



**Inês Margarida Ferreira Delgado**

Licenciatura em Engenharia Química e Bioquímica

**Aplicação do desenho de experiências  
na optimização da quantificação de  
isocianatos livres em materiais em  
contacto com alimentos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Sofia Leonardo Vilela  
de Matos, Professora Auxiliar, FCT-UNL

**Co-orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Maria Martelo  
Ramos, Professora Associada, FCT-UNL

**Co-orientador (a):** Doutora Isabel Palmira Joaquim  
Castanheira, Investigadora Principal, DAN-INSA

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira  
Arguente(s): Prof. Doutor José Fernando Gomes Requeijo  
Vogal(ais): Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Sofia Leonardo Vilela de Matos  
Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Maria Martelo Ramos  
Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro de 2012



**Inês Margarida Ferreira Delgado**

Licenciatura em Engenharia Química e Bioquímica

**Aplicação do desenho de experiências  
na optimização da quantificação de  
isocianatos livres em materiais em  
contacto com alimentos**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química e Bioquímica

**Orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Sofia Leonardo Vilela  
de Matos, Professora Auxiliar, FCT-UNL

**Co-orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Maria Martelo  
Ramos, Professora Associada, FCT-UNL

**Co-orientador (a):** Doutora Isabel Palmira Joaquim  
Castanheira, Investigadora Principal, DAN-INSA

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Rui Manuel Freitas Oliveira  
Arguente(s): Prof. Doutor José Fernando Gomes Requeijo  
Vogal(ais): Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Sofia Leonardo Vilela de Matos  
Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Maria Martelo Ramos  
Doutora Isabel Palmira Joaquim Castanheira



## Direitos de cópia

Aplicação do desenho de experiências na optimização da quantificação de isocianatos livres em materiais em contacto com alimentos.

Copyright © 2012- Inês Margarida Ferreira Delgado - FCT/UNL - UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Todos os excertos e imagens retirados de diversos artigos, presentes ao longo desta dissertação são reproduzidos sob a permissão dos editores originais e sujeitos às restrições de cópia impostas pelos mesmos. À restante dissertação aplica-se a indicação de direitos de autor em nome de Inês Margarida Ferreira Delgado, FCT/UNL e UNL.



## Agradecimentos

Após uma grande dedicação e esforço consigo concretizar o sonho de completar a etapa da concretização do Mestrado em Engenharia Química e Bioquímica.

Em primeiro lugar, às minhas orientadoras, Prof.<sup>a</sup> Ana Sofia Matos, do Departamento de Engenharia e Gestão Industrial e Prof.<sup>a</sup> Ana Maria Ramos, do Departamento de Química, por toda a paciência e dedicação na minha orientação e resolução de problemas que tenham surgido.

À Doutora Isabel Castanheira, do Departamento de Alimentação e Nutrição, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por me ter acolhido e dado a oportunidade de participar nesta investigação e por toda a dedicação que me deu no decorrer desta mesma investigação.

À Dr.<sup>a</sup> Catarina André, bolsista do Departamento de Alimentação e Nutrição, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, por todos os ensinamentos que me foram transmitidos e por todo o carinho e apoio.

A todos os meus colegas de curso por toda a amizade e ajuda, em especial, à Cassia Junqueira e à Mafalda Izidro.

Por último, mas não menos importante, aos meus pais, irmã e namorado por toda a paciência e incentivo que me transmitiram, e aos meus pais pela oportunidade que me ofereceram para estudar.

A todos o meu mais sincero obrigado.





## Resumo

O objectivo deste trabalho consistiu na optimização do método de análise e quantificação de isocianatos livres em materiais em contacto com os alimentos com a ajuda de um método estatístico, o desenho de experiências clássico.

Os isocianatos são compostos com extrema importância comercial tendo em conta a sua utilização no fabrico de poliuretanos. Como estes compostos são tóxicos torna-se muito importante o estudo para a optimização e controlo da concentração presente em variados materiais em contacto com alimentos. Os poliuretanos são utilizados em várias aplicações, como por exemplo, adesivos, espumas, resinas termoplásticas, tintas de impressão, moldes de fundição e borrachas.

Para efectuar a análise e quantificação dos isocianatos 4,4' - difenilmetanodiiisocianato, 4,4' - MDI, 2,4 - toluenodiiisocianato, 2,4 - TDI, 2,6 – toluenodiiisocianato, 2,6 – TDI e 2,4 – toluenodiiisocianato dímero foi utilizado um método cromatográfico, o UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência).

No desenho de experiências clássico foram estudados três factores a dois níveis: temperatura da coluna em graus Celsius (°C), fluxo em mililitros por minuto (mL/min), solvente em percentagem de acetato de amónio (% Ac. NH<sub>4</sub>). Foram realizadas oito experiências, cada uma com três replicações e duas repetições. Foi ainda aplicada a análise de variância (ANOVA) para a identificação dos factores significativos e selecção da melhor combinação de níveis.

Este estudo permitiu concluir que para analisar materiais com base em MDI a melhor combinação de níveis é temperatura da coluna a 30°C, fluxo a 0,3 mL/min e o solvente com 0,1% Ac. NH<sub>4</sub>. No que diz respeito aos materiais que têm como base os TDIs a melhor combinação encontrada foi idêntica à obtida para o MDI. A única diferença entre as duas análises é o MDI e o Dímero apresentarem melhor detecção a um comprimento de onda de 254 nm e os restantes TDIs a 240 nm.

## Palavras Chave

Difenilmetanodiiisocianato (MDI), toluenodiiisocianato (TDI), 9 – (metilaminometil)antraceno (MAMA), 1-(2-piridil)piperazina (1,2-PP), UPLC, DOE



## **Abstract**

The objective of this work is optimize the method of analysis and quantification of free isocyanates in materials in contact with food with the help of a statistical method, the experimental design.

Isocyanates are compounds with great commercial importance in view of their use in the manufacture of polyurethanes. Since these compounds are toxic becomes very important to study the optimization and control of the concentration present in various materials in contact with food. Polyurethanes are used in various applications such as adhesives, foams, thermoplastic resins, printing inks, foundry mold and rubbers.

To perform the analysis and quantification of isocyanates diphenylmethane-4,4'-diisocyanate, 4,4' - MDI, 2,4 - toluene diisocyanate, 2,4 - TDI, 2,6 - toluene diisocyanate, 2,6 - TDI and 2,4 - toluene diisocyanate dimer, Dimer, was used a chromatographic method, the UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography).

In the experimental design three factors were studied at two levels: column temperature in degrees Celsius (°C); flow in milliliters per minute (mL/min) and solvent as a percentage of ammonium acetate (%NH<sub>4</sub> Ac.). Eight experiments were carried out, each with two replicates and three replications. Was further applied analysis of variance (ANOVA) for the identification of significant factors and selection of the best combination of levels.

This study concluded that to analyze materials based on MDI the best combination of levels column was temperature at 30 °C, flow at 0.3 mL/min and the solvent with 0.1% NH<sub>4</sub> Ac.. With respect to materials which are based on TDIs the best combination found was identical to that obtained for the MDI. The only difference between the two analysis is the MDI and dimer having better detection at a wavelength of 254 nm and the other TDIs at 240 nm.

## **Key Words**

Diphenylmethane diisocyanate (MDI), toluene diisocyanate (TDI), 9-(Methylaminomethyl)anthracene (MAMA), 1-(2-methoxyphenyl)piperazine (1,2 - PP), UPLC, DOE



## Índice de matérias

Resumo	ix
Abstract	xi
Índice de matérias	xiii
Índice de tabelas	xv
Índice de figuras	xix
Lista de Abreviaturas	xxv
Simbologia	xxvii
1. Objectivo	1
2. Introdução	3
2.1. Isocianatos	3
2.2. Cromatografia	6
2.2.1. A Cromatografia Líquida	7
2.2.2. UPLC	7
2.2.3. Os Detectores	8
2.3. Desenho de Experiências	10
2.3.1. Desenho factorial completo	12
2.3.2. Análise de variância - ANOVA	12
2.3.3. Análise de Resíduos	13
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Materiais	15
3.2. Métodos	16
4. Apresentação e Discussão de Resultados	19
4.1. Pré-experiências com derivatizantes	19
4.1.1. Pré-experiências com o Derivatizante MAMA	19
4.1.2. Pré-experiências com o Derivatizante 1,2-PP	23
4.1.3. Pré-experiências com o Derivatizante DBA	29
4.2. Ensaio prévios do desenho de experiências	34
4.3. Desenho de Experiências	37
4.3.1. Maximização da área	40
4.3.2. Maximização da resolução	59
4.4. Aplicações	73
5. Conclusões e Recomendações para trabalhos futuros	75
5.1. Pré-experiências com derivatizantes	75
5.2. Desenho de Experiências	76
5.2.1. Maximização da área	76
5.2.2. Maximização da resolução	77
5.3. Aplicações	77
5.4. Recomendações para trabalhos futuros	78
Bibliografia	79
Anexos	81
	xiii

Anexo A: Protocolo Experimental referente às pré-experiências com MAMA	81
Anexo B: Cromatogramas das pré-experiências com MAMA	84
Anexo C: Protocolo Experimental referente às pré-experiências do 1,2 – PP	86
Anexo D: Cromatogramas das pré-experiências do 1,2 – PP	89
Anexo E: Protocolo Experimental referente às pré-experiências com DBA	92
Anexo F: Cromatogramas das pré-experiências com DBA	94
Anexo G: Análise do DOE referente à maximização da resposta do MDI a um comprimento de onda de 240 nm.	100
Anexo H: Análise do DOE referente à maximização da resposta do Dímero.	103
Anexo I: Análise do DOE referente à maximização da resposta do 2,4 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.	106
Anexo J: Análise do DOE referente à maximização da resposta do 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.	109
Anexo K: Análise do DOE referente à maximização da resolução entre o 2,4 – TDI e o 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.	112
Anexo L: Análise do DOE referente à maximização da resolução entre o 2,4 – TDI e o MDI a um comprimento de onda de 254 nm.	115
Anexo M: Análise do DOE referente à maximização da resolução entre o MDI e o Dímero a um comprimento de onda de 254 nm.	118

## Índice de tabelas

Tabela 2.1: Matriz de planeamento factorial 2 <sup>3</sup> .....	12
Tabela 2.2: Tabela ANOVA.....	13
Tabela 4.1: Gradiente aplicado na terceira pré-experiência com MAMA.....	22
Tabela 4.2: Gradiente aplicado na primeira pré-experiência com 1,2 - PP.....	24
Tabela 4.3: Gradiente aplicado na segunda pré-experiência com 1,2 - PP.....	25
Tabela 4.4: Gradiente aplicado na terceira pré-experiência do 1,2 - PP.....	27
Tabela 4.5: Gradiente aplicado na primeira pré-experiência com DBA.....	29
Tabela 4.6: Gradiente aplicado na segunda pré-experiência do DBA.....	30
Tabela 4.7: Gradiente aplicado na terceira pré-experiência com DBA.....	31
Tabela 4.8: Gradiente aplicado na quinta pré-experiência do DBA.....	32
Tabela 4.9: Gradiente aplicado no ensaio prévio do DOE.....	36
Tabela 4.10: Resultados das experiências com os quatro solventes, traduzidos pela área dos picos dos cromatogramas.....	36
Tabela 4.11: Apresentação do DOE aplicado.....	37
Tabela 4.12: Níveis dos factores estudados.....	38
Tabela 4.13: Ordem de execução das experiências do DOE.....	38
Tabela 4.14: Ordem das experiências agrupadas por nível de solvente e temperatura.....	39
Tabela 4.15: Valores da área do MDI nas experiências a um comprimento de onda de 240 nm. .....	40
Tabela 4.16: Valores da área do MDI nas experiências a um comprimento de onda de 254 nm. .....	40
Tabela 4.17: ANOVA para o MDI a um comprimento de onda de 254 nm.....	41
Tabela 4.18: ANOVA condensada para o MDI a um comprimento de onda de 254 nm.....	41
Tabela 4.19: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o MDI a 254 nm. .....	42
Tabela 4.20: Melhor combinação de níveis para o MDI a 254 nm.....	42
Tabela 4.21: Valores da área do Dímero nas experiências a 240 nm.....	44
Tabela 4.22: Valores da área do Dímero nas experiências a 254 nm.....	45
Tabela 4.23: ANOVA para o Dímero a um comprimento de onda de 254 nm.....	45
Tabela 4.24: ANOVA condensada para o Dímero a um comprimento de onda de 254 nm.....	46
Tabela 4.25: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o Dímero a 254 nm. .....	46
Tabela 4.26: Melhor combinação de níveis para o Dímero a 254 nm.....	46
Tabela 4.27: Valores da área do 2,4 – TDI nas experiências a 240 nm.....	49
Tabela 4.28: Valores da área do 2,4 – TDI nas experiências a 254 nm.....	49
Tabela 4.29: ANOVA para o 2,4 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm.....	50
Tabela 4.30: ANOVA condensada para o 2,4 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm.....	50

Tabela 4.31: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o 2,4 – TDI a 240 nm. ....	50
Tabela 4.32: Melhor combinação de níveis para o 2,4 – TDI a 240 nm. ....	51
Tabela 4.33: Valores da área do 2,6 – TDI nas experiências a 240 nm. ....	53
Tabela 4.34: Valores da área do 2,6 – TDI nas experiências a 254 nm. ....	53
Tabela 4.35: ANOVA para o 2,6 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm. ....	54
Tabela 4.36: ANOVA condensada para o 2,6 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm. ....	54
Tabela 4.37: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o 2,6 – TDI a 240 nm. ....	54
Tabela 4.38: Melhor combinação de níveis para o 2,6 – TDI a 240 nm. ....	55
Tabela 4.39: Experiência que corresponde à melhor combinação de níveis para o Dímero. ....	58
Tabela 4.40: Valores da resolução entre o pico do 2,4 - TDI e do 2,6 - TDI para a experiência a. ....	58
Tabela 4.41: Experiência que corresponde à melhor combinação de níveis para o 2,4 - TDI e o 2,6 - TDI. ....	58
Tabela 4.42: Valores da resolução entre o pico do 2,4 - TDI e do 2,6 - TDI para a experiência c. ....	59
Tabela 4.43: Valores da resolução entre o 2,4 – TDI e o 2,6 – TDI nas experiências a 240 nm. ....	60
Tabela 4.44: Valores da resolução entre o 2,4 – TDI e o 2,6 – TDI nas experiências a 254 nm. ....	60
Tabela 4.45: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm. ....	61
Tabela 4.46: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o 2,4 – TDI e o 2,6 – TDI a 240 nm. ....	61
Tabela 4.47: Melhor combinação de níveis para a resolução do 2,4 – TDI e o 2,6 - TDI a 240 nm. ....	61
Tabela 4.48: Valores da resolução entre o 2,4 – TDI e o MDI nas experiências a 240 nm. ....	64
Tabela 4.49: Valores da resolução entre o 2,4 – TDI e o MDI nas experiências a 254 nm. ....	64
Tabela 4.50: ANOVA para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm. ....	65
Tabela 4.51: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm. ....	65
Tabela 4.52: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm. ....	66
Tabela 4.53: Melhor combinação de níveis para a resolução do 2,4 – TDI e o MDI a 240 nm. ....	66
Tabela 4.54: Valores da resolução entre o MDI e o Dímero nas experiências a 240 nm. ....	68
Tabela 4.55: Valores da resolução entre o MDI e o Dímero nas experiências a 254 nm. ....	69
Tabela 4.56: ANOVA para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 240 nm. ....	69



Tabela 4.57: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 240 nm. ....	70
Tabela 4.58: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o MDI e o Dímero a 240 nm. ....	70
Tabela 4.59: Melhor combinação de níveis para a resolução entre o MDI e o Dímero a 254 nm. ....	70
Tabela 4.60: Resumo da melhor combinação de níveis para a maximização da área. ....	73
Tabela 4.61: Resumo da melhor combinação de níveis para a maximização da resolução. ....	73
Tabela 4.62: Valores de % fm - MDI e recuperação de HDI para cada réplica realizada de espuma. ....	74
Tabela 5.1: Gradiente aplicado em experiências com 1,2 - PP. ....	75
Tabela G1: ANOVA para o MDI a um comprimento de onda de 240 nm. ....	100
Tabela G2: ANOVA condensada para o MDI a um comprimento de onda de 240 nm. ....	100
Tabela G3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o MDI a 240 nm. ....	100
Tabela G4: Melhor combinação de níveis para o MDI a 240 nm. ....	101
Tabela H1: ANOVA para o Dímero a um comprimento de onda de 240 nm. ....	103
Tabela H2: ANOVA condensada para o Dímero a um comprimento de onda de 240 nm. ....	103
Tabela H3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o Dímero a 240 nm. ....	103
Tabela H4: Melhor combinação de níveis para o Dímero a 240 nm. ....	104
Tabela I1: ANOVA para o 2,4 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm. ....	106
Tabela I2: ANOVA condensada para o 2,4 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm. ....	106
Tabela I3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o 2,4 – TDI a 254 nm. ....	106
Tabela I4: Melhor combinação de níveis para o 2,4 – TDI a 254 nm. ....	107
Tabela J1: ANOVA para o 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm. ....	109
Tabela J2: ANOVA condensada para o 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm. ....	109
Tabela J3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o 2,6 – TDI a 254 nm. ....	110
Tabela J4: Melhor combinação de níveis para o 2,6 – TDI a 254 nm. ....	110
Tabela K1: ANOVA para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm. ....	112
Tabela K2: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm. ....	112
Tabela K3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a 254 nm. ....	112
Tabela K4: Melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a 254 nm. ....	113

Tabela L1: ANOVA para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a um comprimento de onda de 254 nm. ....	115
Tabela L2: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a um comprimento de onda de 254 nm. ....	115
Tabela L3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 254 nm. ....	116
Tabela L4: Melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 254 nm. ....	116
Tabela M1: ANOVA para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 254 nm. ....	118
Tabela M2: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 254 nm. ....	118
Tabela M3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 254 nm. ....	119
Tabela M4: Melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 254 nm. ....	119

## Índice de figuras

Figura 2.1: Representação esquemática de alguns isocianatos. ....	3
Figura 2.2: Esquema geral da síntese de poliuretano. ....	3
Figura 2.3: Reacção de derivatização entre o MDI e o 1,2 - PP. ....	5
Figura 2.4: Estruturas químicas dos agentes de derivatização utilizados. ....	6
Figura 2.5: Diagrama esquemático das técnicas de cromatografia (Adaptado de [14]).....	7
Figura 2.6: Esquema Geral do Funcionamento de um HPLC.....	8
Figura 2.7: Sistema UPLC.....	9
Figura 2.8: Representação esquemática de um detector de Matriz de Díodos. ....	10
Figura 2.9: Representação esquemática de um detector de fluorescência. ....	10
Figura 2.10: Esquema da abordagem para a aplicação do DOE.....	11
Figura 4.1: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.....	20
Figura 4.2: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.....	20
Figura 4.3: Segunda pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa. .	21
Figura 4.4: Segunda pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa. .	21
Figura 4.5: Terceira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.....	22
Figura 4.6: Terceira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.....	23
Figura 4.7: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 254 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde. ....	24
Figura 4.8: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde. ....	25
Figura 4.9: Segunda pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul. ....	26
Figura 4.10: Segunda pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul. ....	26
Figura 4.11: Terceira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul. ....	27
Figura 4.12: Terceira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul. ....	27
Figura 4.13: Quarta pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul. ....	28

Figura 4.14: Quarta pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.....	28
Figura 4.15: Primeira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.....	30
Figura 4.16: Primeira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.....	30
Figura 4.17: Segunda pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.....	31
Figura 4.18: Segunda pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.....	31
Figura 4.19: Terceira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.....	32
Figura 4.20: Terceira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.....	32
Figura 4.21: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa. .	33
Figura 4.22: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde.....	34
Figura 4.23: Esquema representativo do método de preparação das amostras para a realização da pré-experiência do DOE. ....	35
Figura 4.24: Verificação da Normalidade para o MDI a 254 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.....	43
Figura 4.25: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.....	43
Figura 4.26: Variância das experiências do MDI a 254 nm. Valores previstos vs. resíduos. ....	44
Figura 4.27: Verificação da Normalidade para o Dímero a 254 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.....	47
Figura 4.28: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.....	48
Figura 4.29: Variância das experiências do Dímero a 254 nm. Valores previstos vs. resíduos. 48	
Figura 4.30: Verificação da Normalidade para o 2,4 - TDI a 240 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.....	51
Figura 4.31: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.....	52
Figura 4.32: Variância das experiências do 2,4 - TDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos. ....	52
Figura 4.33: Verificação da Normalidade para o 2,6 - TDI a 240 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.....	55
Figura 4.34: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.....	56

