena.....	82
Figura 45 – Engrenagem pequena já com seus rolamentos de suporte.....	82
Figura 46 – Vista explodida da engrenagem grande.	83
Figura 47 – Ilustração da engrenagem grande montada.	83
Figura 48 – Vista explodida do acoplamento da engrenagem grande com o fuso de esferas.	84
Figura 49 – Ilustração do fuso de esferas já acoplado à engrenagem grande.	84
Figura 50 – Vista explodida da instalação dos rolamentos de suportes.	85
Figura 51 – Ilustração do dos rolamentos já instalados na engrenagem grande.....	85
Figura 52 – Visão explodida da instalação das engrenagens no corpo da bomba.....	86
Figura 53 – a) Vista das engrenagens já instaladas, b) Detalhe das engrenagens montadas no interior da capa da bomba.	87
Figura 54 – Vista explodida da instalação do eixo de travamento do fuso.	88
Figura 55 – Vista explodida da instalação da guia do fuso.	88
Figura 56 – Ilustração do eixo e da guia do fuso de esferas já instalados.....	88
Figura 57 – Instalação do pistão.	89
Figura 58 – Pistão já instalado no fuso de esferas.	89
Figura 59 – Vista explodida da montagem da câmara do pistão.	90
Figura 60 – Ilustração da bomba já montada.	90
Figura 61 – Vista interna detalhando o projeto mecânico da câmara do pistão.....	91
Figura 62 – Três modos de medição de pressão capazes de ser realizadas pelos sensores de pressão do tipo <i>strain gage</i> : a) pressão relativa, b) pressão absoluta e c) pressão referenciada.	92
Figura 63 – Sensor de pressão utilizado: a) Dimensões em mm e b) esquema elétrico.	92
Figura 64 – Esquema elétrico de um sensor ótico de início/final de curso: a) condição na qual o fototransistor se encontra em condução, b) condição na qual o fototransistor se encontra em corte.	93

Figura 65 – Esquema elétrico de um sensor mecânico de início/final de curso: a) sensor não acionado e b) sensor acionado.....	94
Figura 66 – Vista explodida da instalação do sensor de pressão.	95
Figura 67 – Sensor de pressão já instalado.	95
Figura 68 – Esquema elétrico da ligação dos sensores mecânicos de início/final de curso.	96
Figura 69 – Vista explodida da instalação dos sensores de início/final de curso.....	97
Figura 70 – Sensores já instalados no guia do fuso de esferas.....	97
Figura 71 – Diagrama funcional do PIC16F877A.....	99
Figura 72 – Diagrama funcional do AD7705.	101
Figura 73 – Formas de ondas comumente geradas por geradores de onda: a) quadrada, b) senoidal, c) triangular e d) dente-de-serra.	101
Figura 74 – Diagrama funcional do AD9833.	102
Figura 75 – Ilustração do modo de operação <i>Full-Step</i>	103
Figura 76 – Ilustração do modo de operação <i>Half-Step</i>	104
Figura 77 – Seqüência de excitação de um motor de três fases no modo micropasso.	105
Figura 78 – Exemplo do funcionamento dos micropassos.....	106
Figura 79 – Foto do <i>driver</i> RKD514L-A do motor de passo.	107
Figura 80 – Diagrama de blocos do circuito eletrônico da bomba.	108
Figura 81 – Circuito da fonte de alimentação.....	109
Figura 82 – Circuito principal da bomba.....	110
Figura 83 – Circuito de controle do motor.	111
Figura 84 – Circuito de condicionamento do sinal do sensor de pressão.	112
Figura 85 – Circuito dos sensores óticos de início/final de curso.....	114
Figura 86 – Conversor RS232-USB utilizado neste projeto.	114
Figura 87 – Diagrama de blocos ilustrando a estrutura utilizada para o controle da bomba via microcomputador.	115
Figura 88 – Rotina de inicialização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.....	117
Figura 89 – Rotina de finalização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.....	117

Figura 90 – Rotinas de envio de dados para a bomba.	118
Figura 91 – Rotinas de recebimento de dados da bomba.....	119
Figura 92 – Calibração do fluxo. a) Fluxos de 0 a 250,0 $\mu\text{L}/\text{min}$, b) ampliação da faixa de 0 a 10,0 $\mu\text{L}/\text{min}$ e c) ampliação da faixa de 0 a 1,0 $\mu\text{L}/\text{min}$	122
Figura 93 – Forno desenvolvido para micro-colunas.	132
Figura 94 – Corpo metálico do forno.....	133
Figura 95 – Mantas dentro do forno.	133
Figura 96 – Foto do tubo cerâmico.	134
Figura 97 – Detalhe do tubo cerâmico.	134
Figura 98 – Mini-ventilador utilizado no sistema de refrigeração forçada.	135
Figura 99 – Portas do forno.....	135
Figura 100 – Elemento resistivo (fio de níquel-cromo) já enrolado no tubo cerâmico.....	137
Figura 101 – Sensor de temperatura utilizado no forno desenvolvido.	138
Figura 102 – Vista interna de um típico servo-motor.....	139
Figura 103 – Ilustração do funcionamento de um servo-motor.	139
Figura 104 – Foto do servo-motor já montado no forno.	140
Figura 105 – Símbolo eletrônico do TRIAC.	140
Figura 106 – Circuito elétrico interno do MOC3021.	142
Figura 107 – Diagrama de blocos do circuito elétrico responsável pelo controle do forno.....	143
Figura 108 – Circuito eletrônico da fonte de alimentação.	144
Figura 109 – Circuito eletrônico utilizado na conversão das tensões utilizadas pelo microcontrolador PIC para os níveis utilizados pelo PC, e vice-versa.	145
Figura 110 – Circuito de: a) excitação e b) amplificação do sinal do sensor de temperatura.	145
Figura 111 – Circuito responsável pelo: a) monitoramento da tensão da rede elétrica, b) acionamento do servo-motor, c) acionamento dos ventiladores, d) acionamento e controle de potência do aquecedor e e) sincronização do controlador de potência com os ciclos da rede elétrica.....	146
Figura 112 – Foto do circuito eletrônico do forno.	148
Figura 113 – Rotina de inicialização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.....	149

Figura 114 - Rotina de finalização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.....	150
Figura 115 – Rotina de controle da temperatura do forno.....	152
Figura 116 – Rotina de recebimento de uma nova tensão da rede enviada pelo forno.	153
Figura 117 – Calibração do sistema eletrônico. a) Calibração do sensor de temperatura, b) calibração do controlador de potência do aquecedor.	154
Figura 118 – Diferença de temperatura registrada ao longo do tempo para 15 ajustes de potência do forno.	155
Figura 119 – Dissipação térmica do forno em função da diferença de temperatura interna do forno e a temperatura ambiente.	155
Figura 120 – Rampas de temperatura para 15 diferentes potências do aquecedor em função da diferença de temperatura interna e externa do forno.....	156
Figura 121 – Potência térmica necessária pelo forno para realizar rampas de temperatura.	157
Figura 122 – Corridas com temperatura constante.	158
Figura 123 – Corridas com rampas de temperatura.....	158
Figura 124 – Sistema instrumental utilizado no teste do desempenho do forno em aplicações reais.	159
Figura 125 – Cromatogramas comparativos da separação de uma mistura teste com e sem programação de temperatura.	161
Figura 126 – Cromatogramas comparativos da separação de uma mistura teste com e sem programação de temperatura utilizando colunas monolíticas e empacotadas.	163
Figura 127 – Dois principais tipos de válvulas de injeção utilizados na cromatografia líquida: a) válvula com <i>loop</i> externo e b) válvula com <i>loop</i> interno.	166
Figura 128 – Esquema de uma válvula de injeção manual com <i>loop</i> externo: a) posição <i>load</i> e b) posição <i>inject</i>	167
Figura 129 – <i>Loop</i> utilizado nas válvulas de injeção de <i>loop</i> externo.	168
Figura 130 – Esquema de uma válvula de injeção manual com <i>loop</i> interno: a) posição <i>load</i> e b) posição <i>inject</i>	169
Figura 131 – Rotor utilizado em válvulas de injeção de <i>loop</i> interno.	169
Figura 132 – Foto da válvula EPCI4W.06.	172
Figura 133 – Esquema elétrico do sistema de injeção a base de tempo.	173
Figura 134 – Entrada e saída de dados da DLL desenvolvida disponíveis ao <i>software</i> externo de controle da válvula.....	174

Figura 135 – Rotina de inicialização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção à base de tempo.....	175
Figura 136 – Rotina de finalização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.....	176
Figura 137 – Rotinas realizadas quando um novo valor de tempo, volume ou fluxo é passado à DLL de controle do sistema de injeção à base de tempo.	177
Figura 138 – Rotina realizada quando enviado um comando de injeção.....	178
Figura 139 – Cromatograma obtido com tempo de injeção de 300 ms (aproximadamente 30 nL).....	180
Figura 140 – Média dos volumes injetados em função do tempo, obtidos a partir de três repetições.	181
Figura 141 – Detalhes dos dois picos com vários tempos de injeção: a) pravastatina e b) rosuvastatina.	181
Figura 142 – Resultados da calibração dos volumes de injeção obtidos para um fluxo de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. a) Regressão utilizando a função de Nelder e b) curva de calibração realizada após a calibração do sistema.	182
Figura 143 – Estrutura do <i>software</i> desenvolvido.	188
Figura 144 – Tela de informações sobre a análise.....	189
Figura 145 – Tela de controle da bomba.....	190
Figura 146 – Tela de controle do injetor.	191
Figura 147 – Tela de controle do forno.....	192
Figura 148 – Menu “Bomba”.....	193
Figura 149 – Menu “Injetor”.	194
Figura 150 – Menu “Forno”.....	194
Figura 151 – Comparação de três cromatogramas obtidos em fases móveis diferentes.....	204
Figura 152 – Comparação de três cromatogramas obtidos em temperaturas diferentes.	206
Figura 153 – Cromatograma obtido com programação de temperatura.	208
Figura 154 – Comparação entre as melhores condições encontradas para a separação isotérmica e com programação de temperatura.	208

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Nomenclatura proposta por Ishii <i>et al.</i> ²⁸	26
Tabela 2 – Nomenclatura proposta por Verzele e Dewaele ²⁹	26
Tabela 3 – Nomenclatura proposta por Barth <i>et al.</i> ³⁰	27
Tabela 4 – Nomenclatura proposta por Chervet <i>et al.</i> ²⁷ e Vissers ³¹	27
Tabela 5 – Pressão da coluna (back pressure) de colunas convencionais e de cLC.	32
Tabela 6 – Especificações técnicas dos principais sistemas de bombeamento atualmente disponíveis para cLC.	57
Tabela 7 – Principais características do sistema de bombeamento desenvolvido neste projeto.....	60
Tabela 8 – Semelhanças entre os microcontroladores e os microcomputadores.	98
Tabela 9 – Parâmetros utilizados no processo de calibração do fluxo.....	120
Tabela 10 – Dados obtidos durante a calibração do fluxo.....	121
Tabela 11 – Tabela consultada pela DLL com valores de ajuste da rampa.....	151
Tabela 12 – Temperatura constante.....	158
Tabela 13 – Rampas de temperatura.	158
Tabela 14 – Estrutura química das cinco estatinas utilizadas neste projeto.	203

Lista de Abreviaturas e Siglas

ADC	Conversor Analógico-Digital (do inglês <i>Analog-to-Digital Converter</i>)
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Desidrogenase
CEC	Eletrocromatografia Capilar (do inglês <i>Capillary Electrochromatography</i>)
CK	Creatinofosfoquinase
d.i.	Diâmetro interno.
DLL	<i>Dynamic-Link Library</i>
ECD	Detector por Captura de Elétron (do inglês <i>Electron Capture Detector</i>)
EMPV	Válvula de Purga Eletromagnética (do inglês <i>Electromagnetic Purge Valve</i>)
ETFE	Copolímero de etileno-tetrafluoretileno (do inglês <i>Ethylene-Tetrafluoroethylene</i>)
FID	Detector por Ionização em Chama (do inglês <i>Flame Ionization Detector</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i>)
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês <i>High-Performance Liquid-Chromatography</i>)
I²C	Circuito Inter-Integrado (do inglês <i>Inter-Integrated Circuit</i>)
LC	Cromatografia Líquida (do inglês <i>Liquid Chromatography</i>)
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade (do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>)
LED	Diodo Emissor de Luz (do inglês <i>Light Emitting Diode</i>)
MS	Espectrômetro de Massa (do inglês <i>Mass Spectrometry</i>)
PAH	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (do inglês <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>)
PC	Computador Pessoal (do inglês <i>Personal Computer</i>)
PCTFE	Policlorotrifluoretileno (do inglês <i>Polychlorotrifluoroethylene</i>)
PEEK	Polieteretercetona (do inglês <i>Polyetheretherketone</i>)
PTFE	Politetrafluoretileno (do inglês <i>Polytetrafluoroethylene</i>)

PWM	Modulação por Largura de Pulso (do inglês <i>Pulse Width Modulation</i>)
RAM	Memória de Acesso Aleatório (do inglês <i>Random Access Memory</i>)
ROM	Memória Somente de Leitura (do inglês <i>Read-Only Memory</i>)
RTD	<i>Resistive Temperature Detector</i>
SFC	Cromatografia por Fluido Supercrítico (do inglês <i>Supercritical Fluid Chromatography</i>)
SPI	Interface Serial de Periféricos (do inglês <i>Serial Peripheral Interface</i>)
UHMW-PE	Polietileno de Peso Molecular Ultra Alto (do inglês <i>Ultra High Molecular Weight Polyethylene</i>)
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
VAC	Voltagem de corrente alternada
VDC	Voltagem de corrente contínua
VLDL	Lipoproteínas de Densidade Muito Baixa (do inglês <i>Very Low Density Lipoprotein</i>)

Lista de Símbolos

F	Fluxo volumétrico
u	Velocidade linear média
d_c	Diâmetro interno da coluna.
ε	Porosidade da coluna.
V	Tensão elétrica
E_a	Energia de ativação
D_m	Coefficiente de difusão molecular
k_B	Constante de Boltzmann
T	Temperatura
η	Viscosidade
r	Raio
R	Constante dos gases reais
$k_{\text{água}}$	Constante dielétrica da água
k	Fator de retenção
d	Diâmetro
L	Comprimento
ρ	Resistividade elétrica

Sumário

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	21
1. INTRODUÇÃO	22
1.1. <i>Histórico do Desenvolvimento da cLC</i>	22
1.1.1. Miniaturização da coluna de LC	24
1.2. <i>Nomenclaturas Utilizadas</i>	25
1.3. <i>Vantagens Relacionadas à Miniaturização da LC</i>	27
1.3.1. Menor consumo de fase estacionária	28
1.3.2. Menor consumo de fase móvel	28
1.3.3. Pequena quantidade de amostra	29
1.3.4. Aumento na sensibilidade	30
1.3.5. Aplicabilidade de programação de temperatura	31
1.3.6. Facilidade no acoplamento a diversos sistemas de detecção	32
1.3.7. Melhor permeabilidade das colunas	32
1.3.8. Melhor inércia química	33
1.3.9. Diminuição do fluxo ótimo	33
1.3.10. Possibilidade de construção de colunas longas	34
1.3.11. Utilização de colunas menores	34
1.3.12. Facilidade na manutenção	35
1.3.13. Cromatografia unificada	35
1.4. <i>Instrumentação Necessária</i>	36
1.4.1. Sistema de bombeamento	36
1.4.2. Tubulações e conexões	36
1.4.3. Dispositivos de introdução da amostra	37
1.4.4. Colunas	37
1.4.5. Detectores	38
1.4.6. Sistemas de aquisição de dados	38
2. JUSTIFICATIVA	40
3. OBJETIVOS	41

CAPÍTULO II

DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE BOMBEAMENTO PARA CLC	42
1. INTRODUÇÃO	43
1.1. <i>Tipos de Bombas Utilizadas na HPLC</i>	43
1.1.1. Bombas de pressão constante	43
1.1.2. Bombas de volume constante	47
1.2. <i>Bombas Utilizadas Atualmente em cLC</i>	53
1.2.1. Bombas de nano-fluxo da série 1200 (Agilent)	53
1.2.2. Bombas da série Ultimate 3000 (Dionex)	54
1.2.3. LC-20ADnano (Shimadzu)	56
1.2.4. Cap-LC (Waters)	56
1.2.5. Comparação entre os diversos sistemas	57
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	58
3. CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO	59
3.1. <i>Projeto Mecânico</i>	61
3.1.1. Principais componentes mecânicos da bomba	61
3.1.2. Montagem dos componentes mecânicos	80
3.2. <i>Projeto Eletrônico</i>	91

3.2.1. Principais componentes eletromecânicos.....	91
3.2.2. Montagem dos componentes eletromecânicos.....	94
3.2.3. Principais componentes do circuito eletrônico.....	97
3.2.4. Circuito eletrônico	107
3.3. <i>Software – Driver de Instalação para Windows</i>	115
3.3.1. Rotina de inicialização da DLL	116
3.3.2. Rotina de finalização da DLL.....	116
3.3.3. Rotinas principais	118
4. RESULTADOS	120
4.1. <i>Calibração do Fluxo</i>	120
4.2. <i>Testes Realizados em Condições Reais de Uso</i>	121
5. CONCLUSÕES	123

CAPÍTULO III

DESENVOLVIMENTO DO FORNO PARA CLC	124
1. INTRODUÇÃO	125
1.1.1. Viscosidade da fase móvel.....	125
1.1.2. Difusibilidade molecular.....	125
1.1.3. Constante dielétrica da água	126
1.2. <i>Efeitos da Temperatura na Eficiência da Coluna</i>	126
1.3. <i>Histórico da Programação de Temperatura na cLC</i>	128
1.4. <i>Degradabilidade de Compostos Instáveis</i>	129
1.5. <i>Instrumentação Necessária</i>	130
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	131
3. CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO	132
3.1. <i>Projeto Mecânico</i>	132
3.1.1. Principais componentes mecânicos.....	132
3.2. <i>Projeto Eletrônico</i>	136
3.2.1. Principais componentes eletromecânicos.....	136
3.2.2. Principais componentes do circuito eletrônico.....	140
3.2.3. Circuito eletrônico	142
3.3. <i>Software – Driver de Instalação para Windows</i>	148
3.3.1. Rotina de inicialização da DLL	148
3.3.2. Rotina de finalização da DLL.....	150
3.3.3. Rotinas principais	150
4. RESULTADOS	154
4.1. <i>Calibração do Forno</i>	154
4.2. <i>Fórmulas Utilizadas Pela Rotina de Controle da Temperatura</i>	154
4.3. <i>Funcionalidade</i>	157
4.4. <i>Separação Teste (PAHs) Utilizando Colunas Empacotadas</i>	159
4.4.1. Materiais e métodos.....	159
4.4.2. Resultados.....	160
4.5. <i>Separação Teste (PAHs) Utilizando Colunas Monolíticas</i>	161
4.5.1. Materiais e métodos.....	161
4.5.2. Resultados.....	162
5. CONCLUSÕES	164

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA DE INJEÇÃO À BASE DE TEMPO PARA CLC..... 165

1. INTRODUÇÃO	166
1.1.1. Válvulas de injeção com <i>loop</i> externo	167
1.1.2. Válvulas de injeção com <i>loop</i> interno	168
2. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	170
3. CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO	172
3.1. <i>Projeto Mecânico</i>	172
3.2. <i>Projeto Eletrônico</i>	172
3.2.1. Conversor RS232-USB	174
3.3. <i>Software – Driver de Instalação para Windows</i>	174
3.3.1. Rotina de inicialização da DLL	174
3.3.2. Rotina de finalização da DLL	176
3.3.3. Rotinas principais da DLL	176
4. RESULTADOS	179
4.1. <i>Calibração dos Volumes de Injeção</i>	179
4.1.1. Materiais e métodos	179
4.1.2. Resultados	180
5. CONCLUSÕES	183

CAPÍTULO V

DESENVOLVIMENTO DO SOFTWARE..... 184

1. INTRODUÇÃO	185
1.1. <i>Linguagem de Máquina</i>	185
1.2. <i>Linguagem Assembly</i>	185
1.3. <i>Linguagem de Alto Nível</i>	186
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	187
3. DESENVOLVIMENTO DO <i>SOFTWARE</i>	188
3.1. <i>Janela de Monitoramento da Análise</i>	188
3.2. <i>Janela de Controle da Bomba</i>	189
3.3. <i>Janela de Controle do Injetor</i>	191
3.4. <i>Janela de Controle do Forno</i>	191
3.5. <i>Menus de Controle</i>	192
4. CONCLUSÃO	195

CAPÍTULO VI

APLICAÇÃO: SEPARAÇÕES DE ESTATINAS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CAPILAR COM PROGRAMAÇÃO DE TEMPERATURA (TP-CLC)..... 196

1. INTRODUÇÃO	197
1.1. <i>Características Farmacológicas</i>	197
1.1.1. Efeitos não-hipolipemiantes	199
1.2. <i>Características Químicas</i>	200
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	201
3. MATERIAIS E MÉTODOS	202

3.1. Equipamentos	202
3.2. Reagentes	202
4. RESULTADOS	204
4.1. Estudo da Fase Móvel	204
4.2. Estudo da Temperatura	205
4.3. Programação de Temperatura.....	207
5. CONCLUSÕES	209

CAPÍTULO VII

CONCLUSÕES GERAIS	210
--------------------------------	------------

CAPÍTULO VIII

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	212
---	------------

Capítulo I

Introdução, Justificativa e Objetivos

1. Introdução

Desde a última metade do século XX vem sendo observado um grande crescimento na demanda de técnicas analíticas que resolvam amostras complexas. Isto se deve, em parte, ao aparecimento das indústrias petroquímicas, das companhias de processamento de alimentos, da necessidade de melhorias nos produtos farmacêuticos, do surgimento da biotecnologia e das questões relativas às contaminações ambientais¹.

Com o aumento do interesse em amostras complexas e da necessidade de técnicas mais sensíveis, rápidas e confiáveis, atualmente a cromatografia líquida capilar (cLC – do inglês *Capillary Liquid Chromatography*) vem despertando grande interesse da comunidade científica.

1.1. Histórico do Desenvolvimento da cLC

Nos últimos 70 anos a cromatografia líquida (LC – do inglês *Liquid Chromatography*) veio presenciando grandes saltos de inovações em praticamente todos os seus aspectos como, por exemplo, o desenvolvimento da cromatografia de partição ocorrida na década de 40, o desenvolvimento da cromatografia de troca iônica na década de 50 e o desenvolvimento da sua versão instrumental na década de 60, entre muitos outros²⁻⁴.

No entanto, diferentemente do rápido desenvolvimento presenciado pela cromatografia gasosa (GC – do inglês *Gas Chromatography*) que em apenas 10 anos de existência já possuía sua versão capilar e em 20 anos já tinha atingido sua maturidade como técnica de separação, o desenvolvimento da LC não tem sido tão empolgante.

Apesar da LC ter sido o primeiro modo cromatográfico a ser desenvolvido no início do século XX – 50 anos antes da GC – por quase 70 anos ela foi utilizada sem grandes modificações, fazendo com que a sua versão instrumental (a HPLC – do inglês *High-Performance Liquid Chromatography*) só fosse desenvolvida duas décadas após o desenvolvimento do primeiro cromatógrafo gasoso instrumental⁵.

As primeiras colunas desenvolvidas para a HPLC possuíam entre 1,6-3,0 mm de diâmetro interno (d.i.) x 50-100 cm de comprimento e eram, geralmente, empacotadas com partículas de 30 µm recobertas com uma fase estacionária pelicular.

Entretanto, quando surgiram as primeiras fases estacionárias compostas de micropartículas porosas de 5-10 µm, foi observado que as novas colunas de 1,6-3,0 mm d.i. empacotadas com o novo material, diferentemente do esperado, possuíam uma menor eficiência quando comparadas com colunas de diâmetro interno maiores (5-6 mm) empacotadas com o mesmo material. Esta observação fez com que grande parte dos cromatografistas da época acreditasse, erroneamente, que colunas de pequeno diâmetro interno possuíam intrinsecamente eficiências menores que as de grande diâmetro interno, o que fez com que as colunas de 5-6 mm d.i. se tornassem o novo padrão a partir de então⁶.

Na realidade, a menor eficiência obtida pelas novas colunas de pequeno diâmetro interno, não estava intrinsecamente relacionada à sua dimensão, como se acreditava, mas sim a um excessivo alargamento de banda ocorrido tanto dentro da coluna (devido à limitada tecnologia de empacotamento existente na época), quanto fora da coluna (devido utilização de detectores que eram inadequados aos picos estreitos normalmente eluidos da mesma).

Tais detectores eram projetados para serem utilizados, principalmente, com colunas de 2,1 mm d.i. x 500 mm de comprimento, que possuíam em torno de 500 pratos teóricos, ou seja, eles eram projetados para a detecção de picos com um volume de eluição em torno de 200 µl ou maiores. Já uma coluna de 2,1 mm de d.i. x 250 mm de comprimento empacotada com as novas partículas de 5-10 µm podiam atingir até 10.000 pratos teóricos fornecendo assim, para um pico não retido, um volume de eluição em torno de 24 µl que, obviamente, era muito estreito para as antigas celas de detecção de 8 µl utilizadas na época.

Apesar das colunas de 5-6 mm d.i. x 250 mm de comprimento fornecerem, para um pico não retido, um volume de eluição em torno de 100 µl (duas vezes mais

estreitos que os picos eluidos de suas antecessoras de 1,6-3,0 mm d.i.), este ainda podia ser detectado em uma cela de 8 µl sem significativa perda de eficiência. No entanto, devido ao processo de diluição intrinsecamente associado à cromatografia, estas colunas forneciam picos com concentrações tão baixas quanto as primeiras colunas de 1,6-3,0 mm d.i. empacotadas com fase estacionária pelicular desenvolvidas para a HPLC⁷ – embora o seu número de pratos teóricos fosse 20 vezes maior⁶.

Deste modo, quando surgiram as primeiras fases estacionárias porosas de 5-10 µm, havia a necessidade de se redesenhar todo o equipamento cromatográfico (incluindo os detectores) para que o mesmo se adaptasse as novas colunas, no entanto, ocorreu o inverso, as colunas tiveram seu diâmetro interno aumentado para que se adaptassem aos equipamentos⁸.

1.1.1. Miniaturização da coluna de LC

Devido ao desenvolvimento tardio de sua instrumentação, o processo de miniaturização das colunas utilizadas na LC teve seu início somente dez anos após a introdução das colunas capilares na GC⁹, com os trabalhos pioneiros de Horváth *et al.*^{10, 11}, Ishii *et al.*¹²⁻¹⁷, Scott e Kucera¹⁸⁻²³ e Tsuda, Hirata e Novotny²⁴⁻²⁶.

Em 1967, Horváth *et al.* publicaram seu primeiro trabalho¹⁰ relacionado com colunas capilares que focava o estudo da dispersão do pico ocorrido em colunas tubulares abertas de aço-inox de 0,3 mm de d.i. (sem fase estacionária) e em colunas de aço-inox de 1 mm de d.i. empacotadas com partículas de 50 µm recobertas com uma fase estacionária pelicular de troca iônica.

Posteriormente, em 1969 Horváth e Lipsky publicaram um novo trabalho¹¹ que discutia diversos fatores que influenciavam a separação de ribonucleotídeos utilizando colunas de aço-inox de 1 mm de d.i. empacotadas com partículas recobertas com resina pelicular de troca catiônica.

Um novo passo no sentido da miniaturização da LC foi dado por Ishii *et al.*¹²⁻¹⁷ que em 1973 separaram com sucesso, hidrocarbonetos aromáticos polinucleares utilizando uma coluna de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,5 mm d.i. e 15 cm de comprimento empacotada com partículas de 30 µm.

Três anos mais tarde, Scott e Kucera¹⁸⁻²³ relataram a separação de alquil-benzenos com alta eficiência em colunas de aço-inox de 1 mm d.i. e 10 m de comprimento e em 1978, Tsuda e Novotny²⁴⁻²⁶ publicaram um trabalho que estudava o desempenho de colunas de diversos diâmetros internos (50-200 µm) empacotadas com diferentes tamanhos de partículas (10-100 µm).

Apesar desse início promissor, a miniaturização da LC continuou bastante lenta nos últimos 40 anos e só recentemente ela (re)começou a receber a atenção merecida.

1.2. Nomenclaturas Utilizadas

Atualmente, existe muita discussão a respeito do sistema de nomenclatura a ser empregado na classificação da LC. A maioria das técnicas tem sido classificada com base no tipo ou diâmetro interno da coluna cromatográfica, todavia, com o uso de novos materiais para a manufatura dos tubos, como tubos de sílica fundida, tubos poliméricos, tubos de aço inoxidável, etc., esta nomenclatura vem se tornando insuficientemente precisa²⁷.

Ishii²⁸ foi um dos primeiros autores a sugerir uma classificação das colunas de acordo com o diâmetro interno das mesmas, como mostrado pela Tabela 1.

Tabela 1 – Nomenclatura proposta por Ishii *et al.*²⁸

Diâmetro interno	Nomenclatura
4,6 mm	HPLC convencional
1,5 mm	semi-micro HPLC
0,46 mm	micro-HPLC
0,15 mm	ultramicro-HPLC
0,2-0,05 mm	colunas micro-capilares (fracamente) empacotadas
0,06-0,01mm	coluna (capilar) tubular aberta

Verzele e Dewaele²⁹ sugeriram que a classificação (Tabela 2) deveria levar em conta, além do diâmetro interno, os vários tipos de colunas (metálicas, sílica fundida, tubulares abertas, etc).

Tabela 2 – Nomenclatura proposta por Verzele e Dewaele²⁹.

Diâmetro Interno	Tipo	Nomenclatura
5 mm ou maiores	metálicas empacotadas	LC preparativa
5-3 mm	metálicas empacotadas	LC ou LC convencional
2-1 mm	metálicas empacotadas	colunas microbore
100-25 µm	tubulares abertas de vidro ou sílica fundida semi-empacotadas	SPOT-LC
-	tubulares abertas com paredes recobertas com material poroso	PLOT-LC
-	tubulares abertas com paredes recobertas com suportes revestidos	SCOT-LC
-	tubulares abertas com paredes recobertas	WCOT-LC ou LC capilar

Aproximadamente na mesma época Barth *et al.*³⁰ usaram um sistema simplificado (Tabela 3) que também se baseava no diâmetro interno do tubo.

Tabela 3 – Nomenclatura proposta por Barth *et al.*³⁰

Diâmetro interno	Nomenclatura
2-0,5 mm	colunas microbore
< 0,5 mm	colunas de micro-LC

Recentemente, Chervet *et al.*²⁷, seguidos por Vissers³¹, classificaram a LC de acordo com a faixa do fluxo da fase móvel (Tabela 4).

Tabela 4 – Nomenclatura proposta por Chervet *et al.*²⁷ e Vissers³¹.

Diâmetro Interno	Fluxo	Nomenclatura
4,6-3,2 mm	0,5-2,0 mL/min	HPLC convencional
3,2-1,5 mm	100-500 µL/min	HPLC microbore
1,5-0,5 mm	10-100 µL/min	Micro-LC
500-150 µm	1-10 µL/min	LC capilar
150-10 µm	10-1000 nL/min	nano-LC

Embora as diversas classificações citadas difiram em um ou mais pontos, todas consideram que as colunas de diâmetro interno menor que 500 µm não são mais classificadas como colunas de HPLC convencional. Deste modo, estipularemos neste texto o uso do termo “cromatografia líquida capilar” (cLC) à todas as técnicas que utilizam colunas com diâmetro interno igual ou menores que 500 µm.

1.3. Vantagens Relacionadas à Miniaturização da LC

Um ponto importante que deve ser ressaltado no que diz respeito à miniaturização da coluna de LC é que seu principal interesse não está relacionado com o

decréscimo do tamanho da instrumentação, mas sim, pelo fato dela trazer muitas vantagens relacionadas ao custo e, principalmente, à eficiência da técnica¹.

Devido às inúmeras vantagens que permitem sua aplicação em áreas onde a HPLC convencional não se mostra totalmente adequada, atualmente a cLC vem sendo considerada como uma técnica complementar a HPLC. A seguir algumas dessas vantagens serão discutidas.

1.3.1. Menor consumo de fase estacionária

Provavelmente a vantagem mais imediata da redução do diâmetro interno das colunas cromatográficas esteja na redução da quantidade de fase estacionária utilizada. Para colunas empacotadas, o volume que a fase estacionária ocupa dentro de uma coluna é proporcional ao comprimento da coluna e ao quadrado do diâmetro interno da mesma. Deste modo, uma coluna que possui um diâmetro interno de 0,32 mm consumirá uma quantidade de fase estacionária em torno de 200 vezes menor que aquela utilizada no empacotamento de uma coluna de 4,6 mm d.i. Essa enorme redução pode tornar viável o uso de fases estacionárias que normalmente não são utilizadas na HPLC convencional devido ao seu alto custo ou porque se possui em pequenas quantidades.

1.3.2. Menor consumo de fase móvel

Semelhantemente a redução do consumo de fase estacionária, a redução do diâmetro interno das colunas também implicará na redução do consumo da fase móvel.

Uma vez que a separação cromatográfica não é dependente do fluxo volumétrico de fase móvel, mas sim de sua velocidade linear média (u), uma mesma separação poderá ser atingida em duas colunas semelhantes, porém, de diferentes diâmetros internos, se mantivermos a mesma velocidade média linear para ambas^{21, 28, 32, 33}.

A relação entre o fluxo volumétrico (F) da fase móvel e sua velocidade linear média (u) é dada pela seguinte equação:

$$F = \frac{u \pi d_c^2 \varepsilon}{4}$$

Equação 1

onde d_c é o diâmetro interno da coluna e ε a porosidade da mesma.

Deste modo, considerando que a HPLC utiliza fluxos da fase móvel entre 0,5-1,5 mL/min em colunas de 4,6 mm d.i., o fluxo previsto para uma coluna de 0,32 mm d.i. será cerca de 2,5-7,0 μ L/min.

Em um típico laboratório onde um cromatógrafo provavelmente estará em funcionamento 8 horas por dia, 5 dias por semana, 20 dias por mês e 12 meses por ano, mais de 100 L de solventes utilizados como fase móvel serão produzidos em um período de apenas um ano caso esse laboratório utilize colunas de 4,6 mm de d.i. A maioria desses solventes são altamente tóxicos para o homem e para o ambiente, requerendo assim uma estocagem, transporte e descarte especiais⁵.

Já no caso desse mesmo laboratório utilizar colunas de 0,32 mm de d.i. o volume de fase móvel descartado poderá ser reduzido em torno de 200 vezes, resultando assim em um consumo de apenas 500 ml de fase móvel no mesmo período de funcionamento. Em muitos casos a quantidade total de fase móvel necessária para uma única separação poderá ser de menos de 150 μ L (5 μ L/min; 30 minutos por análise). Isto explica porque a cLC também é chamada de “cromatografia de uma gota”.

Devido à significativa redução no consumo de fase móvel, a miniaturização da coluna possibilitará o uso de fases móveis de alto custo, como fases com modificadores quirais e solventes deuterados, assim como fases móveis tóxicas e inflamáveis sem que os mesmos forneçam grandes riscos à segurança do laboratório ou à saúde dos analistas.

1.3.3. Pequena quantidade de amostra

Devido à pequena quantidade de fase estacionária contida dentro da coluna, a quantidade de amostra que pode ser introduzida sem que se sobrecarregue a coluna podem ser tão pequena quanto 700 nL para colunas de 1,0 mm d.i. x 25 cm de

comprimento até cerca de 3 nL para colunas de 75 μm d.i. x 15 cm de comprimento, considerando que ambas estejam empacotadas com partículas de 5 μm ³⁴.

Esta característica é de extrema importância em situações que não se dispõe de grande quantidade de amostras como nas áreas de estudos biomédicos, química forense, produtos naturais entre muitas outras.

1.3.4. Aumento na sensibilidade

Uma vez que o processo de diluição ocorrido dentro de uma coluna cromatográfica é inversamente proporcional ao quadrado do seu diâmetro interno, a concentração de um analito eluído de uma coluna capilar de 0,32 mm d.i. será de cerca de 200 vezes maior que a concentração desse mesmo analito eluído de uma coluna convencional de 4,6 mm d.i. caso as duas separações sejam realizadas em condições cromatográficas semelhantes. Deste modo, se um detector sensível à concentração (UV-Vis, fluorescência, índice de refração, etc.) for utilizado haverá um ganho na sensibilidade na detecção dos picos eluídos.

Entende-se por “condições cromatográficas semelhantes” as condições onde a eficiência das duas colunas, o comprimento das mesmas, o caminho ótico utilizado nas duas detecções e a quantidade em massa do analito injetado sejam, essencialmente, os mesmos.

Na prática, dificilmente condições idênticas poderão ser utilizadas nas separações em escala convencional e capilar, principalmente no que diz respeito a injeção da mesma massa de analito em ambas as colunas já que a capacidade de amostra de uma coluna capilar é muito reduzido. Desta forma, esta vantagem da cLC frente a HPLC somente será válida nos casos onde a quantidade de amostra disponível for menor que a capacidade de amostra da coluna capilar^{2, 28, 35}. A Figura 1 ilustra três cromatogramas simulados em condições cromatográficas semelhantes para três colunas de diferentes diâmetros interno.

Figura 1 – Cromatogramas simulados ilustrando o ganho de sensibilidade em colunas de diversos diâmetros interno: a) 0,320 mm; b) 2,1 mm; c) 4,6 mm.

1.3.5. Aplicabilidade de programação de temperatura

Apesar da programação de temperatura ser uma técnica muito utilizada na cromatografia gasosa, ela é de difícil aplicação na HPLC devido ao gradiente radial de temperatura formado dentro da coluna. Este gradiente é criado principalmente devido ao alto fluxo de fase móvel, grande diâmetro interno e alta capacidade térmica das colunas utilizadas pela HPLC. Deste modo, uma vez que a cLC utiliza baixos fluxos de fase móvel e colunas de pequeno diâmetro interno que possuem baixa capacidade térmica, a programação de temperatura nesta técnica se torna viável.

1.3.6. Facilidade no acoplamento a diversos sistemas de detecção

Devido ao baixo fluxo utilizado na cLC é possível o acoplamento direto com diferentes sistemas de detecção como, por exemplo, ao espectrômetro de massa (MS – do inglês *Mass Spectrometry*) e aos detectores normalmente só utilizados na GC como o detector por ionização em chama (FID – do inglês *Flame Ionization Detector*) e detector por captura de elétrons (ECD – do inglês *Electron Capture Detector*).

1.3.7. Melhor permeabilidade das colunas

Dados obtidos por Verzele³⁶ (Tabela 5) demonstram que as colunas capilares possuem uma permeabilidade cerca de duas vezes maior que as colunas utilizadas na HPLC convencional.

Tabela 5 – Pressão da coluna (back pressure) de colunas convencionais e de cLC.

Material de Empacotamento	Pressão da Coluna* (bar)		Razão Conv./cLC
	Coluna convencional 4,6 mm x 25 cm	Coluna capilar 0,32 mm x 25 cm	
10-µm ROSil-C18-HL-D	23	13	1,77
5-µm Spherisorb-ODS	49	26	1,88
2-µm ROSil-C18-D	437	228	1,91
1-µm ROSil-C18-D	1190	602	1,97

* Os valores das pressões abaixo de 350 bar foram obtidos diretamente do equipamento, valores de pressões maiores que 350 bar foram obtidas por extrapolação linear; condições cromatográficas: fase móvel: 90:10 (v/v) acetonitrila/água; fluxo: 0,826 mL/min (coluna de 4,6 mm), 4 µL/min (coluna de 0,32 mm); $u = 1,728$ mm/s (para as duas colunas). Dados reproduzidos da referência 36.

A principal vantagem deste fato é a significativa redução da pressão da coluna que poderá proporcionar a utilização de partículas menores que as utilizadas na HPLC convencional ou a utilização de colunas mais compridas, o que permitirá, em ambos os casos, análises com alta eficiência.

As razões desta melhor permeabilidade ainda não são claras. Segundo Verzele³⁶ a melhor explicação seria que a densidade de empacotamento nas colunas de sílica fundida é menor. No entanto, esta menor densidade diferentemente do que ocorre em colunas de grandes diâmetros internos, não acarretaria em uma menor estabilidade para as colunas capilares devido ao seu pequeno diâmetro interno e conseqüente efeito de compressão (*pinching effect*) da parede da coluna sobre o empacotamento.

1.3.8. Melhor inércia química

Tem sido demonstrada na literatura³⁷ uma influência negativa de traços de metais no material de empacotamento, assim como nas paredes das colunas. Certamente, colunas de sílica fundida, devido à sua inércia química característica, reduziram consideravelmente este tipo de problema.

1.3.9. Diminuição do fluxo ótimo

Como pode ser visto na Figura 2, as curvas de eficiência relacionada à altura de um prato em função da velocidade linear média (gráfico de *van Deemter*) para colunas convencionais e microcolunas, apesar de teoricamente esperar-se o mesmo comportamento, são diferentes na prática^{36, 38}. Observa-se que as colunas de cLC possuem o valor de velocidade linear ótima cerca de 2 a 3 vezes menores que o esperado quando comparadas as colunas convencionais.

A conseqüência prática desta diminuição da velocidade linear ótima é que a utilização fluxos lentos reduz consideravelmente a pressão do sistema, possibilitando assim às colunas de cLC serem mais compridas ou empacotadas com partículas menores que na HPLC convencionais gerando, em ambos os casos, colunas mais eficientes.

Figura 2 – Gráfico de *van Deemter* para colunas empacotadas. Colunas: 4,6 mm x 15 cm (convencional) e 0,32 mm x 15 cm (capilar de sílica fundida); fase estacionária: 5- μ m ROSil-C18-D; fase móvel: 75:25 (v/v) acetonitrila/água; detector: UV (254 nm); composto: pireno. Adaptado da referência 36.

1.3.10. Possibilidade de construção de colunas longas

Na HPLC convencional o número de pratos não é proporcional ao comprimento da coluna quando várias colunas são conectadas em série. Um das vantagens da cLC é a facilidade do uso de longas colunas, o que resultaria num elevado número de pratos. Isto se deve à diminuição da difusão por múltiplos caminhos e pela eficiente transferência de calor gerado pela queda de pressão na coluna. Tal geração de calor afeta o processo de transferência de massa, o que resulta numa baixa eficiência.

1.3.11. Utilização de colunas menores

Devido à grande eficiência das colunas utilizadas na cLC existe também a possibilidade de se utilizar colunas mais curtas com material de empacotamento menores, o que tem se tornado de grande interesse pelo fato disto oferecer muitas vantagens sobre os métodos convencionais como, por exemplo, a diminuição do custo e do tempo de análise e a possibilidade de analisar amostras instáveis.

1.3.12. Facilidade na manutenção

Uma vez que as colunas de sílica fundida são, pelo menos, parcialmente transparentes, pode-se inspecionar visualmente problemas como vazios, canais, etc. Caso necessário pode-se utilizar revestimentos externos totalmente transparentes como silicones ao invés de poliimidas, uma vez que as colunas de LC, ao contrário das de GC, não são submetidas a temperaturas elevadas.

Outra vantagem advém das características da sílica: caso a parte superior de uma coluna se torne suja (por exemplo, devido à injeção de amostras sujas) pode-se cortar uma pequena parte da coluna, com facilidade, sem prejuízo de seu desempenho, o que é impossível de ser realizado com colunas convencionais de aço inox utilizadas na HPLC.

1.3.13. Cromatografia unificada

Uma das principais vantagens da miniaturização da LC, assim como da GC e da cromatografia por fluido supercrítico (SFC), está na possibilidade do desenvolvimento da cromatografia unificada.

Devido a vários fatores, incluindo interesses comerciais de várias companhias, a família das técnicas cromatográficas teve seu desenvolvimento em instrumentos completamente diferentes⁵. Entretanto, como apontado por Giddings³⁹, a divisão da cromatografia em várias técnicas é artificial e improdutiva. Giddings também postulou que a GC, a LC e a SFC são apenas diferentes formas de apresentar a mesma técnica devido às particularidades na fase móvel.

A primeira demonstração prática que a GC, LC e SFC são complementares e podem ser efetuadas em um mesmo instrumento foi realizada por Ishii *et al.*⁴⁰ em 1988.

1.4. Instrumentação Necessária

Embora a cLC possua todas as vantagens já discutidas em relação a HPLC convencional, para que tal técnica obtenha o máximo desempenho, toda a instrumentação (injetor, tubulações, conexões, celas de detecção, etc) deve ser redimensionada de acordo com o volume da coluna.

1.4.1. Sistema de bombeamento

O sistema de bombeamento da fase móvel utilizado na cLC deve ser capaz de fornecer um faixa de fluxos que vai desde nL até poucos μL por minuto. As melhores bombas utilizadas atualmente para tal finalidade são as do tipo seringa e do tipo pistão recíprocante, tendo esta última um melhor desempenho devido a grande habilidade de compensação da pressão da coluna (*back pressure*), rápida estabilização do fluxo e a facilidade de criação de gradiente^{28, 33, 41-44}.

A maioria dos sistemas de bombeamento para cLC atualmente disponíveis comercialmente utiliza sistemas de divisão de fluxos conhecidos como *splitters*⁴⁵⁻⁴⁸. No entanto, tais sistemas possuem várias limitações, como por exemplo, a dependência do fator de divisão quanto à pressão na coluna. Além disso, a utilização de divisores de fluxos não acarreta numa diminuição do consumo da fase móvel fazendo com que os sistemas que não utilizam sistemas de divisão sejam mais atrativos e econômicos.

1.4.2. Tubulações e conexões

A tubulação utilizada nas conexões das diferentes partes do equipamento contribui para a variância do alargamento da banda de forma linear quanto ao comprimento e na quarta potência quanto ao seu raio fazendo com que a escolha das dimensões do tubo seja extremamente importante³¹.

Para colunas de 0,5-1,0 mm d.i., tubulações de aço-inox especialmente desenvolvidas de 0,25 ou 0,125 mm d.i. são geralmente aplicadas. Alternativamente

tubulações de PEEK ou sílica fundida podem ser utilizadas. Já para colunas de diâmetro interno menor que 500 μm o uso de tubulações deve ser evitada sempre que possível, devendo deste modo, conectar a coluna diretamente no injetor e no detector.

Quando não for possível essa conexão direta, tubulações de diâmetro interno menor que 50 μm devem ser utilizadas. Todas as conexões devem ser feitas evitando volumes mortos, o que pode ser atingido utilizando uniões ZDV (*zero dead volume*).

1.4.3. Dispositivos de introdução da amostra

O volume de amostra que deve ser injetado em colunas capilares empacotadas é proporcional ao quadrado do diâmetro interno da coluna. Normalmente os pequenos volumes de injeção requeridos pela cLC podem ser atingidos facilmente e com grande repetibilidade utilizando válvulas comercialmente disponíveis, mas, caso se necessite de volumes de injeção menores que aqueles fornecidos pelas válvulas, pode-se empregar diversas técnicas de injeção descritas na literatura⁴⁹⁻⁵¹. Atualmente, válvulas de até 4 nL podem ser encontradas comercialmente.

1.4.4. Colunas

Assim como ocorreu com a cromatografia gasosa, os dois principais tipos de colunas estudados para cLC são as colunas empacotadas e colunas tubulares abertas (WCOT – Wall-Coated Open-Tubular).

Esta última geralmente consiste de um tubo de sílica fundida com um filme fino de fase estacionária recobrindo sua parede interna. Este tipo de coluna é essencialmente igual às utilizadas na cromatografia gasosa capilar. Normalmente a fase estacionária utilizada neste tipo de coluna pode sofrer um processo de *cross-link* ou podem ser imobilizadas na parede do capilar para evitar a remoção da fase estacionária pelo

eluente. A principal desvantagem desse tipo de coluna é que elas precisam possuir um diâmetro interno menor que 20 µm para que possuam uma boa eficiência.

Apesar de teoricamente este tipo de coluna fornecer melhores resultados quando comparadas às colunas empacotadas, devido aos pequenos volumes envolvidos na sua utilização, impostas principalmente pela pequena capacidade de amostra desse tipo de coluna, sua utilização fora do meio acadêmico atualmente ainda é impraticável⁵.

Como alternativa, as colunas empacotadas e monolíticas que utilizam a mesma tecnologia de preparação que as de HPLC tem ganhado muita aceitação na área da cLC. Diferentes técnicas de empacotamento vêm sendo relatadas utilizando diversos meios de se transferir a fase estacionária do reservatório externo para dentro das colunas⁵², os quais incluem a utilização de gases⁵³⁻⁵⁵, dióxido de carbono supercrítico⁵⁶⁻⁶⁰ ou líquidos^{12, 61}.

1.4.5. Detectores

Praticamente todos os tipos de detectores utilizados na HPLC podem ser utilizados na cLC. A maior modificação necessária para que eles se adaptem ao pequeno volume de injeção sem que haja um alargamento excessivo do pico, na maioria dos casos, é o decréscimo no volume da cela de detecção⁵.

Além dos sistemas de detecção normalmente utilizados na HPLC convencional, como a espectrofotometria na região do UV-Vis e a fluorescência, diversos outros sistemas que são de difícil acoplamento na HPLC convencional podem ser utilizados, como por exemplo, espectrômetro de massas (MS), ressonância magnética nuclear (NMR), detecção por ionização em chama (FID), detecção por captura de elétrons (ECD), etc.

1.4.6. Sistemas de aquisição de dados

O sistema de aquisição de dados na cromatografia tem um papel muito importante, mas que muitas vezes é menosprezado pelos cromatografistas. Um sistema de aquisição mal projetado (ou mal utilizado) pode influenciar negativamente numa análise

tanto quanto uma coluna com baixa eficiência. Isto ocorre devido ao alargamento do pico causado, por exemplo, pela utilização de filtros analógicos de alta constante de tempo. Esse efeito de alargamento do pico é muito semelhante ao que ocorre quando se utiliza uma coluna com baixa eficiência e, deste modo, é muito comum se confundir um sistema de aquisição mal projetado/utilizado com uma coluna deteriorada.

Além da aparente falta de eficiência na separação, a frequência de aquisição do sinal proveniente do detector também pode degradar a exatidão da quantificação do mesmo. Na HPLC convencional (colunas de 4,6 mm de d.i.) a taxa de amostragem considerada suficiente para uma integração “exata” é de 20 a 30 pontos por pico. Uma vez que os picos eluidos de colunas capilares tendem a serem mais estreitos que aqueles eluidos das colunas de HPLC convencional, para que o esse número seja mantido, devemos aumentar a frequência de aquisição do sinal analítico na mesma razão da redução da largura do pico.

Deste modo, os sistemas de aquisição de dados projetados para a HPLC convencional não podem ser utilizados na cLC uma vez que estes forneceria uma frequência de amostragem inferior àquela necessária para a detecção dos picos estreitos comuns nas técnicas miniaturizadas.

2. Justificativa

Apesar das primeiras colunas capilares para a LC terem sido desenvolvidas há quase 40 anos, até hoje o seu uso vem sendo bastante restrito, principalmente devido à falta de equipamentos adequados às suas dimensões.

Embora atualmente já existam instrumentos comercialmente disponíveis desenvolvidos para micro e nano volumes, nenhum deles atingiu um satisfatório desempenho, pois a grande maioria não passa de adaptações de sistemas convencionais, enquanto os novos sistemas ditos desenvolvidos para cLC ainda permanecem sobredimensionados⁴⁵. Deste modo, ainda há uma carência de sistemas totalmente dedicados às técnicas miniaturizadas que deve ser suprida antes de nos beneficiarmos de todas as vantagens intrínsecas à miniaturização da LC.

3. Objetivos

Este projeto tem como objetivo desenvolver instrumentação dedicada à cromatografia líquida capilar, incluindo:

- Desenvolvimento de um sistema de bombeamento inteligente (microcontrolado) para micro-volumes com *check valves* ativas, sem a utilização de divisores de fluxos (*splitters*);
- Desenvolvimento de fornos, assim como sistemas de controle e programação de temperatura, para microcolunas;
- Desenvolvimento de um injetor para pequenos volumes utilizando técnica de injeção a base de tempo;
- Desenvolvimento de *softwares* para o controle do sistema instrumental (bombas, válvulas, injetor, forno, etc);
- Aplicação dos equipamentos desenvolvidos em análise de fármacos.

Capítulo II

Desenvolvimento do Sistema de Bombeamento para cLC

1. Introdução

A função de um sistema de bombeamento na cromatografia líquida é fornecer um fluxo de fase móvel constante, preciso, reproduzível e sem pulsação. Devido a grande resistência ao fluxo oferecida pelas pequenas partículas utilizadas como fase estacionária, o sistema de bombeamento também deve ser capaz de operar a pressões tão altas quanto – ou mesmo acima de – 5.000 psi^{2, 62}.

Além dessas características, uma bomba de HPLC também deve ser capaz de fornecer uma larga faixa de fluxo, ser robusta e quimicamente inerte. Atualmente os materiais mais utilizados na construção das bombas para HPLC são o aço-inox (316 e 316L), titânio, PEEK (polieteretercetona), PTFE (politetrafluoretileno)*, ETFE (copolímero de etileno-tetrafluoretileno)[†], PCTFE (policlorotrifluoretileno)[‡], UHMW-PE (polietileno de peso molecular ultra alto), safira, rubi e materiais cerâmicos como o ZrO₂ (zircônia) e Al₂O₃ (alumina).

Dentre os diversos equipamentos que compõe um sistema cromatográfico, provavelmente o sistema de bombeamento é componente que possui o maior número de tipos e design diferentes. Os diversos tipos de bombas podem ser divididos, quanto ao seu modo de operação, em dois grandes grupos: bombas de pressão constante e bombas de volume constante.

1.1. Tipos de Bombas Utilizadas na HPLC

1.1.1. Bombas de pressão constante

Bombas de pressão constante utilizam um gás para impulsionar a fase móvel através da coluna, por esse motivo elas também são conhecidas como bombas

* Teflon[®]

† Tefzel[®]

‡ Kel-F[®] ou Neoflon[®]

pneumáticas. Existem basicamente dois tipos de bombas de pressão constante: bombas sem amplificação pneumática e com amplificação pneumática. A seguir serão discutidas as principais características, assim como, as principais vantagens e desvantagens destes dois tipos de bombas.

1.1.1.1. Bombas sem amplificação pneumática

Neste tipo de bomba, a fase móvel é acondicionada dentro de um reservatório convenientemente construído com uma entrada para o gás e uma saída para a fase móvel. A pressão com a qual a fase móvel é bombeada neste tipo de bomba é igual à pressão do gás utilizado, podendo este, exercer pressão diretamente sobre a superfície da fase móvel (Figura 3a e Figura 3b), ou indiretamente, através de um diafragma (Figura 3c) ou pistão (Figura 3d).

Figura 3 – Esquemas de diversos modelos de bombas de pressão constante. Adaptado da referência 63.

Entre as principais vantagens desse tipo de bomba estão a sua construção extremamente simples, baixo custo e fluxo gerado livre de pulsação, enquanto entre as principais desvantagens estão a pressão de trabalho limitada à pressão do cilindro do gás utilizado (geralmente abaixo de 200 bar), constantes interrupções das análises para o reabastecimento do reservatório da fase móvel, nos sistemas nos quais o gás exerce pressão diretamente sobre a fase móvel pode ainda haver geração de bolhas dentro do detector (devido a solubilização do gás) e a incapacidade de se gerar gradientes.

Para se minimizar o problema da solubilização do gás na fase móvel, diversos fabricantes, como a Du Pont e a Varian, utilizavam em seus equipamentos um reservatório na forma de um tubo em espiral (Figura 3b), reduzindo assim, consideravelmente a área de contato entre o gás e a fase móvel².

1.1.1.2. Bombas com amplificação pneumática

Nas bombas com amplificação pneumática, o gás exerce pressão sobre um pistão que, por sua vez, impulsiona a fase móvel. No entanto, diferentemente do que ocorre nas bombas sem amplificação pneumática, o pistão utilizado nestas bombas possui uma área de contato com o gás muito maior que a área de contato com o líquido, como mostrado na Figura 4. Esta simples construção permite uma amplificação da pressão igual à razão entre as duas áreas. Deste modo, para a Figura 4, se considerarmos que o diâmetro do pistão em contato com o gás for 10 vezes maior que o diâmetro do pistão em contato com o líquido, a pressão com a qual a fase móvel será bombeada será de 100 vezes a pressão do gás utilizado.

Figura 4 – Esquema de uma bomba de pressão constante com amplificação pneumática.

A Figura 5 mostra a vista interna de uma bomba com amplificação pneumática produzida pela Haskel (Burbank, EUA). Nesta bomba, quando o gás pressurizado é enviado para parte superior do pistão (Figura 5a), a alta pressão do gás faz

com que o pistão seja movimentado para baixo, empurrando a fase móvel para fora da câmara. Quando o pistão atinge o final do curso, ele aciona uma válvula que promove a inversão da direção do gás (Figura 5b), fazendo com que o gás pressurizado agora entre pela parte inferior do pistão, empurrando o pistão de volta ao início do seu curso (Figura 5c) reenchendo a câmara do pistão. Semelhantemente ao passo anterior, quando o pistão chega ao início do curso, ele aciona uma segunda válvula que inverte novamente a direção do gás (Figura 5d), reiniciando o ciclo de bombeamento.

Figura 5 – Bomba de pressão constante com amplificação pneumática. a) Ciclo de bombeamento, b) acionamento da válvula, c) ciclo de reabastecimento e d) acionamento da segunda válvula.

Neste tipo de bomba a fase móvel é mantida em um reservatório externo, de onde, através das *check valves*, a bomba automaticamente se reabastece (em frações de segundos) a cada ciclo completo do pistão, não necessitando assim, interromper as análises para o reabastecimento como ocorre com as bombas sem amplificação pneumática.

A principal vantagem deste tipo de bomba é a capacidade de fornecer um bombeamento ininterrupto à altas pressões utilizando gases com pressões muito menores que as utilizadas pelas bombas sem amplificação pneumática, (oferecendo deste modo, uma maior segurança em sua operação). Entre as principais desvantagens estão a geração de fluxo pulsado e incapacidade de se gerar gradientes.

1.1.2. Bombas de volume constante

Bombas de volume constante, diferentemente das bombas de pressão constante, utilizam um motor elétrico que, através de um pistão, impulsiona a fase móvel através da coluna. Os dois principais tipos de bomba de volume constante são as bombas do tipo seringas e as bombas de pistão recíprocante.

1.1.2.1. Bomba seringa

Apesar deste tipo de bomba atualmente ter caído em desuso na HPLC convencional devido às inúmeras desvantagens frente às bombas de pistão recíprocante, as bombas seringas ainda são muito utilizadas em aplicações que envolvem fluxos muito pequenos (na faixa de nL/min e μ L/min). Este tipo de bomba utiliza um motor de passo que, através de um fuso, movimenta um pistão que impulsiona a fase móvel. Como o seu próprio nome já indica, este tipo de bomba funciona semelhantemente a uma seringa hipodérmica.

Figura 6 – Esquema de uma bomba do tipo seringa.

Embora o fluxo gerado por este tipo de bomba ser essencialmente livre de pulsação e independente da pressão da coluna, devido à compressibilidade do eluente, as bombas seringas possuem um longo tempo de estabilização do fluxo, como mostrado na

Figura 7. O tempo necessário para a estabilização do fluxo depende do volume da câmara da bomba, do fluxo escolhido, da compressibilidade do líquido e da permeabilidade da coluna.

Figura 7 – Efeito da compressibilidade do líquido no fluxo gerado por 3 bombas seringa com diferentes tamanhos de câmara: a) 20 mL; b) 100 mL; c) 500 mL. Adaptado da referência 64.

Semelhantemente às bombas de pressão constante sem amplificação pneumática, neste tipo de bomba a fase móvel é mantida em um reservatório interno, fazendo com que o sistema deva ser parado para o seu reabastecimento e, posteriormente, repressurizado, sempre que a fase móvel do reservatório se esgota.