Figura 4.35: Variância das experiências do 2,6 - TDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.	56
Figura 4.36: Cromatograma de uma experiência aplicada no DOE.	57
Figura 4.37: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI a 240 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.	62
Figura 4.38: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.	63
Figura 4.39: Variância das experiências da resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.	63
Figura 4.40: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.	67
Figura 4.41: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.	67
Figura 4.42: Variância das experiências da resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.	68
Figura 4.43: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 240 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.	71
Figura 4.44: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.	72
Figura 4.45: Variância das experiências da resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.	72
Figura 4.46: Curva de calibração para a espuma analisada.	73
Figura B1: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.	84
Figura B2: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.	84
Figura B3: Terceira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.	85
Figura B4: Terceira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.	85
Figura D1: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 240 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde.	89
Figura D2: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 240 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde.	89
Figura D3: Segunda pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 240 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.	90
Figura D4: Segunda pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 240 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.	90
Figura D5: Terceira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 240 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.	91

Figura D6: Terceira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 240 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul. ....	91
Figura F1: Terceira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	94
Figura F2: Terceira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	94
Figura F3: Quarta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	95
Figura F4: Quarta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	95
Figura F5: Quinta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	96
Figura F6: Quinta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	96
Figura F7: Sexta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	97
Figura F8: Sexta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	97
Figura F9: Sétima pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	98
Figura F10: Sétima pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	98
Figura F11: Oitava pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	99
Figura F12: Oitava pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro. ....	99
Figura G1: Verificação da Normalidade para o MDI a 240 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal. ....	101
Figura G2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências. ....	101
Figura G3: Variância das experiências do MDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos. ....	102
Figura H1: Verificação da Normalidade para o Dímero a 240 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal. ....	104
Figura H2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências. ....	104
Figura H3: Variância das experiências do Dímero a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos. ....	105
Figura I1: Verificação da Normalidade para o 2,4 - TDI a 254 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal. ....	107
Figura I2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências. ....	107

Figura I3: Variância das experiências do 2,4 - TDI a 254 nm. Valores previstos vs. resíduos.	108
Figura J1: Verificação da Normalidade para o 2,6 – TDI a 254 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.....	110
Figura J2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.....	111
Figura J3: Variância das experiências do 2,6 - TDI a 254 nm. Valores previstos vs. resíduos. ....	111
Figura K1: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI a 254 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal. ....	113
Figura K2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.....	114
Figura K3: Variância das experiências d a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI a 254 nm. Valores previstos vs. Resíduos. ....	114
Figura L1: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 254 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.....	116
Figura L2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.....	117
Figura L3: Variância das experiências d a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 254 nm. Valores previstos vs. Resíduos. ....	117
Figura M1: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do MDI e o pico Dímero a 254 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal. ....	119
Figura M2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.....	120
Figura M3: Variância das experiências d a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 254 nm. Valores previstos vs. Resíduos. ....	120





## Lista de Abreviaturas

1,2 - PP - 1-(2-piridil)piperazina

2,4 - TDI - 2,4 - tolueno diisocianato

2,6 - TDI - 2,6 - tolueno diisocianato

4,4' - MDI - 4,4' - difenilmetano diisocianato

AcN - Acetonitrilo

ANOVA - *Analysis of Variance*, análise de variância

DBA - Dibutilamina

DCM - Diclorometano

Dímero - 2,4 - toluenodiisocianato dímero

DMSO - Dimetilsulfóxido

DOE - *Design of Experiments*, desenho de experiências

HDI - 1,6 - hexametileno diisocianato

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia líquida de alta eficiência

MAMA - 9 - (metilaminometil)antraceno

PDA - *Photodiode Array Detector*, Detector de matriz de díodos

PUR - Poliuretano

UPLC - *Ultra Performance Liquid Chromatography*, Cromatografia líquida de ultra eficiência

UV - Vis - *Ultraviolet - visible spectroscopy*, espectroscopia ultravioleta visível



## **Simbologia**

a – número de níveis

$F_0$  - Estatística da análise de variância de um factor

g.l.- graus de liberdade

k – número de factores

MS - Desvio quadrático médio de um factor

n – número de replicações

SS - Soma dos quadrados de um factor;

$SS_{\text{Erro}}$  – Variação residual

$SS_{\text{T}}$  – Variação Total



## 1. Objectivo

O objectivo principal deste trabalho consistiu em otimizar um método de análise para a quantificação de isocianatos livres em materiais que possam de alguma forma entrar em contacto com alimentos.

Os isocianatos são compostos que se encontram numa classe de extrema importância comercial devido à sua utilização no fabrico de poliuretanos [1]. A análise dos isocianatos é indispensável pois estes compostos são tóxicos e uns dos principais responsáveis por doenças respiratórias como asma.

Em consequência da sua toxicidade, torna-se extremamente importante a optimização de um método analítico que permita a quantificação rigorosa de isocianatos livres, para que durante o fabrico dos produtos que os possuam na sua constituição não sejam ultrapassados os limites legais (1 mg/kg no produto final expresso como grupo isocianato (NCO)) [2]. Esta exigência é fundamental quando se trata da utilização de materiais em contacto com alimentos como é o caso de rolas de aglomerado de cortiça em que é utilizada uma substância aglomerante à base de resinas de poliuretano.

Outro objectivo foi adaptar, desenvolver e otimizar os métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) visto que as colunas e condições cromatográficas são distintas.

Para a optimização da técnica foi utilizado um método estatístico, o Desenho de Experiências (*Design of Experiments*, DOE). Este método estatístico permite estudar vários factores em simultâneo, e respectivas interacções entre eles, cada um com dois ou mais níveis, permitindo identificar a melhor combinação de níveis para cada factor. Neste caso concreto os factores são as principais condições experimentais variáveis do método analítico.



## 2. Introdução

Neste capítulo serão apresentados os conteúdos teóricos que serviram como suporte para a realização deste trabalho.

### 2.1. Isocianatos

Os isocianatos são compostos altamente reactivos que contêm um ou mais grupos funcionais do tipo (-N=C=O). Estes compostos são classificados quanto ao número de grupos funcionais que contêm, podendo ser mono-, di-, ou poliisocianatos conforme contêm um, dois, ou mais grupos. Neste trabalho foram estudados apenas diisocianatos [3]. Na Figura 2.1 são apresentados, de forma esquemática, os isocianatos que foram estudados no presente trabalho.

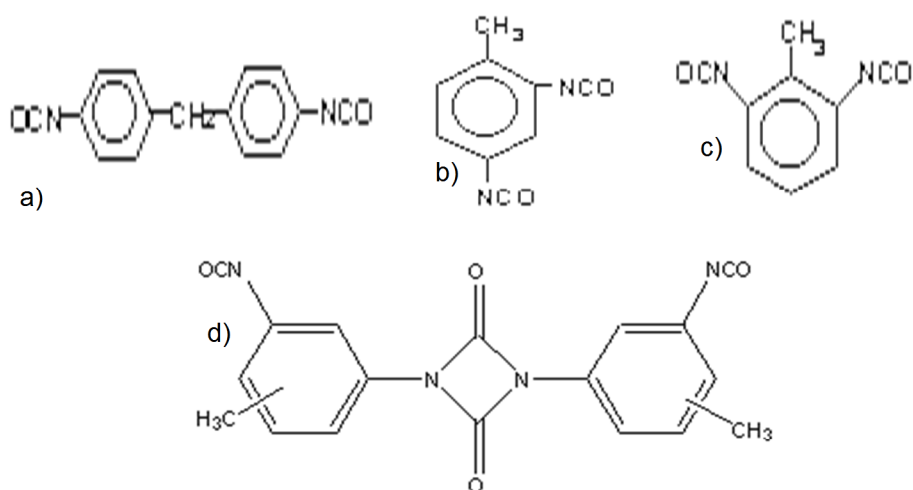


Figura 2.1: Representação esquemática de alguns isocianatos.  
a) 4,4' – difenilmetanodiisocianato (MDI); b) 2,4 – toluenediisocianato (2,4 – TDI);  
c) 2,6 – toluenediisocianato (2,6 – TDI); d) 2,4 – toluenediisocianato dímero (Dímero)

A principal aplicação industrial dos isocianatos é baseada na capacidade dos diisocianatos quando submetidos a reacções de polimerização de adição com polióis, formarem poliuretanos (PUR), como indicado na Figura 2.2 [1,2].

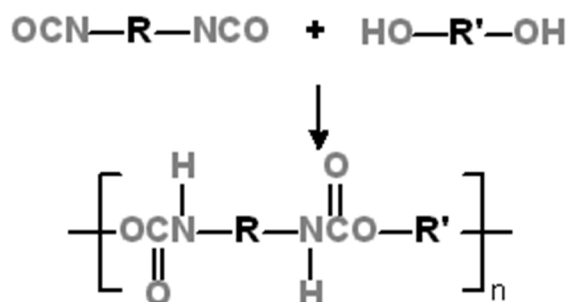


Figura 2.2: Esquema geral da síntese de poliuretano.

Este polímero tem uma vasta gama de aplicações, como por exemplo, adesivos, espumas, resinas termoplásticas, tintas de impressão, moldes de fundição e borrachas. Algumas dessas aplicações, como por exemplo, as espumas e os adesivos, são materiais que de alguma forma podem vir a entrar em contacto com os alimentos. Se no polímero existirem moléculas de isocianato que não reagiram elas encontram-se livres e podem migrar para os alimentos, se o poliuretano tiver sido utilizado em embalagem alimentar [2].

Os adesivos de poliuretano são utilizados, por exemplo, no fabrico de rolhas aglomeradas de cortiça. Este tipo de rolhas é constituído por granulados de cortiça excedentes da brocagem de placas de cortiça no fabrico de rolhas de cortiça natural. Estas rolhas produzidas com granulados podem ser fabricadas por moldagem individual ou por extrusão, sendo necessário utilizar uma substância aglomerante. Para este fim são utilizados adesivos de poliuretano aprovados para materiais que vão estar em contacto com os alimentos [4].

Existem dois tipos de espumas de poliuretano, as espumas flexíveis e as espumas rígidas. As espumas rígidas de poliuretano são muito utilizadas na construção civil em todo o tipo de isolamento térmico. Também se pode encontrar este material nos frigoríficos e arcas comerciais e domésticas e em carrinhas com sistema de refrigeração. Tendo em conta estas aplicações, torna-se importante o controlo destas espumas visto que os isocianatos livres que delas se possam libertar também podem entrar em contacto indirecto com os alimentos através da atmosfera [4].

Existe um efeito crítico na saúde associado aos isocianatos, quando estes compostos se encontram na atmosfera em doses mais elevadas, podendo causar irritação nos olhos, pele e vias respiratórias. Por esta razão os trabalhadores que efectuem trabalhos com estes compostos devem ter especial atenção à protecção de olhos, pele e à inalação de vapores. É necessário um elevado cuidado pois os seres humanos, após longos períodos de exposição, podem tornar-se sensíveis a concentrações extremamente baixas. Tosse, respiração ofegante, desconforto no peito, edema agudo e fibrose pulmonar intersticial são alguns dos efeitos que se têm verificado associados à inalação de isocianatos [5]. Os efeitos que estes compostos têm na saúde estão, por isso, muito bem descritos em documentação específica sobre o assunto [6,7].

Os limites de exposição a estes compostos estão igualmente documentados. Esses limites, devido aos efeitos na saúde, são baixos em alguns países da Europa (< 20 µg/L) [3].

Na literatura a técnica mais referida para a quantificação de isocianatos livres é a cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) [2,8-12]. Quando se pretende fazer também a identificação dos isocianatos é utilizada uma técnica hifenada, cromatografia líquida associada a espectrometria de massa (MS), designada por HPLC-MS [12]. Todos os autores consultados referem a aplicação de derivatização neste tipo de análise cromatográfica, sendo para tal indicados diferentes métodos, consoante o derivatizante



utilizado [2,8-12]. Se for usado o MAMA a fase móvel para realizar a análise cromatográfica é uma solução aquosa de 3% de trietilamina com um pH igual a 3,0 ajustado com ácido ortofosfórico e uma solução de acetonitrilo (20:80) [2,9]. Quando o 1,2 – PP é utilizado como derivatizante usa-se como fase móvel uma solução de aquosa de 0,1 % de acetato de amónio com pH igual a 6,0 ajustado com ácido acético e uma solução de acetonitrilo [10]. Geralmente as percentagens destas duas soluções variam em gradiente ao longo da corrida cromatográfica. Por último, para a utilização do DBA como derivatizante existem na literatura várias fases móveis [8, 11, 12]. No entanto a mais utilizada são duas soluções de acetonitrilo/água/ácido fórmico uma a (5/95/0,05) e outra (95/5/0,05), utilizadas num gradiente de concentrações. No presente estudo foram estas as fases móveis utilizadas. No entanto, como se utilizou uma cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) conseguiu-se reduzir o tempo de análise cromatográfica e o fluxo, o que conduz a uma maior economia no que diz respeito aos solventes utilizados sem comprometer os resultados a obter.

Relativamente à derivatização apresenta-se como exemplo na Figura 2.3 a reacção de derivatização entre o MDI e o 1,2 – PP.

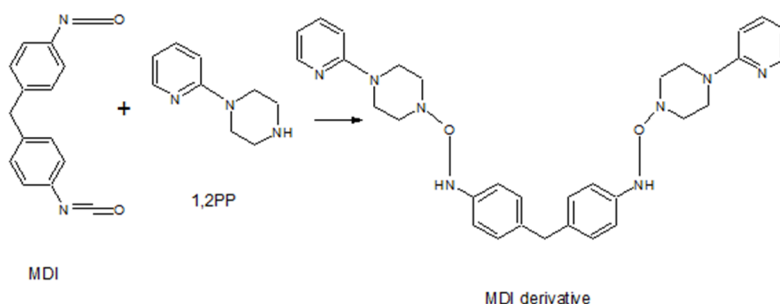


Figura 2.3: Reacção de derivatização entre o MDI e o 1,2 - PP.

A derivatização é geralmente utilizada devido a uma série de razões. Quando a técnica de análise é o UPLC a detecção é um dos maiores problemas. Por vezes, em cromatografia líquida é necessário transformar uma substância num composto fluorescente de modo a ser detectado, porque os detectores utilizados são detectores de emissão na zona ultravioleta-visível (UV-VIS) do espectro de radiação electromagnética. A derivatização pode ser realizada antes da injeção cromatográfica ou entre a coluna e o detector [13].

No caso deste trabalho a derivatização é realizada antes da injeção cromatográfica, ou seja, durante a preparação de todas as amostras. Este procedimento foi utilizado no presente estudo com recurso à realização de uma reacção química com agentes de derivatização para que os isocianatos se tornassem compostos fluorescentes estáveis e serem possíveis de detectar por UPLC (Figura 2.4).

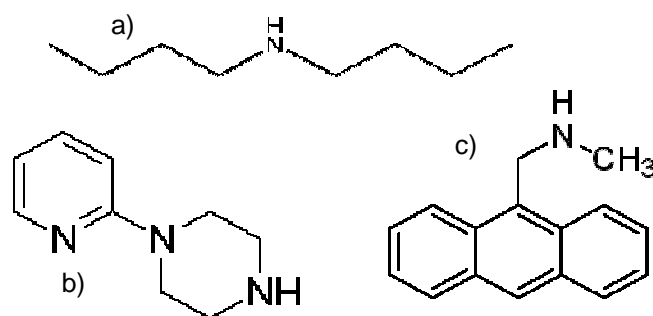


Figura 2.4: Estruturas químicas dos agentes de derivatização utilizados.  
a) Dibutilamina (DBA); b) 1-(2-piridil)piperazina (1,2 – PP);  
c) 9 – (metilaminometil)antraceno (MAMA).

## 2.2. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica de separação química e identificação de componentes. Para que esta separação seja possível deve existir uma diferença entre o comportamento que os analitos têm com a fase móvel ou com a fase estacionária. Isto é, a mistura que se quer analisar tem analitos que vão responder de maneira diferente à fase móvel e à fase estacionária. Normalmente, um analito tem mais afinidade com a fase móvel ou com a fase estacionária do que o outro, o que faz com que estes analitos se separem. Isto acontece porque a interação dos componentes da mistura com as fases depende dos efeitos de afinidade e solubilidade e ainda de cada componente gerar forças intermoleculares diferentes com as fases móveis. A fase estacionária pode ser um líquido depositado num sólido inerte ou um sólido, pode estar empacotada numa coluna ou espalhada por uma superfície formando uma camada fina [13].

Existem variadas classificações para a forma de cromatografia, uma delas é feita através da natureza da fase móvel. Se a fase móvel for um gás estamos perante uma cromatografia gasosa, se por sua vez a fase móvel for um líquido fala-se em cromatografia líquida. Por último ainda existe a cromatografia supercrítica onde se usa um vapor pressurizado, acima da sua temperatura crítica [13].

No próximo subcapítulo aborda-se com maior detalhe no que diz respeito à cromatografia líquida, tendo em conta que foi a técnica utilizada no decorrer deste trabalho.

### 2.2.1. A Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida é uma subdivisão da cromatografia em coluna que por sua vez se divide em dois tipos de cromatografia, como mostra o esquema seguinte.

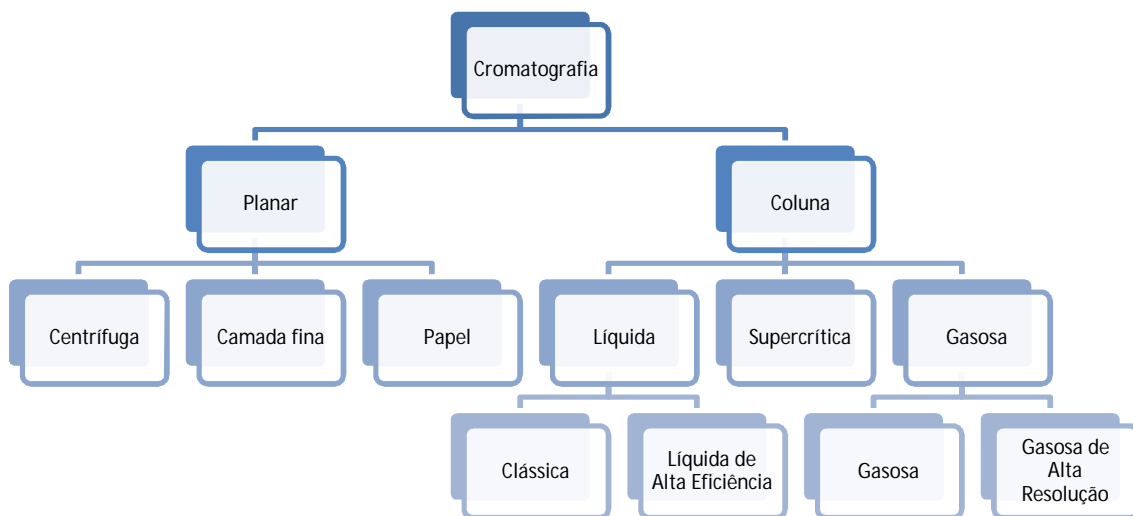


Figura 2.5: Diagrama esquemático das técnicas de cromatografia (Adaptado de [14])

A grande diferença entre a cromatografia líquida clássica e a cromatografia líquida de alta eficiência é que na primeira a fase móvel é arrastada através da coluna apenas pela força da gravidade. Na cromatografia líquida de alta eficiência são utilizadas fases estacionárias com partículas menores, sendo, por isso, necessária a utilização de bombas de alta pressão para que a fase móvel seja eluída. Para este trabalho interessa aprofundar a cromatografia líquida de alta eficiência visto ser esta técnica que vai ser utilizada [14].

### 2.2.2.UPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência veio trazer um grande avanço na cromatografia em coluna visto que, com esta técnica houve um desenvolvimento e o começo da utilização de suportes com partículas mais pequenas. Estas partículas são as responsáveis pela alta eficiência, isto porque com partículas de menor diâmetro consegue-se aumentar a área de contacto e com isso, uma maior eficiência na separação dos analitos [15,16]. A Figura 2.6 apresenta o diagrama geral de funcionamento de um HPLC.