1.1.2.2. Bomba de pistão recíprocante

As bombas de pistão recíprocante utilizam um motor de passo responsável pela movimentação alternada de um ou mais pistões que impulsionam a fase móvel diretamente (ou através de um diafragma) através da coluna. Devido à alternância do movimento do(s) pistão(ões), este tipo de bomba gera um fluxo pulsado. Desde modo, é

muito comum a utilização de *dampers* na saída da bomba com a finalidade de se reduzir a pulsação.

Atualmente pode se encontrar no mercado três tipos de bombas de pistão recíprocante, a citar: bomba de simples pistão, bomba de duplo pistão em paralelo e bomba de duplo pistão em série.

Bomba de pistão simples

A Figura 8 ilustra um esquema interno de uma bomba de pistão simples semelhante às bombas da série *ProStar* atualmente produzidas pela Varian (Palo Alto, EUA). O princípio de funcionamento destas bombas é semelhante ao das bombas de pressão constante com amplificação pneumática, exceto que o pistão é movimentado através de um came acoplado a um motor de passo, ao invés do gás pressurizado.

Figura 8 – Esquema de uma bomba do tipo recíprocante de simples pistão.

Bomba de duplo pistão em paralelo

A Figura 9 ilustra um esquema de uma bomba de duplo pistão em paralelo semelhante ao modelo LC-20AD produzida pela Shimadzu (Kyoto, Japão). Neste tipo de bomba, quando um dos pistões está bombeando, o outro pistão estará reabastecendo a câmara do pistão a partir do reservatório externo de fase móvel. Quando o pistão que está

bombeando chega ao final de seu curso, ele inicia seu trajeto na direção oposta (reabastecendo), enquanto o outro pistão (agora com a câmara cheia) inicia o bombeamento.

Figura 9 – Esquema de uma bomba do tipo recíprocante de duplo pistão em paralelo.

Bomba de duplo pistão em série

A Figura 10 ilustra um esquema de uma bomba de duplo pistão em série semelhante ao modelo LC-20AT produzida pela Shimadzu (Kyoto, Japão). Neste tipo de bomba, quando o primeiro pistão está bombeando a fase móvel para a coluna, o segundo pistão estará reabastecendo sua câmara a partir do reservatório externo. No entanto, quando o primeiro pistão alcança o final do curso, ele inverte a sua direção iniciando o seu reabastecimento a partir da câmara do segundo pistão (e não a partir do reservatório externo como no modelo em paralelo), enquanto o segundo pistão bombeia a fase móvel ao dobro do fluxo ajustado, de forma que metade do volume impulsionado estará sendo enviado para a coluna, enquanto a outra metade, estará sendo utilizada para o reabastecimento do primeiro pistão.

Figura 10 – Esquema de uma bomba do tipo recíprocante de duplo pistão em série.

A principal vantagem deste tipo de bomba frente às de duplo pistão em paralelo é que no modelo em série é utilizado somente um par de *check valves* ao invés dos dois pares utilizados nos modelos em paralelo. A utilização de apenas um par de *check valves* torna a bomba mais robusta, uma vez que ela possui menos partes que podem apresentar falhas (sendo dessa forma, muito utilizada em laboratórios de controle de qualidade de indústrias onde provavelmente o equipamento estará funcionando ininterruptamente).

Bomba de diafragma

O esquema interno de um tipo especial de bomba de pistão recíprocante, conhecida com bomba de diafragma, pode ser encontrado na Figura 11. Este tipo de bomba utiliza um pistão para comprimir um fluido hidráulico (normalmente um óleo) que indiretamente impulsiona a fase móvel através de um diafragma. Este tipo de bomba possui algumas vantagens frente às bombas do tipo recíprocante convencionais como, por exemplo, a diminuição da pulsação causada no momento do reabastecimento. Na realidade,

o que ocorre é que nestes tipos de bomba, o pistão se movimenta para frente e para trás em movimentos menores, no entanto, numa frequência muito maior que nas bombas de pistão recíprocante convencionais, produzindo assim, uma pulsação mais frequente, no entanto, numa amplitude consideravelmente menor.

Figura 11 – Esquema de uma bomba do tipo recíprocante com diafragma.

1.1.2.3. Pressão constante X volume constante

Apesar das bombas de pressão constante serem de simples construção, baixo custo e produzir fluxos livres de pulsação (característica de muita importância para a cLC), este tipo de bomba raramente é utilizado em aplicações com fins analíticos devido ao grande inconveniente de gerar um fluxo dependente da pressão do gás utilizado, da viscosidade da fase móvel e da temperatura.

Por sua vez, diferentemente das bombas de pressão constante, as bombas de volume constante fornecem um fluxo independente da pressão criada pela coluna, viscosidade da fase móvel e temperatura, sendo este o tipo mais utilizado na para fins analíticos.

Atualmente as bombas de pistões recíprocentes de duplo pistão são as mais utilizadas na HPLC. Isto se deve, além dos fatores já citados, a grande habilidade de compensação da pressão da coluna (*back pressure*), rápida estabilização do fluxo, operação contínua e a facilidade de criação de gradiente.

1.2. Bombas Utilizadas Atualmente em cLC

Nos últimos 10 anos, vários fabricantes vêm desenvolvendo sistemas cromatográficos voltados para as técnicas miniaturizadas. Atualmente existem dois tipos de sistemas de bombeamento utilizados na cLC. O primeiro se baseia na adaptação das bombas do tipo duplo pistão recíprocente já utilizadas na HPLC nas quais é acoplado um divisor de fluxo (*splitter*) na saída da bomba. O segundo tipo se baseia na utilização de bombas do tipo seringa capazes de fornecer diretamente fluxos de nL/min até µL/min sem a necessidade da utilização de *splitters*⁴⁵. A seguir será discutido, brevemente, os principais equipamentos utilizados atualmente na cLC.

1.2.1. Bombas de nano-fluxo da série 1200 (Agilent)

As bombas de nano-fluxo da série 1200 fabricadas pela Agilent constituem um sistema duplo de bombeamento que utiliza bombas de duplo pistão recíprocente em série com um *splitter* eletrônico (Figura 12). A faixa de fluxo recomendada pelo fabricante para esse modelo de bomba é de 200 µL/min até 2,5 mL/min (sem a utilização do *splitter*) ou de 100 nL/min até 1 µL/min (com a utilização do *splitter*).

Um dos principais destaques deste sistema de bombeamento é a utilização de uma válvula de purga eletromagnética (EMPV, do inglês *electromagnetic purge valve*) como *splitter*. Este tipo de válvula, quando utilizada em conjunto com um sensor de fluxo, consegue manter o fluxo da coluna com uma relativa constância independente da pressão da coluna, permitindo assim, a utilização de gradientes durante uma análise. No entanto, pelo fato do *splitter* estar localizado após a mistura dos solventes (durante a formação de

um gradiente), toda a mistura não utilizada (descartada pelo *splitter*) não pode ser reaproveitada, o que conseqüentemente, resulta num consumo de solvente significativamente maior quando comparado com os sistemas *splitless* (que não utilizam *splitters*).

Figura 12 – Esquema do sistema de bombeamento de nano-fluxo da série 1200 da Agilent.

1.2.2. Bombas da série Ultimate 3000 (Dionex)

Os modelos LPG-3400M+FLM e DGP-3600M+FLM são os dois tipos de bombas produzidos pela Dionex voltadas para o seu sistema capilar Ultimate 3000. Ambos os modelos consistem de uma adaptação dos seus modelos básicos (LPG-3400M e DGP-3600M respectivamente) com um *splitter* ativo. A principal diferença entre os dois sistemas é que o primeiro (Figura 13) consiste de um sistema simples de bombeamento de duplo pistão em série capaz de realizar gradientes quaternários a baixa pressões, enquanto o segundo (Figura 14) consiste de um sistema duplo de bombeamento de duplo pistão em série no qual o *splitter* se encontra instalado apenas na saída de uma das duas bombas presente no sistema.

Figura 13 – Esquema do sistema de bombeamento LPG-3400M+FLM da Dionex.

Figura 14 – Esquema do sistema de bombeamento DGP-3600M+FLM da Dionex.

O *splitter* utilizado nestes sistemas pode ser encontrado em três versões diferentes: versão nano, capaz de fornecer uma faixa de fluxo de 50 nL/min a 1 μ L/min; versão capilar, capaz de fornecer uma faixa de 500 nL/min a 10 μ L/min; e a versão micro, capaz de fornecer uma faixa de 10 a 160 μ L/min.

1.2.3. LC-20ADnano (Shimadzu)

As bombas modelo LC-20ADnano produzida pela Shimadzu se baseiam na adaptação da bomba LC-20AD de duplo pistão recíprocante em paralelo utilizada em sistemas convencionais de HPLC com um *splitter* ativo na saída da bomba. A faixa de fluxo recomendada pelo fabricante para esse modelo de bomba é de 100 nL/min a 5 μ L/min. A Figura 15 ilustra esquematicamente o sistema de bombeamento da LC-20ADnano.

Figura 15 – Esquema do sistema de bombeamento LC-20ADnano da Shimadzu.

1.2.4. Cap-LC (Waters)

O sistema Cap-LC fabricado pela Waters utiliza um sistema de bombeamento do tipo dupla seringa (opcionalmente tripla seringa) capaz de fornecer uma faixa de fluxo de 1 a 40 μ L/min em incrementos de 10 nL/min sem qualquer tipo de *splitter*.

Por possuir múltiplas seringas independentes, este sistema de bombeamento pode realizar análises tanto em modo isocrático sem que seja necessária a interrupção das análises para reabastecimento (quando uma seringa se esgota a segunda seringa inicia o bombeamento permitindo que a primeira se reabasteça), quanto análises com gradiente binário (opcionalmente ternário) com múltiplas seringas operando simultaneamente com solventes distintos. A Figura 16 ilustra esquematicamente o sistema de dupla seringa utilizada pelos equipamentos Cap-LC.

Figura 16 – Esquema do sistema de bombeamento Cap-LC da Waters.

1.2.5. Comparação entre os diversos sistemas

A Tabela 6 resumi as principais características dos diferentes sistemas de bombeamento discutido anteriormente.

Tabela 6 – Especificações técnicas dos principais sistemas de bombeamento atualmente disponíveis para cLC.

Especificações Técnicas	Série 1200 (Agilent)	Ultimate 3000 (Dionex)	Cap-LC (Waters)	LC-20ADnano (Shimadzu)
Fluxo Mínimo	10 nL/min	Nano: 50 nL/min Capilar: 500 nL/min Micro: 10 µL/min	250 nL/min	1 nL/min
Fluxo Máximo	4,0 µL/min	Nano: 1 µL/min Capilar: 10 µL/min Micro: 160 µL/min	40 µL/min	5 µL/min
Fluxo Min. Recomendado	100 nL/min	Nano: 50 nL/min Capilar: 500 nL/min Micro: 10 µL/min	1 µL/min	100 nL/min
Fluxo Máx. Recomendado	1,0 µL/min	Nano: 1 µL/min Capilar: 10 µL/min Micro: 160 µL/min	40 µL/min	5 µL/min
Incremento	10 nL/min		10 nL/min	1 nL/min

2. Justificativas e Objetivos

Como visto anteriormente, grande parte dos sistemas de bombeamento atualmente disponível para cLC utiliza bombas do tipo pistão recíprocante com sistemas de divisão de fluxos (*splitters*) passivos ou ativos. Apesar da incorporação dos *splitters*, à primeira vista, ser bastante atrativa economicamente devido à simplicidade de se converter uma bomba convencional para aplicações capilares, tais sistemas possuem vários inconvenientes.

Uma das principais limitações dos sistemas que utilizam *splitters* passivos é a dependência do fator de divisão do fluxo quanto à pressão do sistema. Isto significa que, se houver alguma variação da pressão da coluna, como a causada por gradientes de fase móvel, ou, por gradientes de temperatura, haverá também uma variação do fluxo na coluna devido a constante mudança da viscosidade da fase móvel.

Apesar dos sistemas que incorporam *splitters* ativos não possuírem tal limitação devido à correção do fluxo realizado automaticamente pelo sistema, tais *splits* acabam adicionando mais dispositivos mecânicos e eletrônicos ao sistema. Tal complexividade extra se traduz, ao longo do tempo, em mais fontes que possivelmente poderão apresentar falhas e, certamente, num maior custo de manutenção do equipamento.

Além disso, a utilização de *splitters*, tanto ativos, quanto passivos, normalmente não acarreta numa diminuição do consumo da fase móvel, fazendo com que os sistemas *splitless*, sejam mais atrativos e econômicos.

Deste modo, o projeto mecânico proposto neste trabalho visa a construção de um equipamento que opere fornecendo um fluxo constante e sem pulsação na faixa de nL até $\mu\text{L}/\text{min}$ sem que seja necessário utilizar divisores de fluxos.

3. Construção do Equipamento

Como pode ser visto na Figura 17, o sistema de bombeamento desenvolvido é constituído basicamente de um motor de passo, uma caixa de redução do tipo planetária, um par de engrenagens de dentes helicoidais (apoiadas em rolamentos), um fuso de esferas, um pistão, um selo e um sensor de pressão. Como *check valves*, foi utilizado válvulas com atuação eletrônica.

Figura 17 – Vista interna da bomba desenvolvida.

A Tabela 7 mostra as principais características do sistema de bombeamento desenvolvido.

Tabela 7 – Principais características do sistema de bombeamento desenvolvido neste projeto.

Especificações Técnicas	Valor	Observações
Volume Total da Câmara do Pistão	1370 μL	
Volume Útil da Câmara do Pistão	1000 μL	
Fluxo Mínimo	4,71 nL/min	Operando a 1 passo/segundo
Fluxo Máximo	1,00 mL/min	
Fluxo Min. Recomendado	47,1 nL/min	Operando a 10 passos/segundo
Fluxo Máx. Recomendado	250 $\mu\text{L}/\text{min}$	
Incremento	20 pL/min	
Exatidão	0,2 %	Com fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$
Precisão	0,3 %	Com fluxo de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$
Pressão Máxima	5.000 psi	Aproximadamente 350 bar
Características Elétricas		
Alimentação	110 Vac / 60 Hz	
Interface com PC	USB	
Características Mecânicas		
Dimensões	175 x 120 x 391	A x L x P (mm)
Peso	14 kg	

3.1. Projeto Mecânico

A seguir, serão discutidos os princípios básicos de cada componente mecânico do sistema de bombeamento desenvolvido, incluindo suas funções e seus princípios de operação.

3.1.1. Principais componentes mecânicos da bomba

3.1.1.1. Motor de passo

Motores de passo são dispositivos eletromecânicos que convertem eletricidade em movimentos mecânicos. Diferentemente dos motores elétricos convencionais que giram constantemente quando energizados, os motores de passo funcionam produzindo movimentos angulares discretos (chamados “passos”) a cada pulso elétrico recebido pelo seu acionador (*driver*).

Devido a sua característica única de se manter em uma determinada posição até que o *driver* receba um novo pulso, os motores de passo permitem controles de velocidades e posições extremamente precisos, sem necessitar de realimentação através de transdutores de velocidade ou posição. A vantagem da ausência de realimentação adiciona-se as características de robustez, vida longa, ausência de manutenção regular (pelo fato desses motores não possuírem escovas) e maior economia e precisão quando comparados aos servo-motores⁶⁵.

Existem basicamente três tipos de motores de passo: motores de relutância variável, motores com magneto permanente e motores híbridos. Estes três tipos de motores se diferenciam entre si principalmente pela construção e composição do seu rotor. A Figura 18 ilustra uma vista interna esquemática de um motor de passo de relutância variável de três fases com rotor de quatro dentes.

Figura 18 – Vista interna esquemática de um motor de passo de relutância variável de três fases com rotor de quatro dentes.

Princípio de funcionamento

O princípio de funcionamento de um motor de passo é ilustrado na Figura 19. Quando a Bobina 1 encontra-se energizada (Figura 19a), o campo magnético criado pela passagem da corrente elétrica através da bobina atrai os dentes do rotor de forma que haja um alinhamento de um par de dentes do rotor com o campo magnético criado.

Quando o *driver* do motor recebe um pulso elétrico enviado pelo seu controlador, seu chaveador interno desliga a Bobina 1 e energiza a Bobina 2 (Figura 19b), fazendo com que o par de dentes mais próximo da Bobina 2 seja atraída pelo novo campo magnético, girando dessa maneira, o rotor numa determinada angulação definida pela distribuição das bobinas ao redor do motor e pela quantidade de dentes do rotor (30° para o motor ilustrado). O motor se manterá nessa nova posição até que o *driver* receba um novo pulso, o que causaria o desligamento da Bobina 2 e energização da Bobina 3 (Figura 19c). Após a energização da Bobina 3, um novo pulso fará com que a Bobina 3 seja desligada e a Bobina 1 energizada novamente, iniciando assim um novo ciclo.

Em aplicações nas quais se necessita um controle preciso da velocidade de rotação do motor ao invés do controle de posição, o controlador pode enviar uma forma de onda quadrada (seqüência de pulsos) ao motor, fazendo com que este gire numa velocidade proporcional a frequência da onda gerada (Figura 19d).

Figura 19 – Funcionamento de um motor de passo.

Motor utilizado neste projeto

Neste projeto foi utilizado um motor modelo PK564AW* da Oriental Motors (Tokyo, Japão). Tal modelo consiste de um motor de passo do tipo híbrido de 5 fases com 500 passos/revolução (passo de $0,72^\circ$) alimentado à 110 V_{AC}. A Figura 20 ilustra duas vistas internas deste motor.

Figura 20 – Vistas internas do motor utilizado.

3.1.1.2. Caixa de redução (ou caixa de engrenagens)

Originariamente, quando os motores eram considerados simplesmente como dispositivos responsáveis pela rotação de alguma peça, as caixas de redução eram utilizadas principalmente para mudar a velocidade de rotação do eixo de saída e para amplificar o torque gerado pelo motor.

No entanto, com a introdução dos motores de passo, motores DC e motores incorporados com controle de velocidade, as principais funções das caixas de

* Na realidade foi utilizado o pacote RK564AA-N50 disponibilizado pela Oriental Motor. Este pacote consiste do motor PK564AW, seu *driver* RKD514L-A e uma caixa de redução do tipo planetária.

redução se tornaram, além das já citadas, melhorar a inércia permissiva, reduzir o ângulo de rotação dos motores de passo e reduzir a vibração do motor⁶⁶.

Atualmente existem diversos tipos de caixa de redução, como por exemplo, as com engrenagens de dentes retos com eixos paralelos, com engrenagens de dentes helicoidais com eixos paralelos ou perpendiculares, hipóide, planetária, etc.

Devido as suas inúmeras vantagens frente aos outros tipos de caixas de redução, que incluem: auto torque permissível (valor do torque limitado pela força mecânica dos dentes das engrenagens), alta rigidez de torção, pequena folga entre as engrenagens e alta razão de amplificação de torque, a caixa de redução do tipo planetária foi escolhida para ser utilizada para a construção da bomba.

Como pode ser visto na Figura 21, uma caixa de redução planetária é constituída de uma engrenagem sol cercada de duas ou mais engrenagens planetárias presas a um prato, todas encerradas dentro de uma engrenagem de dentes internos chamada coroa.

Figura 21 – Vista interna de uma caixa de redução do tipo planetária. Adaptado da referência 66.

Princípios de funcionamento das caixas do tipo planetária

As caixas planetárias podem ser utilizadas de várias maneiras. Uma única caixa de redução planetária pode ter várias razões de redução, dependendo de qual engrenagem é utilizada como entrada, qual é utilizada como saída e qual permanecerá estacionária.

Para o caso particular da caixa planetária utilizada neste projeto, a engrenagem sol é utilizada como entrada do movimento, enquanto a coroa permanece fixa, e o prato, no qual estão presas as engrenagens planetárias, é utilizado como saída. A Figura 22 ilustra o funcionamento das caixas de redução do tipo planetária utilizada neste projeto.

Figura 22 – Ilustração do funcionamento das caixas de redução planetárias. a) Condição inicial, b) após uma revolução completa da engrenagem sol, c) após duas revoluções completas da engrenagem sol.

Caixa de redução utilizada neste projeto

A caixa de redução utilizada neste projeto consistiu de uma caixa do tipo planetária com razão de redução de 50:1. Tal caixa faz parte do pacote RK564AA-N50 adquirido da Oriental Motors.

A Figura 23 ilustra uma vista interna da caixa de redução utilizada (já acoplada ao motor de passo) detalhando o mecanismo utilizado na eliminação das folgas entre as engrenagens.

Figura 23 – Vista interna da caixa de redução do tipo planetária utilizada neste projeto. Adaptado da referência 66.

3.1.1.3. Fusos

Fusos são atuadores utilizados para transformar movimentos rotacionais em movimentos lineares precisos e suaves. Os dois tipos de fusos mais utilizados atualmente são os fusos de rosca trapezoidal e os fusos de esferas (Figura 24).

Figura 24 – Tipos de fusos: a) fusos de esferas, b) fusos convencionais com rosca trapezoidal.

A principal diferença entre estes dois tipos de fusos é que os fusos de rosca trapezoidal são constituídos de duas partes: um parafuso e uma porca (castanha), ambos com um perfil de rosca trapezoidal; enquanto os fusos de esferas são constituídos de três partes: um parafuso com uma rosca de perfil circular, uma castanha com igual perfil de rosca, e várias esferas de aço montada convenientemente entre o parafuso e a castanha, como mostrado na Figura 25.

Figura 25 – Fuso de esferas.

Princípios de funcionamento dos fusos

Fusos, tanto de rosca trapezoidal quanto os de esferas, podem ser operados de duas formas. Em um dos modos, o parafuso pode ser conectado a peça que produz o movimento rotacional (um motor, por exemplo) enquanto a castanha é de alguma forma impedida de girar. Neste modo, o movimento rotacional transmitido ao parafuso será

convertido em um movimento linear da castanha (Figura 26a). O outro modo de funcionamento se dá de forma inversa, o movimento rotacional é transmitido à castanha permitindo assim que o fuso seja movimentado linearmente quando impedido de girar (Figura 26b).

Figura 26 – Ilustração do funcionamento de um fuso. a) Movimento circular aplicado ao fuso, b) movimento circular aplicado à castanha.

Fuso utilizado neste projeto

Devido às inúmeras vantagens dos fusos de esferas frente aos fusos de rosca trapezoidal que incluem maior eficiência da transferência do torque, maior vida útil, altas velocidades de rotação, menor vibração, menor ruído, menor desgaste e menor aquecimento, o fuso de esferas foi o tipo de fuso utilizado.

O modelo do fuso de esferas utilizado foi o R16-FSI-191-237 de classe C7 da HIWIN (Taiwan) com pontas usinadas sob encomenda. Tal fuso consiste de um parafuso de 16 mm de diâmetro com passo de 2 mm com uma castanha com recirculação interna por deflexão. A Figura 27 ilustra o fuso utilizado neste projeto.

Figura 27 – Ilustração do fuso de esferas utilizado neste projeto.

3.1.1.4. Rolamentos

Rolamentos são dispositivos utilizados em equipamentos mecânicos com a função de reduzir (ou mesmo eliminar) o atrito entre duas peças das quais uma, ou ambas, possuem movimento rotacional. Os rolamentos são constituídos basicamente de três partes principais: um anel externo, um anel interno e vários elementos rolantes. Opcionalmente, os rolamentos também podem possuir uma gaiola interna (que encerra e espaça igualmente os elementos rolantes) e/ou capas fixadas entre o anel interno e externo (que possuem a função de vedar o compartimento dos elementos rolantes). A Figura 28 ilustra um rolamento rígido de esferas identificando seus principais componentes.

Figura 28 – Rolamento.

Atualmente existem diversos tipos rolamentos. Estes se diferenciam entre si principalmente pelo formato e disposição dos seus elementos rolantes. A Figura 29 ilustra uma vista interna dos três tipos de rolamentos utilizados neste projeto.

Figura 29 – Vista interna dos três tipos de rolamentos utilizados neste projeto. a) rolamento rígido de esferas, b) rolamento de contato angular e c) rolamento de rolos cônicos.

Princípios de funcionamento dos rolamentos

No modo mais comum de utilização, o anel externo do rolamento é fixado num suporte fixo, permanecendo assim estático, enquanto o eixo de rotação da peça móvel é fixado no interior do anel interno. A redução do atrito promovido pelos rolamentos é atingida devido às esferas (ou rolos) que rolam entre os dois anéis permitindo que o anel interno gire sem que este entre em contato com o anel externo estático.

Rolamentos utilizados neste projeto

Neste projeto foram utilizados seis rolamentos de cinco modelos diferentes. Para o apoio da engrenagem pequena foi utilizado um rolamento de esferas modelo 16003 2Z e um rolamento de contato angular modelo 7203 BEP. Para o apoio da engrenagem grande foi utilizado um rolamento de rolos cônicos modelo 32006 X/Q e um rolamento de contato angular modelo 7205 BECBM. Para o eixo de travamento do fuso de

esferas foram utilizados dois rolamentos de esferas modelo 619/6 2Z. A Figura 30 ilustra os cinco modelos de rolamentos utilizados.

Figura 30 – Rolamentos utilizados neste projeto: a) 16003 2Z, b) 7203 BEP, c) 32006 X/Q, d) 7205 BECBM e e) 619/6 2Z.

3.1.1.5. Check valve

Check valves são dispositivos utilizados em sistemas de bombeamento com a função de permitirem a passagem de fluxo apenas numa direção. Em um equipamento de HPLC podemos encontrar dois tipos de *check valves*: as do tipo passiva e as do tipo ativa.

Princípios de funcionamento - check valves passivas

Os modelos mais simples de *check valves* passivas são constituídos de três partes principais: uma esfera, um assento e um alojamento (Figura 31). As esferas podem ser fabricadas em diversos materiais, como rubi, zircônia, alumina ou outro material cerâmico, enquanto os assentos geralmente são fabricados de safira, zircônia, alumina ou outro material cerâmico. Os alojamentos, quase sempre, são de aço-inox 316.

Figura 31 – Vista interna de uma *check valve* passiva.

A Figura 32 mostra uma foto de 6 conjuntos de esferas e assentos de vários tamanhos. Nesta foto, as esferas vermelhas são de rubi e os assentos onde estão alojadas são de safira. Já as esferas brancas, assim como seus assentos, são de cerâmica.

Figura 32 – Conjuntos de esferas e assentos utilizados nas *check valves* passivas. As esferas vermelhas são de rubi e seus assentos de safira. Já as esferas brancas, assim como seus assentos, são de cerâmica.

A Figura 33 ilustra o funcionamento desse tipo de *check valves*. Na Figura 33a, quando o fluxo da fase móvel entra pela parte inferior da *check valve* a pressão do líquido consegue empurrar a esfera para cima, liberando a passagem da fase móvel nesta direção. No entanto, no instante em que há a inversão do sentido do fluxo (Figura 33b), o próprio fluxo e pressão do líquido na direção inversa empurram a esfera contra o seu assento, permitindo que apenas uma pequena quantidade de líquido, momentaneamente, escape nesta direção, até que a esfera fique totalmente assentada (Figura 33c).

Figura 33 – Funcionamento de uma *check valve* passiva. a) Passagem do líquido no sentido direto, b) momento da inversão do sentido do fluxo e c) válvula fechada.

Apesar das *check valves* do tipo mostrado na Figura 33 funcionarem muito bem na HPLC convencional devido à utilização de alto fluxo de fase móvel, em fluxo muito baixos (menores que 100 $\mu\text{L}/\text{min}$) o pequeno volume de líquido que passa pela esfera, algumas vezes, não consegue fechar a *check valve* rapidamente, permitindo assim, que um volume significativamente alto “vaze” pela *check valve* até que a esfera fique totalmente assentada.

Caso tais *check valves* fossem utilizadas em bombas de pistão recíprocante destinadas micro- ou nano-volumes, isso causaria uma grande pulsação no fluxo, impossibilitando desta maneira, sua utilização em equipamentos voltados a cLC.

Para tais aplicações, diversos fabricantes estão utilizando um novo modelo de *check valve* (ou mesmo combinando o antigo modelo com o novo, formando assim, uma *check valve* dupla) que utiliza um pequeno pistão que pressiona, através de uma mola, a esfera contra o seu assento, permitindo assim um fechamento mais rápido da mesma. A Figura 34 ilustra este novo modelo de *check valve*, enquanto a Figura 35 mostra duas fotos dos dois tipos de *check valves* comentados.

Figura 34 – Vista interna de uma *check valve* passiva com fechamento facilitado.

Figura 35 – Foto dos dois tipos de *check valves* desmontadas.

Princípios de funcionamento - check valves ativas

A principal diferença entre as *check valves* passivas e ativas é que a primeira utiliza o fluxo e a pressão do líquido para movimentar a esfera permitindo, ou impedindo, a passagem do líquido (não podendo sua abertura ou fechamento ser controlada diretamente), enquanto a segunda, utiliza válvulas com rotores atuados pneumaticamente ou eletricamente, permitindo assim, um controle preciso de sua abertura e fechamento.

Check valve utilizada neste projeto

Neste projeto, uma válvula modelo EMTCS4UW da VALCO (Houston, EUA) foi utilizada como *check valve*. Tal modelo consiste de uma válvula com configuração ST de 4 posições com atuador microeletrônico. A Figura 36 ilustra esquematicamente a utilização desta válvula como *check valve*.

Figura 36 – Vista esquemática da válvula utilizada com *check valve*: a) posição de reabastecimento, b) posição para descarte, c) posição para pressurização, d) posição de bombeamento.

3.1.1.6. Pistão

Como visto anteriormente, a função dos pistões nos sistema de bombeamento utilizados pela HPLC é empurrar a fase móvel através da coluna. Os pistões utilizados em tais equipamentos podem ser encontrados em vários materiais, como o aço-inox (316 ou 316L), safira, rubi e zircônia, sendo a safira o mais utilizado devido a sua

excelente resistência química, alta dureza* e baixa rugosidade superficial (o que estende significativamente a vida útil do selo).

Os pistões de safira são fabricados a partir de um monocristal do material que é fixado em uma base de aço-inox. A Figura 37 ilustra alguns pistões utilizados pelos principais fabricantes de equipamentos para HPLC.

Figura 37 – Pistões utilizados por diversos fabricantes de equipamentos de HPLC: a) Agilent; b) Dionex; c) Jasco; d) Perkin-Elmer; e) Shimadzu; f) Varian e g) Waters

Pistão utilizado neste projeto

Neste projeto, foi utilizado um pistão retificado de aço-inox 316 de 5 mm de diâmetro e 50 mm de comprimento. Este pistão foi fabricado pela Valmar Ferramentaria (São Carlos, SP) sobre encomenda.

Figura 38 – Ilustração do pistão utilizado neste projeto.

* A safira (ou coríndon) é um mineral a base de óxido de alumínio (Al_2O_3) que possui o valor de dureza igual a nove na escala Mohs (sendo assim o segundo material mais duro existente, atrás apenas do diamante com o valor de 10 na escala Mohs).

3.1.1.7. Selo do pistão

Os selos utilizados em equipamentos comerciais de HPLC são constituídos basicamente de duas partes: um corpo (ou jaqueta) e uma mola, podendo a última ser de três tipos diferentes: mola em “V”, mola de espirais inclinadas e mola helicoidal (Figura 39).

Figura 39 – Principais tipos de selos utilizados na HPLC: a) mola em “V”, b) mola de espirais inclinadas e c) mola helicoidal.

O corpo do selo pode ser fabricado em diversos tipos de materiais, podendo estar na forma virgem (puro), como no caso do uso de PTFE, PEEK e polietileno UHMW, ou em *blends*, como no caso do uso do PTFE com grafite.

Assim como o corpo, a mola também pode ser fabricada em diversos materiais, como em aço-inox (302, 316 ou 316L), titânio, hastelloy (liga de Ni com um ou mais dos seguintes elementos: Cr, Mo, W), Inconel (liga de Ni-Cr-Fe), entre muitos outros, sendo o aço-inox 316 e 316L os mais utilizados na HPLC.

Princípios de funcionamento dos selos

A vedação proporcionada por estes tipos de selos se dá por dois processos. O primeiro é dado pela tensão radial aplicada pela mola que pressiona as paredes do corpo do selo contra as paredes do pistão e do cilindro. O segundo processo se

dá pela própria pressão do líquido no interior do cilindro que contribui empurrando as paredes do selo contra as paredes do pistão e do cilindro. O segundo processo somente é considerável em médias ou altas pressões, contribuindo assim, muito pouco com o processo de vedação em baixas pressões. Deste modo, quanto maior a pressão do sistema, melhor será a vedação proporcionada por este tipo de selo.

Selo utilizado neste projeto

O selo utilizado neste projeto consistiu do U-R134MB-(I)-(5.00-2.50)-GFP 55-316BRT-SOW-(L 4.42) fabricado sob encomenda pela Bal Seal (Foothill Ranch, EUA). Tal modelo consiste de um selo de Teflon reforçado com grafite com uma mola do tipo de espirais inclinadas de aço-inox 316. A Figura 40 mostra uma foto do selo utilizado

Figura 40 – Selo utilizado neste projeto.

3.1.2. Montagem dos componentes mecânicos

3.1.2.1. Fixação do conjunto motor/caixa-planetária ao corpo da bomba

Uma vez que a alimentação do motor de passo utilizado neste projeto é fornecida diretamente da rede elétrica (110 V_{AC}), houve a preocupação durante a montagem de se isolar eletricamente o motor de todo o restante da bomba a fim de se evitar que qualquer corrente elétrica de fuga originada no motor não causasse nenhum tipo de interferência nas análises cromatográficas caso esta bomba fosse utilizada com detectores eletroquímicos. Este isolamento também possibilita que a bomba, no futuro, possa ser facilmente adaptada para o uso em sistemas de eletrocromatografia capilar (CEC, do inglês *capillary electrochromatography*) pressurizada.

A fixação do conjunto motor/caixa-planetária ao corpo da bomba se deu através de quatro parafusos do tipo allen com rosca M5. O isolamento elétrico foi realizado utilizando buchas e chapas de celeron. A Figura 41 mostra uma vista explodida da fixação do conjunto motor/caixa-planetária ao corpo da bomba, enquanto a Figura 42 mostra o conjunto motor/caixa-planetária já montados.

Figura 41 – Fixação do motor à bomba utilizando celeron como isolante elétrico.

Figura 42 – Conjunto motor/caixa-planetária fixado ao corpo da bomba.

Detalhes do modo como o isolamento elétrico do motor foi realizado podem ser vistos na Figura 43.

Figura 43 – Detalhe do isolamento elétrico do motor.

3.1.2.2. Montagem da engrenagem pequena

Apesar da montagem do conjunto motor/caixa-planetária utilizando buchas e chapas de celeron ter isolado o motor do corpo da bomba, uma corrente de fuga ainda poderia fluir do motor para o sistema cromatográfico através de seu eixo metálico acoplado à engrenagem da bomba. Desde modo, houve também a necessidade de se isolar a engrenagem pequena (fabricada em aço 1020) através de seus rolamentos de suporte.

O isolamento elétrico da engrenagem foi realizado através de buchas de nylon industrial conectadas aos seus dois rolamentos de suporte, como pode ser visto na visão explodida ilustrada na Figura 44. A engrenagem pequena já montada em seus rolamentos de suporte pode ser vista na Figura 45.

Figura 44 – Vista explodida da engrenagem pequena.

Figura 45 – Engrenagem pequena já com seus rolamentos de suporte.

3.1.2.3. Montagem da engrenagem grande

Para que o fuso de esferas pudesse ser acoplado à engrenagem grande, foi necessário construir um suporte no qual o fuso de esferas pudesse ser fixado juntamente com a engrenagem grande fabricada em nylon industrial. Uma vez que o nylon é um material relativamente mole, a engrenagem foi fixada ao seu suporte por seis parafusos do tipo allen de rosca M5 através de um anel de aço 1020 para que no momento do aperto dos parafusos não houvesse nenhuma deformação da engrenagem. A Figura 46 ilustra uma vista explodida da montagem da engrenagem grande no seu suporte, enquanto a Figura 47 ilustra a engrenagem já montada.

Figura 46 – Vista explodida da engrenagem grande.

Figura 47 – Ilustração da engrenagem grande montada.

3.1.2.4. Acoplamento da engrenagem grande com o fuso de esferas

O acoplamento do fuso de esferas na engrenagem grande foi realizado através de quatro parafusos do tipo allen de rosca M5. Uma vez que a furação da castanha do fuso de esferas não possui rosca, foi necessário utilizar um anel de rosqueamento para a fixação do mesmo ao suporte da engrenagem grande. A Figura 48 ilustra uma vista explodida do acoplamento da engrenagem grande com o fuso de esferas, enquanto a Figura 49 ilustra o conjunto já montado.

Figura 48 – Vista explodida do acoplamento da engrenagem grande com o fuso de esferas.

Figura 49 – Ilustração do fuso de esferas já acoplado à engrenagem grande.

3.1.2.5. Instalação dos rolamentos de suportes

A instalação do rolamento de rolos cônicos foi realizada diretamente através da inserção do mesmo ao suporte da engrenagem grande, por sua vez, a instalação do rolamento de contato angular à castanha do fuso de esferas foi realizada utilizando um anel espaçador de ajuste. O anel de ajuste tem a função de permitir o controle da carga (pressão) com que o conjunto composto pela engrenagem grande e o fuso de esferas é instalado no interior da bomba para se evitar que haja qualquer folga na instalação do conjunto no interior da bomba. A Figura 50 ilustra uma visão explodida da instalação dos rolamentos de suporte da engrenagem grande, enquanto a Figura 51 ilustra o conjunto já montado.

Figura 50 – Vista explodida da instalação dos rolamentos de suportes.

Figura 51 – Ilustração do dos rolamentos já instalados na engrenagem grande.

3.1.2.6. Instalação das engrenagens

Após suas montagens, as duas engrenagens foram instaladas no corpo da bomba através de seus rolamentos de suporte, conforme mostrado na Figura 52. A capa da bomba, dentro da qual as engrenagens ficam instaladas, foi fixada ao corpo da bomba através de seis parafusos do tipo allen de rosca M5 e de dois pinos guias, que possuem a função de alinhar as duas peças.

Figura 52 – Visão explodida da instalação das engrenagens no corpo da bomba.

A Figura 53a ilustra as engrenagens já instaladas na bomba. A Figura 53b ilustra uma vista interna mostrando a disposição das engrenagens dentro da capa.

Figura 53 – a) Vista das engrenagens já instaladas, b) Detalhe das engrenagens montadas no interior da capa da bomba.

3.1.2.7. Travamento do fuso de esferas

Como discutido anteriormente, os fusos de esferas possuem dois modos de operação, sendo no primeiro o movimento rotacional transmitido diretamente ao fuso resultando um movimento linear da castanha quando esta é impedida de rotacionar, e no segundo, o inverso, sendo o movimento rotacional transmitido à castanha resultando assim num movimento linear do fuso quando este é impedido de rotacionar. Neste projeto o segundo método de operação foi o escolhido.

O travamento do fuso foi realizado através da instalação de um eixo no qual dois rolamentos de esferas são presos através de espaçadores às suas extremidades. Este eixo, quando inserido na guia do fuso, impede que o fuso rotacione, permitindo assim que o mesmo se movimente livremente ao longo do seu eixo. A Figura 54a ilustra uma visão explodida da montagem do eixo a uma das extremidades do fuso, enquanto a Figura 54b mostra o eixo já montado.

O guia do fuso foi preso ao corpo da bomba através de quatro parafusos do tipo allen de rosca M5 e dois pinos guias de alinhamento, como mostrado na vista explodida ilustrada pela Figura 55. A Figura 56 ilustra o guia já montado ao corpo da bomba.

Figura 54 – Vista explodida da instalação do eixo de travamento do fuso.

Figura 55 – Vista explodida da instalação da guia do fuso.

Figura 56 – Ilustração do eixo e da guia do fuso de esferas já instalados.

3.1.2.8. Instalação do pistão

A instalação do pistão é realizada pela simples introdução da base do pistão na cavidade de uma das extremidades do fuso de esferas, como mostrado na Figura 57. A Figura 58 ilustra o pistão já montado no fuso de esferas.

Figura 57 – Instalação do pistão.

Figura 58 – Pistão já instalado no fuso de esferas.

3.1.2.9. Instalação da câmara do pistão

A instalação da câmara do pistão ao corpo da bomba foi realizada através de um cilindro espaçador, como mostrado na vista explodida ilustrada na Figura 59. Este cilindro espaçador, dentro do qual o fuso de esferas se movimenta, foi preso ao corpo da bomba através de quatro parafusos do tipo allen de rosca M5 e dois pinos guias de

alinhamento. A câmara do pistão, dentro do qual ficam a guia e o selo do pistão, é presa ao cilindro espaçador através de quatro parafusos do tipo allen de rosca M5 e dois pinos guias de alinhamento. A Figura 60 mostra a câmara do pistão já montada através do cilindro espaçador. A Figura 61 mostra uma vista interna detalhando a câmara do pistão.

Figura 59 – Vista explodida da montagem da câmara do pistão.

Figura 60 – Ilustração da bomba já montada.

Figura 61 – Vista interna detalhando o projeto mecânico da câmara do pistão.

3.2. Projeto Eletrônico

3.2.1. Principais componentes eletromecânicos

3.2.1.1. Sensor de pressão

Sensores de pressão são transdutores eletrônicos que convertem a pressão de um sistema em um sinal elétrico. Existem diversos tipos de sensores de pressão, como por exemplo, sensores potenciométricos, capacitivos, piezoelétricos, *strain gage*, óticos, etc.

Princípio de funcionamento dos sensores por strain gage

O princípio de funcionamento dos sensores de pressão do tipo *strain gage* se baseia na medição da deformação de uma membrana metálica, causada pela pressão do sistema, através de um sensor de mesmo nome. Este tipo de sensor, apesar de ser muito utilizado em aplicações de medição de pressões diferenciais (quando ambos os lados do sensor estão submetidos sob diferentes pressões – Figura 62a), pode também medir pressões absolutas (quando um dos lados do diafragma é mantido sob vácuo – Figura 62b) ou referenciadas (quando um dos lados da membrana é selado à pressão atmosférica – Figura 62c).

Figura 62 – Três modos de medição de pressão capazes de ser realizadas pelos sensores de pressão do tipo *strain gage*: a) pressão relativa, b) pressão absoluta e c) pressão referenciada.

Sensor utilizado neste projeto

O sensor de pressão utilizado neste projeto foi o EPB-C11-5KP da Measurement Specialties (Hampton, EUA). Tal sensor consiste de um sensor do tipo *strain gage* com faixa de trabalho de 0-5000 psi (0-350 bar) alimentado a 10 VDC com saída não amplificada. A Figura 63a ilustra as dimensões do sensor enquanto a Figura 63b ilustra o esquema elétrico interno do mesmo.

Figura 63 – Sensor de pressão utilizado: a) Dimensões em mm e b) esquema elétrico.

3.2.1.2. Sensores de início/final de curso

Sensores de início/final de curso são dispositivos eletromecânicos utilizados para indicar se uma peça mecânica se encontra, ou não, numa determinada posição. Como seu próprio nome já indica, estes sensores são muito utilizados para identificar se uma determinada peça se encontra, ou não, em sua posição inicial ou final. Existem diversos tipos de sensores de início/final de curso, no entanto, os mais utilizados são os sensores do tipo ótico e os sensores do tipo mecânico.

Princípio de funcionamento – sensores óticos

O funcionamento de um sensor ótico de início/final de curso se baseia na transmissão/interrupção de um feixe de luz infra-vermelho emitido por um diodo emissor de luz (LED – do inglês *Light Emitting Diode*) e detectado por um fototransistor. Neste tipo de sensor, quando o feixe de luz alcança o fototransistor, a energia dos fótons recebidos pelo seu substrato é suficientemente grande para que o mesmo entre num estado de condução elétrica. Este estado de condução pode então ser utilizado para gerar um sinal elétrico que indicará ao circuito eletrônico se a peça em questão está, ou não, numa determinada posição. A Figura 64 ilustra o esquema elétrico do sensor ótico utilizado neste projeto.

Figura 64 – Esquema elétrico de um sensor ótico de início/final de curso: a) condição na qual o fototransistor se encontra em condução, b) condição na qual o fototransistor se encontra em corte.

Princípio de funcionamento – sensores mecânicos (*microswitchs*)

Diferentemente dos sensores óticos que são acionados indiretamente pela interrupção do feixe de luz, os sensores mecânicos de início/final e curso são acionados diretamente pela peça em movimento. A Figura 65 ilustra os dois estados possíveis para tais sensores. Na Figura 65a o sensor se encontra não acionado, o que faz com que o primeiro terminal seja conectado ao terceiro. Já na Figura 65b, o sensor se encontra no seu estado acionado, o que faz com que o primeiro terminal seja conectado ao segundo.

Figura 65 – Esquema elétrico de um sensor mecânico de início/final de curso: a) sensor não acionado e b) sensor acionado.

Sensores de início/final de curso utilizados neste projeto

Neste projeto, foram utilizados os dois tipos de sensores de início/final de curso discutidos anteriormente. O sensor ótico utilizado foi o modelo C860NP, enquanto o sensor mecânico foi um *microswitch* com haste comumente encontrado no mercado.

3.2.2. Montagem dos componentes eletromecânicos

3.2.2.1. Instalação do sensor de pressão

O sensor de pressão, juntamente com o seu selo de PTFE, foi conectado à câmara do pistão através de um parafuso fabricado sob encomenda, como mostrado na

visão explodida ilustrada pela Figura 66. A Figura 67 ilustra o pistão já montado na câmara do pistão.

Figura 66 – Vista explodida da instalação do sensor de pressão.

Figura 67 – Sensor de pressão já instalado.

3.2.2.2. Instalação dos sensores óticos de início/final de curso

Foram utilizados três sensores óticos de início/final de curso na montagem do sistema de bombeamento. Os sensores óticos, já soldados em sua placa de circuito impresso, foram fixados aos seus suportes através de oito parafusos de rosca M3. Estes suportes, por sua vez, foram fixados a bomba (cada um através de quatro parafusos de rosca M3) de tal forma que o primeiro sensor ótico fosse acionado precisamente quando o

pistão se encontrasse no início do seu curso, o segundo quando o pistão estivesse aproximadamente a 10% do final do seu curso e o terceiro quando o pistão estivesse precisamente no final de seu curso.

Além dos três sensores óticos já comentados, foram utilizados mais dois sensores mecânicos na construção da bomba. Estes dois sensores foram adicionados ao sistema como medida de segurança para, no caso dos sensores óticos que identificam o início e o final do curso do pistão apresentar qualquer tipo de falha, o motor seja automaticamente desligado quando o pistão ultrapassar 1 mm dessas posições.

O desligamento do motor é realizado por tais sensores mecânicos através do corte da alimentação do motor, como ilustrado esquematicamente na Figura 68.

Figura 68 – Esquema elétrico da ligação dos sensores mecânicos de início/final de curso.

Ambos os sensores foram fixados aos seus suportes através de dois parafusos de rosca M3, enquanto os próprios suportes foram fixados ao guia do fuso através de 4 parafusos de rosca M3. A Figura 69 ilustra uma visão explodida da fixação dos cinco sensores de início/final de curso no guia do fuso de esferas, enquanto a Figura 70 ilustra todos os sensores já fixados.

Figura 69 – Vista explodida da instalação dos sensores de início/final de curso.

Figura 70 – Sensores já instalados no guia do fuso de esferas.

3.2.3. Principais componentes do circuito eletrônico

3.2.3.1. Microcontrolador

Microcontroladores são dispositivos programáveis utilizados em circuitos eletrônicos com a função de controlar seu funcionamento. Os microcontroladores são

estruturalmente muito similares com os microcomputadores, a Tabela 8 resumi as principais semelhanças entre um microcomputador e um microcontrolador.

Tabela 8 – Semelhanças entre os microcontroladores e os microcomputadores.

Microcomputador	Microcontrolador
Disco Rígido	Memória Flash
Memória RAM	Memória RAM
Processador	Unidade Lógica Aritmética (ALU)
Relógio em Tempo Real	Timers
Porta serial, paralela, USB, etc...	Porta serial, paralela, SPI, etc...

Princípios de funcionamento dos microcontroladores

O princípio de funcionamento dos microcontroladores é muito similar ao funcionamento dos microcomputadores. Ao ser energizado, o microcontrolador começa a executar o *firmware* gravado na sua memória de programa, semelhantemente ao que ocorre com os microcomputadores que quando ligado, começam a executar os *softwares* gravados no seu disco rígido.

Microcontrolador utilizado neste projeto

O microcontrolador utilizado neste projeto foi o PIC16F877A fabricado pela Microchip (Chandler, EUA). O PIC16F877A consiste de um microcontrolador de 8 bits que pode operar com frequências de DC-20MHz e que possui uma memória de programa de 8K, 368 bytes de memória RAM, 256 bytes de memória ROM, 15 fontes de interrupção, três timers (um de 16 bits e dois de 8 bits), comunicação serial RS232, SPI e I²C e um conversor analógico-digital de 10 bits com 10 canais. A Figura 71 ilustra o diagrama funcional do PIC16F877A.

Figura 71 – Diagrama funcional do PIC16F877A

3.2.3.2. Conversor analógico-digital (ADC)

Conversores analógico-digitais (ADC – do inglês *analog-to-digital converter*) são componentes utilizados na amostragem e conversão de uma grandeza analógica (como por exemplo, temperatura, pressão, corrente ou tensão elétrica) em uma representação digital que pode ser utilizada por sistemas digitais.

Existem diversos tipos de ADCs, desde os mais simples, como os ADC de rampa digital, aos mais complexos, como os ADC sigma/delta, que podem possuir inclusive amplificadores e filtros digitais incorporados na sua construção.

Princípios de funcionamento dos ADC

O princípio de funcionamento dos ADCs depende muito do método de conversão utilizado pelo mesmo. Como comentado anteriormente, existem diversos métodos de conversão, como os métodos por rampa digital, por aproximação sucessiva, por rampa digital crescente/decrescente (rastreador), por rampa dupla, por modulação sigma-delta, etc.

No entanto, independente do método utilizado, um ADC funciona convertendo o valor de uma determinada grandeza física analógica num determinado instante de tempo em uma representação numérica digital do mesmo. Isto é, ele converte o valor de uma grandeza física em uma sequência de 1s e 0s de forma que um sistema digital, como um microcomputador, por exemplo, possa processar, registrar e até mesmo atuar sobre o sistema que gerou o sinal analógico.

ADC utilizado neste projeto

O ADC utilizado neste projeto foi o AD7705 da Analog Device. Este ADC consiste de um conversor analógico-digital de 16 bits que utiliza o método de conversão por modulação sigma/delta. Este conversor possui dois canais diferenciais de entrada, possui internamente um amplificador programável que pode ter o seu ganho ajustado de 1x até 128x em incrementos digitais (ou seja, 1x, 2x, 4x, 8x, 16x, 32x, 64x e 128x), além de um filtro digital do tipo passa baixa. O diagrama funcional do AD7705 pode ser encontrado na Figura 72.

Figura 72 – Diagrama funcional do AD7705.

3.2.3.3. Gerador de formas de ondas programável

Geradores de formas de ondas (*waveform generator*) são componentes eletrônicos desenvolvidos com a função de gerar um sinal analógico (ou digital) contínuo e periódico ao longo do tempo. Atualmente pode se encontrar comercialmente disponíveis geradores de formas de ondas capazes de gerar ondas quadradas (Figura 73a), senoidais (Figura 73b), triangulares (Figura 73c) e dente-de-serra (Figura 73d).

Figura 73 – Formas de ondas comumente geradas por geradores de onda: a) quadrada, b) senoidal, c) triangular e d) dente-de-serra.

Princípio de funcionamento do gerador de ondas programável

O método utilizado na geração da onda depende muito da forma de onda em questão. Apesar dos métodos diferirem muito um do outro, todas as formas de ondas são criadas a partir da manipulação/conversão de uma frequência de referência que pode ser gerada externamente, ou internamente, através de um cristal de quartzo, ressonador cerâmico ou mesmo um circuito oscilador do tipo RC (**Resistivo-Capacitivo**).

Gerador de ondas utilizado neste projeto

O gerador de ondas utilizado neste projeto foi o AD9833. Este gerador de ondas é capaz de gerar ondas do tipo senoidal, triangular e quadrada a partir de uma frequência de referência criada por um oscilador externo. Neste projeto apenas a geração de ondas quadradas foi utilizada. A Figura 74 ilustra o diagrama funcional do AD9833.

Figura 74 – Diagrama funcional do AD9833.

3.2.3.4. Driver do motor de passo

Os *drivers* dos motores de passo são circuitos elétricos responsáveis pelo acionamento das bobinas dos motores de passos. Existem diversos tipos de *drivers*, desde

os mais simples que controlam a tensão de alimentação das bobinas dos motores até os mais complexos que controlam a corrente elétrica que flui através das mesmas.

Princípio de funcionamento dos drivers de motores de passo

Os *drivers* dos motores de passo podem operar de três modos, conhecidos como modos *Full-Step*, *Half-Step* e por micropassos.

No modo *Full-Step*, o *driver* energiza apenas uma fase a cada instante de tempo. Neste modo, inicialmente o *driver* do motor energiza a fase A, fazendo com que um par de dentes do rotor se alinhe com o campo magnético criado pela corrente elétrica que circula pela bobina (Figura 75a). Na seqüência, a fase A é desligada e a fase B energizada, fazendo com que o par de dentes mais próximas à bobina B se alinhe com o novo campo magnético (Figura 75b). A próxima etapa consiste do desligamento da fase B e a energização da fase C (Figura 75c). Após a fase C ser energizada a próxima etapa consiste do desligamento da mesma e energização da fase A, iniciando um novo ciclo. Neste modo, a seqüência de excitação das fases do motor é: $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow A \rightarrow \dots$

Figura 75 – Ilustração do modo de operação *Full-Step*.

O modo de operação *Half-Step* é muito similar ao *Full-Step*. A única diferença deste modo de operação, quanto comparada a anterior, é a existência de uma etapa de excitação intermediária entre as excitações de uma fase e outra, na qual ambas as

fases estão excitadas. Este modo de operação resulta num ângulo de rotação duas vezes menor que as fornecidas pelo modo *Full-Step*.

Neste modo de operação, após a fase A ser energizada (Figura 76a), a próxima etapa de excitação é a excitação das fases A e B simultaneamente (Figura 76b). Nesta etapa, as duas bobinas atraem os dentes do rotor com a mesma intensidade, fazendo com que o rotor do motor adquira uma posição intermediária. Após esta etapa, a corrente elétrica de excitação que circula pela fase A é cortada, enquanto a fase B permanece excitada (Figura 76c), fazendo com que o rotor adquira uma nova posição com os dentes do rotor totalmente alinhada com os da fase B. Deste modo, quando se utiliza o modo *Half-Step*, a seqüência de excitação das fases é : $A \rightarrow A+B \rightarrow B \rightarrow B+C \rightarrow C \rightarrow C+A \rightarrow A \rightarrow \dots$

Figura 76 – Ilustração do modo de operação *Half-Step*.

Quando necessitamos de uma maior precisão (passo angular menor que aquele fornecido pelos dois modos anteriormente descritos) podemos utilizar um terceiro modo de acionamento de motores de passo conhecida como micropasso.

O modo de micropassos controla o fluxo da corrente elétrica que alimenta as bobinas do motor para dividir um passo do motor em vários passos menores. Na prática, isso é realizado inicialmente excitando a fase A com 100% da corrente elétrica normalmente utilizada na sua excitação e posteriormente incrementando a corrente da fase B até que ambas estejam excitadas à 100%. Em seguida, a corrente da fase A é decrementada até

0% enquanto a da fase B permanece inalterada (100%). O próximo passo é o incremento da corrente elétrica da fase C até 100% e posteriormente o decréscimo da corrente da fase B até 0%. Na seqüência a corrente da fase A é incrementada até 100% e posteriormente a corrente da fase C decrementada até 0%, iniciando assim um novo ciclo. O valor do incremento/decremento da corrente é determinado pelo número de micropassos desejado. Deste modo, a seqüência de excitação (Figura 77) de um motor de três fases no modo micropasso é: $A_{100\%}|B_{0\%}|C_{0\%} \rightarrow \dots \rightarrow A_{100\%}|B_{100\%}|C_{0\%} \rightarrow \dots \rightarrow A_{0\%}|B_{100\%}|C_{0\%} \rightarrow \dots \rightarrow A_{0\%}|B_{100\%}|C_{100\%} \rightarrow \dots \rightarrow A_{0\%}|B_{0\%}|C_{100\%} \rightarrow \dots \rightarrow A_{100\%}|B_{0\%}|C_{100\%} \rightarrow \dots \rightarrow A_{100\%}|B_{0\%}|C_{0\%} \rightarrow \dots$

Figura 77 – Seqüência de excitação de um motor de três fases no modo micropasso.

Além da maior precisão fornecida por este modo de operação, esta tecnologia também possibilita ao motor operar com baixíssimo ruído e em velocidades extremamente baixas. A utilização de micropassos pode possibilitar a divisão do passo angular de um motor em até 250 vezes, deste modo, um motor que possui $0,72^\circ/\text{passo}$ (como o motor utilizado neste projeto) pode operar, utilizando uma divisão de 250 micropassos por passo, com um rotacionamento de $0,00288^\circ/\text{passo}$. A Figura 78 ilustra uma comparação do ângulo de rotação do motor em função do tempo para três valores de micropassos.

Figura 78 – Exemplo do funcionamento dos micropassos.

Driver do motor de passo utilizado neste projeto

O *driver* do motor de passo consistiu do RKD514L-A. Tal *driver* faz parte do pacote RK564AA-N50 adquirido da Oriental Motors. O RKD514L-A possui duas chaves de seleção para ajustes da corrente elétrica de alimentação do motor, sendo um para a corrente de excitação das fases quando o motor está em movimento, enquanto a segunda para a excitação das fases quando o motor está parado.

Este *driver* também possui duas chaves seletoras de micropassos que podem ser ajustadas individualmente para um dos 16 diferentes micropassos capazes de serem realizadas pelo mesmo. O controle do sentido de direção da rotação do motor (horário, ou anti-horário), assim como qual ajuste de micropasso deve ser utilizado (ajuste da primeira ou da segunda chave) devem ser fornecidos através de um controlador externo conectado ao mesmo. A Figura 79 mostra uma foto do *driver* do motor de passo utilizado neste projeto.

Figura 79 – Foto do *driver* RKD514L-A do motor de passo.

3.2.4. Circuito eletrônico

O circuito eletrônico desenvolvido para o controle da bomba pode ser visto, na forma de diagrama de blocos, na Figura 80. Tal circuito é constituído basicamente de um microcontrolador PIC16F877A, um conversor analógico-digital AD7705 responsável pela aquisição do sinal já amplificado proveniente do sensor de pressão, um gerador de formas de onda AD9833 responsável pela criação da onda quadrada de acionamento do motor de passo conectado ao seu *driver* e um conversor RS232-USB utilizado na conversão da comunicação serial utilizada pelo PIC16F877A para a comunicação USB.

Figura 80 – Diagrama de blocos do circuito eletrônico da bomba.

3.2.4.1. Fonte

A fonte desenvolvida para a alimentação o circuito eletrônico da bomba consistiu da utilização dos reguladores de tensão da família LM78XX para as tensões positivas de +12V (LM7812) e +5V (LM7805) e dos reguladores de tensão da família LM79XX para as tensões negativas de -12V (LM7912) e -5V (LM7905), além de um regulador LM317 de tensão variável ajustado para +10V, todos apropriadamente montados em dissipadores de calor de alumínio.

Para o circuito gerador das tensões simétricas de $\pm 12V$ e $\pm 5V$ (circuito da parte de cima da Figura 81), foi utilizado um transformador de tensão com saídas 15V+15V de 800mA, enquanto para o circuito gerador das tensões de +10V e 5V (circuito da parte de baixo da Figura 81), foi utilizado um transformador de tensão com saída de 15V de 500mA. A retificação da tensão alternada proveniente dos transformadores foi realizada através de pontes retificadoras BF40B6D. Os capacitores C1, C5 e C18 foram do tipo eletrolítico de óxido de alumínio, enquanto os demais capacitores foram os do tipo cerâmico. Os diodos

D1-D6 são diodos 1N4148 de chaveamento rápido utilizados apenas como medida de segurança para evitar a queima dos reguladores de tensão, sendo o seu uso opcional.