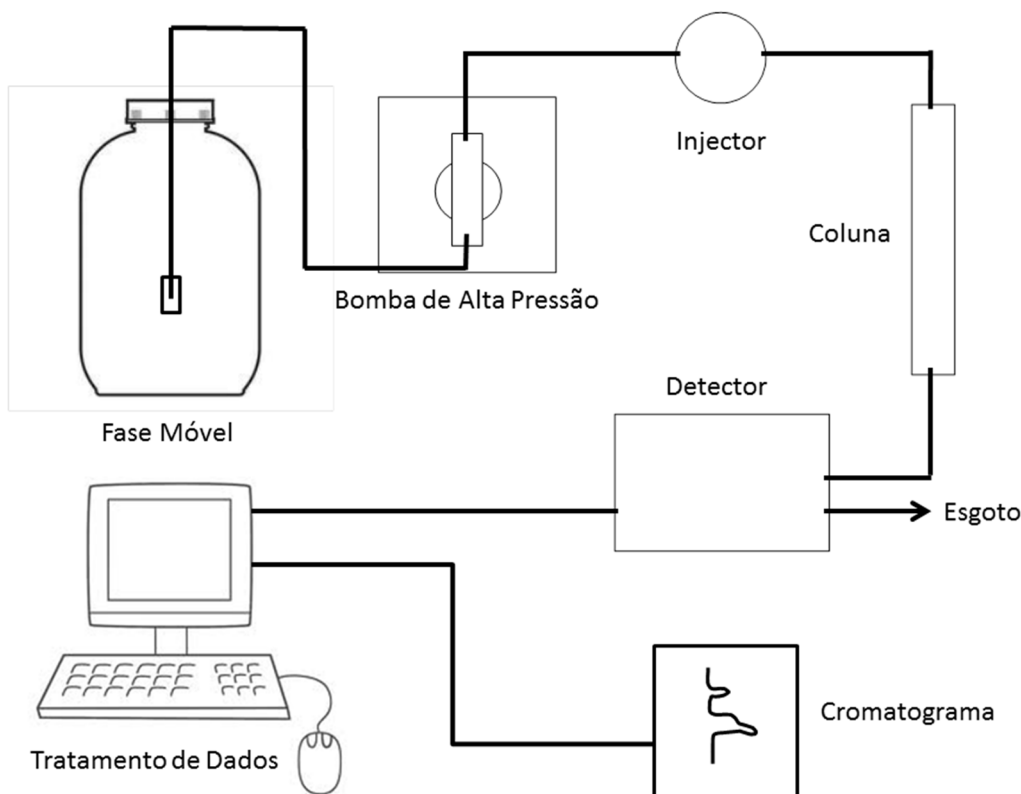


Figura 2.6: Esquema Geral do Funcionamento de um HPLC.

Para que ocorra a separação em HPLC pode-se utilizar três características principais dos compostos. Estas características podem ser:

- Polaridade;
- Carga eléctrica;
- Peso molecular.

No entanto, neste trabalho utilizou-se cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC). Este tipo de cromatografia apenas difere do HPLC no que diz respeito ao tamanho das partículas do enchimento da coluna e à velocidade do fluxo. A eficiência da cromatografia aumenta quando a fase estacionária é constituída por partículas mais pequenas do que as que normalmente se utiliza em HPLC. Esta utilização de partículas mais pequenas provoca uma perda de carga e posteriormente um aumento da pressão. Normalmente os aparelhos de HPLC não estão preparados para este aumento de pressão, mas os de UPLC já conseguem suportar pressões elevadas. Este aumento de pressão não compromete a resolução, por outro lado ainda se obtém resoluções e sensibilidades superiores às obtidas por HPLC [15,16].

### 2.2.3.Os Detectores

Como foi dito anteriormente, o método cromatográfico utiliza detectores para fazer a identificação dos vários compostos a analisar. São vários os detectores que podem ser usados

em cromatografia, entre eles estão, os detectores de ultravioleta, os de fluorescência, os de índice de refração e os electroquímicos, sendo que os que são mais utilizados são os ópticos (detector de ultravioleta - UV e detector de matriz de díodos - PDA) [14,16].

O princípio de funcionamento destes detectores é a intercepção de um feixe de luz com uma célula, por onde passa o eluente e os compostos em análise. Quando este feixe de luz entra em contacto com um composto este faz variar a intensidade luminosa. Estas variações podem ser causadas pela absorção no UV, emissão de fluorescência ou mudanças no índice de refração, dos compostos. Estes dados são então fornecidos ao *software* informático que depois faz a conversão destes valores em tempo de retenção e/ou área dos picos [14,16].

No caso presente, como os compostos que se pretendem analisar absorvem em UV e emitem fluorescência foram utilizados dois detectores em série, um PDA e um de fluorescência. Na Figura 2.7 é apresentado o sistema UPLC utilizado, as duas primeiras estruturas são, respectivamente, o detector de fluorescência e o detector PDA.



Figura 2.7: Sistema UPLC.

#### ✓ **Detector de Matriz de Díodos**

Este tipo de detector consegue detectar qualquer absorção de luz desde a região do UV até à região do visível. A figura abaixo é uma representação esquemática de um detector do tipo de Matriz de Díodos.

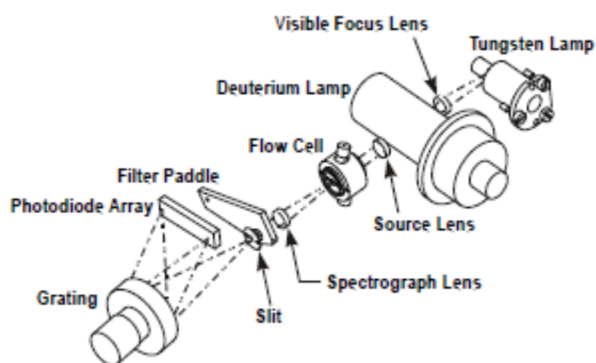


Figura 2.8: Representação esquemática de um detector de Matriz de Díodos.

### ✓ Detector de Fluorescência

Quando se utiliza este tipo de detector, normalmente, são utilizados dois comprimentos de onda, um comprimento de onda de excitação e um comprimento de onda de emissão. A razão pela qual tal acontece é que uma molécula apenas emite fluorescência quando passa de um estado excitado para o seu estado normal. Isto é, a molécula é excitada até ao comprimento de onda de excitação máxima e como este estado excitado da molécula é instável, assim que se deixa de excitá-la ela passa para o seu estado de energia fundamental emitindo fluorescência que é medida ao comprimento de onda de emissão [17]. A Figura 2.9 apresenta de forma esquemática um detector de fluorescência.

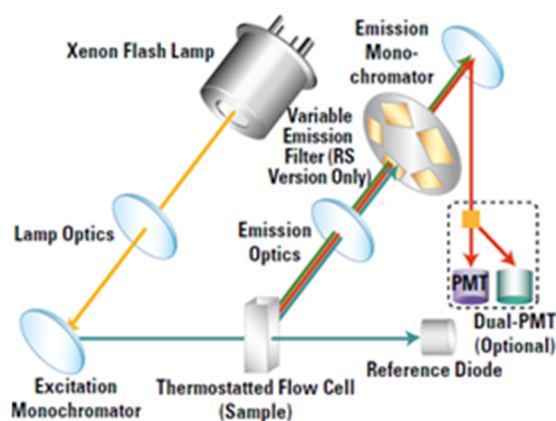


Figura 2.9: Representação esquemática de um detector de fluorescência.

## 2.3. Desenho de Experiências

A capacidade que um método cromatográfico tem em separar, identificar e quantificar compostos satisfatoriamente depende de vários factores que podem ser controlados pelo operador. Muitas vezes o recurso ao desenho de experiências (DOE) poderá constituir uma poderosa ferramenta estatística, permitindo ao analista identificar que factores, ou interacção

de factores, pode afectar a resposta do cromatograma, conduzindo à sua optimização [18]. Qualquer que seja a sua área de aplicação, o desenho de experiências permite obter resultados de uma forma mais eficaz, uma vez que considera a variação dos factores em conjunto, e suas interacções [19].

O DOE em cromatografia tem duas aplicações. Uma delas é mostrar que nenhum dos factores em estudo é significativo e assim verificar a robustez para a validação do método. A outra aplicação, aquela que foi utilizada no presente estudo, é identificar quais os factores que são significativos e otimizar a resposta tendo em conta esses mesmos factores [18].

Antes da aplicação do DOE é necessário executar uma abordagem disciplinada para que a sua aplicação produza resultados positivos. O esquema apresentado na Figura 2.10 permite sumarizar as principais etapas que devem ser tidas em consideração na fase de planeamento das experiências.

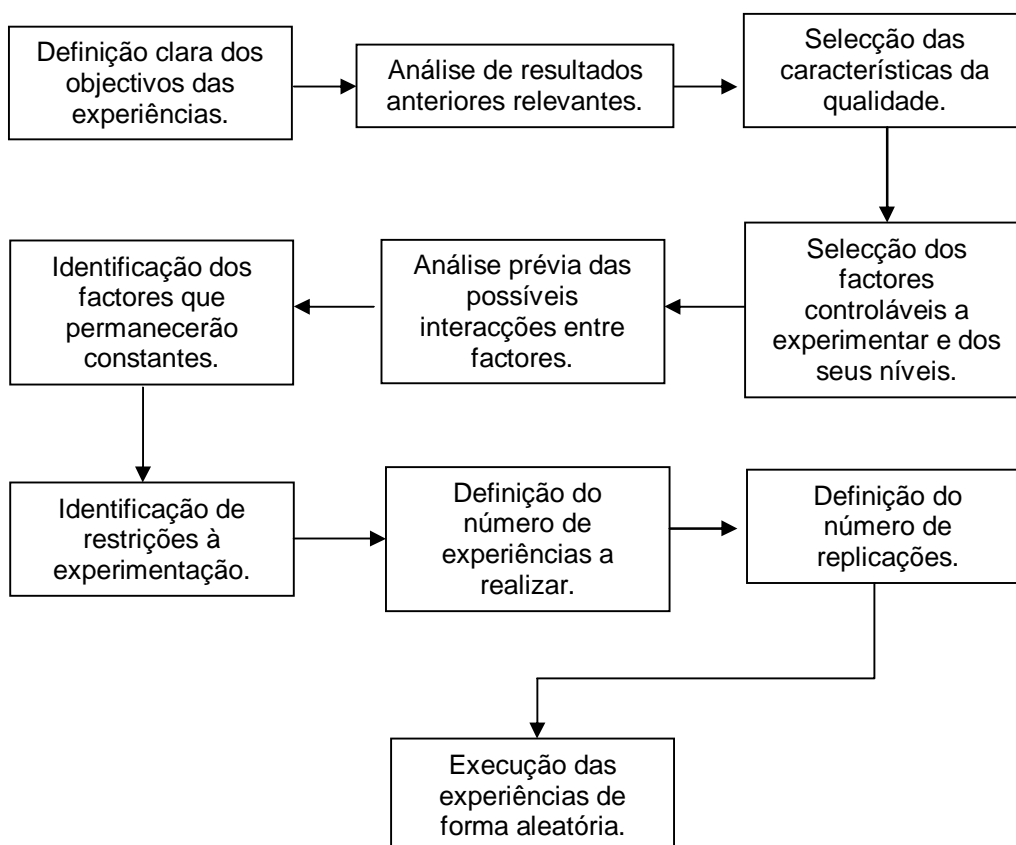


Figura 2.10: Esquema da abordagem para a aplicação do DOE [19].

Depois da realização das experiências deve-se utilizar a análise de variância para o tratamento estatístico dos resultados obtidos. Esta análise de variância permite identificar, de forma objectiva, quais os factores e/ou interacções que afectam significativamente as respostas.

Após a identificação desses factores (isolados ou em interacção), estabelece-se a melhor combinação de níveis dos factores que irá conduzir à maximização dos objectivos pré-estabelecidos.

De entre os vários desenhos de experiências existentes, na presente dissertação, apenas irá ser objecto de estudo e aplicação o desenho factorial completo.

### **2.3.1. Desenho factorial completo**

O desenho factorial completo, com vários factores a dois níveis, pode ser representado de forma genérica por  $2^k$ , onde 2 representa o número de níveis de cada factor e k designa o número de factores a considerar no desenho. Neste trabalho o desenho factorial completo contempla três factores, cada um com dois níveis, ou seja, a representação genérica é  $2^3$ .

Normalmente, os dois níveis são designados por baixo e alto e designados na forma codificada por -1 e +1. No que concerne aos factores, estes geralmente são representados por letras maiúsculas: A, B e C.

Para se conseguir planear correctamente as experiências correspondentes a um factorial  $2^k$  foi desenvolvido um algoritmo que considera uma *ordem padrão* pela qual as combinações de níveis vão sendo introduzidas. Na Tabela 2.1 é apresentada a matriz de planeamento  $2^3$ , correspondente à realização de um total de oito experiências, colocadas de acordo com a *ordem padrão*.

Tabela 2.1: Matriz de planeamento factorial  $2^3$ .

<i>Ordem padrão</i>	A	B	C
(1)	-1	-1	-1
a	+1	-1	-1
b	-1	+1	-1
ab	+1	+1	-1
c	-1	-1	+1
ac	+1	-1	+1
bc	-1	+1	+1
abc	+1	+1	+1

Esta ordem padrão, como se pode verificar na tabela anterior, é representada por letras minúsculas. Em cada experiência a letra que a representa corresponde ao factor que se encontra no nível alto. Por convenção, a primeira experiência represente-se por (1) e corresponde a todos os factores se encontrarem no nível baixo.

### **2.3.2. Análise de variância - ANOVA**

A análise de variância é uma técnica estatística que pode ser utilizada para analisar o erro de medição, bem como outras fontes de variabilidade num conjunto de dados. Esta análise



possibilita a repartição da variabilidade total dos dados experimentais pelas diversas componentes causadoras da variabilidade, sendo assim possível determinar que componentes são estatisticamente significativas [19 - 22].

A ANOVA normalmente é apresentada sobre a forma de tabela.

Tabela 2.2: Tabela ANOVA.

Fonte de Variação	Soma de quadrados	g.l.	Média de quadrados	F0
A	$SS_A$	1	$SS_A/g.l._A$	$MS_A/MS_{Erro}$
B	$SS_B$	1	$SS_B/g.l._B$	$MS_B/MS_{Erro}$
AB	$SS_{AB}$	1	$SS_{AB}/g.l._{AB}$	$MS_{AB}/MS_{Erro}$
C	$SS_C$	1	$SS_C/g.l._C$	$MS_C/MS_{Erro}$
AC	$SS_{AC}$	1	$SS_{AC}/g.l._{AC}$	$MS_{AC}/MS_{Erro}$
BC	$SS_{BC}$	1	$SS_{BC}/g.l._{BC}$	$MS_{BC}/MS_{Erro}$
ABC	$SS_{ABC}$	1	$SS_{ABC}/g.l._{ABC}$	$MS_{ABC}/MS_{Erro}$
Erro	$SS_{Erro}$	$2^k(n-1)$	$SS_{Erro}/g.l._{Erro}$	-
Total	$SS_T$	$2^k n - 1$	-	-

onde,

$$SS_X = \frac{[(\sum y)_{X+} - (\sum y)_{X-}]^2}{2^k n}$$

Equação 2.1: Variação do factor X.

$$SS_T = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n y_{ij}^2 - \frac{(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n y_{ij})^2}{2^k n}$$

Equação 2.2: Variação total.

$$SS_{Erro} = SS_T - \sum SS_X$$

Equação 2.3: Variação Residual.

a – número de níveis correspondente a cada factor, onde  $i = 1, \dots, a$

n – número de replicações efectuadas, onde  $j = 1, \dots, n$

### 2.3.3. Análise de Resíduos

Depois de efectuar o DOE é importante verificar se todos os pressupostos subjacentes à análise de variância são válidos, ou seja, se os erros são independentes e Normalmente

distribuídos, com média nula e variância constante. A validação de tais pressupostos passa pela:

- Verificação da Normalidade

Para se verificar se os resíduos são Normalmente distribuídos efectua-se um gráfico das probabilidades da distribuição Normal. Se os resíduos se dispuserem aproximadamente em linha recta, o pressuposto da Normalidade é satisfeito.

- Resíduos e ordem das experiências

Efectuando-se um gráfico dos resíduos em função da ordem aleatória pela qual as experiências foram efectuadas consegue-se concluir se existe independência ou não, ou seja, se os resíduos se dispuserem no gráfico de forma aleatória, a hipótese de independência é satisfeita.

- Resíduos em função dos valores previstos ou estimados

Este pressuposto avalia se a variância é constante, construindo um gráfico dos resíduos em função dos valores previstos ou estimados. Se o gráfico não apresentar nenhuma estrutura especial, o pressuposto da variância constante é satisfeito.

### 3. Materiais e Métodos

Neste capítulo serão apresentados todos os materiais utilizados nas experiências realizadas e todos os métodos cromatográficos empregados para a realização da análise dos isocianatos.

#### 3.1. Materiais

No decorrer deste trabalho foram utilizados variadíssimos materiais, entre os quais se destacam o equipamento e reagentes que seguidamente se indicam.

- **Equipamento**
  - Cromatógrafo líquido de ultra eficiência, Sistema ACQUITY UPLC, Waters;
  - Coluna ACQUITY UPLC BEH C18, Waters;
  - Sistema de detecção PDA e Fluorescência ACQUITY UPLC, Waters.
- **Reagentes**
  - Acetonitrilo, Merck, gradient grade for liquid chromatography;
  - Diclorometano, Merck, for chromatography;
  - Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, ACS spectrophometric grade  $\geq 99,9$  %;
  - Ácido acético glacial, Panreac, p. a.;
  - Água Milli-Q, Millipore, tipo 1;
  - N,N' – dimetilformamida, Emsure, for analysis;
  - 4,4' – MDI, fornecido pela indústria;
  - Dímero, Rheinchemie;
  - 2,4 – TDI, Ehrenstorfer, 96,0 %;
  - 2,6 – TDI, Ehrenstorfer 98,5 %;
  - HDI, Ehrenstorfer, 99 %;
  - Acetato de amónio, Merck, p.a.;
  - Trietilamina, Alfa Aesar, 99 %;
  - 1,2 – PP, Aldrich,  $\geq 99,5$  %;
  - MAMA, Aldrich, 99 %;
  - DBA, Aldrich,  $\geq 99,5$  %;
  - Ácido ortofosfórico, Panreac, 85 %;
  - Ácido fórmico, Merck, for analysis 98/100 %;
  - Isooctano, Merck, p.a.;
  - Etanol, Merck, absolute for analysis;
  - T-80, fornecido pela indústria.

### **3.2. Métodos**

Para se efectuar a análise dos isocianatos foram utilizados essencialmente três métodos distintos, ou seja, um método por cada derivatizante testado. Estes métodos são diferentes tendo em conta que a detecção do conjugado isocianato-derivatizante é diferente, visto que possuem propriedades químicas e físicas distintas. No entanto, existem condições que são comuns a todos os métodos, isto é, independentemente do derivatizante utilizado.

Em todas as experiências foram utilizados dois detectores, um detector de fluorescência e um detector de matriz de díodos (PDA). No detector PDA foram utilizados dois comprimentos de onda, 240 e 254 nm. O detector de fluorescência tem como comprimento de onda de excitação 254 nm e como comprimento de onda de emissão a 412 nm.

As experiências realizadas com o derivatizante MAMA tiveram todas como fase móvel dois solventes: o solvente A, uma solução de 3 % de trietilamina em água (p/v) com pH = 3,0 acertado com ácido ortofosfórico, e o solvente B, acetonitrilo. As percentagens utilizadas foram, para a maioria das experiências 20 % de solvente A e 80 % de solvente B. No entanto houve uma experiência na qual se utilizou um gradiente mantendo estes dois solventes. No que diz respeito ao tempo de análise, quando utilizado este derivatizante, foram realizados dois tempos, 15 e 30 minutos. A temperatura da coluna a 30 °C e o fluxo a 0,33 mL/min foram mantidos constantes em todas estas experiências.

Quando foi utilizado o derivatizante 1,2 – PP a fase móvel foi constituída por dois solventes: o solvente A, uma solução aquosa de acetato de amónio com uma percentagem de 0,01 % e 0,1 % com um pH igual a 3,0 ou a 6,0 acertado com ácido acético glacial (quatro soluções combinando as duas variáveis dos dois factores); o solvente B, acetonitrilo. Foram testados diversos gradientes com estes dois solventes. Na coluna foram experimentadas duas temperaturas, uma a 30 °C e outra a 40 °C, no que respeita ao fluxo foram também utilizados dois, 0,3 mL/min e 0,4 mL/min. O tempo da análise cromatográfica variou entre 8 minutos e 10 minutos.

Em todas as experiências que foram realizadas com o derivatizante DBA a fase móvel utilizada foi uma combinação entre dois solventes. O solvente A, uma solução de acetonitrilo/água/ácido fórmico (5/95/0,05) e o solvente B, uma solução de acetonitrilo/água/ácido fórmico (95/5/0,05). Foram realizados vários gradientes com estes dois solventes. O tempo da análise cromatográfica variou entre 8 minutos e 18 minutos, a temperatura variou entre 30 °C e 45 °C, por fim, o fluxo variou entre 0,25 mL/min e 0,35 mL/min.

Em anexo (Anexos A, C e E) encontra-se o protocolo experimental referente à preparação das amostras de todas as experiências de análise cromatográfica dos isocianatos livres, com as diferentes substâncias derivatizantes, realizadas.

No que diz respeito à análise de amostras reais de espumas de poliuretano o procedimento experimental foi o seguinte:

**Preparação de solução de espuma:**

- Pesquisar um balão de 50 mL com tampa;
- Colocar a espuma no balão e pesar novamente;
- Completar com DCM.

**Preparação de solução com 1,2 – PP:**

- Num balão de 50 mL colocar 100 µL de 1,2 – PP;
- Colocar alguns mL de AcN:DMSO (95:5);
- Colocar 2,5 mL da solução de espuma;
- Completar com AcN:DMSO (95:5);
- Esperar 2 horas para que a derivatização ocorra.

**Preparação de amostras a injectar no UPLC:**

- Num balão de 10 mL colocar 5 mL da solução anterior;
- Completar com AcN;

Para se traduzir a área de pico integrada pelo *software* para percentagem de isocianato livre, é necessário fazer uma curva de calibração. Essa curva de calibração foi preparada da seguinte forma.

- Colocar num balão de 10 mL padrão de MDI e completar com DCM;
- Num balão de 50 mL colocar 100 µL de 1,2 – PP, 2,5 mL da solução anterior e completar com AcN:DMSO (95:5);
- Passar para um balão de 10 mL 5mL da solução anterior;
- Fazer diluições para balões de 10 mL para que a concentração final de cada um seja 9, 5, 1, 0,1, 0,01 mg/L e completar com uma solução que contenha 2,5 % DCM, 47,5 % AcN:DMSO e 50 % AcN para que todas as soluções a injectar tenham a mesma matriz;

Nas amostras de espuma para injectar e nas soluções da curva adicionou-se uma solução de HDI como padrão interno. De seguida filtrou-se cerca de 2 mL de todas as soluções por filtro de seringa 2 µm para vial e injectar. A solução de HDI foi preparada segundo os passos seguintes.

- De uma solução de 2500 mg/L retirar 2,5 mL para um balão de 50 mL e juntar 100 µL de 1,2 – PP e completar com AcN:DMSO;
- Num balão de 100 mL colocar toda a solução anterior e completar com AcN;
- Desta última solução, retirar 10 mL e adicionar a todas as soluções a injectar para que a concentração do padrão interno seja de 5 mg/L.
- Filtrar cerca de 2 mL desta solução por filtro de seringa 2 µm para vial e injectar.



## **4. Apresentação e Discussão de Resultados**

Neste capítulo serão apresentados todos os resultados obtidos e realizada a respectiva discussão.

Para possibilitar uma melhor leitura da análise dos mesmos, optou-se por resumidamente abordar neste capítulo, caso a caso, os métodos experimentais associados a cada experiência e não no capítulo Materiais e Métodos.

### **4.1. Pré-experiências com derivatizantes**

Foram realizadas pré-experiências para se entender qual dos três derivatizantes seria o mais adequado para realizar a análise cromatográfica dos isocianatos livres. Foram analisados quatro isocianatos: MDI, Dímero do 2,4 - TD, 2,4-TDI e 2,6-TDI derivatizados com três substâncias derivatizantes: MAMA, 1,2-PP e DBA.

#### **4.1.1. Pré-experiências com o Derivatizante MAMA**

A preparação das amostras para estas experiências foram executadas tendo em conta dois métodos. No primeiro método tanto a solução de isocianato como a solução de derivatizante são realizadas em separado. Por outro lado, no segundo método prepara-se uma única solução contendo tanto o isocianato como o derivatizante. O protocolo experimental detalhado encontra-se no anexo A, tanto para o método 1 como para o método 2.

Para analisar isocianatos derivatizados com MAMA a fase móvel mais referenciada na literatura é uma solução de 3% de trietilamina em água (p/v) com pH = 3,0 acertado com ácido ortofosfórico como solvente A e acetonitrilo como solvente B.

Para se conseguir detectar os isocianatos derivatizados utilizaram-se dois detectores: um detector de fluorescência e um detector de matriz de díodos (PDA). No detector PDA foram utilizados dois comprimentos de onda, um a 240 nm e outro a 254 nm. O detector de fluorescência tem como comprimento de onda de excitação 254 nm e como comprimento de onda de emissão 412 nm.

Todas as pré-experiências com este derivatizante foram realizadas com um tempo de análise de 15 min, com um fluxo de 0.33 mL/min e com a temperatura da coluna a 30°C.

Os eluentes da primeira pré-experiência foram mantidos constantes ao longo da análise cromatográfica com percentagem do solvente A a 20% e o solvente B a 80%.

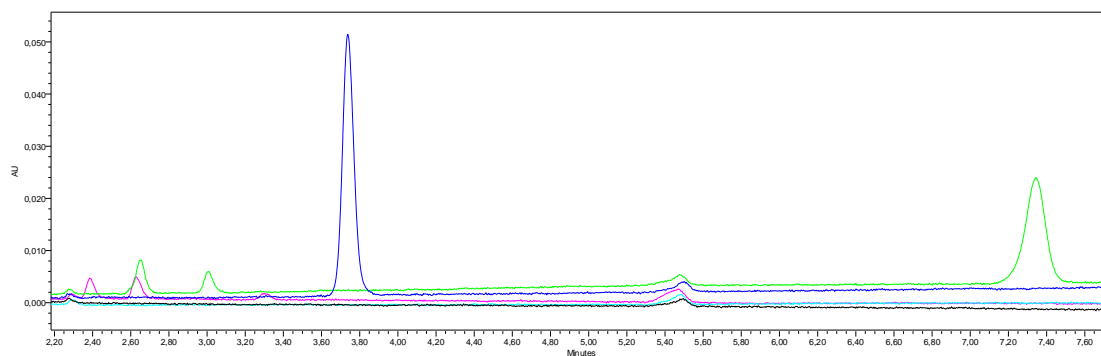


Figura 4.1: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

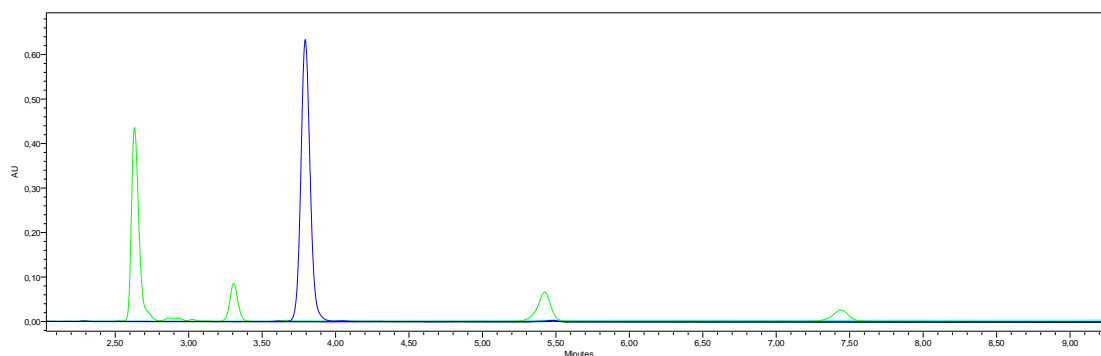


Figura 4.2: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

Depois de serem analisados os quatro cromatogramas relativos à primeira pré-experiência realizada pode afirmar-se que o detector PDA a um comprimento de onda de 254 nm é aquele onde a resposta é melhor relativamente aos dois métodos distintos. Os cromatogramas referentes tanto ao método 1 como ao método 2 para um comprimento de onda de 240 nm encontram-se no anexo B.

Como se pode observar pelos dois cromatogramas apresentados acima, o 2,4 – TDI não é detectado em nenhum dos métodos bem como em nenhum dos comprimentos de onda. Esta situação pode dever-se ao facto de a solução de 2,4 – TDI utilizada como inicial já estar preparada há algum tempo e apesar de estar guardada a -20 °C, o isocianato se ter degradado.

Em relação ao pico do 2,6 – TDI este apenas é observado no método 1, não se conseguindo, no entanto, concluir qual dos picos é que corresponde efectivamente ao 2,6 – TDI.



O Dímero é detectado em todos os cromatogramas, sendo o melhor resultado o verificado no cromatograma referente ao método 1 a um comprimento de onda de 254 nm. Este isocianato elui com um tempo de retenção de 7,10 minutos.

Quanto ao MDI como se pode observar este apresenta um pico bem definido em todos os cromatogramas apesar de o melhor corresponder ao método 1 a 254 nm.

Tendo em conta estes resultados optou-se por efectuar uma nova experiência, para se tentar detectar os TDI's.

Na segunda pré-experiência apenas se modificou o método de análise no que diz respeito ao tempo de análise, passou de 15 para 30 minutos.

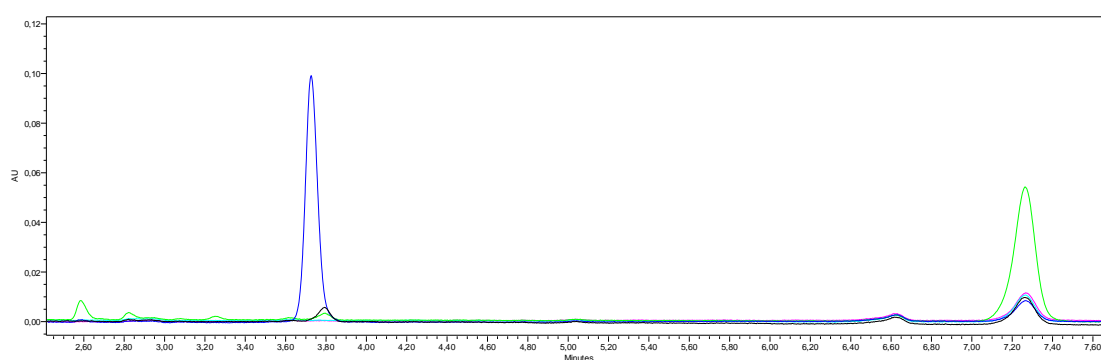


Figura 4.3: Segunda pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

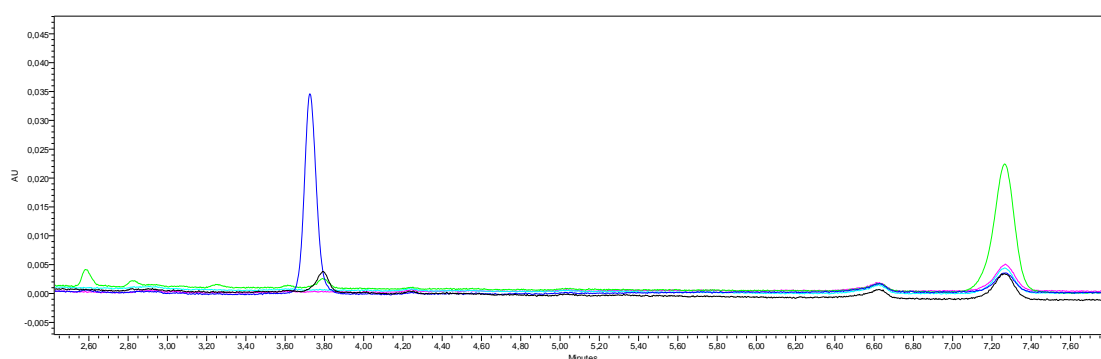


Figura 4.4: Segunda pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

Neste teste só foram analisadas amostras que tiveram como base de preparação o método 1. Isto porque na primeira experiência se verificou que o melhor método de preparação de amostras foi o método 1 e como a única diferença da primeira pré-experiência para esta foi o aumento do tempo de análise, não se justificava analisar também amostras cujo método de preparação fosse o método 2.

A primeira conclusão a destacar é que mais uma vez o melhor comprimento de onda é a 254 nm, visto que comparando os dois cromatogramas acima apresentados o que corresponde ao comprimento de onda de 254 nm é aquele onde a área de todos os picos é maior.

Como se pode verificar pelo cromatograma que se refere a um comprimento de onda de 254 nm, os isocianatos 2,4 – TDI e 2,6 – TDI não são detectados. Quanto aos picos de MDI e de Dímero estes são detectados e também se pode dizer que as outras amostras foram contaminadas com MDI e Dímero, visto que existe um pico ao mesmo tempo de retenção destes.

Na terceira pré-experiência optou-se por fazer uma análise cromatográfica em gradiente onde se mantiveram todas as outras condições relativamente à primeira pré-experiência. O gradiente aplicado foi o seguinte:

Tabela 4.1: Gradiente aplicado na terceira pré-experiência com MAMA.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	0	100
2	0	100
2,1	20	80
15	20	80
15,1	0	100
16	0	100

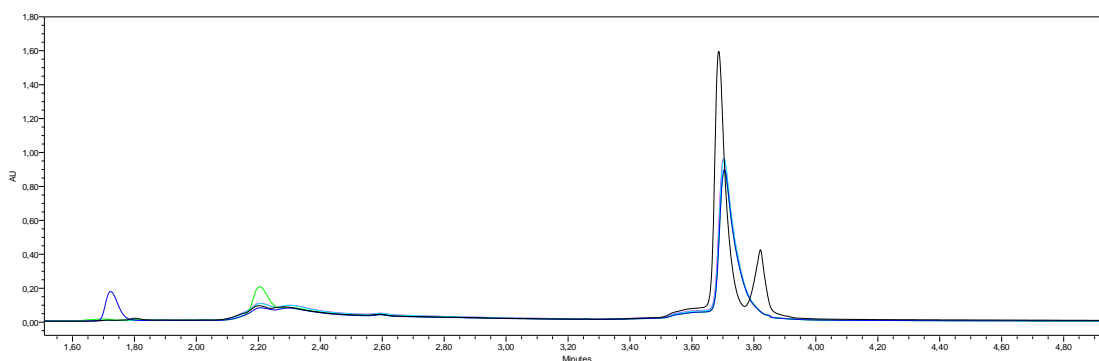


Figura 4.5: Terceira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

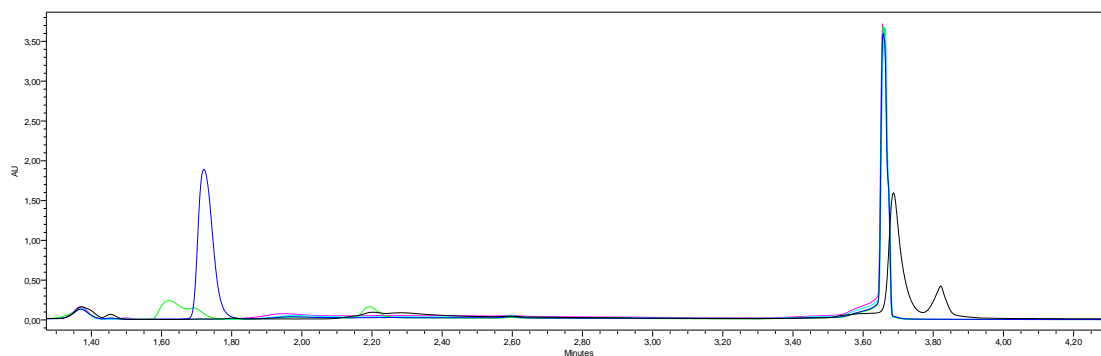


Figura 4.6: Terceira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

Nesta terceira experiência, como foi alterado o método de análise, decidiu-se testar novamente o método de preparação 2. Mais uma vez, o comprimento de onda de 254 nm foi aquele onde ouve uma maior resposta. Os cromatogramas referentes ao comprimento de onda de 240 nm tanto do método 1 como do método 2 encontram-se no anexo B.

Pela observação destes dois cromatogramas pode concluir-se que o gradiente aplicado não é adequado. Assim, pode verificar-se que os picos de Dímero e MDI não são totalmente separados a não ser no método 1, mas se se compararem com os cromatogramas referentes à primeira pré-experiência, este gradiente não produz uma resposta tão elevada.

A conclusão para estas pré-experiências com o derivatizante MAMA é que o melhor método de análise dos isocianatos livres é o apresentado na primeira pré-experiência. Logo à partida pode-se desprezar a terceira pré-experiência pelas razões acima indicadas. Quanto à primeira e segunda pré-experiências, como a sua única diferença é o tempo de corrida cromatográfica, e não há nenhum isocianato que elua com um tempo de retenção superior ao da primeira pré-experiência, opta-se pela primeira pré-experiência.

#### 4.1.2. Pré-experiências com o Derivatizante 1,2-PP

As amostras para estas pré-experiências foram preparadas igualmente através de dois métodos. Isto é, assim como nas pré-experiências com o MAMA foram preparadas as amostras de duas formas, o mesmo será feito para este derivatizante. No primeiro método a solução de isocianato e a de derivatizante são preparadas separadamente; no segundo método apenas se prepara uma amostra conjunta com isocianato e com derivatizante. Estes dois protocolos experimentais encontram-se detalhados no anexo C.

A fase móvel mais utilizada para analisar os isocianatos derivatizados com 1,2 – PP consiste na combinação de dois solventes, o solvente A, uma solução aquosa de acetato de amónio a 0,1% com pH = 6,0 acertado com ácido acético, e o solvente B, acetonitrilo.

No que diz respeito à detecção dos isocianatos derivatizados utilizaram-se igualmente dois detectores. O detector PDA foi utilizado a dois comprimentos de onda: 240 nm e 254 nm. No detector de fluorescência utilizou-se como comprimento de onda de excitação 254 nm e como comprimento de onda de emissão 412 nm. Estas pré-experiências foram realizadas com um tempo de análise cromatográfica de 10 min, um fluxo de 0,4 mL/min e uma temperatura da coluna de 40°C.

Na primeira pré-experiência foi aplicado o seguinte gradiente:

Tabela 4.2: Gradiente aplicado na primeira pré-experiência com 1,2 - PP.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	65	35
0,01	65	35
4,69	30	70
5,16	5	95
7,03	5	95
7,05	65	35
10	65	35

Nas Figuras 4.7 e 4.8 encontram-se os cromatogramas obtidos.

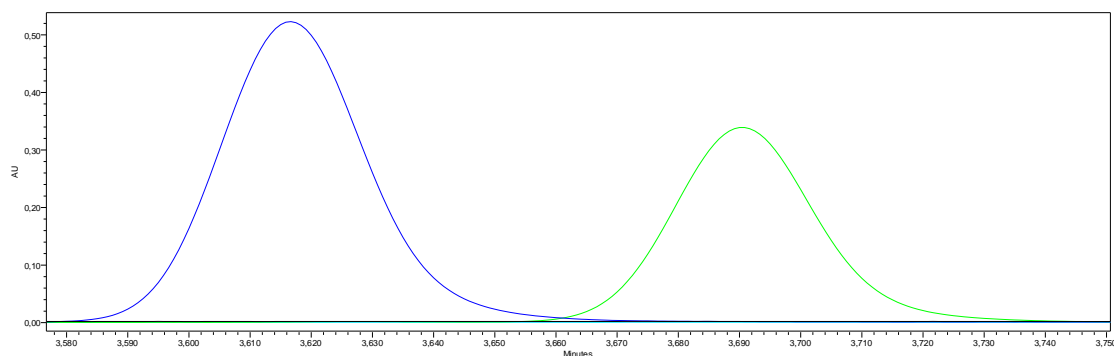


Figura 4.7: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 254 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde.

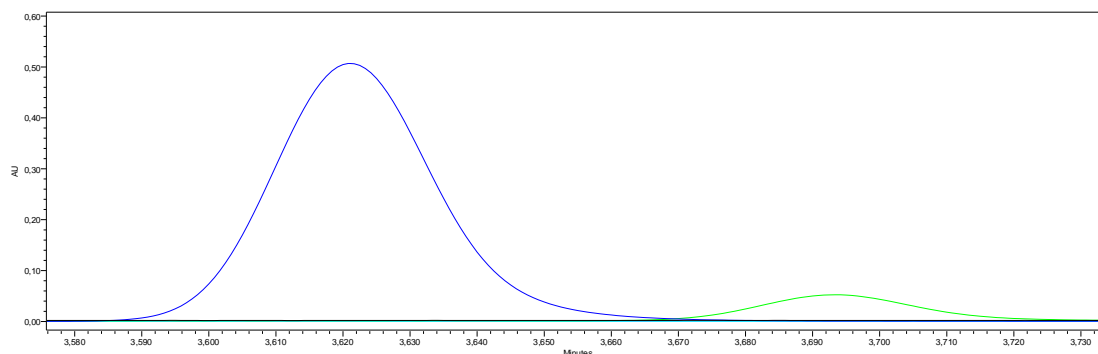


Figura 4.8: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde.