Como pode ser visto na Figura 81, a fonte de alimentação desenvolvida possui duas saídas de +5V. A tensão de +5V gerada pelo componente U10 foi utilizada na alimentação dos componentes digitais, enquanto a tensão de +5V gerada pelo componente U1 foi utilizada na alimentação dos circuitos analógicos. Esta separação das alimentações dos circuitos digitais e analógicos foi realizada com o intuito de impedir que as rápidas oscilações nas tensões de alimentação comumente ocasionadas pelos chaveamentos dos circuitos digitais não comprometessem a precisão dos componentes analógicos altamente sensíveis a tais oscilações.

Figura 81 – Circuito da fonte de alimentação.

3.2.4.2. Circuito principal

A Figura 82 ilustra o circuito elétrico principal da bomba.

Figura 82 – Circuito principal da bomba.

Neste circuito pode se ver que o microcontrolador PIC16F877A é operado com um cristal de quartzo de 20 MHz (X1) enquanto o ADC AD7705 e o gerador de formas

de ondas AD9833 são operados com um oscilador à cristal de quartzo AEL9710CSN de frequência de 1 MHz (U7).

Os pinos Rx e Tx utilizados pelo microcontrolador para comunicação serial RS232 são ligados diretamente ao circuito conversor RS232-USB (discutido mais a frente). Dois dos conectores HDR1x4 (Otico_Alím e Otico_Sinal) são utilizados na conexão do circuito dos sensores óticos ao microcontrolador. O outro HDR1x4 (ICSP_1) é utilizado para futuras atualizações do *firmware* da bomba.

As saídas e entradas digitais do controlador da válvula EMTCS4UW utilizada como *check valve* são conectadas diretamente as portas digitais do microcontrolador através do conector HDR1x12. Os subcircuitos X3 e X5 (circuito de controle do motor e circuito de amplificação e condicionamento do sinal do sensor de pressão, respectivamente) são comentados na sequência.

3.2.4.3. Circuito de controle do motor

O circuito de controle do motor (subcircuito X5 da Figura 82) é apresentado na Figura 83.

Figura 83 – Circuito de controle do motor.

Neste circuito, os pinos M_Dir, M_AWCOFF e M_CS possuem as funções de definir o sentido da rotação do motor, desligar todas as bobinas do motor e escolher qual chave de seleção de micropasso que o motor irá utilizar, respectivamente. Já os pinos M_TIM e M_OH são sinais enviados pelo *driver* do motor a cada vez que a excitação das bobinas inicia um novo ciclo e para indicar um sobreaquecimento do *driver*, respectivamente. Estes pinos (ligados ao microcontrolador) são ligados ao *driver* do motor de passo através dos conectores HDR1x8 e HDR1x4.

O pino M_Step é conectado à saída do AD9833 responsável pela geração do trem de pulsos (onda quadrada) que é utilizada pelo *driver* do motor.

3.2.4.4. Circuito de amplificação e condicionamento do sinal do sensor de pressão

O circuito de amplificação e condicionamento do sinal do sensor de pressão (subcircuito X3 da Figura 82) é apresentado na Figura 84.

Figura 84 – Circuito de condicionamento do sinal do sensor de pressão.

Neste circuito, o sinal proveniente do sensor de pressão EPB-C11-5KP (conectado diretamente no conector HDR1x4) é amplificado duas vezes pelo amplificador operacional instrumental INA118P.

Este circuito também é responsável pela criação da tensão de referência (saída do amplificador OPA227P) que será utilizada pelo ADC AD7705 durante a conversão do sinal analógico para sua representação digital. Esta tensão de referência é criada a partir de um circuito divisor de tensão (compostos pelos resistores R35, R44 e R45) conectado a tensão de 10V utilizada na alimentação do sensor de pressão.

Desta forma, caso a tensão de alimentação do sensor de pressão sofra alguma oscilação, a tensão de referência do AD7705 oscilará proporcionalmente, compensando assim a oscilação do sinal de saída do sensor (causado pela oscilação da sua alimentação) proporcionando uma leitura constante do sinal, independente de oscilações da tensão de alimentação.

3.2.4.5. Sensores óticos

O circuito eletrônico dos sensores óticos é apresentado na Figura 85. Os resistores R26, R27 e R28 são utilizados para limitar a corrente elétrica que alimenta o LED infra-vermelho dos sensores óticos C860NP em torno de 12 mA, enquanto os resistores R29, R30 e R31 são utilizados para limitar a corrente elétrica que circula pelos fototransistores em torno de 1 mA quando estes estão em condução.

Neste circuito, quando os sensores não estão acionados (fototransistor em estado de condução), o sinal de saída do circuito (Otico_Inicio, Otico_Limpar e Otico_Fim) permanece em aproximadamente 5V e quando acionados (fototransistor em corte), o sinal de saída do circuito permanece em 0V, funcionando dessa forma em lógica inversa.

Figura 85 – Circuito dos sensores óticos de início/fim de curso.

3.2.4.6. Conversão RS232-USB

A conversão da comunicação RS232 utilizada pelo PIC16F877A para a comunicação USB foi realizada através do adaptador TATO-USB2 desenvolvido pela TATO Equipamentos Eletrônicos. Na realidade, tal adaptador consiste do componente FT232R desenvolvido pela FTDI Chip soldado em uma placa de circuito impresso já com um conector USB. A Figura 86 mostra uma foto do adaptador TATO-USB2.

Figura 86 – Conversor RS232-USB utilizado neste projeto.

Quando o conversor é utilizado em ambiente Windows, quando conectado ao microcomputador, o sistema operacional executa o seu *driver* (previamente instalado no microcomputador) que cria uma porta virtual de comunicação serial (ou seja, cria uma porta RS232 que não existe fisicamente no microcomputador). Todas as informações enviadas

para esta porta virtual são convertidas para o formato utilizado pela comunicação USB e transmitidas pelo microcomputador através da porta USB na qual o conversor está conectado. Quando o conversor recebe estas informações, ele as converte para o formato RS232 e transmite através de sua porta serial ao dispositivo conectado a mesma (no caso, o microcontrolador PIC16F877A).

3.3. Software – Driver de Instalação para Windows

O *software* desenvolvido para o controle do equipamento é composto de duas partes principais. A primeira parte constitui do *software* principal (discutido posteriormente no Capítulo V) que contém toda a interface gráfica a partir da qual o usuário pode ajustar os parâmetros de operação do equipamento (fluxo de bombeamento, pressão máxima, pressão mínima, etc...), enquanto a segunda parte constitui do *driver* do equipamento, através do qual o *software* principal acessa a bomba, como mostrado na Figura 87.

Figura 87 – Diagrama de blocos ilustrando a estrutura utilizada para o controle da bomba via microcomputador.

O *driver* desenvolvido para o controle da bomba foi programado na forma de um arquivo do tipo DLL (Dynamic Link Library) utilizando o Visual Basic versão 6. O *driver* na realidade consiste de três arquivos, Pump.dll (o *driver* em si), Pump_Comm.ini

(que armazena os dados de configuração das portas de comunicação) e o arquivo Pump.ini (que armazena, entre outras informações, dados de calibração, parâmetros eletrônicos e mecânicos da bomba).

3.3.1. Rotina de inicialização da DLL

Assim que o *software* principal é aberto, o arquivo Pump.dll é carregado na memória do microcomputador e o sistema operacional executa a rotina de inicialização desta DLL (mostrada em forma de fluxograma pela Figura 135).

Esta rotina carrega os dados de configuração da comunicação contidos no arquivo Pump_Comm.ini e na sequência, tenta abrir a porta serial virtual (criada pelo *driver* do conversor RS232-USB) especificada no arquivo Pump_Comm.ini. Caso haja algum erro no processo de abertura da porta serial virtual, a DLL gera um erro informando que não foi possível se comunicar com a bomba e realiza a rotina de finalização da DLL.

Caso a porta seja aberta normalmente, a DLL requisita ao dispositivo conectado a porta serial aberta anteriormente a enviar a sua identificação. Caso o dispositivo conectado não seja a bomba, é gerado um erro informando que não foi possível se comunicar com a bomba e realiza a rotina de finalização da DLL. Caso a identificação enviada pelo dispositivo seja a bomba, a DLL a configura, carrega os dados contidos no arquivo Pump.ini e entra num estado de espera.

3.3.2. Rotina de finalização da DLL

A rotina de finalização da DLL é realizada sempre que o sistema operacional encontra um erro durante seu funcionamento ou quando o *software* é fechado pelo usuário. Esta rotina, quando executada, verifica se a porta serial especificada no arquivo Pump_Comm.ini se encontra aberta, caso se encontre, a rotina fecha a porta serial e descarrega o arquivo da memória do PC. A rotina de finalização é mostrada em forma de fluxograma pela Figura 136.

Figura 88 – Rotina de inicialização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.

Figura 89 – Rotina de finalização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.

3.3.3. Rotinas principais

A DLL desenvolvida ainda possui quatro rotinas principais, duas para envio de dados do microcomputador para a bomba e duas para recebimento de dados da bomba.

3.3.3.1. Rotinas de envio de dados para a bomba

Quando o usuário ajusta um novo valor de fluxo de bombeamento a partir do *software* principal, este o envia à DLL que converte o novo valor de fluxo para a frequência da onda quadrada que o gerador de formas de ondas deverá enviar para o motor de modo que este produza o fluxo desejado. Após o cálculo ter sido realizado, a DLL então envia o novo valor de frequência para a bomba e entra novamente no estado de espera (Figura 90).

Figura 90 – Rotinas de envio de dados para a bomba.

Quando o usuário ajusta a bomba para que a mesma realize uma nova ação (como por exemplo, bombear, parar, reencher a seringa, etc...) estas ações são enviadas para a DLL pelo *software* principal, e então o respectivo comando é enviado para a bomba, como ilustrado na segunda rotina da Figura 90.

3.3.3.2. Rotinas de recebimento de dados da bomba

A bomba constantemente envia informações sobre o seu funcionamento ao *software* principal de modo que o usuário possa ter controle sobre o sistema

cromatográfico. As duas principais informações repassadas pela bomba é o valor da pressão atual do sistema e a posição que o pistão se encontra.

Quando tais informações são recebidas pela DLL, esta executa as rotinas ilustradas na Figura 91. Ao receber uma nova informação da pressão do sistema a DLL inicialmente compara o novo valor da pressão com as pressões limites ajustadas pelo usuário. Caso esta pressão seja maior que a pressão máxima ajustada, ou menor que a pressão mínima ajustada, a DLL automaticamente desliga o bombeamento antes de repassar a nova pressão ao *software* principal. Caso a pressão não esteja fora dos limites ajustados, a DLL simplesmente repassa a informação para o *software* principal e retorna ao estado de espera.

Figura 91 – Rotinas de recebimento de dados da bomba.

Quando uma nova posição do pistão é enviada pela bomba, assim que a DLL recebe tal informação ela a converte para o respectivo volume ainda restante na seringa e repassa este valor ao *software* principal antes de entrar no estado de espera.

4. Resultados

4.1. Calibração do Fluxo

A calibração do fluxo de bombeamento do sistema desenvolvido foi realizada através do método gravimétrico da seguinte maneira.

Inicialmente pesou-se 45 frascos do tipo eppendorf de 0,5 mL em uma balança analítica AG285 (Mettler Toledo) . Em seguida, a bomba foi preenchida com água, o fluxo desejado foi ajustado e o bombeamento foi iniciado. Cinco minutos após o bombeamento ter sido ligado, iniciou-se a coleta do líquido bombeado em um dos frascos do tipo eppendorf. Após um determinado tempo de coleta (ver Tabela 9), o frasco foi fechado, novamente pesado e a diferença de peso foi calculada. Foram realizadas cinco medidas para cada um dos nove fluxos testados (totalizando 45 medidas).

Tabela 9 – Parâmetros utilizados no processo de calibração do fluxo.

Fluxo Ajustado (μL/min)	Tempo de Coleta (min)	Volume de Coleta (μL/min)	Peso Respetivo (gramas)
0,100	50,0	5,0	0,005
0,500	50,0	25,0	0,025
1,000	50,0	50,0	0,050
5,000	20,0	100,0	0,100
10,000	10,0	100,0	0,100
50,000	4,0	100,0	0,100
100,000	2,0	200,0	0,200
200,000	1,0	200,0	0,200
250,000	1,0	250,0	0,250

A Tabela 10 resume os resultados obtidos a partir das cinco repetições de cada um dos nove fluxos testados durante o processo de calibração.

Tabela 10 – Dados obtidos durante a calibração do fluxo.

Fluxo Ajustado ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Fluxo Medido ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Desvio Padrão ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Desvio Padrão Relativo (%)
0,100	0,098	0,00167	1,71
0,500	0,499	0,00228	0,45
1,000	0,998	0,00261	0,26
5,000	4,999	0,00652	0,13
10,000	10,000	0,01225	0,12
50,000	50,005	0,03260	0,06
100,000	99,990	0,05477	0,05
200,000	200,080	0,13038	0,06
250,000	250,060	0,15166	0,06

Uma vez que os fluxos produzidos pela bomba se mostraram lineares e muito próximos dos fluxos ajustados (Figura 92), não houve necessidade de qualquer tipo de correção eletrônica do fluxo produzido pela bomba.

4.2. Testes Realizados em Condições Reais de Uso

Depois de concluído a etapa de calibração do fluxo (realizadas sem coluna conectada ao sistema de bombeamento), foram realizados três testes em condições reais de uso no qual uma coluna capilar de 250 μm de d.i. x 15 cm de comprimento empacotada com partículas C18 de 3 μm foi conectada a bomba. Os três fluxos de fase móvel (ACN/ H_2O 50/50) testados foram de 1, 3 e 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Após o início do bombeamento e estabilização do fluxo (verificada pela estabilização da pressão da coluna), foram realizadas 20 estimativa do fluxo através da injeção de um composto não retido (uracila) a cada 10 minutos. A média das 20 estimativas para o fluxo de 1, 3 e 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ foram de 1,01 $\mu\text{L}/\text{min} \pm 0,97\%$, 3,00 $\mu\text{L}/\text{min} \pm 0,83\%$ e 4,99 $\mu\text{L}/\text{min} \pm 0,73\%$, respectivamente.

Figura 92 – Calibração do fluxo. a) Fluxos de 0 a 250,0 μL/min, b) ampliação da faixa de 0 a 10,0 μL/min e c) ampliação da faixa de 0 a 1,0 μL/min.

5. Conclusões

Como demonstrado pelos resultados obtidos nos testes de calibração, e confirmados pelos testes em condições reais de uso, a bomba desenvolvida apresentou um excelente desempenho, não havendo necessidade de qualquer tipo de correção eletrônica do fluxo fornecido pela mesma.

Capítulo III

Desenvolvimento do Forno para cLC

1. Introdução

A temperatura da coluna tem um papel muito importante no controle de várias propriedades de interesse da cromatografia como, por exemplo, o coeficiente de partição, a pressão de vapor, a viscosidade e a difusibilidade molecular, entre muitas outras⁶⁷. Deste modo, quase todos os parâmetros de importância na cromatografia, incluindo o tempo de retenção, a seletividade, a eficiência, a pressão do sistema e várias outras propriedades da fase estacionária, serão mais, ou menos, influenciados por variações da temperatura da coluna^{68, 69}.

1.1.1. Viscosidade da fase móvel

A dependência da viscosidade da fase móvel em função da temperatura é dada pela equação de Carrancio

$$\eta = A \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad \text{Equação 2}$$

onde A é uma constante dependente da massa e do volume molar do líquido, E_a a energia de ativação necessária para iniciar o fluxo entre as camadas moleculares, R a constante dos gases e T a temperatura absoluta.

Esta equação mostra que a viscosidade da fase móvel é reduzida com o aumento da temperatura, resultando assim, numa conseqüente diminuição da pressão da coluna.

1.1.2. Difusibilidade molecular

O efeito da temperatura na difusibilidade molecular de um analito é dado pela equação de Einstein-Stokes

$$D_m = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}$$

Equação 3

onde k_B é a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade da fase móvel e r o raio da molécula.

A partir da Equação 3, pode-se verificar que a difusibilidade molecular de um composto sofre um efeito duplo da temperatura. O primeiro efeito resulta da dependência direta com a temperatura, enquanto o segundo resulta da diminuição da viscosidade da fase móvel com o aumento da temperatura.

1.1.3. Constante dielétrica da água

A dependência da constante dielétrica da água em função da temperatura pode ser aproximada pela seguinte equação

$$k_{\text{água}} \approx 80 - 0,4(T - 293)$$

Equação 4

onde T é a temperatura absoluta.

Tal equação revela que o aumento da temperatura reduz o caráter polar da água, isto é, faz com que a água vá ganhando um caráter moderadamente apolar (se comportando mais como um solvente orgânico polar como o metanol ou a acetonitrila) a medida que a temperatura é aumentada. Deste modo, o aumento da temperatura pode funcionar semelhantemente a um gradiente de fase móvel na qual há uma diminuição da polaridade do eluente ao longo da corrida cromatográfica.

1.2. Efeitos da Temperatura na Eficiência da Coluna

A eficiência de uma coluna cromatográfica em função da velocidade linear média da fase móvel é dada pela equação

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_s + C_m)u$$
Equação 5

conhecida como equação de *van Deemter*. Nesta equação, H é altura do prato teórico, A é um termo relacionado ao fenômeno dos múltiplos caminhos através dos quais um analito pode percolar a coluna, B é um termo relacionado à difusão longitudinal do analito, C_s e C_m são termos relacionados ao transporte de massa do analito da fase móvel para a fase estacionária e vice-versa, e u é a velocidade linear média da fase móvel. Deste modo, se soubermos como a temperatura influencia o comportamentos dos termos A , B , C_s e C_m , podemos prever a influência da temperatura na eficiência da coluna.

O efeito da temperatura no termo A , que é dado pela equação

$$A = 2\lambda d_p$$
Equação 6

onde λ é uma constante relacionada com a qualidade do empacotamento da coluna e d_p o diâmetro da partícula, ainda é incerto, mas, é esperado que a elevação da temperatura melhore o perfil laminar do fluxo da fase móvel e aumente a difusão lateral das moléculas dos analitos, no entanto, estes efeitos não são significativos⁷⁰.

O termo B , que é dado pela equação

$$B = 2\gamma D_m$$
Equação 7

onde γ é uma constante relacionada ao empacotamento da coluna e D_m o coeficiente de difusão do analito na fase móvel, aumenta com o aumento da temperatura devido ao aumento do coeficiente de difusão. No entanto, este efeito só se torna significativo em velocidades lineares médias muito baixas.

Os termos C_s e C_m , que são dados pelas equações

$$C_s = \frac{f_s(k')d_f^2}{D_s} \quad \text{Equação 8}$$

e

$$C_m = \frac{f_m(k')d_p^2}{D_m} \quad \text{Equação 9}$$

onde $f_s(k')$ e $f_m(k')$ são funções complexas do fator de retenção k' , d_f é espessura da fase estacionária, d_p é o diâmetro da partícula, D_s e D_m são o coeficiente de difusão do analito na fase estacionária e na fase móvel, respectivamente, são reduzidos com o aumento da temperatura devido ao aumento dos coeficientes de difusão do analito na fase móvel (D_m) e na fase estacionária (D_s).

Deste modo, o aumento da temperatura normalmente é benéfico à eficiência da coluna, com exceção apenas dos casos nos quais um grande coeficiente de difusão molecular, quando associado com a utilização de uma baixa velocidade linear média da fase móvel, eleva muito o termo B da equação de *van Deemter*⁶⁸.

1.3. Histórico da Programação de Temperatura na cLC

Historicamente, o primeiro relato do efeito da temperatura na retenção de compostos na cromatografia líquida foi realizado por Strain⁷¹ em 1946. Vinte anos depois, G. Hesse e H. Engelhardt⁷² demonstraram pela primeira vez uma aplicação da programação de temperatura na cromatografia líquida. Neste trabalho, os autores realizaram uma separação de quatro compostos em uma coluna de fase normal de 11 mm de d.i. utilizando uma rampa de temperatura de 7°C/hora com um tempo de análise de 10 horas.

Na década seguinte, outros trabalhos relacionados com programação de temperatura na LC foram relatados na literatura^{73, 74}, no entanto, os primeiros estudos dos efeitos da temperatura na cLC só foram realizados na década de 1980 por Takeuchi⁷⁵, Hirata⁷⁶, Bowermaster⁷⁷, McNair⁷⁸ e Jinno⁷⁹.

Bowermaster e McNair⁸⁰ relataram em 1984 que um aumento de 3,75 °C na temperatura da coluna causa um efeito na retenção dos compostos equivalente a um aumento de 1% da quantidade de metanol na composição de uma fase móvel metanol/água. Em 1997 Chen e Horváth⁸¹ relataram que o aumento de 5 °C na temperatura da coluna causa um efeito na retenção dos compostos equivalente a um aumento de 1% da quantidade de acetonitrila (ACN) na composição de uma fase móvel ACN/água.

Molander *et al.*⁸² relataram em 1999 que o aumento da temperatura de uma coluna empacotada com partículas de sílica de 25°C para 70°C aumentava a eficiência da mesma em 48%. No mesmo ano, Dolan *et al.*⁸³ relataram também que o aumento da temperatura de uma coluna empacotada com partículas de zircônia de 25°C para 65°C aumentava a eficiência da mesma em 30%.

Sheng *et al.*⁸⁴ relataram em 1997 que a elevação da temperatura de uma coluna de fase reversa de 24°C para 80°C resulta numa diminuição de 2,2 vezes da viscosidade de uma fase móvel composta por acetonitrila/água de proporção de 72/28%, um aumento de 2,6 vezes no coeficiente de difusão do analito testado (naftaleno), uma velocidade linear média ótima cerca de 2,6 maior, e uma diminuição de 2,5 vezes do termo C da equação de *van Deemter*. Neste mesmo trabalho, os autores relatam também que a diminuição da pressão em torno de duas vezes causada pela diminuição da viscosidade da fase móvel permite a utilização de partículas de empacotamento menores ou colunas maiores que, em ambos os casos, poderiam mais que duplicar o número de prato teórico de uma coluna capilar.

1.4. Degradabilidade de Compostos Instáveis

Um ponto importante levantado por Strain⁷¹ há mais de 50 anos atrás, diz respeito à decomposição dos analitos a temperaturas elevadas. Dado o curto tempo das corridas cromatográficas na cLC, este autor considera que o tempo de exposição dos analitos a altas temperaturas é muito pequeno para que possa ocorrer degradação.

Thompson e Carr⁸⁵ também afirmaram que a maioria das reações químicas, tais como hidrólise, oxidação, isomerização e epimerização podem ser consideradas desprezíveis. Este ponto é muito importante, visto que muitos justificam a não utilização de altas temperaturas devido à degradabilidade dos analitos sem que, no entanto, comprovarem experimentalmente se essa degradação realmente ocorre⁸⁶.

1.5. Instrumentação Necessária

Atualmente os três principais tipos de fornos utilizados para o controle da temperatura da coluna na cromatografia líquida são os do tipo *air-bath* (aquecimento da coluna através do aquecimento do ar ao redor da coluna), *water-jacket* (aquecimento através de um fluxo de água termostatizada) e os do tipo *block-heater* (aquecimento da coluna através de um bloco metálico no qual a coluna é fixada).

Cada tipo de forno possui suas vantagens e desvantagens. A grande vantagem da utilização de fornos com circulação de água termostatizada e com blocos metálicos aquecedores é a sua grande habilidade em manter a temperatura da coluna constante. No entanto, devido a grande massa que deve ser aquecida e resfriada, tais fornos possuem uma inércia térmica muito grande, não sendo aconselhadas para aplicações nas quais há variações de temperaturas da coluna durante a análise.

Os fornos que realizam o aquecimento da coluna através do aquecimento do ar ao redor da mesma, apesar de não produzir uma temperatura tão constante quanto à fornecida pelos outros dois tipos de fornos devido a sua baixa capacidade térmica, estes fornos podem produzir variações de temperaturas muito rápidas, sendo deste modo, mais aconselhados para aplicações com programação de temperatura.

2. Justificativa e Objetivos

Apesar da variação da temperatura na LC não produzir efeitos tão pronunciáveis quanto aqueles produzidos pela variação do pH ou polaridade da fase móvel, esta é uma técnica muito promissora, uma vez que a instrumentação necessária para a programação de temperatura é mais simples e de menor custo quando comparada com sistemas de gradiente de fase móvel, seja ela realizada em baixa, ou alta pressão. No entanto, atualmente ainda não existem equipamentos comercialmente disponíveis capazes de realizá-la com a precisão e exatidão requeridas. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de aquecimento para colunas capilares de cromatografia líquida capaz de realizar programações de temperaturas.

3. Construção do Equipamento

Como pode ser visto na Figura 93, o forno desenvolvido é composto basicamente de seis componentes principais: um corpo metálico, um isolante térmico, um tubo cerâmico, um sistema de refrigeração, um elemento resistivo (aquecedor) e um sensor de temperatura.

Figura 93 – Forno desenvolvido para micro-colunas.

3.1. Projeto Mecânico

3.1.1. Principais componentes mecânicos

3.1.1.1. Corpo do forno

O corpo do forno foi construído utilizando uma chapa de aço-inox 304 de 0,8 mm de espessura. Esta chapa foi dobrada no formato de uma caixa de 280 mm de comprimento por 40 mm de altura e 40 mm de profundidade e teve suas arestas soldadas

para dar uma maior resistência mecânica ao forno. Como pode ser visto na Figura 94, foram feitos pequenos orifícios para a passagem da coluna e dos fios do sensor de temperatura e do aquecedor. Ele também possui dois orifícios responsáveis pela refrigeração do forno.

Figura 94 – Corpo metálico do forno.

3.1.1.2. Isolamento térmico

Para o isolamento térmico foi utilizado o produto Fiberfrax® da empresa Unifrax do Brasil (Vinhedo, SP). Trata-se de uma manta composta basicamente de fibras de sílica e alumina que suportam temperaturas de até 1430°C. Estas mantas são caracterizadas pela baixa condutividade térmica, baixo armazenamento de calor; excelente resistência à choques térmicos, baixo peso e grande resistência química. A Figura 95 mostram a manta já acomodada dentro do forno.

Figura 95 – Mantas dentro do forno.

3.1.1.3. Tubo cerâmico

Devido às pequenas dimensões do forno, a falta de homogeneidade de temperatura dentro do mesmo poderia se tornar um problema já que fisicamente seria impossível instalar no seu interior um ventilador responsável pela circulação do ar.

Para contornar tal problema, foi utilizado um sistema de aquecimento no qual a coluna é aquecida igualmente ao longo de todo o seu comprimento. Para tal, foi utilizado um tubo cerâmico (Figura 96) dentro do qual passa a coluna, enquanto o aquecimento se dá pelo elemento resistivo enrolado do lado de fora do tubo.

Figura 96 – Foto do tubo cerâmico.

O tubo utilizado foi fabricado em alumina pela Tecnicer (São Carlos, SP) a partir de projeto fornecido por nós. Este tubo possui 200 mm de comprimento, 8 mm de diâmetro externo e 4 mm de diâmetro interno. Como pode ser visto na Figura 97, o tubo possui uma rosca na parede externa. Esta rosca serve para impedir que as espiras do fio utilizado como aquecedor (discutido mais a frente) se toquem evitando, assim, um curto circuito.

Figura 97 – Detalhe do tubo cerâmico.

3.1.1.4. Sistema de refrigeração forçada

O sistema de refrigeração desenvolvido é constituído de dois mini-ventiladores de 25x25 mm (Figura 98a), conectados ao forno através de dois dutos (Figura 98b) construídos em Celeron. O Celeron é um laminado industrial, duro e denso, fabricado através de aplicação de calor e pressão em camadas de celulose, tecidos de algodão, amianto ou vidro impregnado com uma resina sintética (fenólica). Quando o calor e a pressão são aplicados às camadas, ocorre a polimerização, aglomerando as camadas em uma massa sólida e compacta. Este material possui um excelente isolamento elétrico, alta resistência mecânica e boa isolamento térmica.

a)

b)

Figura 98 – Mini-ventilador utilizado no sistema de refrigeração forçada.

O sistema de refrigeração também possui um sistema de portinholas constituído de um eixo de bronze onde se encontram as duas portas em forma de disco construídas em Celeron e um servo-motor (discutido mais a frente) responsável pela abertura e fechamento das portas. A Figura 99 mostra o eixo com as duas portas.

Figura 99 – Portas do forno.

3.2. Projeto Eletrônico

3.2.1. Principais componentes eletromecânicos

3.2.1.1. Aquecedor

Aquecedores são dispositivos capazes de converter um tipo qualquer de energia em calor. Existem diversos tipos de aquecedores, como por exemplo, os aquecedores a gás, infravermelhos, elétricos, entre muitos outros. Devido a sua grande simplicidade, o aquecedor utilizado neste projeto foi o do tipo elétrico.

Princípio de funcionamento dos aquecedores elétricos

Aquecedores elétricos são dispositivos capazes de converter energia elétrica em calor. Um aquecedor elétrico consiste de um elemento resistivo (resistência) conectado a uma fonte elétrica. O princípio de funcionamento (conhecido como efeito Joule) deste tipo de aquecedor se baseia no aumento das vibrações moleculares causa pelos constantes choques dos elétrons em movimento contra os átomos do retículo cristalino do condutor.

A potência térmica produzida por um aquecedor elétrico na forma de fio é dada pela equação

$$P = \frac{V^2 d^2 \pi}{4L\rho}$$
Equação 10

onde V é a tensão de alimentação, d o diâmetro do fio, L o comprimento do fio e ρ a resistividade elétrica do metal do qual o fio é constituído.

Aquecedor utilizado neste projeto

O aquecedor utilizado neste projeto consistiu de fio de níquel-cromo ($\rho = 1,0 \cdot 10^{-6} \Omega \cdot m$) de 0,102 mm de diâmetro e 4 metros de comprimento enrolado ao longo de todo o comprimento do tubo cerâmico. A potência térmica fornecida pelo aquecedor

(calculada a partir da Equação 10) quando alimentado a 110 V é de 24 W. A Figura 100 mostra o elemento resistivo já enrolado no tubo cerâmico.