Por lapso em todas as pré-experiências com o derivatizante 1,2 – PP a quantidade de Dímero na preparação das amostras, método 1 e método 2, não é igual. Assim, é normal que se note uma diferença tão grande na área do seu pico nos respectivos cromatogramas. No entanto, o método que foi considerado melhor foi o método 2, não por haver uma maior resposta mas porque, como não existe grande diferença de resposta a não ser devido ao engano no Dímero, optou-se pelo protocolo interno existente que consiste na aplicação do método 2.

Através da observação dos cromatogramas relativos aos dois métodos a um comprimento de onda de 240 nm que se encontram no Anexo D, pode-se concluir mais uma vez que o melhor comprimento de onda para a detecção destes isocianatos é 254 nm, pois é aquele em que se obtém uma maior resposta.

Dado que os dois isocianatos não se encontram totalmente separados, fez-se uma nova pré-experiência.

Na segunda pré-experiência modificou-se apenas o gradiente (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Gradiente aplicado na segunda pré-experiência com 1,2 - PP.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	70	30
4,5	30	70
5	5	95
6,5	5	95
6,6	70	30
8	70	30

Através da observação dos quatro cromatogramas relativos a esta segunda pré-experiência (Figuras 4.9 e 4.10) pode-se afirmar que, mais uma vez, o comprimento de onda em que se

verifica uma maximização da resposta é 254 nm. Os cromatogramas a 240 nm, para os dois métodos de preparação da amostra, encontram-se no anexo D.

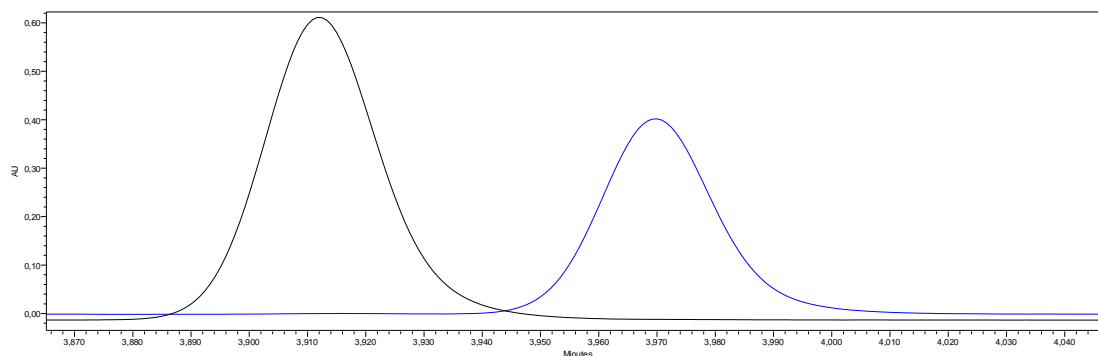


Figura 4.9: Segunda pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

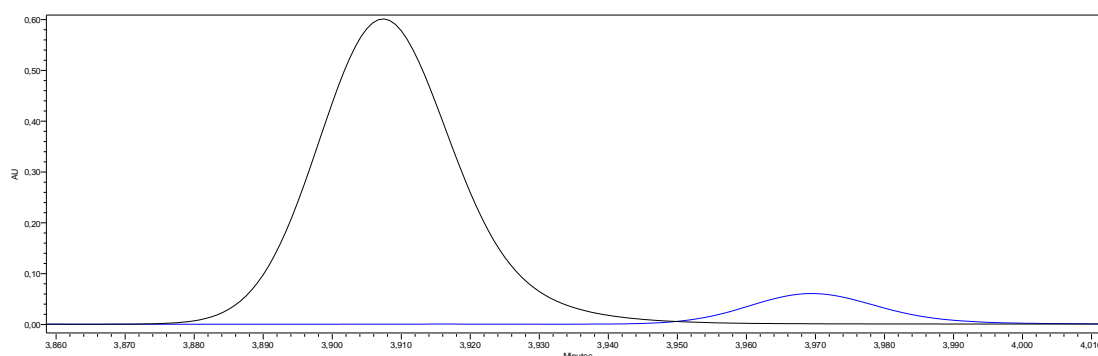


Figura 4.10: Segunda pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

Comparando esta segunda pré-experiência com a primeira pode-se concluir que o gradiente da primeira pré-experiência é melhor. Isto porque, pela observação dos cromatogramas é visível que na segunda pré-experiência os dois picos relativos ao MDI e ao Dímero estão mais próximos, ou seja, têm uma resolução mais baixa, do que na primeira pré-experiência.

Assim, foi feita uma nova pré-experiência com um outro gradiente para se tentar melhorar a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero.

Na terceira pré-experiência o gradiente utilizado foi o descrito na Tabela 4.4 e os cromatogramas obtidos os apresentados nas Figuras 4.11 e 4.12.

Tabela 4.4: Gradiente aplicado na terceira pré-experiência do 1,2 - PP.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	70	30
3	60	40
3,9	40	60
4	10	90
4,5	5	95
5	5	95
6,5	5	95
6,6	70	30
8	70	30

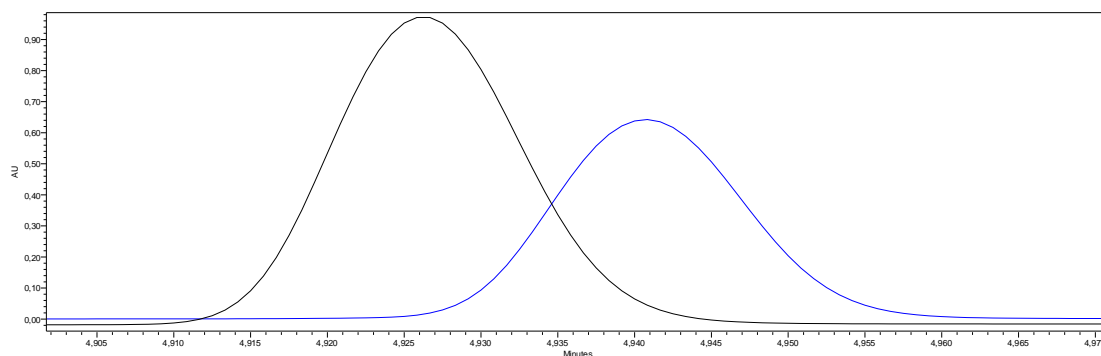


Figura 4.11: Terceira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

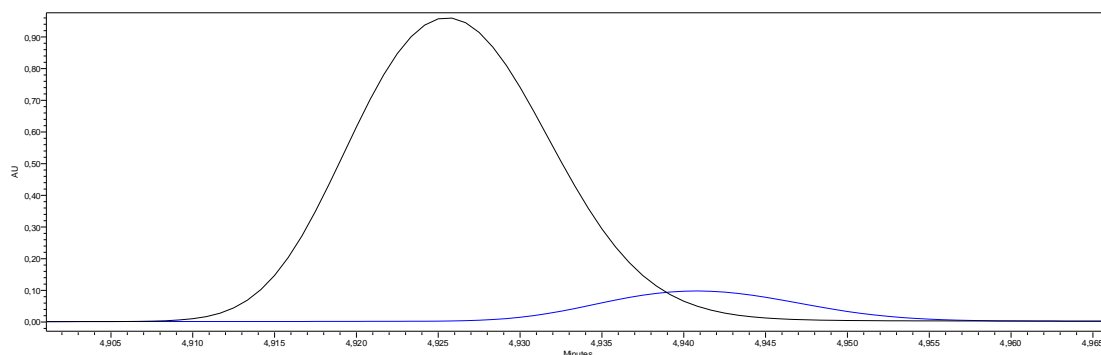


Figura 4.12: Terceira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

Como já se esperaria, mais uma vez, o comprimento de onda onde se obteve uma melhor resposta foi 254 nm. Os restantes cromatogramas, a 240 nm, encontram-se no anexo D.

O gradiente desta pré-experiência veio agravar ainda mais a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero, como se pode ver através dos respectivos. Assim sendo, optou-se por realizar ainda outra pré-experiência.

A quarta pré-experiência foi executada com as condições do gradiente aplicado na primeira pré-experiência com apenas uma modificação, a temperatura da coluna passou de 40°C para 30°C. Neste teste como apenas se alterou a temperatura da coluna optou-se por analisar apenas o método 1 de preparação da amostra. Os cromatogramas obtidos são apresentados nas Figuras 4.13 e 4.14.

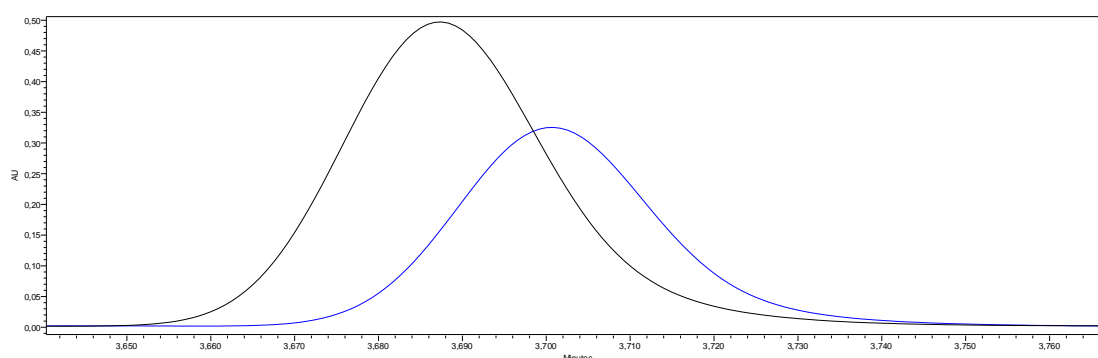


Figura 4.13: Quarta pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

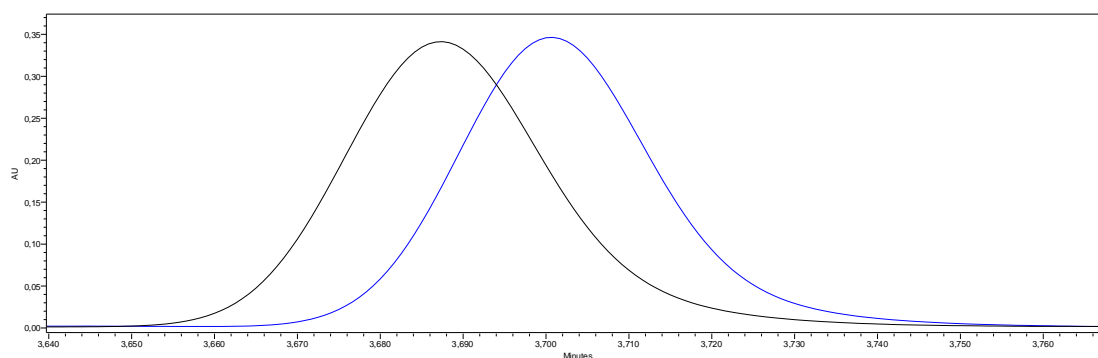


Figura 4.14: Quarta pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

Da análise dos cromatogramas observa-se que a resolução entre os dois picos é, mais uma vez, muito pior do que na primeira pré-experiência.



Como conclusão geral destas pré-experiências com o derivatizante 1,2 – PP, pode-se afirmar que o melhor gradiente é aquele que foi aplicado na primeira pré-experiência e com uma temperatura da coluna de 40°C.

#### 4.1.3. Pré-experiências com o Derivatizante DBA

A preparação das amostras para as pré-experiências com o derivatizante DBA foi feita seguindo um método onde se preparam as soluções de isocianato e derivatizante em separado. Neste método é necessário evaporar, filtrar e recristalizar, processos estes que são complexos, morosos e habitualmente com diversas perdas de amostra. Por esta razão, com este derivatizante só foram feitas pré-experiências com o isocianato MDI. O método encontra-se descrito no anexo E de um modo mais detalhado.

Para analisar isocianatos derivatizados com DBA a fase móvel mais utilizada consiste na combinação de dois solventes, o solvente A, uma solução de acetonitrilo/água/ácido fórmico (5/95/0,05), e o solvente B, uma solução de acetonitrilo/água/ácido fórmico (95/5/0,05).

No que diz respeito à detecção dos isocianatos derivatizados utilizaram-se igualmente dois detectores. O detector PDA foi utilizado a dois comprimentos de onda, um a 240 nm e outro a 254 nm. O detector de fluorescência tem como comprimento de onda de excitação 254 nm e como comprimento de onda de emissão 412 nm. Estas pré-experiências foram realizadas com um fluxo de 0,35 mL/min e uma temperatura da coluna de 30°C.

Relativamente à primeira pré-experiência, começou-se por aplicar o gradiente indicado na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Gradiente aplicado na primeira pré-experiência com DBA.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	60	40
12	0	100
15	0	100
16	60	40
18	60	40

Os cromatogramas obtidos nestas condições são os apresentados nas Figuras 4.15 e 4.16.

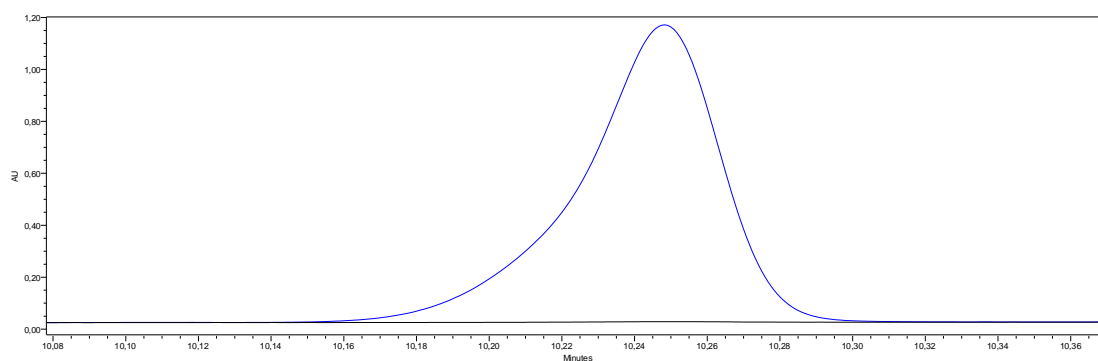


Figura 4.15: Primeira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

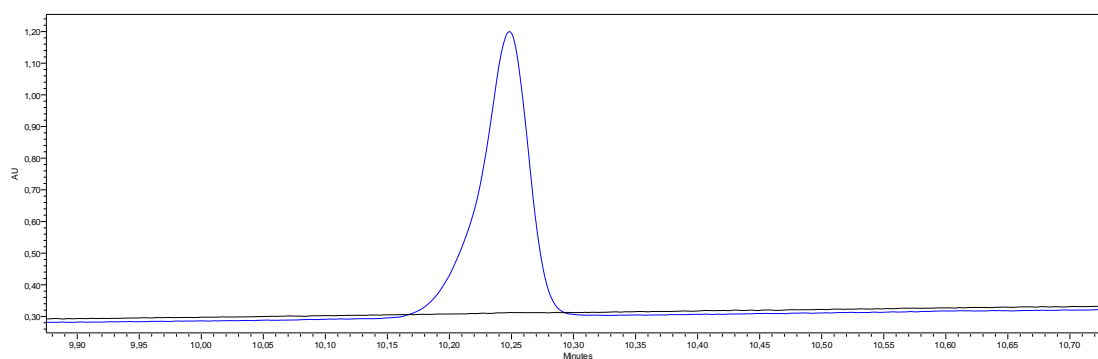


Figura 4.16: Primeira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

Como é visível nos cromatogramas, com este gradiente, observar os compostos a 240 nm ou a 254 nm é indiferente dado que a resposta dos detectores a esses comprimentos de onda é equivalente. É verificado ainda que o pico tem algum *fronting*, não sendo simétrico e não se considerando um bom resultado analítico pelo que se optou por testar novas condições de análise cromatográfica num 2º teste.

Na segunda pré-experiência foi aplicado o novo gradiente indicado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Gradiente aplicado na segunda pré-experiência do DBA.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	60	40
5	0	100
6	0	100
7	60	40
8	60	40

Nos cromatogramas apresentados (Figuras 4.17 e 4.18) é possível verificar que novamente o pico do MDI possui *fronting*. Por esta razão foi efectuada uma nova pré-experiência. É possível ainda afirmar que a 254 nm é onde se verifica uma maior resposta.

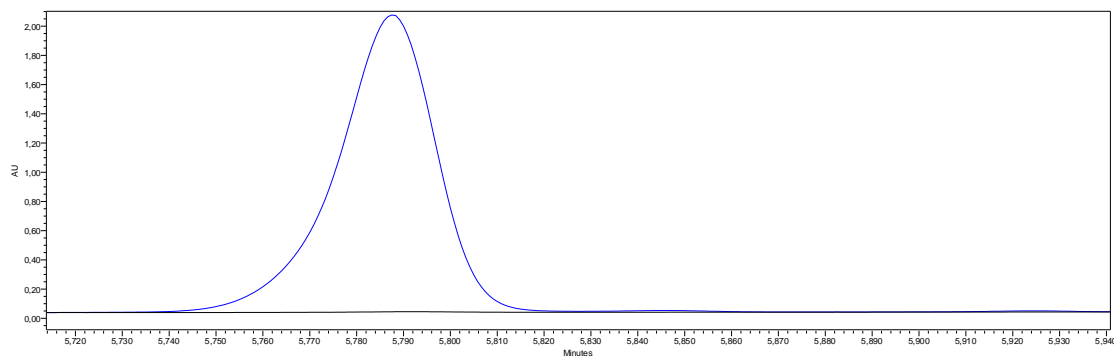


Figura 4.17: Segunda pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

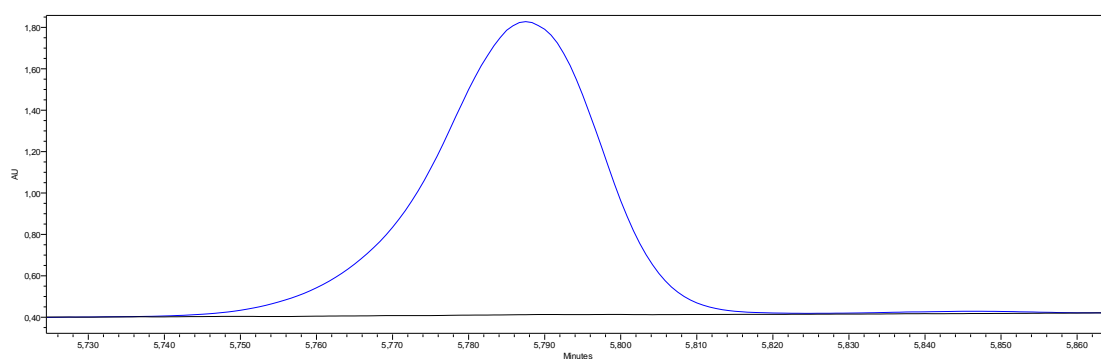


Figura 4.18: Segunda pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

A terceira pré-experiência cujos resultados se apresentam seguidamente foi executada com um novo gradiente (Tabela 4.7 e Figuras 4.19 e 4.20).