Figura 100 – Elemento resistivo (fio de níquel-cromo) já enrolado no tubo cerâmico.

3.2.1.2. Sensor de temperatura

Sensor de temperatura é um tipo de transdutor que converte a temperatura de um sistema em uma propriedade elétrica fácil de ser medida por circuitos eletrônicos. Atualmente existem diversos tipos de sensores de temperatura, como por exemplo, os termopares, os termistores NTC (*Negative Temperature Coefficient*) e PTC (*Positive Temperature Coefficient*), os infravermelhos e os RTDs (*Resistance Temperature Detector*), cada tipo com suas vantagens e desvantagens.

Devido ao seu pequeno tamanho, alta precisão e larga faixa de aplicabilidade, características estas indispensáveis em um forno desenvolvido para técnicas miniaturizadas, o sensor de temperatura utilizado consistiu de um RTD comercialmente conhecido como PT-100.

Princípio de funcionamento

O princípio de funcionamento dos sensores de temperatura do tipo RTD se baseia na dependência da resistência de um metal (ou liga metálica) com a temperatura. Os RTDs podem ser fabricados de diversos metais como níquel, cobre, ferro, molibdênio ou platina, sendo este último o mais utilizado por sua resistência à corrosão e estabilidade em altas temperaturas.

Sensor de temperatura utilizado neste projeto

O modelo do sensor de temperatura utilizado foi o DM-503 fabricado pela Labfacility Ltd. Este sensor é um PT-100 de platina de tolerância classe B que pode ser utilizado em temperaturas de até 500 °C. Na faixa de temperatura de 0-100 °C ele possui uma exatidão em torno de 0,5 °C. Devido ao seu pequeno tamanho (2 mm de largura, 5 mm de comprimento e 1,1 mm de altura) o sensor pode ser instalado dentro do tubo cerâmico junto com a coluna. A Figura 101 mostra uma foto do sensor de temperatura utilizado.

Figura 101 – Sensor de temperatura utilizado no forno desenvolvido.

3.2.1.3. Servo-Motor

Um servo-motor é um dispositivo eletromecânico que a partir de um sinal elétrico na forma de pulsos pode ter o seu eixo posicionado em uma determinada posição angular. Por permitirem um posicionamento preciso de seu eixo os servos-motores são muito utilizados na robótica e aeromodelismo.

Princípio de funcionamento

Um servo-motor possui um tipo de motor elétrico que possui um potenciômetro ligado ao seu eixo de saída. Este potenciômetro funciona como um sensor de posição que possibilita ao circuito de controle monitorar o ângulo do eixo do servo-motor. Se o circuito detecta que o ângulo do eixo está incorreto, o motor é ativado até que o ângulo seja o desejado. Nas engrenagens de um servo-motor existe um limitador que atua no ângulo de giro do eixo fazendo com que este varie entre 0° a 180°. A Figura 102 ilustra uma vista interna de um típico servo-motor.

Figura 102 – Vista interna de um típico servo-motor.

O posicionamento do eixo é determinado a partir da duração dos pulsos enviados ao motor através de um circuito conhecido como controlador PWM (*Pulse Width Modulation*). O circuito eletrônico do servo-motor monitora este sinal de controle a cada 20 ms. Se dentro deste intervalo for identificado um pulso de duração entre 1 a 2 ms, ele altera a posição do seu eixo proporcionalmente à largura do pulso (1 ms $\rightarrow$ 0°; 1,5 ms $\rightarrow$ 90°; 2 ms $\rightarrow$ 180°). A Figura 103 ilustra o funcionamento de um servo-motor.

Figura 103 – Ilustração do funcionamento de um servo-motor.

Servo-Motor utilizado neste projeto

O servo-motor utilizado neste projeto consistiu de um micro-servo-motor Tower Pro SG90 comumente encontrado em lojas de aeromodelismo. A Figura 104 mostra uma foto do servo-motor já montado no forno.

Figura 104 – Foto do servo-motor já montado no forno.

3.2.2. Principais componentes do circuito eletrônico

3.2.2.1. TRIAC

Um TRIAC (sigla em inglês de triodo de corrente alternada) é um componente eletrônico semicondutor muito utilizado no controle de dispositivos de corrente alterna. Como pode ser visto na Figura 105, este componentes possui três terminais conhecidos como “terminal principal 1” (MT1), “terminal principal 2” (MT2) e porta ou *gate* (G).

Figura 105 – Símbolo eletrônico do TRIAC.

Os TRIACs atualmente são utilizados em diversas aplicações, como por exemplo no controle de potência para lâmpadas (*dimmers*), controle de velocidade para ventiladores e controle de potência de aquecedores.

Princípio de funcionamento dos TRIACs

Quando um TRIAC é utilizado em circuitos de corrente alternada, ele funciona como uma chave elétrica controlada por uma tensão no seu *gate*. Quando a tensão no *gate* é de zero volts, o TRIAC não conduzirá eletricidade funcionando como uma chave aberta no circuito. No entanto, quando um pequeno pulso de voltagem é aplicado no *gate* o TRIAC é então “ligado” e conduz até a corrente alternada mude de sentido. Quando isto ocorre, é necessário outro pulso no *gate* para que o mesmo conduza novamente.

TRIAC utilizado neste projeto

O TRIAC utilizado neste projeto consistiu do MAC8M da On Semiconductor. Este TRIAC, quando corretamente montado sobre dissipadores de calor, pode ser utilizado para acionar cargas de até 8 A em voltagens alternadas de até 800V.

3.2.2.2. Optoacoplador acionador de TRIAC

Optoacopladores (ou optoisoladores) são componentes eletrônicos utilizados para isolar eletricamente duas partes de um mesmo circuito. Este isolamento é atingido fazendo com que o sinal de um dos circuitos seja transmitido ao outro na forma de luz, possibilitando assim que ambos se comuniquem sem que haja contato elétrico entre os mesmos.

Princípio de funcionamento dos optoacopladores

O princípio de funcionamento dos optoacopladores acionadores de TRIAC é muito similar ao funcionamento dos sensores óticos de início/final de curso discutidos anteriormente. Ambos possuem um LED infravermelho em um dos lados e um detector do

outro, no entanto, ao invés do fototransistor utilizado como detector nos sensores óticos de início/final de curso, os optoacopladores acionadores de TRIAC utilizam uma chave bilateral que funciona similarmente a um TRIAC.

Optoacoplador utilizado neste projeto

O optoacoplador acionador de TRIACs utilizado neste projeto foi o MOC3021 da Fairchild. Este optoacoplador consiste de um LED de GaAs como emissor e uma chave bilateral acionada por luz como detector. A Figura 106 ilustra o circuito interno de um optoacoplador acionador de TRIAC.

Figura 106 – Circuito elétrico interno do MOC3021.

3.2.3. Circuito eletrônico

O circuito eletrônico desenvolvido para o controle do forno pode ser visto, na forma de diagrama de blocos, na Figura 107. Tal circuito é constituído de um microcontrolador PIC16F877A responsável pelo controle do servo-motor (abertura e fechamento das portas do forno), velocidade dos ventiladores, acionamento do aquecedor do forno, monitoramento da rede elétrica, aquisição do sinal do sensor de temperatura e comunicação com o microcomputador (PC) através de uma interface serial RS232.

Figura 107 – Diagrama de blocos do circuito elétrico responsável pelo controle do forno.

3.2.3.1. Fonte de alimentação

O circuito da fonte de alimentação consistiu da utilização dos reguladores de tensão da família LM78XX para as tensões positivas de +15V (LM7815) e +5V (LM7805) e dos reguladores de tensão da família LM79XX para a tensão negativa de -15V (LM7915), todos apropriadamente montados em dissipadores de calor de alumínio.

O transformador de tensão utilizado foi um 18V+18V de 700mA. A retificação da tensão alternada proveniente dos transformadores foi realizada através de uma ponte retificadora composto por quatro diodos 1N4007. Os capacitores C1, C2 e C3 foram do tipo eletrolítico de óxido de alumínio, enquanto os demais capacitores foram do tipo cerâmico.

Os diodos D5 e D6 e o capacitor C3 fazem parte do circuito de monitoramento da tensão da rede elétrica. Este circuito realiza a retificação da tensão alternada da saída do transformador (enrolamento secundário) e a tensão de saída desse circuito é enviada para o monitor de tensão da rede (discutido mais a frente). O circuito da fonte de alimentação é ilustrado na Figura 108.

Figura 108 – Circuito eletrônico da fonte de alimentação.

3.2.3.2. Conversor de tensão – RS232

Apesar do microcontrolador PIC16F877A possuir uma interface serial RS232 análoga à utilizada pela porta serial dos microcomputadores, ambos não podem ser conectados diretamente, pois os níveis de tensão elétrica utilizada na interface serial do PIC (5-V TTL/CMOS*) são diferentes das utilizadas pela interface do PC (TIA/EIA-232-F†), necessitando assim de um circuito conversor de tensão entre o microcontrolador e o PIC.

O circuito utilizado para a conversão da tensão se baseou no uso do componente MAX232 da Texas Instrument. Tal componente, como o próprio nome já indica, foi desenvolvido exclusivamente para tal aplicação, necessitando apenas de 4 capacitores externos de 1μF para operar. A Figura 109 mostra o circuito eletrônico do conversor de tensão.

* 5 Volts → nível lógico 1 / 0 Volts → nível lógico 0.

† -11 Volts → nível lógico 1 / +11 Volts → nível lógico 0.

Figura 109 – Circuito eletrônico utilizado na conversão das tensões utilizadas pelo microcontrolador PIC para os níveis utilizados pelo PC, e vice-versa.

3.2.3.3. Circuito do sensor de temperatura

O sensor de temperatura utilizado no forno (PT-100), diferentemente de outros tipos de sensores, como os termopares, necessita de uma excitação elétrica para funcionarem. A Figura 110 ilustra o circuito de excitação e amplificação do sinal do PT-100.

Figura 110 – Circuito de: a) excitação e b) amplificação do sinal do sensor de temperatura.

O circuito utilizado para a excitação do PT-100 (Figura 110a) consistiu de uma fonte de corrente constante de 1 mA. Uma vez que o PT-100 é um sensor de temperatura do tipo RTD (ou seja, sua resistência depende da temperatura), sua excitação com corrente constante propicia um sinal de saída na forma de uma tensão elétrica proporcional à temperatura. Tal tensão é então amplificada (circuito mostrado na Figura 110b) para que a mesma possa ser adquirida pelo conversor analógico-digital (ADC) integrado ao microcontrolador.

3.2.3.4. Demais circuitos

Os demais circuitos (*driver* dos ventiladores, *driver* do servo-motor, controlador de potência do aquecedor e monitor de tensão da rede elétrica) são mostrados na Figura 111.

Figura 111 – Circuito responsável pelo: a) monitoramento da tensão da rede elétrica, b) acionamento do servo-motor, c) acionamento dos ventiladores, d) acionamento e controle de potência do aquecedor e e) sincronização do controlador de potência com os ciclos da rede elétrica.

Monitor de tensão da rede elétrica

Uma vez que qualquer variação da tensão presente no enrolamento primário do transformador de tensão utilizado na alimentação do circuito eletrônico provoca uma variação proporcional na tensão do secundário do mesmo, o sistema de monitoramento da tensão da rede (Figura 111a) utiliza um circuito divisor de tensão para limitar a tensão do circuito retificador descrito na seção 3.2.3.1 para que o mesmo possa ser medido pelo ADC do microcontrolador e então convertida pelo *software* para a respectiva tensão da rede.

Driver do servo-motor

O circuito mostrado na Figura 111b é responsável pelo acionamento do servo-motor, ele utiliza uma das saídas lógicas do microcontrolador para ligar, ou desligar, a alimentação do servo-motor através de um transistor BC337. A saída do primeiro controlador PWM (*Pulse Width Modulation*) do microcontrolador é ligada a sua respectiva entrada no motor.

Driver dos ventiladores

O circuito mostrado na Figura 111c fornece um controle de velocidade para os ventiladores utilizando o segundo controlador PWM do microcontrolador que é ligado à base de um transistor BC337 que fornece a alimentação para os ventiladores.

Controlador de potência do aquecedor

O controlador de potência do aquecedor é mostrado na Figura 111d. Tal circuito utiliza um TRIAC MAC8M acionado por um optoacoplador MOC3021. Neste sistema de controle de potência do aquecedor também foi utilizado um circuito (Figura 111e) capaz de realizar a sincronização do acionamento do TRIAC com os ciclos da rede elétrica a fim de reduzir os pulsos eletromagnéticos que constituem de uma fonte de ruído muito problemática em laboratórios que utilizam equipamentos de alta precisão.

A Figura 112 mostra o circuito eletrônico completo já em sua placa de circuito impresso.

Figura 112 – Foto do circuito eletrônico do forno.

3.3. Software – Driver de Instalação para Windows

Semelhantemente ao realizado no desenvolvimento dos *drivers* de controle da bomba, o *driver* de controle do forno consistiu de uma DLL programada em Visual Basic 6 nomeada de Oven.dll.

3.3.1. Rotina de inicialização da DLL

Assim que o *driver* Oven.dll é carregado na memória do microcomputador e o sistema operacional executa a rotina de inicialização desta DLL (mostrada em forma de fluxograma pela Figura 113).

Esta rotina carrega os dados de configuração da comunicação contidos no arquivo Oven_Comm.ini e na sequência, tenta abrir a porta serial especificada no arquivo Oven_Comm.ini. Caso haja algum erro no processo de abertura da porta serial, a DLL gera

um erro informando que não foi possível se comunicar com o forno e realiza a rotina de finalização da DLL.

Caso a porta seja aberta normalmente, a DLL requisita ao dispositivo conectado a porta serial a enviar a sua identificação. Caso a identificação enviada pelo dispositivo seja o forno, a DLL o configura, carrega os dados de calibração contidos no arquivo Oven.ini e entra num estado de espera. Caso o dispositivo conectado não seja o forno, é gerado um erro informando que não foi possível se comunicar com o forno e realiza a rotina de finalização da DLL.

Figura 113 – Rotina de inicialização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.

3.3.2. Rotina de finalização da DLL

A rotina de finalização da DLL é realizada sempre que o sistema operacional encontra um erro durante seu funcionamento ou quando o *software* é fechado pelo usuário. Esta rotina, quando executada, verifica se a porta serial especificada no arquivo Oven_Comm.ini se encontra aberta, caso se encontre, a rotina fecha a porta serial e descarrega o arquivo da memória do PC. A rotina de finalização é mostrada em forma de fluxograma na Figura 114.

Figura 114 - Rotina de finalização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.

3.3.3. Rotinas principais

3.3.3.1. Rotina de controle da temperatura

Quando o forno está em operação, a potência térmica que o aquecedor deve fornecer em qualquer instante de tempo é igual à potência dissipada naturalmente pelo forno (P_{Dis}) mais a quantidade de calor necessária para aquecer o seu conteúdo na taxa (rampa) especificada pelo usuário (P_{Rampa}).

Deste modo, quando a DLL recebe um novo valor da resistência do sensor de temperatura enviada pelo forno, a rotina apresentada na Figura 115 converte este valor de resistência para a respectiva temperatura e envia o valor da mesma para o software principal. Na seqüência, a rotina verifica se o aquecimento do forno está atualmente ligado ou desligado. Caso esteja desligado, a DLL volta para o estado de espera, caso esteja ligado, a rotina calcula a diferença entre a temperatura atual enviada pelo forno e a temperatura que teoricamente o forno deveria estar. Com esta diferença, a rotina consulta uma tabela que possui alguns valores de ajuste da inclinação da rampa, calcula a potencia (ver seção 4.2 mais a frente) com a qual o aquecedor do forno deve aquecer a coluna (já incluindo o valor de ajuste) e envia este valor para o forno antes de retornar ao estado de espera. A Tabela 11 mostra a tabela com os valores de ajuste da inclinação da rampa consultada pela DLL.

Tabela 11 – Tabela consultada pela DLL com valores de ajuste da rampa.

ΔT (°C)	Ajuste da Rampa (°C/min)	ΔT (°C)	Ajuste da Rampa (°C/min)
> 15	-20	< -15	20
> 7	-10	< -7	10
> 5	-7	< -5	7
> 2	-5	< -2	5
> 0,5	-2	< -0,5	2
> 0,1	-0,5	< -0,1	0,5
> 0,01	-0,1	< -0,01	0,1
> 0,005	-0,02	< -0,005	0,02
= 0	0	= 0	0

Figura 115 – Rotina de controle da temperatura do forno.

3.3.3.2. Rotina de recebimento de uma nova tensão da rede

Quando a DLL de controle do forno recebe um novo valor da tensão do transformador lida do pelo ADC do microcontrolador, a rotina apresentada na Figura 116 é executada. Ao receber este novo valor, a rotina converte a tensão lida no enrolamento secundário do transformador para a respectiva tensão do enrolamento primário (tensão da rede elétrica) do mesmo e envia para o *software* principal. Esta tensão é utilizada pelo *software* para calcular a potência de aquecimento do aquecedor durante os cálculos realizados no controle da temperatura do forno.

Figura 116 – Rotina de recebimento de uma nova tensão da rede enviada pelo forno.

4. Resultados

4.1. Calibração do Forno

Os resultados obtidos durante a calibração dos sensores de temperatura e do controlador de potência de aquecedor podem ser encontrados na Figura 117. Tais resultados demonstram uma excelente linearidade em toda a faixa de calibração.

Figura 117 – Calibração do sistema eletrônico. a) Calibração do sensor de temperatura, b) calibração do controlador de potência do aquecedor.

4.2. Fórmulas Utilizadas Pela Rotina de Controle da Temperatura

Os valores de P_{Dis} em função da diferença de temperatura dentro e fora do forno, assim como os valores de P_{Rampa} em função da inclinação da rampa de temperatura utilizados pela rotina de controle da temperatura do forno foram obtidos através do seguinte experimento.

O aquecedor do forno foi ajustado com 15 diferentes potências (de 1 a 15% da potência máxima do forno) e a diferença entre a temperatura interna e externa do forno foi registrada até a sua estabilização (Figura 118). Uma vez que no momento em que

a temperatura se estabiliza significa que a quantidade de calor sendo fornecida pelo aquecedor é exatamente a mesma sendo dissipada pelo forno, foi possível através desse experimento obter a exata dissipação térmica do forno para as 15 respectivas temperaturas finais obtidas. A Figura 119 ilustra a dissipação térmica do forno (P_{Dis}) em função da diferença da temperatura interna e externa (temperatura ambiente).

Figura 118 – Diferença de temperatura registrada ao longo do tempo para 15 ajustes de potência do forno.

Figura 119 – Dissipação térmica do forno em função da diferença de temperatura interna do forno e a temperatura ambiente.

A partir dos resultados obtidos pelo experimento anterior, foi calculada a derivada das 15 curvas obtidas (ou seja, foi calculado rampa de temperatura momentânea ao longo do tempo) e a mesma foi plotada em função da diferença de temperatura obtendo o gráfico mostrado na Figura 120

Figura 120 – Rampas de temperatura para 15 diferentes potências do aquecedor em função da diferença de temperatura interna e externa do forno.

As curvas plotadas no gráfico da Figura 120 mostram a rampa de temperatura que as 15 potências testadas do aquecedor são capazes de fornecer em função da diferença entre as temperaturas interna e externa do forno. As curvas são descendentes, pois a medida que a diferença entre a temperatura interna do forno e a temperatura ambiente vai aumentando, vai havendo uma maior dissipação térmica fazendo com que parte da energia térmica que poderia estar sendo utilizada para aquecer o forno, e sustentar a rampa de temperatura, está na realidade sendo perdida ao ambiente.

Deste modo, se esta potência térmica perdida pelo forno for “reposta” ao sistema, a rampa de temperatura que cada uma das 15 potências testadas será capaz de realizar será igual àquela realizada quando não há perda de calor por dissipação térmica,

isto é, a rampa de temperatura que cada uma das 15 potências testadas será capaz de realizar será aquela de valor mostrado no gráfico Figura 120 para $\Delta T = 0$ ($x = 0$).

A Figura 121 mostra a potência térmica (P_{Rampa}) necessária para realizar as rampas de temperatura quando a dissipação térmica é compensada durante a rampa.

Figura 121 – Potência térmica necessária pelo forno para realizar rampas de temperatura.

4.3. Funcionalidade

A Figura 122 mostra seis corridas isotérmicas de 10 minutos de duração realizadas para avaliar o desempenho do controle de temperatura realizado pelo sistema de controle do forno. Como pode ser comprovado pelos dados da Tabela 12, o sistema desenvolvido foi capaz de controlar a temperatura em uma corrida isotérmica com excelente desempenho.

Tabela 12 – Temperatura constante.

Temperatura (°C)	Média (°C)	Desvio Padrão (°C)
40	40,001	0,0094
50	50,007	0,0058
60	60,001	0,0098
70	70,003	0,0062
80	80,004	0,0099
90	89,997	0,0047

Figura 122 – Corridas com temperatura constante.

Por sua vez, a Figura 123 mostra seis corridas com rampas de temperatura realizadas para avaliar o desempenho do controle de rampas realizado pelo sistema de controle do forno. Como pode ser comprovado pelos dados da Tabela 13, o sistema desenvolvido para programação de temperatura também foi capaz de controlar a rampa de temperatura em uma corrida com excelente desempenho.

Tabela 13 – Rampas de temperatura.

Rampa (°C/min)	Média (°C/min)	Desvio Padrão (°C/min)
0,5	0,499	0,1277
1	1,001	0,1370
2	2,000	0,2807
5	5,001	0,2869
10	10,01	0,2302
15	14,97	0,2329

Figura 123 – Corridas com rampas de temperatura.

4.4. Separação Teste (PAHs) Utilizando Colunas Empacotadas

Todos os testes demonstrados anteriormente foram realizados sem que houvesse uma coluna capilar no interior do forno. Para testarmos o seu desempenho em uma aplicação real, utilizamos uma mistura teste de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (PAHs).

4.4.1. Materiais e métodos

O sistema instrumental constituiu de uma bomba LC-10ADvp, um detector de redes de diodos SPD-M10Avp com uma cela semi-micro, um controlador SCL-10Avp (todos Shimadzu), um PC rodando o *software* Class VP da Shimadzu, uma válvula de injeção manual CI4W.06 (VALCO), o forno desenvolvido e uma coluna de sílica fundida de 250 μm de d.i. com 15 cm de comprimento empacotada com partículas Spherisorb C-18 de 3 μm , adquiridas da Alltech. A Figura 124 mostra uma foto do sistema instrumental utilizado.

Figura 124 – Sistema instrumental utilizado no teste do desempenho do forno em aplicações reais.

A mistura teste utilizada continha 8 PAHs (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, criseno e dibenzo(a,h)antraceno) além da uracila (composto não retido utilizado como marcador de tempo morto).

Todos os experimentos foram realizados utilizando uma fase móvel de ACN/H₂O (40:60) com uma vazão de 3 $\mu\text{L min}^{-1}$ e com um volume de injeção de 60 nL.

4.4.2. Resultados

Apesar da cela de detecção utilizada neste teste ser extremamente grande para aplicações capilares, a mesma só foi utilizada, pois a cela capilar, adquirida por nós para tais aplicações, sofreu um considerável atraso na sua entrega.

A utilização desta cela semi-micro (2,5 μL de volume interno) resultou em um enorme alargamento dos picos, o que fez com que tivéssemos que utilizar uma fase móvel muito polar (60% aquosa) para que os picos, apesar de seu grande alargamento extra-coluna, pudessem ser separados até a linha de base. Consequentemente, a utilização de tal fase móvel resultou em um tempo de análise extremamente longo (350 minutos até a eluição total do último pico).

Como pode ser observado pela Figura 125, a programação de temperatura realizada pelo forno desenvolvido foi capaz de reduzir o tempo de análise em três vezes, quando comparada a mesma análise sem a programação de temperatura, e aumentar a eficiência da coluna em 2,5 vezes (calculada para o último pico). A partir da Figura 125, podemos verificar que a programação de temperatura também foi capaz de melhorar a simetria dos picos, mostrando que a programação de temperatura em cromatografia líquida capilar realmente é possível, uma vez que praticamente não existe gradiente de temperatura dentro da coluna (o que é evidenciado pela simetria dos picos).

Figura 125 – Cromatogramas comparativos da separação de uma mistura teste com e sem programação de temperatura.

4.5. Separação Teste (PAHs) Utilizando Colunas Monolíticas

A fim de avaliarmos o desempenho do forno em aplicações utilizando colunas monolíticas, realizamos alguns experimentos utilizando tais colunas sob condições semelhantes às realizadas com as colunas empacotadas.

4.5.1. Materiais e métodos

Toda a instrumentação utilizada neste teste foi a mesma utilizada com as colunas empacotadas. A coluna capilar monolítica foi feita em um tubo de sílica fundida de 15 cm de comprimento e 250 μm de diâmetro interno. Sua estrutura de sílica foi

funcionalizada com uma fase estacionária C18 e a vazão utilizada da fase móvel foi de 20 $\mu\text{L min}^{-1}$.

4.5.2. Resultados

Uma vez que, devido a sua alta permeabilidade, o uso de colunas monolíticas permite o uso de fluxos da fase móvel consideravelmente maiores que a utilizada com as colunas empacotadas, havia a possibilidade de que o forno não pudesse aquecer a fase móvel dentro da coluna de maneira suficientemente rápida para que não houvesse um gradiente radial de temperatura, já que o forno desenvolvido não possui um sistema de pré-aquecimento da fase móvel (que teoricamente não é necessário quando utilizado colunas capilares devido a sua pequena capacidade térmica).

No entanto, mesmo com fluxos relativamente altos (cerca de sete vezes maiores que o fluxo normalmente utilizado pelas colunas capilares de 250 μm de diâmetro interno), não verificamos nenhuma assimetria dos picos, o que poderia evidenciar um gradiente radial de temperatura dentro da coluna, demonstrando assim, também um excelente desempenho do forno em aplicações que utilizam colunas monolíticas e altas vazões de fase móvel.

Como pode ser visto na Figura 126, o uso das colunas monolíticas utilizando programação de temperatura foi capaz de reduzir em 12 vezes o tempo da mesma análise utilizando colunas empacotadas sem que houvesse uma significativa perda de eficiência.

Figura 126 – Cromatogramas comparativos da separação de uma mistura teste com e sem programação de temperatura utilizando colunas monolíticas e empacotadas.

5. Conclusões

O forno desenvolvido mostrou um excelente desempenho, mesmo em aplicações com colunas capilares monolíticas utilizando vazões de fase móvel muito maiores que aquelas utilizadas pelas colunas empacotadas. Em tais aplicações não foi evidenciado nenhum gradiente de temperatura radial formado dentro de tais colunas, o que vem demonstrar que a utilização de colunas capilares, seja ela monolítica ou empacotada, não há a necessidade de pré-aquecimento da fase móvel.

Capítulo IV

Desenvolvimento do Sistema de Injeção à Base de Tempo para cLC

1. Introdução

Originalmente, quando as colunas utilizadas na cromatografia líquida eram operadas apenas em baixas pressões, o processo de introdução da amostra era normalmente realizado através da introdução de uma seringa hipodérmica diretamente no sistema cromatográfico através de um septo de borracha de silicone (processo semelhante ao utilizado até hoje na cromatografia gasosa). No entanto, à medida que novas fases estacionárias particuladas de pequeno diâmetro foram sendo utilizadas na fabricação de colunas de alta eficiência, tal técnica veio se tornando impraticável devido a grande pressão gerada por tais colunas⁸⁷. A partir de então, uma nova técnica utilizando válvulas especialmente desenvolvidas para tal propósito começaram a ser utilizados no processo de introdução de amostra na LC.

Atualmente, os dois tipos de válvulas de injeção mais utilizadas na cromatografia líquida são as válvulas com *loop* externo (Figura 127a) e válvulas com *loop* interno (Figura 127b), ambas podendo ser atuadas pneumaticamente, eletricamente ou manualmente (como as mostradas na Figura 127).

Figura 127 – Dois principais tipos de válvulas de injeção utilizados na cromatografia líquida: a) válvula com *loop* externo e b) válvula com *loop* interno.

1.1.1. Válvulas de injeção com *loop* externo

A Figura 128 ilustra esquematicamente uma válvula de *loop* externo (conhecidas também como válvula de injeção de seis pórticos). Este tipo de válvula utiliza um rotor com três ranhuras responsáveis por interligar dois pórticos adjacentes da válvula.

Quando este tipo de válvula se encontra na posição *load* (Figura 128a), a fase móvel que entra pelo pórtico 4 é enviada através de uma das ranhuras do rotor diretamente para a coluna conectada ao pórtico 5, enquanto a entrada da amostra (pórtico 1) é conectada através de uma segunda ranhura ao *loop* externo (conectado aos pórticos 3 e 6), permitindo que o *loop* seja preenchido e que todo o excesso de amostra seja descartado pelo do pórtico 2 através da terceira ranhura do rotor. Quando a válvula é girada para a posição *inject* (Figura 128b) a fase móvel bombeada pelo sistema é então conectada ao *loop* externo, permitindo que toda a amostra contida no *loop* seja carregada para o interior da coluna, enquanto a entrada da amostra fica conectada diretamente ao descarte.

Figura 128 – Esquema de uma válvula de injeção manual com *loop* externo: a) posição *load* e b) posição *inject*.

Neste tipo de válvula, o volume injetado é definido pelo volume do *loop* externo conectada a mesma. Os *loops* utilizados por estas válvulas são pequenos pedaços de tubos (geralmente de aço-inox ou PEEK) cortados em determinados comprimentos de forma que o seu volume interno seja aquele especificado na sua etiqueta. Atualmente estes

loops podem ser comprados já prontos ou fabricados no próprio laboratório a partir das tubulações utilizadas nos equipamentos de HPLC.