Tabela 4.7: Gradiente aplicado na terceira pré-experiência com DBA.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	60	40
3	0	100
6	0	100
7	60	40
8	60	40

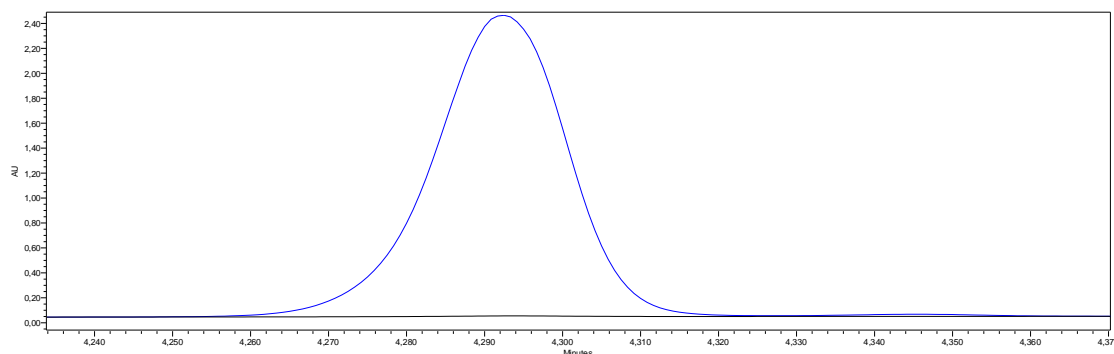


Figura 4.19: Terceira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

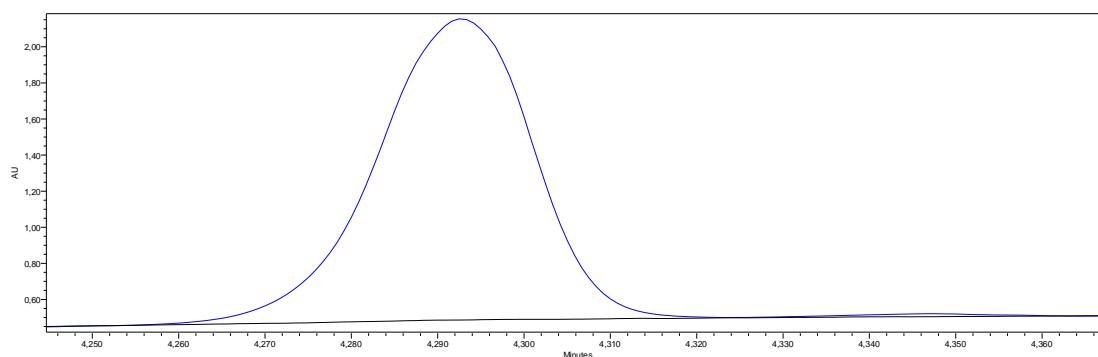


Figura 4.20: Terceira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

Observa-se que, de novo, o pico do MDI possui *fronting* e o melhor resultado é obtido a 254 nm. Por esta razão foram executadas mais algumas pré-experiências que se encontram a seguir descritas e os respectivos cromatogramas no anexo F.

Na quarta pré-experiência foi utilizado o gradiente anterior mas a temperatura da coluna foi alterada de 30 °C para 45 °C.

No que diz respeito à quinta pré-experiência voltou-se para a temperatura da coluna a 30 °C mas foi aplicado outro gradiente (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Gradiente aplicado na quinta pré-experiência do DBA.

Tempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	50	50
3,33	95	5
6,67	95	5
10	50	50
12	50	50

A sexta pré-experiência foi realizada com o gradiente relativo à terceira pré-experiência mas com o fluxo de 0,3 mL/min.

Na sétima pré-experiência aplicou-se igualmente o gradiente utilizado na terceira pré-experiência com um fluxo de 0,25 mL/min e a temperatura da coluna a 40 °C.

A oitava e última pré-experiência foi executada com as mesmas condições que a sétima com a diferença que o fluxo passou para 0,35 mL/min.

Complementando com a análise dos cromatogramas que se encontram no anexo F pode-se concluir que em todas as pré-experiências o pico do MDI apresentou *fronting*, não podendo ser considerados cromatogramas aceitáveis.

Visto que para este método não se conseguiu definir condições de análise cromatográfica que permitissem uma boa detecção do MDI, e por o método de preparação das amostras exigir múltiplas operações experimentais, complexas, morosas e que conduzem a perdas de amostra, optou-se por desprezar este derivatizante.

Em relação aos outros dois derivatizantes, o MAMA e o 1,2 – PP, pode-se afirmar que as experiências com o 1,2 – PP foram aquelas onde se obtiveram melhores resultados. Em todas estas experiências só se conseguiu visualizar o MDI e o Dímero, os outros dois isocianatos, o 2,4 – TDI e o 2,6 – TDI, não se conseguiram detectar provavelmente devido à instabilidade dos compostos resultantes da sua reacção de derivatização.

Resumindo as conclusões retiradas do estudo da eficiência dos diferentes derivatizantes utilizados e escolha do melhor para a continuidade do trabalho, apresentam-se nas Figuras 4.21 e 4.22 os melhores cromatogramas obtidos para a análise dos isocianatos, com os derivatizantes MAMA e 1,2 – PP.

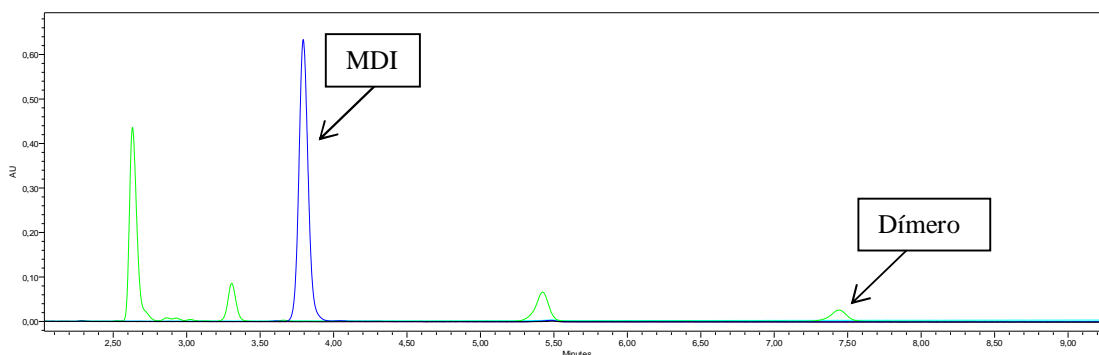


Figura 4.21: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 254 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

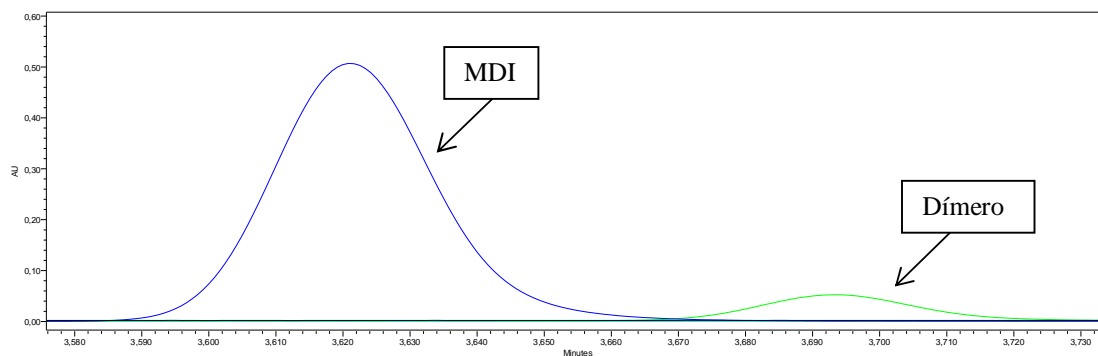


Figura 4.22: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 254 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde.

A análise dos dois cromatogramas acima apresentados permite verificar que a resolução entre os picos do MDI e do Dímero é maior quando se utiliza o MAMA como derivatizante do que quando se utiliza o 1,2 – PP. No entanto, relativamente ao pico do conjugado Dímero – MAMA pode-se observar a existência de vários pequenos picos pouco intensos, cuja identificação não é possível. No que diz respeito às experiências com o 1,2 – PP como derivatizante os picos destes dois isocianatos são bem definidos apesar de não se conseguir uma resolução desejada destes dois picos. Tendo em conta estes factos, conclui-se que a análise dos isocianatos é mais adequada quando se utiliza como derivatizante o 1,2 – PP.

Com base nos resultados obtidos com as pré-experiências realizadas com os três derivatizantes, decidiu-se aplicar o Desenho de Experiências apenas ao 1,2 – PP visto ter sido aquele que permitiu uma melhor separação dos vários isocianatos livres.

## 4.2. Ensaios prévios do desenho de experiências

Antes de ser aplicado efectivamente o desenho de experiências para otimizar o método de análise dos isocianatos foi realizado um estudo para verificar qual a melhor concentração de acetato de amónio no solvente A e o pH mais adequado desta solução.

A fase móvel que se estava a utilizar era constituída pelo solvente A, uma solução de acetato de amónio a 0,1 % em água com pH = 6,0 acertado com ácido acético. Com estes ensaios foram estudadas mais três variantes desta solução, considerando quatro solventes distintos:

- Solvente A1: Acetato de amónio 0,1 % a pH = 6,0;
- Solvente A2: Acetato de amónio 0,01 % a pH = 6,0;
- Solvente A3: Acetato de amónio 0,01 % a pH = 3,5;
- Solvente A4: Acetato de amónio 0,1 % a pH = 3,5.

O outro solvente utilizado foi na mesma o solvente B, acetonitrilo.

Foram preparadas quatro amostras de quatro isocianatos diferentes, MDI, Dímero, 2,6 – TDI e 2,4 – TDI. Como não havia disponível padrão puro de 2,6 – TDI, a amostra referente a este isocianato foi feita a partir de uma solução de T-80; esta solução consiste numa mistura que em teoria apresenta 80 % de 2,6 – TDI e 20 % de 2,4 – TDI. O método de preparação destas amostras é apresentado na Figura 4.23.

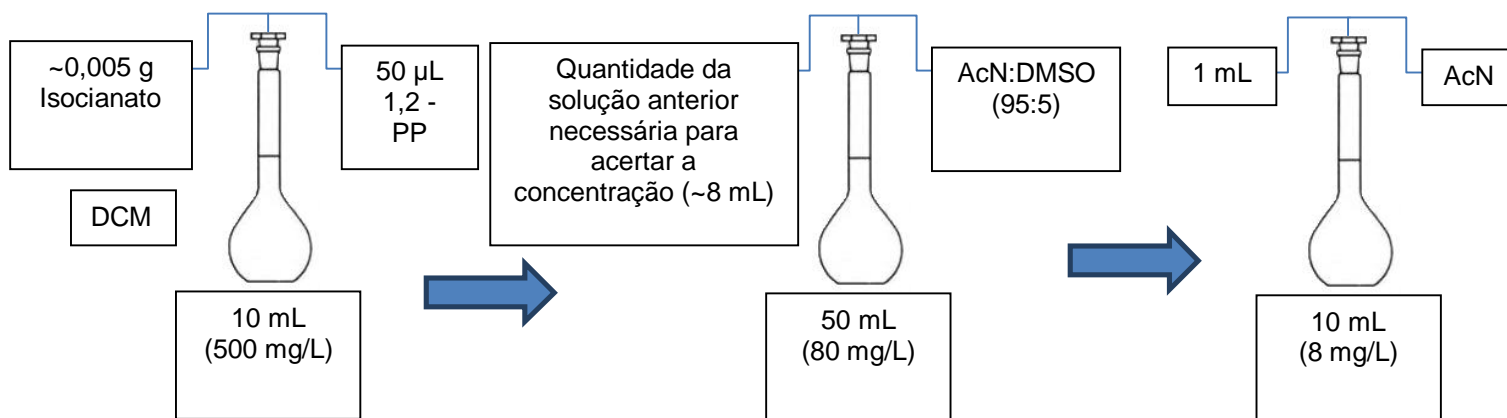


Figura 4.23: Esquema representativo do método de preparação das amostras para a realização da pré-experiência do DOE.

- Agitar;
- Filtrar cerca de 2 mL desta solução por filtro de seringa 2 µm para vial e injectar.

As restantes condições para efectuar a análise destas amostras e consequentemente a identificação dos dois melhores solventes A<sub>i</sub> são as seguintes:

- Fluxo: 0,4 mL/min;
- Temperatura:
  - Amostras: 4 °C;
  - Coluna: 40 °C;
- Detector: PDA – 240 nm e 254 nm;

- Gradiente:

Tabela 4.9: Gradiente aplicado no ensaio prévio do DOE.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	65	35
0,01	65	35
4,69	30	70
5,16	5	95
7,03	5	95
7,05	65	35
10	65	35

Como se pode observar estas condições correspondem à primeira pré-experiência com o derivatizante 1,2 – PP, visto ter sido com esta pré-experiência que se obtiveram os melhores resultados no que diz respeito à separação dos isocianatos.

Após a recolha de todos os dados importantes foi elaborada a tabela seguinte onde são apresentados os valores das áreas correspondentes a cada isocianato analisado a cada comprimento de onda e com cada solvente A<sub>i</sub>.

Tabela 4.10: Resultados das experiências com os quatro solventes, traduzidos pela área dos picos dos cromatogramas.

	MDI	Dímero	2,4 - TDI	2,6 - TDI
<b>240 nm</b>	A3 526887,60	A3 452024,62	A3 663142,33	A4 0,00
	A2 584020,88	A4 561686,91	A2 729409,88	A3 11721,09
	A1 592073,57	A2 600180,14	A4 734800,08	A2 15906,40
	A4 628822,15	A1 609188,36	A1 746526,91	A1 17551,81
<b>254 nm</b>	A3 668462,54	A4 402374,50	A4 477258,97	A3 6818,51
	A4 751498,23	A3 465017,94	A3 517670,90	A4 8032,72
	A2 850738,59	A2 564338,64	A2 693290,26	A2 13936,04
	A1 865191,07	A1 573619,29	A1 709045,52	A1 14816,82

A primeira observação que se pode fazer é que para o MDI o comprimento de onda melhor para o analisar é 254 nm, já no que diz respeito tanto ao Dímero, como ao 2,4 – TDI e 2,6 – TDI o melhor comprimento de onda será a 240 nm, aos quais correspondem os valores mais elevados das áreas, obtidas.

Pode-se verificar também que para todos os isocianatos bem como para os dois comprimentos de onda os dois solventes que deram melhores resultados quanto à área do pico de cada isocianato foram os solventes A1e A2. Com esta observação pode-se concluir que o pH do solvente que compõe a fase móvel é um factor importante, devendo ser um pH ligeiramente ácido, muito próximo do neutro. As excepções a este facto são quando se trata da observação do MDI a um comprimento de onda de 240 nm e do 2,4 – TDI também a este comprimento de



onda. A situação do MDI não é preocupante porque este é observado com uma maximização da resposta a um comprimento de onda de 254 nm; já no que diz respeito ao 2,4 – TDI há que ter maior cuidado, mas como se pode verificar na tabela a diferença da resposta quando aplicado o solvente A4 e quando aplicado o solvente A2 é pouco significativa. Assim sendo, pode-se concluir que para todos os isocianatos os dois melhores solventes são o A1 e o A2. Por esta razão o Desenho de Experiências aplicado teve como um dos factores o solvente tendo este variado em dois níveis, um nível com o solvente A1 e outro nível com o A2.

### 4.3. Desenho de Experiências

O desenho de experiências que foi utilizado para a otimização do método de análise de isocianatos livres é apresentado na Tabela 4.11.

Tabela 4.11: Apresentação do DOE aplicado.

Ordem Padrão	Experiência	Factores		
		Temperatura (°C)	Fluxo (mL/min)	Solvente (% Ac. NH <sub>4</sub> )
		A	B	C
(1)	1,1	-1	-1	-1
	1,2			
	1,3			
a	2,1	1	-1	-1
	2,2			
	2,3			
b	3,1	-1	1	-1
	3,2			
	3,3			
ab	4,1	1	1	-1
	4,2			
	4,3			
c	5,1	-1	-1	1
	5,2			
	5,3			
ac	6,1	1	-1	1
	6,2			
	6,3			
bc	7,1	-1	1	1
	7,2			
	7,3			
abc	8,1	1	1	1
	8,2			
	8,3			

Como se pode verificar este desenho de experiências foi aplicado executando  $8 \times 3 = 24$  experiências. Os factores estudados foram três, a temperatura da coluna em °C, o fluxo da fase móvel em mL/min e a concentração de acetato de amónio utilizada no solvente em % Ac. NH<sub>4</sub>. Estes factores foram estudados a dois níveis, esses níveis são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12: Níveis dos factores estudados.

Factores	Nível -1	Nível 1
Temperatura (°C)	30	40
Fluxo (mL/min)	0,3	0,4
Solvente (% Ac. NH <sub>4</sub> )	0,01	0,1

Para que não houvesse qualquer influência nas respostas de cada experiência, estas experiências foram executadas de forma aleatória. Com a ferramenta do Excel ALEATÓRIO foi devolvido a cada experiência um número de 0 a 1 aleatoriamente. De seguida estes números aleatórios foram ordenados por ordem crescente. A ordem pela qual foram executadas as experiências foi a seguinte:

Tabela 4.13: Ordem de execução das experiências do DOE.

Experiência	Aleatório
4,1	0,05277
6,2	0,05813
1,1	0,12255
8,3	0,13530
1,2	0,16121
3,3	0,19770
4,3	0,19968
8,1	0,22914
7,3	0,24194
2,1	0,28748
6,3	0,37012
7,2	0,37406
1,3	0,39978
5,2	0,55991
3,2	0,57032
8,2	0,58394
3,1	0,59046
2,2	0,62102
6,1	0,63471
7,1	0,65767
5,1	0,79988
5,3	0,89035
4,2	0,93262
2,3	0,93903

No entanto, não foi exactamente por esta ordem que as experiências foram realizadas, dado que o planeamento da *sample set* no *Empower* seria complexo uma vez que para mudar tanto o solvente como o fluxo, os dois em separado ou os dois em conjunto, seria necessário aguardar que o sistema voltasse a estar equilibrado. Com estas mudanças de condições a experiência completa iria demorar muito mais tempo e além disso ir-se-ia gastar muito mais solvente, o que pode ser evitado. Assim, foi feita uma pequena alteração na ordem. Primeiro separam-se todas as experiências que tinham o mesmo nível do factor relativo ao solvente e depois dentro de cada grupo agrupam-se as experiências cujo fluxo iria ser o mesmo. A razão pela qual se separaram primeiro as experiências cujo solvente era o mesmo e só depois o fluxo foi porque o sistema demora mais tempo a voltar a estabilizar quando se muda de solvente, em que o ideal será duas horas, do que quando se muda o fluxo, que demora apenas 10 minutos. Resumindo, a ordem das experiências pela qual foi efectivamente executado o DOE encontra-se na Tabela 4.14.

Tabela 4.14: Ordem das experiências agrupadas por nível de solvente e temperatura.

Solvente + Fluxo
1,1
1,2
2,1
1,3
2,2
2,3
4,1
3,3
4,3
3,2
3,1
4,2
6,2
6,3
5,2
6,1
5,1
5,3
8,3
8,1
7,3
7,2
8,2
7,1

As amostras para executar esta experiência foram preparadas com o mesmo método de preparação que foi utilizado para as amostras da pré-experiência do DOE.

A análise dos resultados do DOE foi realizada de duas formas: uma onde o objectivo era encontrar a melhor combinação de níveis para cada isocianato para a maximização da área. Outra onde o objectivo era conseguir a melhor combinação de níveis para que a resolução entre picos fosse máxima.

#### 4.3.1. Maximização da área

- MDI

Estas experiências foram analisadas com um detector de PDA a dois comprimentos de onda, 240 nm e 254 nm. Um dos objectivos desta experiência é também conseguir perceber qual o melhor comprimento de onda em que, neste caso, o MDI deve ser lido para que tenha uma maximização da área obtida. Para tal foram analisadas as respostas a cada comprimento de onda que se apresentam nas Tabelas 4.15 e 4.16.

Tabela 4.15: Valores da área do MDI nas experiências a um comprimento de onda de 240 nm.

Detector UV-Vis a 240 nm				Respostas			Soma
Exp.	A	B	C	1	2	3	
1	-1	-1	-1	975434	977000	969257	2921691
a	1	-1	-1	942513	949300	916831	2808644
b	-1	1	-1	727264	730143	750639	2208046
ab	1	1	-1	652209	656427	658811	1967447
c	-1	-1	1	981376	979121	981832	2942328
ac	1	-1	1	951502	914703	916879	2783084
bc	-1	1	1	765355	733682	735873	2234911
abc	1	1	1	658581	664083	659615	1982279

Tabela 4.16: Valores da área do MDI nas experiências a um comprimento de onda de 254 nm.

Detector UV-Vis a 254 nm				Respostas			Soma
Exp.	A	B	C	1	2	3	
1	-1	-1	-1	1158609	1151364	1150963	3460935
a	1	-1	-1	1060813	1055479	1076169	3192461
b	-1	1	-1	861751	866549	818431	2546730
ab	1	1	-1	828270	831404	829637	2489311
c	-1	-1	1	1166362	1163986	1168146	3498494
ac	1	-1	1	1076628	1089310	1090145	3256082
bc	-1	1	1	872285	870533	874780	2617598
abc	1	1	1	837155	830967	836409	2504531

Nas tabelas anteriores é visível que o melhor comprimento de onda para analisar o MDI é a 254 nm. Isto é, analisando experiência a experiência verifica-se que aquele que tem um maior valor da soma das respostas é 254 nm.