O fato dos *loops* externos serem intercambiáveis confere a este tipo de válvula uma grande versatilidade, uma vez que caso se deseje injetar um volume diferente daquele fornecido atualmente pela válvula, basta adquirir (ou mesmo fabricar) um novo *loop* sem que seja necessário substituir a válvula utilizada. No entanto, devido à grande distância que separa os pórticos nos quais o *loop* é conectado, o volume mínimo de injeção capaz de ser fornecido por tal tipo de válvula é de em torno 2 μL , sendo, desta maneira, recomendada apenas para colunas maiores que 1 mm de d.i. A Figura 129 mostra uma foto de um *loop* externo de 20 μL fabricado em aço-inox pela Valco (Houston, USA).

Figura 129 – Loop utilizado nas válvulas de injeção de loop externo.

1.1.2. Válvulas de injeção com *loop* interno

A Figura 130 ilustra esquematicamente uma válvulas de injeção com *loop* interno (conhecida também como válvula de injeção de quatro pórticos). Diferentemente das válvulas com *loop* externo, este tipo de válvula utiliza um rotor de quatro ranhuras das quais apenas duas delas são utilizadas simultaneamente na interligação dos pórticos da válvula.

Quando este tipo de válvula se encontra na posição *load* (Figura 130a), a fase móvel que entra pelo pórtico “P” é enviada, através de uma das ranhuras do rotor, diretamente para a coluna conectada ao pórtico “C”, enquanto a entrada da amostra (pórtico “S”) é conectada através da segunda ranhura (*loop* interno), permitindo que o mesmo seja preenchido e que todo o excesso de amostra seja descartado através do pórtico “W”.

Figura 130 – Esquema de uma válvula de injeção manual com *loop* interno: a) posição *load* e b) posição *inject*.

Quando esta válvula é girada para posição *inject* (Figura 130b) a fase móvel bombeada pelo sistema é então conectada ao *loop* interno permitindo que toda a amostra contida no mesmo seja carregada para o interior da coluna, enquanto a entrada da amostra fica conectada diretamente ao descarte.

Neste tipo de válvula, o volume injetado é definido pelo volume da ranhura do rotor. O fato deste tipo de válvula utilizar o próprio rotor como *loop* confere às válvulas de *loop* interno uma menor versatilidade quando comparada às válvulas de *loop* externo, pois caso se deseje injetar um volume diferente daquele fornecido atualmente pela válvula, será necessário desmontá-la e substituir o seu rotor. Apesar deste grande inconveniente, este tipo de válvula é capaz de fornecer volumes de injeção tão baixos quanto 4 nL, sendo, desta maneira, recomendada para colunas menores de 1 mm de d.i. A Figura 131 ilustra um rotor utilizado pelas válvulas de *loop* interno produzidas pela Valco.

Figura 131 – Rotor utilizado em válvulas de injeção de *loop* interno.

2. Justificativas e Objetivos

Como discutido anteriormente, ambas as válvulas de injeções possuem suas vantagens e desvantagens. As válvulas de *loop* externo possuem grande versatilidade quanto ao volume de amostra que pode ser injetado, no entanto, tais válvulas não permitem volumes de injeções suficientemente pequenos para que seja possível utilizá-las na cLC. Por sua vez, apesar das válvulas de *loop* interno serem capazes de fornecer volumes de amostragem suficientemente pequenos para a sua utilização na cLC, este tipo de válvula possui o grande inconveniente de se necessitar de um rotor diferente para cada volume de injeção de interesse.

Para se contornar tais inconvenientes, ao longo dos últimos anos foram relatados na literatura dois métodos de injeção que permitem que apenas uma porção do volume do *loop* seja introduzida no sistema cromatográfico, possibilitando que um único rotor (ou *loop*) seja utilizado para fornecer diferentes volumes de injeção.

No primeiro método, conhecido como injeção por *loop* parcial (*partial-loop injection*), o processo de injeção é realizado da seguinte maneira. Inicialmente a válvula é colocada na posição *load* e, através de uma microseringa graduada, apenas uma pequena fração do volume do *loop* é introduzido no mesmo. Em seguida a válvula é girada para a posição *inject* permanecendo nesta posição tempo suficiente para que todo o volume do *loop* seja arrastado para o interior da coluna.

Uma vez que neste método o volume injetado na coluna é definido pelo volume da amostra aspirado pela microseringa, a injeção por *loop* parcial apresenta boa reprodutibilidade apenas quando utilizado por sistemas automatizados de injeção nos quais os volumes aspirados são controlados por sistemas eletrônicos.

Já no segundo método, conhecido como injeção a base de tempo (*time-based injection*), o processo de injeção é realizado da seguinte maneira. Inicialmente a válvula é colocada na posição *load* e o *loop* é totalmente preenchido com a amostra. Em

seguida a válvula é girada para a posição *inject* permanecendo nesta posição apenas uma fração de segundo para que apenas uma pequena parte do volume do *loop* seja arrastada para o interior da coluna.

Diferentemente do método de injeção por *loop* parcial, a injeção a base de tempo pode ser utilizado com grande reprodutibilidade em sistemas menos complexos, necessitando apenas de uma válvula atuada eletronicamente que possui somente uma fração do custo de um sistema de injeção automático.

Deste modo, com o objetivo de fornecer uma maior versatilidade para o sistema instrumental construído neste projeto, foi desenvolvido um sistema de injeção à base de tempo controlado por uma interface USB.

3. Construção do Equipamento

O sistema de injeção a base de tempo desenvolvido baseou se num recurso disponível nas válvulas com atuação microelétrica produzidas pela Valco que permite controlar o tempo em que a válvula permanece na posição *inject* antes de retornar para a posição *load*.

3.1. Projeto Mecânico

A válvula utilizada neste projeto foi o modelo EPCI4W.06 fabricada pela Valco. Tal modelo consiste basicamente de uma válvula com *loop* interno de 60 nL do tipo “W” (conexões de 1/16”, pórtilco da coluna de 0,25 mm e pórtilcos restantes de 0,40 mm de diâmetro) atuada eletricamente. A Figura 132 ilustra uma foto da válvula utilizada.

Figura 132 – Foto da válvula EPCI4W.06.

3.2. Projeto Eletrônico

O projeto eletrônico desenvolvido (Figura 133) consistiu de uma fonte de 24 VDC alimentada a 110/220 VAC, um módulo controlador EPCA-CE de médio torque, um

controlador manual e um conversor RS232-USB além, é claro, da válvula EPCI4W.06 conectada a um atuador microelétrico modelo EHMA e dos cabos de interligação.

Figura 133 – Esquema elétrico do sistema de injeção a base de tempo.

3.2.1. Conversor RS232-USB

O conversor utilizado para a conversão da comunicação serial RS232 utilizado pela válvula para a comunicação USB foi o mesmo utilizado no desenvolvimento da bomba.

3.3. Software – Driver de Instalação para Windows

Semelhantemente ao realizado no desenvolvimento dos *drivers* de controle da bomba e do forno, o *driver* de controle da válvula consistiu de uma DLL programada em Visual Basic 6 nomeada de Valve.dll. A Figura 134 ilustra a entrada e saída de dados da DLL desenvolvida disponíveis ao *software* principal de controle.

Figura 134 – Entrada e saída de dados da DLL desenvolvida disponíveis ao *software* externo de controle da válvula.

3.3.1. Rotina de inicialização da DLL

Assim que o arquivo Valve.dll é carregado pelo sistema operacional, a rotina de inicialização (mostrada em forma de fluxograma pela Figura 135) carrega os dados de configuração da comunicação contidos no arquivo Valve_Comm.ini.

Na sequência, a DLL tenta abrir a porta serial virtual (criada pelo *driver* do conversor RS232-USB) especificada no arquivo Valve_Comm.ini. Caso haja algum erro no processo de abertura da porta serial virtual, a DLL gera um erro informando que não foi possível se comunicar com a válvula de injeção e realiza a rotina de finalização da DLL.

Caso a porta seja aberta normalmente, a DLL requisita ao dispositivo conectado a porta serial aberta anteriormente a enviar a sua identificação.

Caso o dispositivo conectado não seja uma válvula de injeção, é gerado um erro informando que não foi possível se comunicar com a válvula e realiza a rotina de finalização da DLL. Caso a identificação enviada pelo dispositivo seja de uma válvula de injeção compatível com o *software*, a DLL configura a válvula para atuar no modo de injeção por tempo, carrega os dados de calibração contidos no arquivo Valve.ini para aquela válvula específica encontrada (identificada pelo número serial enviado pela mesma no processo de identificação do dispositivo realizada anteriormente) e entra num estado de espera.

Figura 135 – Rotina de inicialização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção à base de tempo.

3.3.2. Rotina de finalização da DLL

A rotina de finalização da DLL é realizada sempre que o sistema operacional encontra um erro durante seu funcionamento ou quando o *software* é fechado pelo usuário. Esta rotina verifica se a porta serial especificada no arquivo Valve_Comm.ini se encontra aberta, caso se encontre, a rotina fecha a porta serial e descarrega o arquivo da memória do PC. A rotina de finalização é mostrada em forma de fluxograma pela Figura 136.

Figura 136 – Rotina de finalização da DLL desenvolvida para o controle do sistema de injeção a base de tempo.

3.3.3. Rotinas principais da DLL

Como mostrado anteriormente pela Figura 134, a DLL desenvolvida aceita a entrada de três dados (volume, tempo e fluxo) e um comando (injeção). A Figura 137 ilustra na forma de fluxograma a rotina realizada pela DLL quando um dos três dados é enviado pelo *software* principal para a DLL desenvolvida.

Quando o usuário, através do *software* principal, configura uma injeção baseada num valor específico de tempo (ao invés de volume), a DLL, ao receber este valor, calcula o respectivo volume de injeção a partir do fluxo atual da bomba e dos dados de

calibração (lidos do arquivo Valve.ini durante a rotina de inicialização) para que a mesma possa retornar ao usuário o volume de injeção respectivo ao tempo por ele ajustado.

Figura 137 – Rotinas realizadas quando um novo valor de tempo, volume ou fluxo é passado à DLL de controle do sistema de injeção à base de tempo.

Em seguida, a DLL envia o valor do tempo de injeção à válvula e aguarda a confirmação de recebimento da nova configuração que é enviado pela válvula sempre que um parâmetro do seu funcionamento é modificado. Ao receber tal confirmação, a rotina compara a configuração recebida com a originalmente enviada. Caso a configuração retornada pela válvula coincida com a enviada pela rotina (significando que a configuração

foi realizada com sucesso) a DLL entra novamente no modo de espera. Caso a configuração retornada pela válvula não coincida (indicando um erro durante a configuração) a rotina envia novamente a configuração até que ela seja reconhecida corretamente pela válvula.

Quando o usuário, através do *software* principal, configura uma injeção baseada num valor específico de volume (ao invés de tempo), a DLL, ao receber o novo valor, calcula o respectivo tempo de injeção a partir do fluxo atual da bomba e dos dados de calibração (lidos do arquivo Valve.ini durante a rotina de inicialização) para que a mesma possa configurar a válvula com este valor de tempo e retornar ao usuário o tempo de injeção respectivo ao volume por ele ajustado. Em seguida, a DLL realiza a mesma rotina de configuração da válvula discutida anteriormente.

Uma vez que o volume/tempo de injeção na técnica de injeção por tempo depende do fluxo fornecido pela bomba, quando um novo fluxo de fase móvel é ajustado, a DLL, ao receber este novo valor de fluxo, calcula o novo valor de tempo com o qual a válvula deverá permanecer na posição *inject* para que o mesmo volume ajustado atualmente seja mantido. Após este cálculo, a DLL realiza a mesma rotina de configuração da válvula já discutida.

A Figura 138 ilustra na forma de fluxograma a rotina realizada pela DLL quando recebido um comando de injeção. Nesta rotina, quando a DLL recebe o comando para efetuar a injeção, ela envia o respectivo comando para a válvula para que a mesma realize a injeção utilizando última configuração enviada pelas rotinas descritas anteriormente.

Figura 138 – Rotina realizada quando enviado um comando de injeção.

4. Resultados

4.1. Calibração dos Volumes de Injeção

Os dados de calibração contidos no arquivo Valve.ini foram obtidos a partir de experimentos nos quais os volumes injetados pela válvula para 23 diferentes tempos de injeção foram avaliados através das áreas de dois picos (pravastatina e rosuvastatina) obtidas pela injeção de uma solução padrão.

4.1.1. Materiais e métodos

Os equipamentos utilizados no processo de calibração foram a bomba e o forno desenvolvidos neste projeto, um detector de rede de diodos modelo SPD-M10Avp (Shimadzu) utilizando uma cela capilar de 35 nL (LC Packings) e uma controladora CMB-20A (Shimadzu). Os cromatogramas foram adquiridos através do *software* Class VP (Shimadzu) executado numa plataforma Windows XP SP2 instalados em um Pentium IV 3,0 GHz. A coluna utilizada foi uma coluna capilar de sílica fundida de 250 µm de d.i. e 15 cm de comprimento empacotada com uma fase estacionária C18 Pinnacle II (Restek) de 3,0 µm.

Os reagentes utilizados foram acetonitrila e metanol da Tedia, ácido acético glacial da Cinética Química e água ultra pura fornecida pelo sistema Purelab Ultra (Elga). A pravastatina e a rosuvastatina foram cedidas gentilmente pela Bristol-Myers Squibb Farmacêutica e AstraZeneca respectivamente.

A solução padrão injetada consistiu de uma solução de pravastatina e rosuvastatina preparadas em metanol. Os cromatogramas foram obtidos utilizando uma fase móvel composta de acetonitrila/água na proporção 48:62 acidificada com 0,5% de ácido acético glacial com um fluxo de 3 µL/min. O cálculo das áreas dos picos foram realizadas utilizando os cromatogramas obtidos com o comprimento de onda de 240 nm.

4.1.2. Resultados

A Figura 139 ilustra um típico cromatograma obtido a partir da injeção da solução padrão preparada utilizando um tempo de injeção de 300 ms.

Figura 139 – Cromatograma obtido com tempo de injeção de 300 ms (aproximadamente 30 nL).

A Figura 140 ilustra o volume injetado (média de três repetições) para os 23 tempos de injeção testados utilizando um fluxos de fase móvel de 3 $\mu\text{L}/\text{min}$. A partir dessa figura, pode se observar que o volume de injeção em função do tempo possui uma relação linear somente na faixa de 0 a 300 ms, o que corresponde à aproximadamente 50% (30 nL) do volume de amostragem máximo capaz de ser fornecido pelo *loop* interno da válvula (60 nL). Para a faixa de 300 a 5000 ms o volume injetado por unidade de tempo decai com um perfil aproximadamente exponencial. Para tempos de injeção maiores que 5000 ms, o volume de injeção atinge o volume máximo de 60 nL.

Os resultados obtidos estão de acordo com a literatura que relata que até 50% do volume do *loop* pode ser utilizado de forma linear em métodos de injeção por *loop*

parcial ou a base de tempo. A partir dos 50%, o processo de diluição ocorrido dentro da válvula começa a causar o perfil exponencial observado a partir dos 300 ms de injeção.

Figura 140 – Média dos volumes injetados em função do tempo, obtidos a partir de três repetições.

A Figura 141 ilustra uma ampliação das regiões dos picos de uma sobreposição de 23 cromatogramas obtidos com os 23 diferentes tempos de injeção.

Figura 141 – Detalhes dos dois picos com vários tempos de injeção: a) pravastatina e b) rosuvastatina.

A partir dos dados obtidos nos experimentos anteriores, foi realizada uma regressão de Nelder. Os parâmetros obtidos a partir dessa regressão são os dados de calibração que estão presentes no arquivo Valve.ini. A Figura 142a ilustra os resultados obtidos na regressão para o fluxo de bombeamento de 3 µL/min enquanto a Figura 142b ilustra os resultados obtidos pelo sistema de injeção após ser calibrado.

Figura 142 – Resultados da calibração dos volumes de injeção obtidos para um fluxo de 3 µL/min. a) Regressão utilizando a função de Nelder e b) curva de calibração realizada após a calibração do sistema.

5. Conclusões

A pesar dos sistemas de injeção a base de tempo não serem tão robustos quanto os por *loop* parcial devido a dependência do volume injetado com o fluxo de bombeamento (o que resulta na necessidade de se calibrar os volumes de injeção para cada fluxo de fase móvel), o sistema desenvolvido se mostrou altamente reprodutível quando utilizado em conjunto com a bomba desenvolvida. Quando comparados aos sistemas automatizados de injeção que utilizam o método de *loop* parcial, o sistema desenvolvido apresenta também uma grande vantagem em relação ao custo do equipamento, uma vez que o sistema é composto apenas de uma válvula de injeção com atuação eletrônica.

Capítulo V

Desenvolvimento do Software

1. Introdução

Um *software* consiste de uma seqüência de instruções que é interpretada e executada ordenadamente por um processador. Em um *software* funcional, essa seqüência segue padrões específicos que resultam no comportamento desejado.

Os programadores costumam escrever instruções em várias linguagens de programação, algumas diretamente inteligíveis pelos computadores e outras que exigem passos de tradução intermediários. Embora centenas de linguagens de computador estejam em uso atualmente, todas podem ser classificadas em três tipos principais: linguagens de máquina, linguagem assembly e linguagem de alto nível⁸⁸.

1.1. Linguagem de Máquina

Um computador pode entender apenas sua própria *linguagem de máquina*. As linguagens de máquinas consistem em seqüências de 0s e 1s que instruem diretamente os computadores a como realizar suas operações elementares.

As linguagens de máquina são dependentes do *hardware*, o que significa que uma linguagem de máquina específica só pode ser usada naquele tipo específico de computador⁸⁸ para a qual ela foi projetada.

1.2. Linguagem Assembly

Com o aumento da popularidade dos computadores, a programação em linguagem de máquina demonstrou ser excessivamente lenta, maçante e propensa a erros. Em vez de usarem as seqüências de 0s e 1s que os computadores podiam entender diretamente, os programadores começaram a usar abreviações parecidas com o inglês para representar tais seqüências numéricas binárias. Essas abreviações formaram a base da *linguagem assembly*. Programas de tradução chamados *assemblers* convertem as abreviações utilizadas na linguagem assembly diretamente para linguagem de máquina⁸⁸.

Uma vez que a linguagem assembly na realidade ainda representa a linguagem de máquina substituindo apenas a representação numérica por uma abreviação, os softwares programados nesta linguagem também são específico para apenas um tipo de computador.

1.3. Linguagem de Alto Nível

Embora o uso do computador tenha aumentado rapidamente com o advento das linguagens assembly, elas ainda exigiam muitas instruções para realizar até mesmo as tarefas mais simples. Para acelerar o processo de programação, as *linguagens de alto nível*, nas quais um comando simples podem representar dezenas de instruções de máquina, foram desenvolvidas. Os programas de tradução, chamados compiladores, convertem os programas em linguagem de alto nível em linguagem de máquina. As linguagens de alto nível permitem aos programadores escrever instruções semelhantes ao inglês cotidiano, incluindo até mesmo notações matemáticas comuns. O Visual Basic é hoje uma das linguagens de programação de alto nível mais populares no mundo⁸⁸.

Diferentemente dos dois tipos de linguagens de programação descritos anteriormente, este tipo de linguagem costuma ser portátil, isto é, pode funcionar em qualquer tipo de computador, para isto, sendo necessário apenas um compilador apropriado para aquele tipo de computador.

2. Justificativa e Objetivos

A grande maioria dos *softwares* utilizados atualmente para o controle de sistemas instrumentais cromatográficos é desenvolvida em língua inglesa, de uso complicado e pouco intuitivo para usuários não tão familiarizado com sistemas computacionais. Deste modo, o objetivo desta parte do trabalho foi desenvolver um *software* de fácil uso e em língua portuguesa responsável pelo controle de todo o sistema instrumental desenvolvido neste projeto.

3. Desenvolvimento do *Software*

O *software* desenvolvido para o controle da instrumentação desenvolvida neste projeto foi programado em Visual Basic 6 (Microsoft) utilizando componentes Active X do Measurement Studio 6 (National Instruments). A estrutura do *software* pode ser vista na Figura 143.

Figura 143 – Estrutura do *software* desenvolvido.

O *software* consiste de quatro telas que permitem monitorar os parâmetros experimentais durante uma análise, além de controlar a bomba, o injetor e o forno. Estas telas são selecionadas por botões de alternância.

3.1. Janela de Monitoramento da Análise

A Figura 144 ilustra a tela destinada ao monitoramento dos parâmetros experimentais do equipamento. Esta tela é acionada quando o usuário clica no botão de alternância “Análise”. Nesta tela, os parâmetros como o tempo decorrido da análise, o fluxo e a pressão da bomba, o volume de fase móvel ainda restante na seringa, o volume de

injeção, a descrição da amostra injetada, a temperatura da coluna e a rampa atualmente controlada pelo forno são mostrados na forma de uma tabela do lado direito da janela.

Nesta tela, ainda pode se acompanhar o histórico das últimas duas horas da pressão e temperatura do sistema através dos dois gráficos da parte de cima da janela. Na parte central, também pode ser encontrada uma imagem interna da bomba e do forno que mostram através de animações o funcionamento do sistema. A descrição da fase móvel utilizada pode ser registrada, e posteriormente salva junta com os dados experimentais, através caixa de texto ao lado da imagem do frasco azul.

Figura 144 – Tela de informações sobre a análise.

3.2. Janela de Controle da Bomba

A janela do *software* apresentada pela Figura 145 ilustra a tela de controle da bomba ativada quando o usuário clica no botão de alternância “Bomba”. Nesta tela todos

os parâmetros relacionados ao sistema de bombeamento, como o fluxo de bombeamento e de retorno (velocidade utilizada nos processos de reabastecimento da seringa) e a pressão máxima e mínima de segurança, podem ser alterados e/ou monitorados através da tabela de parâmetros do lado direito da janela.

Nesta tabela há também um relatório descrevendo o volume total da seringa, o volume já bombeado e o ainda restante do sistema, assim como o tempo total, decorrido e restante, que a bomba pode fornecer com o fluxo de bombeamento atualmente ajustado.

Na parte de cima da janela é apresentado um gráfico com o histórico da pressão do sistema de até duas horas atrás. Caso o usuário deseje, há também a possibilidade de acompanhar a temperatura do sistema, bastando para isso clicar com o botão direito do *mouse* em cima do gráfico e selecionar a opção de exibição de gráfico duplo (semelhante ao mostrado na tela “Análise” descrita anteriormente).

Figura 145 – Tela de controle da bomba.

3.3. Janela de Controle do Injetor

A janela de controle do injetor é mostrada na Figura 146. Esta janela é ativada quando o usuário clica no botão de alternância “Injetor”. Nesta tela, o usuário do sistema pode ajustar o volume de amostra que será injetado pelo sistema de injeção a base de tempo desenvolvido neste projeto ou, alternativamente, ajustar o tempo em que a válvula permanecerá na posição *inject* antes de retornar a posição *load*. Nesta janela o usuário também pode descrever a amostra que está sendo injetada. Esta descrição é salva junta com os dados experimentais (pressão e temperatura) obtidos durante a análise.

Figura 146 – Tela de controle do injetor.

3.4. Janela de Controle do Forno

A janela apresentada na Figura 147 ilustra a tela de controle do forno ativada quando o usuário clica no botão de alternância “Forno”. Nesta janela o usuário pode

definir a temperatura com a qual o forno manterá a coluna quando nenhuma programação de temperatura está sendo realizada (campo “Temp. Inicial” presente na parte de cima da tabela) assim como a própria programação de temperatura a ser realizada durante a análise.

Nesta janela, o usuário também pode monitorar alguns parâmetros relacionados ao forno, como a temperatura atual da coluna, a rampa de temperatura atualmente gerada, a etapa da programação de temperatura, a tensão elétrica da rede e a condição atual das portas e ventiladores do forno.

Figura 147 – Tela de controle do forno.

3.5. Menus de Controle

A funcionalidade do equipamento é totalmente controlada pelos quatro menus presentes na parte de cima da janela do *software*. O menu “Nova Amostra” é utilizado quando uma nova análise vai ser realizada. Ao clicar neste menu, o *software* abre

uma janela requisitando o diretório e o nome do arquivo a ser salvo. Após informar ao software o nome do arquivo, o *software* abre uma segunda janela na qual a descrição da fase móvel e da amostra podem ser inseridas, caso isto ainda não tenha sido realizado, e fica aguardando a injeção.

O menu “Bomba” contém todas as operações que a bomba pode realizar, ou seja, bombear, parar, limpar, recarregar, purgar e pressurizar. Esta última operação é muito útil no início do bombeamento para a rápida pressurização do sistema. Quando o usuário clica nesta opção, a bomba inicia o bombeamento com um fluxo três vezes maior que o ajustado na tabela de parâmetros da bomba (Figura 145) até atingir a pressão estipulada no campo “Pressurização” (também presente na tabela de parâmetros da bomba). Este menu também pode ser aberto na forma de um *pop-up menu* clicando com o botão direito do *mouse* em cima da imagem da bomba. O menu “Bomba” é apresentado na Figura 148.

Figura 148 – Menu “Bomba”.

A Figura 149 mostra o menu “Injetor”. Neste menu, o usuário pode girar “manualmente” a válvula para a posição *inject* (Posição A da válvula) ou para a posição *load* (Posição B da válvula).

Figura 149 – Menu “Injetor”.

O conteúdo do menu “Forno” é mostrado na Figura 150. Este menu permite ao usuário colocar o forno no estado de espera no qual o forno irá manter a temperatura ajustada no campo “Temp. Inicial” da tabela de parâmetros do forno (Figura 147), permite também o desligamento e refrigeração do mesmo. Este menu também pode ser aberto na forma de um *pop-up menu* clicando com o botão direito do *mouse* em cima da imagem do forno.

Figura 150 – Menu “Forno”.

4. Conclusão

O *software* desenvolvido se mostrou muito simples e intuitivo de ser utilizado. Devido ao fato do *software* acessar os equipamentos através de seus *drivers* programados na forma de arquivos DLLs, futuras atualizações do *software* podem ser realizadas com grande facilidade, uma vez que não será necessário modificar as rotinas utilizadas no acesso, comunicação e controle dos equipamentos.

Uma outra vantagem do uso dos *drivers* do modo como foram programados (e discutidos nos capítulos II, III e IV) é que todos os parâmetros mecânicos, eletrônicos e de calibração dos equipamentos são descritos e acessados pelos *drivers* através dos arquivos Pump.ini, Valve.ini e Oven.ini permitindo que caso alguma peça seja trocada por outra com especificações diferentes, ou mesmo que o projeto do equipamento seja modificado, basta modificar as especificações contidas nestes arquivos de forma que reflitam a nova peça ou modificação para que o *software* continue funcionando perfeitamente, sem que seja necessário reprogramá-lo.

Capítulo VI

Aplicação:
Separações de Estatinas por
Cromatografia Líquida Capilar com
Programação de Temperatura (TP-cLC)

1. Introdução

As estatinas (astatinas ou vastatinas) são substâncias originárias de culturas de fungos. A primeira substância dessa família foi isolada em 1976, de uma cultura de *Penicillium citrinum* sendo chamada compactina. Esta substância se revelou excelente inibidora da síntese do colesterol, mas, por sua toxicidade, não reunia condições de uso clínico⁸⁹.

Posteriormente, foi isolada a lovastatina da cultura do *Aspergillus terreus*, com igual propriedade da substância anterior, mas com mínima toxicidade. Desde então foram produzidas várias outras substâncias com fórmulas estruturais semelhantes às acima referidas, todas mostrando efeito inibidor da síntese do colesterol, as quais receberam a denominação genérica de estatinas⁸⁹.

Todas as estatinas têm em comum um anel hidronaftaleno. A pravastatina foi obtida, de cultura dos fungos *Nocardia autrophica*. A simvastatina resultou de pequena modificação na fórmula estrutural da lovastatina (adição de radical metila). A fluvastatina, a atorvastatina e a cerivastatina são drogas sintéticas. As estatinas sintéticas e a pravastatina são compostos ativos na forma de anéis abertos. A lovastatina e a simvastatina são pró-drogas, apenas sendo ativas, "in vivo", após metabolizadas para a forma de anel aberto. Essas drogas têm efeitos metabólicos muito semelhantes, ainda que haja entre elas várias diferenças farmacológicas⁸⁹.

1.1. Características Farmacológicas

As estatinas são absorvidas no intestino e extraídas do sangue na primeira passagem pelo fígado. Nas células hepáticas, são metabolizadas pelo citocromo P450 (3A4) e transformadas em metabólitos ativos e inativos.

Todas as estatinas são substâncias com a propriedade comum de inibir a síntese de colesterol endocelular, por competição com a enzima HMG-CoA redutase (3-

hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase), impedindo a transformação da HMG-CoA em ácido mevalônico. Ao ocorrer redução intracelular de colesterol, há estímulo à formação de LDL-receptores na membrana da célula. A presença de maior número de LDL-receptores determina maior captação das LDL (sigla em inglês para lipoproteínas de baixa densidade – *low density lipoprotein*) em circulação, com diminuição de seu nível plasmático. Há também elementos que demonstram que a diminuição da síntese do colesterol leva à menor produção hepática das VLDL (sigla em inglês para lipoproteínas de densidade muito baixa – *very low density lipoprotein*), pois esse esteróide é usado na formação dessas partículas.

Portanto, as estatinas têm efeito hipolipemiante semelhante, em função do maior catabolismo das LDL e da menor síntese endógena das VLDL. O resultado mais marcante é o de redução das LDL plasmáticas, com menor repercussão sobre a concentração sanguínea das VLDL.

As estatinas são geralmente bem toleradas, sendo muito baixa a ocorrência de efeitos adversos que obriguem a interrupção de tratamento (incidência de 2% independentemente do tipo de estatina utilizado). As estatinas têm dois efeitos metabólicos comuns que merecem atenção: a) ação sobre os hepatócitos, podendo determinar elevação de enzimas hepáticas; e b) ação sobre fibras dos músculos esqueléticos, eventualmente expressa por aumento da concentração de creatinofosfoquinase total (CK total). O monitoramento por meio de dosagens de ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato desidrogenase) e de CK total, é obrigatória, independentemente do tipo de estatina em uso. Vale salientar que elevações enzimáticas significativas (valores três vezes superiores aos basais) são infreqüentes (0,2% para elevação de CK e 1% para AST e ALT). A literatura refere a ocorrência de 1 caso de rabdomiólise para cada 100.000 pacientes tratados por ano. A cerivatatina, no entanto, possui uma incidência grande desse para-efeito, com vários casos de óbito registrados, sendo por isso retirada do mercado.