Tendo em conta esta observação a restante análise vai ser aplicada apenas aos resultados que dizem respeito a 254 nm; os resultados obtidos a 240 nm encontram-se no anexo G.

O primeiro passo para a obtenção da combinação dos melhores níveis para a análise do MDI é a elaboração de uma ANOVA e da correspondente ANOVA condensada para a identificação dos factores significativos.

Tabela 4.17: ANOVA para o MDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	19344542869	1	19344542869	168,8449	Significativo
B	440050732872	1	440050732872	3840,8926	Significativo
AB	4827998157	1	4827998157	42,1402	Significativo
C	1461216311	1	1461216311	12,7539	Significativo
AC	36468936	1	36468936	0,3183	
BC	9489975	1	9489975	0,0828	
ABC	278197356	1	278197356	2,4282	
Erro	1833118626	16	114569914		
Total	467841765103	23			

<b>F (0,05;1;16)</b>	4,4940
----------------------	--------

Tabela 4.18: ANOVA condensada para o MDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	19344542869	1	19344542869	170,3753	Significativo
B	440050732872	1	440050732872	3875,7063	Significativo
AB	4827998157	1	4827998157	42,5221	Significativo
C	1461216311	1	1461216311	12,8695	Significativo
Erro	2157274894	19	113540784		
Total	467841765103	23			

<b>F (0,05;1;19)</b>	4,3807
----------------------	--------

Pela ANOVA condensada chega-se à conclusão que os factores significativos para a análise do MDI a um comprimento de onda de 254 nm são: o factor A, o B, o C e a interacção entre os factores A e B. Fazendo agora a soma de todas as respostas que correspondem a cada nível de cada factor obtém-se os valores indicados na Tabela 4.19.

Tabela 4.19: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o MDI a 254 nm.

<b>A-</b>	12123756
<b>A+</b>	11442384
<b>B-</b>	13407971
<b>B+</b>	10158169
<b>A-B-</b>	6959429
<b>A-B+</b>	5164328
<b>A+B-</b>	6448543
<b>A+B+</b>	4993841
<b>C-</b>	11689436
<b>C+</b>	11876704

A selecção do melhor nível é feita escolhendo aquele que tem um valor superior de resposta.

Neste caso, como o factor A e o factor B são significativos e a sua interacção também o que prevalece é sempre a interacção. No entanto, pela observação da tabela anterior pode-se verificar que não existe conflito, ou seja, tanto o factor A como o factor B quando analisados em separado o melhor nível é igual a quando analisada a interacção. Assim para este caso, a melhor combinação de níveis é a seguinte.

Tabela 4.20: Melhor combinação de níveis para o MDI a 254 nm.

<b>Melhores Níveis</b>	<b>Nível</b>
A	-1
B	-1
C	1

Em mais detalhe, a melhor combinação de níveis para a análise do MDI a um comprimento de onda de 254 nm é:

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Para a realização da análise dos resíduos relativos a este caso, foram verificados os pressupostos subjacentes à ANOVA através das seguintes representações gráficas: verificação da normalidade (Figura 4.24), gráfico de resíduos e ordem das experiências (Figura 4.25) e o gráfico dos resíduos e os valores previstos ou estimados (Figura 4.26).

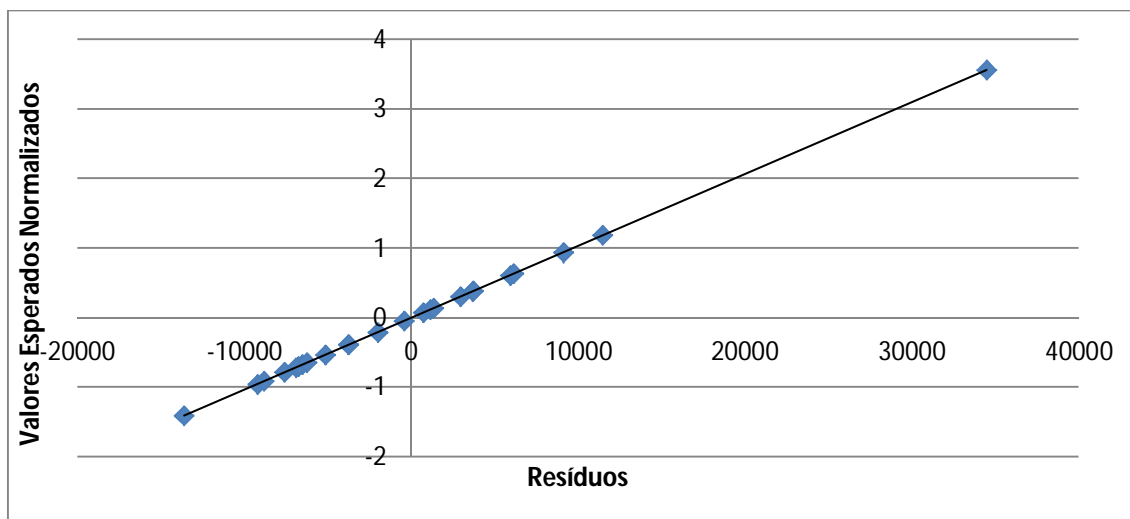


Figura 4.24: Verificação da Normalidade para o MDI a 254 nm. Gráfico de probabilidade da distribuição normal.

O gráfico anterior indica que o pressuposto da normalidade é razoavelmente satisfeito, visto que, os resíduos se dispõem aproximadamente em linha recta.

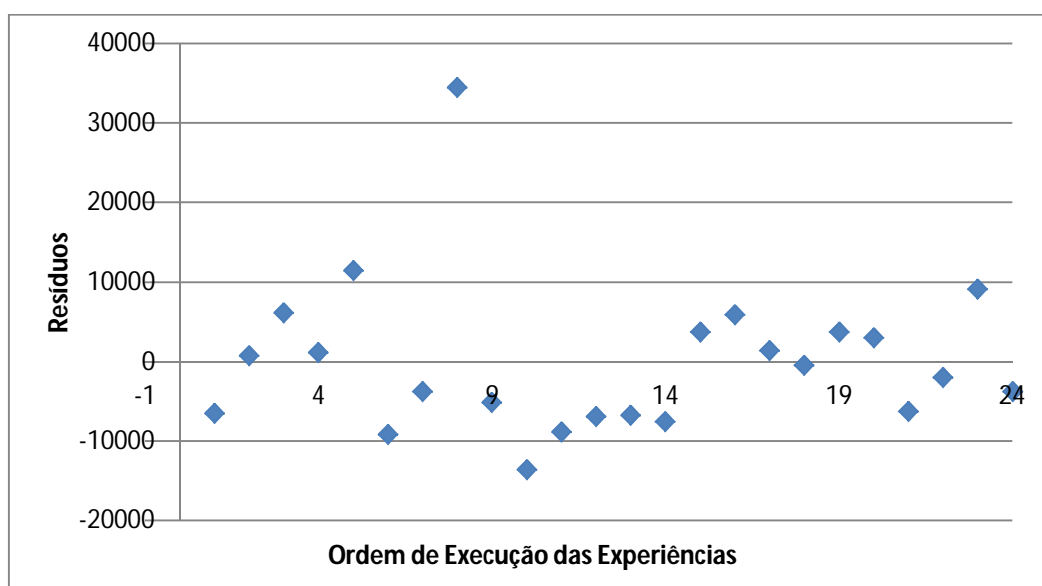


Figura 4.25: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

Pela observação do gráfico anterior pode-se concluir que a hipótese de independência é razoavelmente satisfeita uma vez que os resíduos dispõem-se no gráfico de forma aleatória, sem demonstrarem qualquer tendência especial.

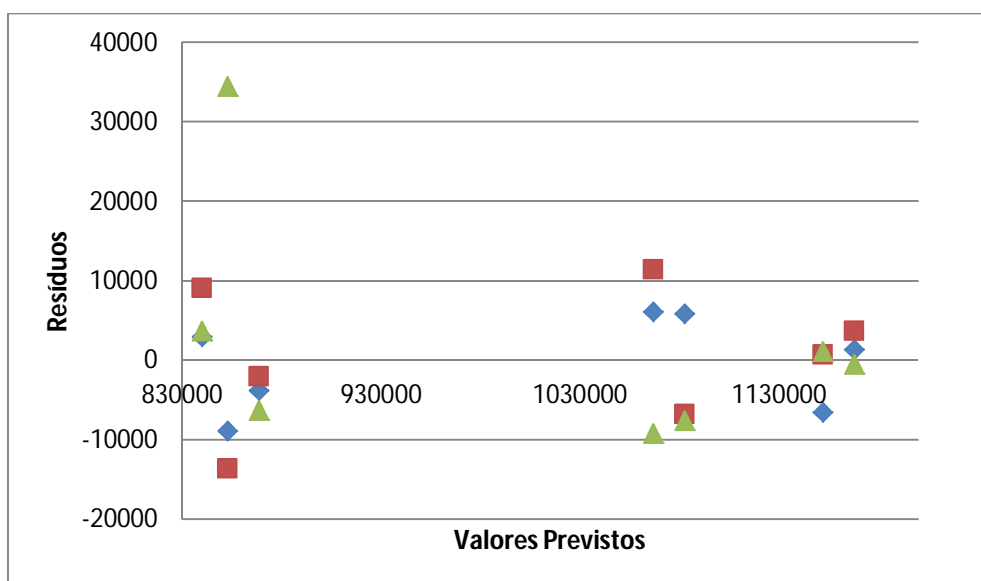


Figura 4.26: Variância das experiências do MDI a 254 nm. Valores previstos vs. resíduos.

O gráfico anterior parece indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância, visto que apresenta uma estrutura especial.

- **Dímero**

O primeiro objectivo destas experiências, como já foi referido para a experiência do MDI, é saber qual dos dois comprimentos de onda utilizados no detector PDA é o melhor para que a resposta do detector ao Dímero seja optimizada. Utilizou-se o procedimento previamente indicado para o MDI e os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 4.21 e 4.22.

Tabela 4.21: Valores da área do Dímero nas experiências a 240 nm.

Detector UV-Vis a 240 nm				Respostas			Soma
Exp.	A	B	C	1	2	3	
1	-1	-1	-1	650289	651333	646171	1947794
a	1	-1	-1	686659	684662	725101	2096422
b	-1	1	-1	484843	486762	466435	1438040
ab	1	1	-1	570103	566933	569339	1706375
c	-1	-1	1	654251	652747	654555	1961552
ac	1	-1	1	697512	730893	728146	2156551
bc	-1	1	1	463831	489122	490582	1443535
abc	1	1	1	572315	567133	571471	1710919



Tabela 4.22: Valores da área do Dímero nas experiências a 254 nm.

Detector UV-Vis a 254 nm				Respostas			
Exp.	A	B	C	1	2	3	Soma
1	-1	-1	-1	772406	767576	767308	2307290
a	1	-1	-1	887713	893000	874159	2654871
b	-1	1	-1	574500	577699	625191	1777391
ab	1	1	-1	612087	638430	625655	1876172
c	-1	-1	1	777575	775991	778764	2332329
ac	1	-1	1	887798	871208	871302	2630308
bc	-1	1	1	581523	580355	583187	1745065
abc	1	1	1	624901	630469	624778	1880147

A observação das tabelas anteriores permite verificar que para o Dímero o melhor comprimento de onda para a sua análise é 254 nm, pois comparando a soma das respostas das várias experiências aquelas que são maiores são as que correspondem a um comprimento de onda de 254 nm.

Assim sendo, a restante análise vai ser aplicada apenas aos resultados que dizem respeito a um comprimento de onda de 254 nm; os resultados a 240 nm encontram-se no anexo H.

O primeiro passo para a obtenção da combinação dos melhores níveis para a análise do Dímero é a elaboração de uma ANOVA e da correspondente ANOVA condensada para a identificação dos factores significativos.

Tabela 4.23: ANOVA para o Dímero a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	32224286592	1	32224286592	217,0271	Significativo
B	291726637673	1	291726637673	1964,7471	Significativo
AB	7062257200	1	7062257200	47,5635	Significativo
C	32374954	1	32374954	0,2180	
AC	7371858	1	7371858	0,0496	
BC	34620747	1	34620747	0,2332	
ABC	307474040	1	307474040	2,0708	
Erro	2375688006	16	148480500		
Total	333770711068	23			

<b>F(0,05;1;16)</b>	4,4940
---------------------	--------

Tabela 4.24: ANOVA condensada para o Dímero a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	32224286592	1	32224286592	233,7	Significativo
B	291726637673	1	291726637673	2115,9	Significativo
AB	7062257200	1	7062257200	51,2	Significativo
Erro	2757529604	20	137876480		
Total	333770711068	23			

<b>F(0,05;1;20)</b>	4,3512
---------------------	--------

Pela ANOVA condensada chega-se à conclusão que os factores significativos para a análise do Dímero a um comprimento de onda de 254 nm são: o factor A, o B e a interacção entre os factores A e B. Fazendo agora a soma de todas as respostas que correspondem a cada nível de cada factor obtêm-se os valores indicados na Tabela 4.25.

Tabela 4.25: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o Dímero a 254 nm.

<b>A-</b>	8162075
<b>A+</b>	9041497
<b>B-</b>	9924798
<b>B+</b>	7278774
<b>A-B-</b>	4639619
<b>A-B+</b>	3522456
<b>A+B-</b>	5285179
<b>A+B+</b>	3756319

A escolha do melhor nível é feita escolhendo aquele que tem um valor superior de resposta.

Neste caso, como o factor A e o factor B são significativos e a sua interacção também, o que prevalece é sempre a interacção. No entanto, pela observação da tabela anterior pode-se verificar que não existe conflito, ou seja, tanto para o factor A como para o factor B quando analisados em separado o melhor nível é igual a quando analisada a interacção. Sabe-se ainda que como o factor C não é significativo nem nenhuma interacção que o inclua, considera-se que o melhor nível para este factor é aquele tido como o mais económico. Assim para este caso, a melhor combinação de níveis é a seguinte:

Tabela 4.26: Melhor combinação de níveis para o Dímero a 254 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	1
B	-1
C	Mais económico

Para o factor C o nível que é considerado mais económico é o nível -1, pois como este factor é a quantidade de acetato de amónio utilizada no solvente A o mais económico é utilizar uma quantidade mais pequena do mesmo.

Detalhando, a melhor combinação de níveis para a análise do Dímero a um comprimento de onda de 254 nm é:

- Temperatura da Coluna: 40 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,01 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Para a realização da análise dos resíduos relativos a este caso, é necessário incluir três aspectos importantes, a verificação da normalidade, gráfico de resíduos e ordem das experiências e o gráfico dos resíduos e os valores previstos ou estimados.

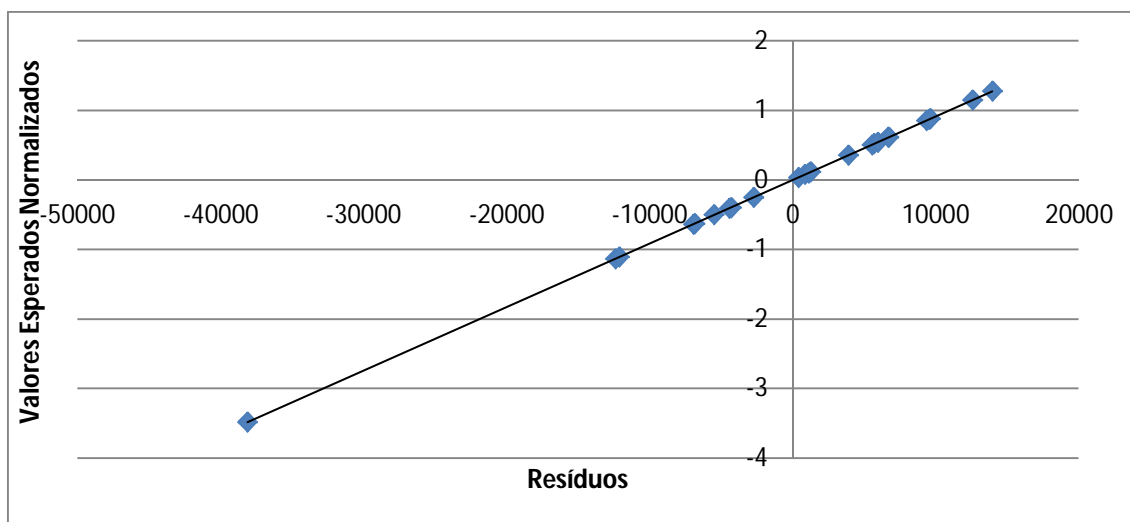


Figura 4.27: Verificação da Normalidade para o Dímero a 254 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.

O gráfico anterior indica que o pressuposto da normalidade é razoavelmente satisfeito, visto que, os resíduos se dispõem aproximadamente em linha recta.

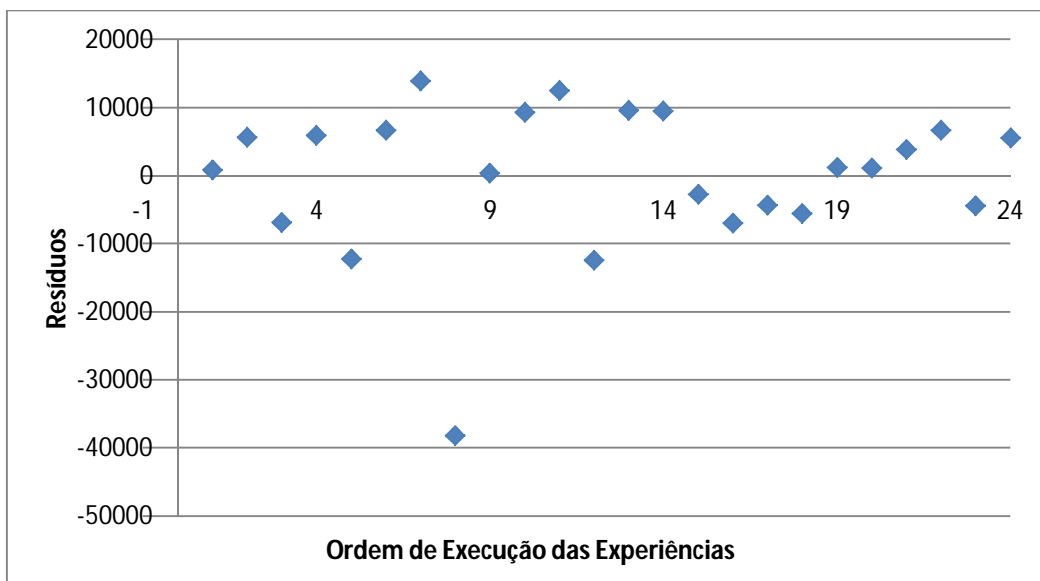


Figura 4.28: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

Pela observação do gráfico anterior pode-se concluir que a hipótese de independência é razoavelmente satisfeita uma vez que os resíduos dispõem-se no gráfico de forma aleatória, sem demonstrarem qualquer tendência especial.

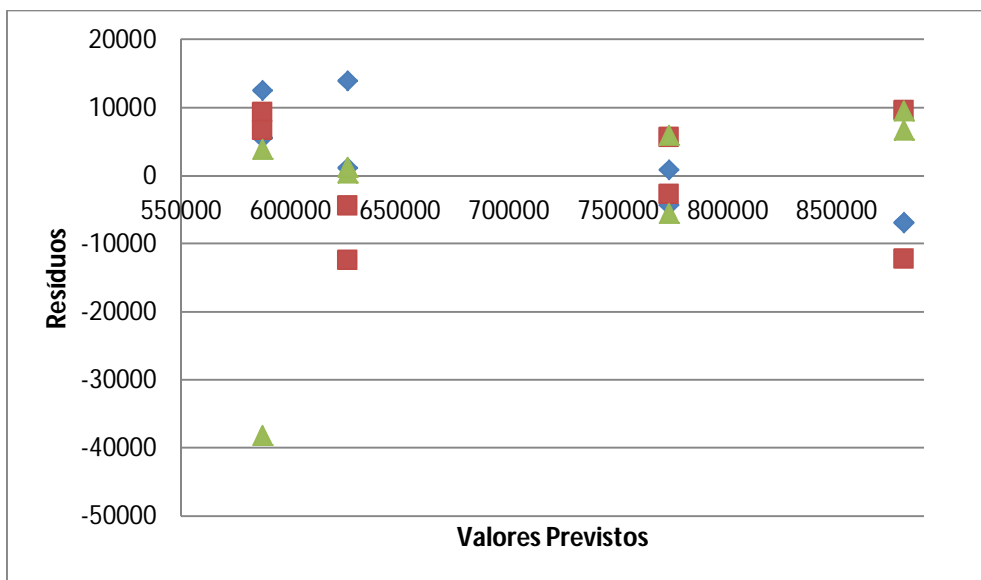


Figura 4.29: Variância das experiências do Dímero a 254 nm. Valores previstos vs. resíduos.