Não foram evidenciadas diferenças relevantes na eficácia clínica das várias estatinas em relação à idade e ao sexo. A lovastatina e a simvastatina são

lipossolúveis, ao passo que as demais estatinas são hidrossolúveis, particularidade que confere diferenças em relação à passagem pela barreira líquórica.

Com exceção da pravastatina, cuja ligação com a albumina plasmática é baixa (45%), as demais estatinas têm ligação superior a 95%. Embora a essa diferença tenha sido atribuída menor possibilidade de interação com outras drogas, o fato não parece ter relevância clínica.

A absorção das estatinas pelo trato gastrointestinal recebe influência da ingestão de alimentos. A absorção intestinal da lovastatina aumenta aproximadamente 50% quando a droga é administrada com alimentos. A biodisponibilidade da pravastatina é diminuída cerca de 30% quando tomada com refeições ricas em gorduras. As demais estatinas não parecem sofrer influência da ingestão alimentar.

Em razão do ritmo circadiano da HMG-CoA redutase, determinando maior síntese de colesterol no período noturno, as estatinas devem ser administradas preferencialmente à noite, mas para a atorvastatina não foram observadas diferenças em relação ao período de ingestão.

As estatinas têm sua biotransformação por meio de citocromos mitocondriais. A fluvastatina é fundamentalmente metabolizada no fígado via CYP2C9, diferentemente das demais que o são via CYP3A4. Como outras drogas são raramente metabolizadas pela via CYP2C9 há poucas as interações da fluvastatina com outros medicamentos. Inúmeras drogas têm maior afinidade pela CYP3A4, portanto interações são possíveis, como ocorre com a ciclosporina e a eritromicina.

1.1.1. Efeitos não-hipolipemiantes

Tem sido demonstrado que as estatinas reduzem a proliferação e a multiplicação de células musculares lisas, efeito que é dose-dependente. Também, em cultura de macrófagos houve inibição de acúmulo de colesterol intracelular. O efeito está

relacionado ao bloqueio da esterificação do colesterol e ao bloqueio da endocitose de lipoproteínas modificadas.

Investigações com diferentes estatinas têm demonstrado efeitos sobre fatores da cascata de coagulação, na interação entre plaquetas e fibrinogênio, na modulação de trombos plaquetários. Além disso, há pesquisas evidenciando possível papel antiinflamatório das estatinas e como influenciadoras da oxidação de lipoproteínas (efeito antioxidante). Os dados disponíveis permitem também admitir que elas exercem efeitos diretos sobre a parede arterial (antiinflamatórios e antioxidantes) e possivelmente sobre elementos trombogênicos, independentemente dos efeitos hipolipemiantes.

1.2. Características Químicas

As estatinas apresentam-se geralmente como um pó branco ou amarelado, fino e cristalino, são fotossensíveis e apresentam caráter ácido. Apresentam-se como moléculas bem estáveis, muito solúveis em meio alcalino, solúveis em pH neutro e levemente solúveis em meio ácido, são também solúveis em metanol e água e praticamente insolúveis em acetona, acetonitrila, clorofórmio e éter.

2. Justificativa e Objetivos

Devido à carência de métodos analíticos disponíveis na literatura, o estudo e a validação de métodos analíticos que sejam simples, econômicos e rápidos são de grande valia para separação e quantificação das estatinas. Desde modo, este trabalho tem como objetivo estudar qualitativamente a viabilidade do emprego da programação de temperatura na separação de estatinas, utilizando os equipamentos desenvolvidos neste projeto.

3. Materiais e Métodos

3.1. Equipamentos

O sistema cromatográfico utilizado nesta aplicação foi composto pelo sistema de bombeamento, o sistema de injeção e o forno desenvolvidos neste projeto, um detector de rede de diodos modelo SPD-M10Avp (Shimadzu) utilizando uma cela capilar de 35 nL (LC Packings), uma controladora CBM-20AD (Shimadzu). Os cromatogramas foram adquiridos através do *software* Class VP (Shimadzu) executado numa plataforma Windows XP SP2 instalados em um Pentium IV 3,0 GHz. A coluna utilizada foi uma coluna capilar de sílica fundida de 250 µm de d.i. e 15 cm de comprimento empacotada com uma fase estacionária C18 Pinnacle II (Restek) de 3,0 µm.

3.2. Reagentes

Os reagentes utilizados foram acetonitrila e metanol grau cromatográfico da Tedia, ácido acético glacial da Cinética Química, água ultra pura fornecida pelo sistema Purelab Ultra (Elga).

Para o presente trabalho foram selecionadas cinco estatinas mais empregados e comercializados no Brasil: a pravastatina, a simvastatina, a rosuvastatina, a fluvastatina e a atorvastatina que foram gentilmente cedidas pelas indústrias farmacêuticas Bristol-Myers Squibb, Krebs Biochemical, AstraZeneca, Novartis Biociências e Laboratórios Pfizer, respectivamente. A Tabela 14 mostra a estrutura química, assim como os nomes químicos, das cinco estatinas utilizadas neste projeto.

A solução padrão injetada consistiu de uma solução 0,1 mg/mL das cinco estatinas de interesse em metanol. Os cromatogramas foram obtidos utilizando diferentes fases móveis composta de acetonitrila/água acidificadas com 0,5% de ácido acético glacial com um fluxo de 3 µL/min. O cálculo das áreas dos picos foram realizadas utilizando os cromatogramas obtidos com o comprimento de onda de 240 nm.

Tabela 14 – Estrutura química das cinco estatinas utilizadas neste projeto.

Estrutura Química	Nome
	<p>Pravastatina</p> <p>(hexa-idro-6-idroxi-2-metil-8-(2-metilbutiriloxi)-1-naftil-3,5-diidroxi-heptanoato)</p>
	<p>Simvastatina</p> <p>(ácido butanóico-2,2-dimetil-(1S,3R,7S,8S,8aR)1,2,3,7,8,8α-hexaidro-3,7-dimetil-8-[2-[(2R,4R)-tetraidro-4-idroxi-6-oxo-2H-piran-2-il]etil]-1-éster naftalenil)</p>
	<p>Rosuvastatina</p> <p>(6-ácido heptanóico-7-[4-(4-fluorofenil)-6-(1-metiletil)-2-[metil (metilsulfonil) amino]-5-pirimidinil]-3,5-diidroxi-(3R,5S,6E))</p>
	<p>Fluvastatina</p> <p>(ácido-6-heptenóico-7-[3-(4-fluorofenil)-1-(1-metiletil)-1H-indol-2-il]-3,5-diidroxi-(3R,5S,6E))</p>
	<p>Atorvastatina</p> <p>(1-H-pirrol-1-ácido heptanico, 2-(4-fluorofenil)-β,δ-diidroxi-5-(1-metiletil)-3-fenil-4-[(fenilamino) carbonil]-(βR,δR))</p>

4. Resultados

4.1. Estudo da Fase Móvel

Inicialmente foi realizado um estudo do efeito da composição da fase móvel na separação das cinco estatinas. Neste estudo foram testadas três composições de fases móveis. A Figura 151 ilustra os cromatogramas obtidos nestes testes.

Figura 151 – Comparação de três cromatogramas obtidos em fases móveis diferentes.

Como pode ser observado pelo primeiro cromatograma da Figura 151, a separação obtida à 30°C com a fase móvel com composição de 60% de acetonitrila (ACN) e 40% de H₂O acidificada com 0,5% de ácido acético, o pico da pravastatina (Pra) sofreu apenas uma pequena retenção saindo sobreposto ao “pico da injeção”. A rosuvastatina (Rosu) foi totalmente separada enquanto a atorvastatina (Ator) e fluvastatina (Flu) eluíram apenas parcialmente separadas. A simvastatina (Sim), assim como a rosuvastatina, foi totalmente separada eluindo com um tempo de retenção de 16,37 minutos. O tempo total de análise utilizando esta fase móvel foi de 17,5 minutos.

No cromatograma obtido com a segunda fase móvel, de composição 50% ACN e 50% H₂O acidificada com 0,5% de ácido acético com a coluna à 30°C, a pravastatina eluiu totalmente separada do “pico da injeção” e a rosuvastatina, assim como a simvastatina, permaneceram totalmente separadas. No entanto, a atorvastatina e a fluvastatina coeluíram. O tempo total de análise utilizando esta fase móvel foi de 40 minutos.

No cromatograma obtido com a terceira fase móvel testada, de composição 45% ACN e 55% H₂O acidificada com 0,5% de ácido acético com a coluna à 50°C, todos os picos foram resolvidos até a linha de base. Nesta condição, também foi observado uma inversão na ordem de eluição dos picos da atorvastatina e da fluvastatina quando comparado com o cromatograma obtido com a primeira fase móvel de composição 60% ACN e 40% H₂O, evidenciando que o tempo de retenção da fluvastatina é mais influenciado pela composição da fase móvel que o tempo de retenção da atorvastatina. O tempo de análise utilizando esta terceira condição foi de 67,5 minutos, sendo esta a melhor condição isotérmica encontrada durante este trabalho para a separação das cinco estatinas.

4.2. Estudo da Temperatura

Durante o estudo do efeito da composição da fase móvel, também foram realizados estudos do efeito da variação da temperatura na separação das estatinas. Neste

estudo foram realizadas injeções da mistura padrão utilizando uma fase móvel de composição 50% ACN e 50% H₂O acidificada com 0,5% de ácido acético em três diferentes temperaturas (30°C, 50°C e 70°C). A Figura 152 ilustra os cromatogramas obtidos nestes testes.

Figura 152 – Comparação de três cromatogramas obtidos em temperaturas diferentes.

Como discutido anteriormente, utilizando a fase móvel de composição 50% ACN e 50% H₂O com a coluna à 30°C a atorvastatina e a fluvastatina coeluem. No entanto, quando a temperatura da coluna é elevada à 50°C (segundo cromatograma da Figura 152), estes dois picos são parcialmente separados. À 70°C a separação é ainda melhor (terceiro cromatograma da Figura 152). Estes resultados demonstram que o tempo de retenção da fluvastatina sofre uma maior influência da temperatura que o tempo de retenção da atorvastatina.

4.3. Programação de Temperatura

Com base nos resultados obtidos nos estudos anteriores, foi estudada uma condição de fase móvel que, através da programação de temperatura, fornecesse um tempo de análise inferior àquela obtida em condições isotérmicas. A melhor condição encontrada foi a utilização de uma fase móvel de composição 48% ACN e 62% H₂O acidificada com 0,5% de ácido acético com a seguinte programação de temperatura: 1 minuto em 40°C e então 20°C/min até 80°C permanecendo nesta temperatura até o final da análise.

Apesar desta fase móvel em condições isotérmicas não ser capaz de resolver todos os picos até a linha de base (em baixas temperaturas a fluvastatina e a atorvastatina não são separadas e em altas temperaturas a pravastatina coelui com o “pico da injeção”), devido à grande influência que o tempo de retenção da fluvastatina possui em relação à temperatura, quando esta fase móvel é utilizada em conjunto com a programação de temperatura descrita anteriormente, todos os picos são resolvidos até a linha de base com um tempo de análise em torno de 30 minutos. A Figura 153 mostra o cromatograma obtido com a fase móvel de composição 48% ACN e 62% H₂O com a programação de temperatura sugerida.

A Figura 154 compara o cromatogramas obtido com a melhor condição encontrada para uma análise sem programação de temperatura (isotérmica) com o cromatograma obtido com a melhor condição encontrada com programação de temperatura.

Figura 153 – Cromatograma obtido com programação de temperatura.

Figura 154 – Comparação entre as melhores condições encontradas para a separação isotérmica e com programação de temperatura.

5. Conclusões

O equipamento desenvolvido apresentou um excelente desempenho quando aplicado em condições reais de uso. Como demonstrado pelos cromatogramas da Figura 154, a programação de temperatura foi capaz de reduzir em duas vezes o tempo de análise de uma separação das cinco estatinas de interesse quando comparada com a mesma análise em condições isotérmica.

Capítulo VII

Conclusões Gerais

Ao longo deste trabalho foram desenvolvidos diversos equipamentos voltados para cromatografia líquida capilar. Como demonstrado pelos resultados obtidos nos testes de calibração, e confirmados pelos resultados obtidos nas aplicações destes equipamentos nas separações de PAHs, assim como nas separações das estatinas, o sistema cromatográfico desenvolvido composto pela bomba, forno e sistema de introdução da amostra, apresentou um ótimo desempenho.

A bomba desenvolvida não necessitou de qualquer tipo de correção eletrônica do fluxo fornecido pela mesma. O forno mostrou um excelente desempenho, mesmo em aplicações com colunas capilares monolíticas utilizando vazões de fase móvel muito maiores que aquelas utilizadas normalmente pelas colunas empacotadas. Apesar dos sistemas de injeção a base de tempo não serem tão robustos quanto os por *loop* parcial devido à dependência do volume injetado com o fluxo de bombeamento, o sistema de introdução da amostra se mostrou altamente reprodutível quando utilizado em conjunto com a bomba desenvolvida. E finalmente, o software desenvolvido se mostrou muito simples e intuitivo de ser utilizado.

Com base nos resultados e conclusões apresentados ao final de cada capítulo, e resumidos aqui, é possível afirmar que todos os objetivos estabelecidos neste trabalho foram plenamente atingidos.

Capítulo VIII

Referências Bibliográficas

1. LANÇAS, F. M. The role of the separation sciences in the 21(th) century. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 183-197, 2003.
2. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. New York: Wiley, 1979. 863 p.
3. ETTRE, L. S. Evolution of liquid chromatography: A historical overview. In: HORVÁTH, C. (Ed.). **High-performance liquid chromatography**. New York: Academic Press, 1980. v. 1, p. 1-74.
4. SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. State of the art in miniaturized separation techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 1-46, 2002.
5. LANÇAS, F. M. Packed capillary liquid chromatography. In: CAZES, J. (Ed.). **Encyclopedia of chromatography**. New York: Marcel Dekker, 2000. 1 v.
6. SAITO, M.; HIBI, K.; ISHII, D.; TAKEUCHI, T. Instrumental requirements in microscale hplc. In: ISHII, D. (Ed.). **Introduction to microscale high-performance liquid chromatography**. New York: VCH, 1988. p. 7-31.
7. SAITO, M.; WADA, A.; HIBI, K.; TAKAHASHI, M. Semi-micro hplc gives lowa-cost, fast, clean separation. **Industrial Research & Development**, v. 25, n. 4, p. 102-106, 1983.
8. KNOX, J. H. Practical aspects of lc theory. **Journal of Chromatographic Science**, v. 15, n. 9, p. 352-364, 1977.
9. GOLAY, M. J. E. **Gas chromatography**. London: Butterworths, 1958. p. 36.
10. HORVATH, C. G.; PREISS, B. A.; LIPSKY, S. R. Fast liquid chromatography. Investigation of operating parameters and the separation of nucleotides on pellicular ion exchangers. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1422-1428, 1967.
11. HORVATH, C. G.; LIPSKY, S. R. Rapid analysis of ribonucleosides and bases at the picomole level using pellicular cation exchange resin in narrow bore columns. **Analytical Chemistry**, v. 41, n. 10, p. 1227-1234, 1969.
12. ISHII, D.; ASAI, K.; HIBI, K.; JONOKUCHI, T.; NAGAYA, M. A study of micro-high-performance liquid chromatography: I. Development of technique for miniaturization of high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 144, n. 2, p. 157-168, 1977.
13. ISHII, D.; HIBI, K.; ASAI, K.; JONOKUCHI, T. Studies of micro high-performance liquid chromatography: li. Application to gel permeation chromatography of techniques developed for micro high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 151, n. 2, p. 147-154, 1978.
14. ISHII, D.; HIBI, K.; ASAI, K.; NAGAYA, M. Studies of micro high-performance liquid chromatography: lii. Development of a "Micro-pre-column method" For pre-treatment of samples. **Journal of Chromatography A**, v. 152, n. 2, p. 341-348, 1978.

15. ISHII, D.; HIBI, K.; ASAI, K.; NAGAYA, M.; MOCHIZUKI, K.; MOCHIDA, Y. Studies of micro high-performance liquid chromatography: Iv. Application of the micro pre-column method to the analysis of corticosteroids in serum. **Journal of Chromatography A**, v. 156, n. 1, p. 173-180, 1978.
16. ISHII, D.; HIROSE, A.; HIBI, K.; IWASAKI, Y. Studies on micro high-performance liquid chromatography: V. Design of a microscale liquid chromatograph and its application to cation-exchange separation of alkali metals. **Journal of Chromatography**, v. 157, p. 43-50, 1978.
17. ISHII, D.; HIROSE, A.; HORIUCHI, I. Application of microscale liquid chromatographic technique to the anion exchange separation of halide ions. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 45, n. 1, p. 7-14, 1978.
18. SCOTT, R. P. W.; KUCERA, P. Mode of operation and performance characteristics of microbore columns for use in liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 169, p. 51-72, 1979.
19. SCOTT, R. P. W.; KUCERA, P. Use of microbore columns for the separation of substances of biological origin. **Journal of Chromatography**, v. 185, p. 27-41, 1979.
20. SCOTT, R. P. W.; KUCERA, P.; MUNROE, M. Use of microbore columns for rapid liquid chromatographic separations. **Journal of Chromatography**, v. 186, p. 475-487, 1979.
21. REESE, C. E.; SCOTT, R. P. W. Microbore columns - design, construction, and operation. **Journal of Chromatographic Science**, v. 18, n. 9, p. 479-486, 1980.
22. SCOTT, R. P. W. Microbore columns in liquid-chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 18, n. 2, p. 49-54, 1980.
23. KUCERA, P. Design and use of short microbore columns in liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 198, n. 2, p. 93-109, 1980.
24. TSUDA, T.; NOVOTNY, M. Packed microcapillary columns in high performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 271-275, 1978.
25. TSUDA, T.; NOVOTNY, M. Band-broadening phenomena in microcapillary tubes under the conditions of liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 50, n. 4, p. 632-634, 1978.
26. HIRATA, Y.; NOVOTNY, M. Techniques of capillary liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 186, p. 521-528, 1979.
27. CHERVET, J. P.; URSEM, M.; SALZMANN, J. P. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 9, p. 1507-1512, 1996.
28. ISHII, D. **Introduction to microscale high-performance liquid chromatograph**. New York: VCH, 1988. 208 p.

29. VERZELE, M.; DEWAELE, C. Liquid-chromatography in packed fused-silica capillaries or micro-ic - a repeat of the capillary gas-chromatography story. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 10, n. 5, p. 280-287, 1987.
30. BARTH, H. G.; BARBER, W. E.; LOCHMUELLER, C. H.; MAJORS, R. E.; REGNIER, F. E. Column liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 12, p. 387-435, 1988.
31. VISSERS, J. P. C.; CLAESSENS, H. A.; CRAMERS, C. A. Microcolumn liquid chromatography: Instrumentation, detection and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 779, n. 1-2, p. 1-28, 1997.
32. NOVOTNY, M.; ISHII, D. **Microcolumn separations**. Amsterdam: Elsevier, 1985. 336 p.
33. YANG, F. J. **Microbore column chromatography**. New York: Marcel Dekker, 1989. 405 p.
34. VISSERS, J. P. C. Recent developments in microcolumn liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 1-2, p. 117-143, 1999.
35. SAITO, Y.; JINNO, K.; GREIBROKK, T. Capillary columns in liquid chromatography: Between conventional columns and microchips. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 17-18, p. 1379-1390, 2004.
36. VERZELE, M.; DE WEERDT, M.; DEWAELE, C.; DE JONG, G. J.; LAMMERS, N.; SPRUIT, F. Microcolumn lc: Is it worth it? **LC-GC**, v. 4, n. 12, p. 1162-1177, 1986.
37. VERZELE, M.; DEWAELE, C. The evaluation of reversed phase high-performance liquid-chromatography packing materials. **Chromatographia**, v. 18, n. 2, p. 84-86, 1984.
38. HIROSE, A.; WIESLER, D.; NOVOTNY, M. High-efficiency microcolumn separation of polycyclic arene isomers isolated from carbon-black. **Chromatographia**, v. 18, n. 5, p. 239-242, 1984.
39. GIDDINGS, J. C. **Dynamics of chromatography**. New York: Marcel Dekker, 1965. 340 p.
40. ISHII, D.; NIWA, T.; OHTA, K.; TAKEUCHI, T. Unified capillary chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 11, n. 11, p. 800-801, 1988.
41. BROWN, P. R. High-performance liquid-chromatography - past developments, present status, and future-trends. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. A995-&, 1990.
42. HUANG, E. C.; WACHS, T.; CONBOY, J. J.; HENION, J. D. Atmospheric-pressure ionization mass-spectrometry - detection for the separation sciences. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 13, p. A713-&, 1990.

43. FLURER, C. L.; BORRA, C.; ANDREOLINI, F.; NOVOTNY, M. Separation of proteins by microcolumn liquid chromatography based on the reversed-phase and size-exclusion principles. **Journal of Chromatography A**, v. 448, p. 73-86, 1988.
44. BANKS JUNIOR, J. F.; NOVOTNY, M. V. A step gradient system for microcolumn liquid chromatography based on a multiple-loop valve. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 2, n. 2, p. 84-87, 1990.
45. RAPP, E.; TALLAREK, U. Liquid flow in capillary (electro)chromatography: Generation and control of micro- and nanoliter volumes. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 6-7, p. 453-470, 2003.
46. VANDERWAL, S.; YANG, F. J. Gradient elution system for capillary and micro hplc. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**, v. 6, n. 4, p. 216-217, 1983.
47. NAGAE, N.; ITOH, H.; NIMURA, N.; KINOSHITA, T.; TAKEUCHI, T. Rapid separation of proteins and peptides by reversed-phase microcolumn liquid chromatography. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 3, n. 1, p. 5-9, 1991.
48. CHERVET, J. P.; MEIJVOGEL, C. J.; URSEM, M.; SALZMANN, J. P. Recent advances in capillary liquid-chromatography - delivery of highly reproducible microflows. **Lc Gc-Magazine of Separation Science**, v. 10, n. 2, p. 140-&, 1992.
49. CLAESSENS, H. A.; BURCINOVA, A.; CRAMERS, C. A.; MUSSCHE, P.; VAN TILBURG, C. C. E. Evaluation of injection systems for open tubular liquid chromatography. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 2, n. 3, p. 132-137, 1990.
50. JORGENSEN, J. W.; GUTHRIE, E. J. Liquid chromatography in open-tubular columns : Theory of column optimization with limited pressure and analysis time, and fabrication of chemically bonded reversed-phase columns on etched borosilicate glass capillaries. **Journal of Chromatography A**, v. 255, p. 335-348, 1983.
51. MANZ, A.; SIMON, W. Injectors for open-tubular column liquid chromatography with 10^6 theoretical plates at retention times in the minute range. **Journal of Chromatography A**, v. 387, p. 187-196, 1987.
52. LANÇAS, F. M.; RODRIGUES, J. C.; FREITAS, S. S. Preparation and use of packed capillary columns in chromatographic and related techniques. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 17-18, p. 1475-1482, 2004.
53. GUAN, Y. F.; ZHOU, L. M.; SHANG, Z. H. Dry-packed capillary columns for micro hplc. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 15, n. 7, p. 434-436, 1992.
54. CRESCENTINI, G.; MASTROGIACOMO, A. R. Liquid chromatography capillary columns dry-packed with polar and nonpolar stationary phases. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 3, n. 6, p. 539-545, 1991.
55. CRESCENTINI, G.; BRUNER, F.; MANGANI, F.; GUAN, Y. Preparation and evaluation of dry-packed capillary columns for high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 17, p. 1659-1662, 1988.

56. MALIK, A.; LI, W.; LEE, M. L. Preparation of long packed capillary columns using carbon dioxide slurries. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 5, n. 4, p. 361-369, 1993.
57. TONG, D.; BARTLE, K. D.; CLIFFORD, A. A. Preparation and evaluation of supercritical carbon dioxide-packed capillary columns for hplc and sfc. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 6, n. 3, p. 249-255, 1994.
58. TONG, D.; BARTLE, K. D.; CLIFFORD, A. A.; EDGE, A. M. Theoretical studies of the preparation of packed capillary columns for chromatography. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 7, n. 3, p. 265-278, 1995.
59. KOIVISTO, P.; DANIELSSON, R.; MARKIDES, K. E. Factors affecting the preparation of packed capillary columns in supercritical carbon dioxide media. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 9, n. 2, p. 97-103, 1997.
60. PLANETA, J.; KARÁSEK, P.; VEJROSTA, J. Development of packed capillary columns using carbon dioxide slurries. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 6-7, p. 525-530, 2003.
61. VISSERS, J. P. C.; HOEBEN, M. A.; LAVEN, J.; CLAESSENS, H. A.; CRAMERS, C. A. Hydrodynamic aspects of slurry packing processes in microcolumn liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 883, n. 1-2, p. 11-25, 2000.
62. BRAITHWAITE, A.; SMITH, F. J. **Chromatographic methods**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. 559 p.
63. PARRIS, N. A. **Instrumental liquid chromatography**. Amsterdam: Elsevier, 1984. 432 p.
64. MARTIN, M.; BLU, G.; EON, C.; GUIOCHON, G. The use of syringe-type pumps in liquid chromatography in order to achieve a constant flow-rate. **Journal of Chromatography**, v. 112, p. 399-414, 1975.
65. SYNCRO. **Literatura**: Motor de Passo. 2005. Disponível em: <<http://www.syncro.com.br/>>. Acesso em: 23 set. 2007.
66. ORIENTAL. **Technical reference**: Gearheads. 2008. Disponível em: <http://www.orientalmotor.com/products/pdfs/F_TecRef/TecGear.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2008.
67. SKVORTSOV, A. M.; GORVUNOV, A. A. Adsorption effects in the chromatography of polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 358, p. 77-83, 1986.
68. GREIBROKK, T.; ANDERSEN, T. Temperature programming in liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 24, n. 12, p. 899-909, 2001.

69. HOLM, A.; MOLANDER, P.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Novel column oven concept for cold spot large volume sample enrichment in high throughput temperature gradient capillary liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 26, n. 12-13, p. 1147-1153, 2003.
70. LI, J.; CARR, P. W. Effect of temperature on the thermodynamic properties, kinetic performance, and stability of polybutadiene-coated zirconia. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 5, p. 837-843, 1997.
71. STRAIN, H. H. Conditions affecting the sequence of organic compounds in tswett adsorption columns. **Industrial and Engineering Chemistry-Analytical Edition**, v. 18, n. 10, p. 605-609, 1946.
72. HENSSE, G.; ENGELHARDT, H. Temperaturprogrammierung bei der adsorptionschromatographie von lösungen. **Journal of Chromatography**, v. 21, p. 228-238, 1966.
73. GRUSHKA, E.; KIKTA, E. J. New polar bonded liquid chromatography phase. **Analytical Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 1370-1375, 1974.
74. KARGER, B. L.; GANT, J. R.; MARTKOPF, A.; WEINER, P. H. Hydrophobic effects in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of chromatography**, v. 128, n. 1, p. 65-78, 1976.
75. TAKEUCHI, T.; WATANABE, Y.; ISHII, D. Role of column temperature in micro high performance liquid chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 4, n. 6, p. 300-302, 1981.
76. HIRATA, Y.; SUMIYA, E. Temperature-programmed reversed-phase liquid chromatography with packed fused-silica columns. **Journal of Chromatography**, v. 267, p. 125-131, 1983.
77. BOWERMASTER, J.; MCNAIR, H. Microbore high-performance liquid chromatographic columns: Speed, efficiency, sensitivity and temperature programming **Journal of Chromatography**, v. 279, p. 431-438, 1983.
78. MCNAIR, H.; BOWERMASTER, J. Microbore hplc column performance and temperature programming capabilities. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 10, n. 1, p. 27-31, 1987.
79. JINNO, K.; PHILLIPS, J. B.; CARNEY, D. P. Temperature-controlled high-speed microcolumn liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 574-576, 1985.
80. BOWERMASTER, J.; MCNAIR, H. Temperature programmed microbore hplc-part i. **Journal of Chromatographic Science**, v. 22, p. 165-170, 1984.
81. CHEN, M. H.; HORVÀTH, C. Temperature programming and gradient elution in reversed-phase chromatography with packed capillary columns. **Journal of Chromatography A**, v. 788, p. 51-61, 1997.

82. MOLANDER, P.; GUNDERSEN, T. E.; HAAS, C.; GREIBROKK, T.; BLOMHOFF, R.; LUNDANES, E. Determination of retinoids by packed-capillary liquid chromatography with large-volume on-column focusing and temperature optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 847, p. 59-68, 1999.
83. DOLAN, J. W.; SNYDER, L. R.; DJORDJEVIC, N. M.; HILL, D. W.; WAEGHE, T. J. Reversed-phase liquid chromatographic separation of complex samples by optimizing temperature and gradient time iii. Improving the accuracy of computer simulation. **Journal of Chromatography A**, v. 857, p. 41-68, 1999.
84. SHENG, G.; SHEN, Y.; LEE, M. L. Elevated temperature liquid chromatography using reversed-phase packed capillary columns. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 9, n. 2, p. 63-72, 1997.
85. THOMPSON, J. D.; CARR, P. W. A study of the critical criteria for analyte stability in high-temperature liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 1017-1023, 2002.
86. VON MUHLEN, C.; LANCAS, F. M. Unified chromatography. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 747-753, 2004.
87. SCOTT, R. P. W. High-performance liquid chromatography. In: CAZES, J. (Ed.). **Ewing's analytical instrumentation handbook**. New York: CRC, 2005. p. 687-726.
88. DEITEL, H. M.; DEITEL, P. J.; NIETO, T. R. **Visual basic .Net**. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2004. 1116 p.
89. MANO, R. **Manuais de cardiologia: dislipidemias - tratamento farmacológico - vastatinas**. 2008. Disponível em:
<http://www.manuaisdecardiologia.med.br/Dislipidemia/Lipid1_Lipid5.htm>. Acesso em: 26 jun. 2008.