O gráfico anterior parece indicar uma violação do pressuposto da homogeneidade da variância, visto que apresenta uma estrutura tipo funil.

- **2,4 – TDI**

De forma idêntica à efectuada anteriormente recorre-se aos resultados das áreas do pico do 2,4 - TDI obtidas nos ensaios cromatográficos indicados nas Tabelas 4.27 e 4.28.

Tabela 4.27: Valores da área do 2,4 – TDI nas experiências a 240 nm.

Detector UV-Vis a 240 nm				Respostas			
Exp.	A	B	C	1	2	3	Soma
<b>1</b>	-1	-1	-1	4513670	4522689	4502456	13538814
<b>a</b>	1	-1	-1	4495047	4509529	4486964	13491540
<b>b</b>	-1	1	-1	3373708	3384527	3384071	10142306
<b>ab</b>	1	1	-1	3377115	3384068	3383109	10144292
<b>c</b>	-1	-1	1	4613640	4603758	4612637	13830034
<b>ac</b>	1	-1	1	4601103	4592920	4590992	13785015
<b>bc</b>	-1	1	1	3453850	3454082	3458858	10366789
<b>abc</b>	1	1	1	3446738	3442698	3444175	10333610

Tabela 4.28: Valores da área do 2,4 – TDI nas experiências a 254 nm.

Detector UV-Vis a 254 nm				Respostas			
Exp.	A	B	C	1	2	3	Soma
<b>1</b>	-1	-1	-1	4317326	4328773	4309576	12955674
<b>a</b>	1	-1	-1	4300118	4312736	4297435	12910288
<b>b</b>	-1	1	-1	3218104	3233299	3227940	9679343
<b>ab</b>	1	1	-1	3219841	3223688	3226800	9670328
<b>c</b>	-1	-1	1	4407953	4399714	4408449	13216116
<b>ac</b>	1	-1	1	4396131	4388398	4386837	13171366
<b>bc</b>	-1	1	1	3283772	3289326	3292344	9865442
<b>abc</b>	1	1	1	3282461	3277514	3276383	9836358

Pela observação das tabelas anteriores pode-se verificar que para o 2,4 – TDI o melhor comprimento de onda para a sua análise é 240 nm.

Assim sendo, a restante análise vai ser executada apenas aos resultados que dizem respeito a um comprimento de onda de 240 nm; os resultados a 254 nm encontram-se no anexo I.

Tabela 4.29: ANOVA para o 2,4 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	635371487	1	635371487	14,2915	Significativo
B	7773002838302	1	7773002838302	174839,6847	Significativo
AB	155552963	1	155552963	3,4989	
C	41541385980	1	41541385980	934,3986	Significativo
AC	45126466	1	45126466	1,0150	
BC	1216857848	1	1216857848	27,3710	Significativo
ABC	58345576	1	58345576	1,3124	
Erro	711326182	16	44457886		
Total	7817366804803	23			

<b>F(0,05;1;16)</b>	4,4940
---------------------	--------

Tabela 4.30: ANOVA condensada para o 2,4 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	635371487	1	635371487	12,4409	Significativo
B	7773002838302	1	7773002838302	152199,5912	Significativo
C	41541385980	1	41541385980	813,4028	Significativo
BC	1216857848	1	1216857848	23,8267	Significativo
Erro	970351187	19	51071115		
Total	7817366804803	23			

<b>F(0,05;1;19)</b>	4,3807
---------------------	--------

Pela ANOVA condensada chega-se à conclusão que os factores significativos para a análise do 2,4 – TDI a um comprimento de onda de 240 nm são: o factor A, o B, o C e a interacção entre os factores B e C. Realizando a soma de todas as respostas que correspondem a cada nível de cada factor obtém-se a tabela seguinte.

Tabela 4.31: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o 2,4 – TDI a 240 nm.

<b>A-</b>	47877942
<b>A+</b>	47754455
<b>B-</b>	54645402
<b>B+</b>	40986995
<b>C-</b>	47316951
<b>C+</b>	48315446
<b>B-C-</b>	27030354
<b>B-C+</b>	27615048
<b>B+C-</b>	20286597
<b>B+C+</b>	20700398

Neste caso, como o factor B e o factor C são significativos e a sua interação também, o que prevalece é sempre a interação. No entanto, pela observação da tabela anterior pode-se verificar que não existe conflito, ou seja, tanto para o factor B como para o factor C quando analisados em separado o melhor nível é igual a quando analisada a interação. Assim para este caso, a melhor combinação de níveis é a seguinte:

Tabela 4.32: Melhor combinação de níveis para o 2,4 – TDI a 240 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	-1
B	-1
C	1

Detalhando, a melhor combinação de níveis para a análise do 2,4 – TDI a um comprimento de onda de 240 nm é:

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Para a realização da análise dos resíduos relativos a este caso, é igualmente necessário incluir a verificação da normalidade, gráfico de resíduos e ordem das experiências e o gráfico dos resíduos e os valores previstos ou estimados.

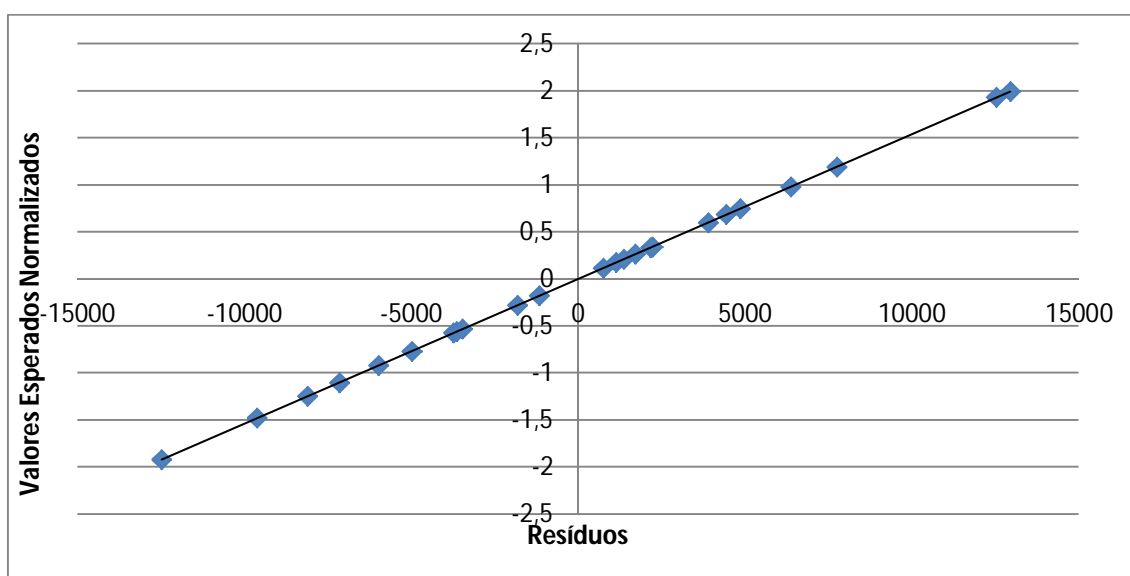


Figura 4.30: Verificação da Normalidade para o 2,4 - TDI a 240 nm. Gráfico de probabilidade da distribuição normal.

O gráfico anterior indica que o pressuposto da normalidade é razoavelmente satisfeito, visto que, os resíduos se dispõem aproximadamente em linha recta.

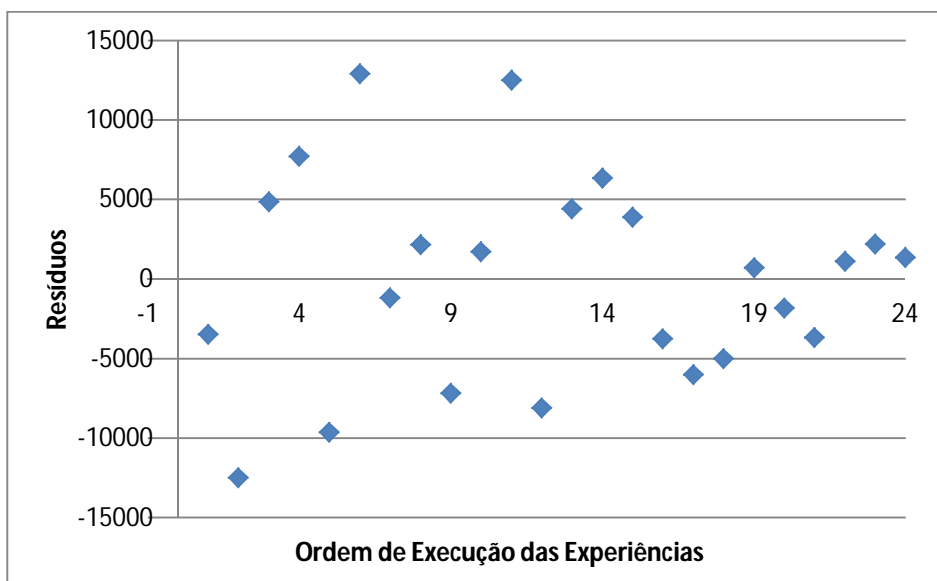


Figura 4.31: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

Pela observação do gráfico anterior pode-se concluir que a hipótese de independência é razoavelmente satisfeita uma vez que os resíduos dispõem-se no gráfico de forma aleatória, sem demonstrarem qualquer tendência especial.

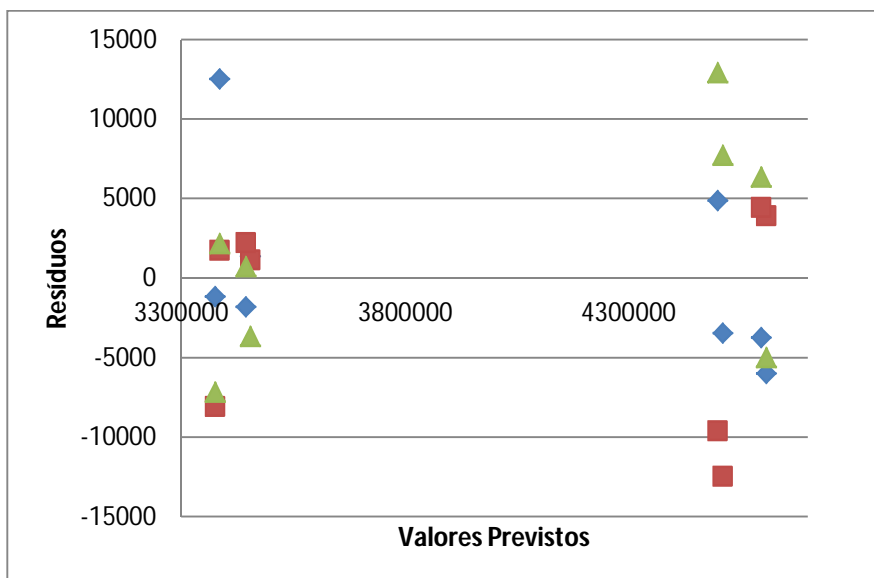


Figura 4.32: Variância das experiências do 2,4 - TDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.



O gráfico anterior parece não indicar uma forte violação do pressuposto da homogeneidade da variância, visto que não apresenta qualquer estrutura especial.

- **2,6 – TDI**

Para se proceder à identificação de qual o melhor comprimento de onda para o 2,6 - TDI, recorre-se aos resultados que são apresentados nas Tabelas 4.33 e 4.34.

Tabela 4.33: Valores da área do 2,6 – TDI nas experiências a 240 nm.

Detector UV-Vis a 240 nm				Respostas			
Exp.	A	B	C	1	2	3	Soma
1	-1	-1	-1	955363	956056	961789	2873207
a	1	-1	-1	964051	965921	943387	2873359
b	-1	1	-1	721916	717805	721036	2160756
ab	1	1	-1	722704	721636	723888	2168227
c	-1	-1	1	1006489	1004554	1004636	3015679
ac	1	-1	1	1004989	1004476	1004450	3013914
bc	-1	1	1	744180	738828	751788	2234796
abc	1	1	1	750909	750530	748874	2250312

Tabela 4.34: Valores da área do 2,6 – TDI nas experiências a 254 nm.

Detector UV-Vis a 254 nm				Respostas			
Exp.	A	B	C	1	2	3	Soma
1	-1	-1	-1	836427	836401	833498	2506326
a	1	-1	-1	825700	824992	828343	2479035
b	-1	1	-1	623270	624914	623333	1871517
ab	1	1	-1	623983	623960	624457	1872399
c	-1	-1	1	868566	866084	866925	2601574
ac	1	-1	1	867661	868076	867377	2603113
bc	-1	1	1	641175	633894	646707	1921776
abc	1	1	1	646762	644491	645756	1937008

Pela observação das tabelas anteriores pode-se verificar que para o 2,6 – TDI o melhor comprimento de onda para a sua análise é 240 nm.

Assim sendo, a restante análise vai ser executada apenas aos resultados que dizem respeito a um comprimento de onda de 240 nm, os resultados a 254 nm encontram-se no anexo J.

Tabela 4.35: ANOVA para o 2,6 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	19032657	1	19032657	0,6932	
B	365577074946	1	365577074946	13314,4613	Significativo
AB	25213975	1	25213975	0,9183	
C	8035621594	1	8035621594	292,6605	Significativo
AC	1564938	1	1564938	0,0570	
BC	671010188	1	671010188	24,4385	Significativo
ABC	4134645	1	4134645	0,1506	
Erro	439314296	16	27457144		
Total	374772967238	23			

<b>F(0,05;1;16)</b>	4,4940
---------------------	--------

Tabela 4.36: ANOVA condensada para o 2,6 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
B	365577074946	1	365577074946	14944,0663	Significativo
C	8035621594	1	8035621594	328,4803	Significativo
BC	671010188	1	671010188	27,4296	Significativo
Erro	489260511	20	24463026		
Total	374772967238	23			

<b>F(0,05;1;20)</b>	4,3512
---------------------	--------

Pela ANOVA condensada chega-se à conclusão que os factores significativos para a análise do 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 240 nm são: o factor B, o C e a interacção entre os factores B e C. Fazendo agora a soma de todas as respostas que correspondem a cada nível de cada factor obtém-se a Tabela 4.37.

Tabela 4.37: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o 2,6 – TDI a 240 nm.

<b>B-</b>	11776159
<b>B+</b>	8814090
<b>C-</b>	10075548
<b>C+</b>	10514701
<b>B-C-</b>	5746566
<b>B-C+</b>	6029593
<b>B+C-</b>	4328983
<b>B+C+</b>	4485108

A selecção do melhor nível é feita escolhendo aquele que tem um valor superior de resposta.

Neste caso, como o factor B e o factor C são significativos e a sua interacção também, o que prevalece é sempre a interacção. No entanto, pela observação da tabela anterior pode-se verificar que não existe conflito, ou seja, tanto para o factor B como para o factor C quando analisados em separado o melhor nível é igual a quando analisada a interacção. Sabe-se ainda que como o factor A não é significativo nem nenhuma interacção que o inclua, considera-se que o melhor nível para este factor é aquele que se considera como o mais económico. Assim para este caso, a melhor combinação de níveis é a seguinte.

Tabela 4.38: Melhor combinação de níveis para o 2,6 – TDI a 240 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	mais económico
B	-1
C	1

Para o factor A o nível que é considerado o mais económico é o nível -1, pois como este factor é a temperatura da coluna e o mais económico é utilizar uma temperatura mais baixa.

Em mais detalhe, a melhor combinação de níveis para a análise do 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 240 nm é:

- o Temperatura da Coluna: 30 °C;
- o Fluxo: 0,3 mL/min;
- o Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Para a realização da análise dos resíduos relativos a este caso, é necessário incluir três aspectos importantes, a verificação da normalidade, gráfico de resíduos e ordem das experiências e o gráfico dos resíduos e os valores previstos ou estimados.

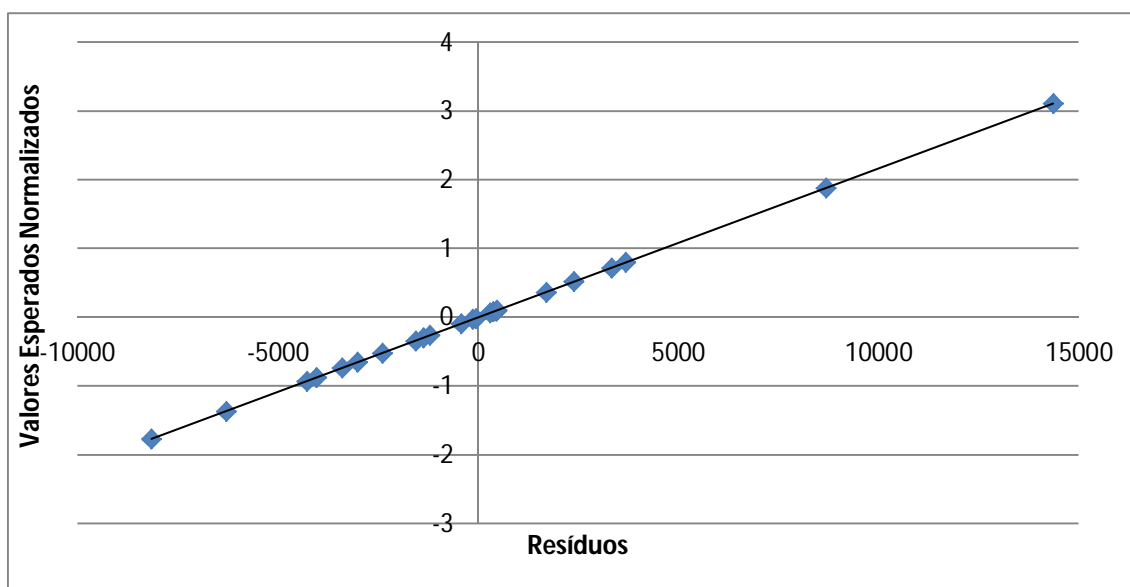


Figura 4.33: Verificação da Normalidade para o 2,6 - TDI a 240 nm. Gráfico de probabilidade da distribuição normal.

O gráfico anterior indica que o pressuposto da normalidade é razoavelmente satisfeito, visto que, os resíduos se dispõem aproximadamente em linha recta.

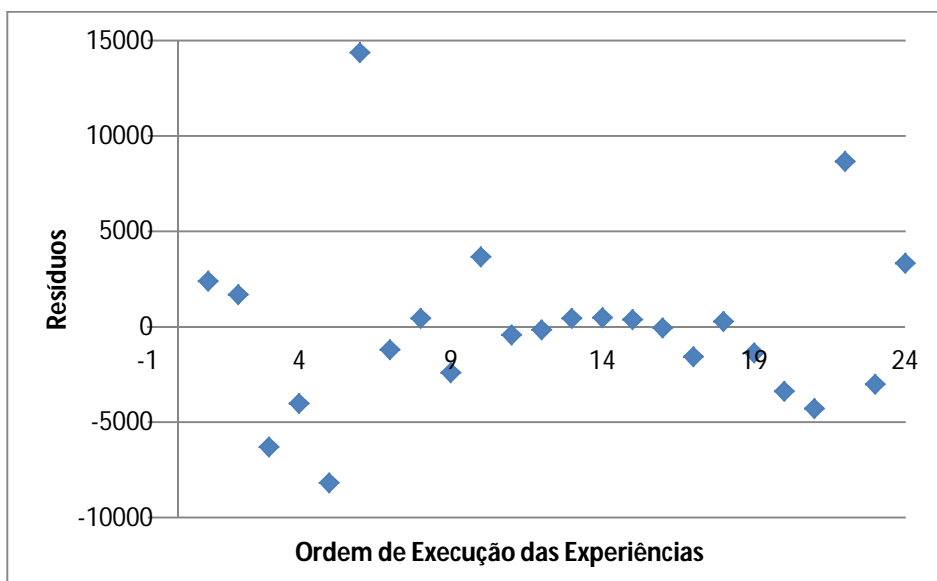


Figura 4.34: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

Pela observação do gráfico anterior pode-se concluir que a hipótese de independência é razoavelmente satisfeita uma vez que os resíduos dispõem-se no gráfico de forma aleatória, sem demonstrarem qualquer tendência especial.

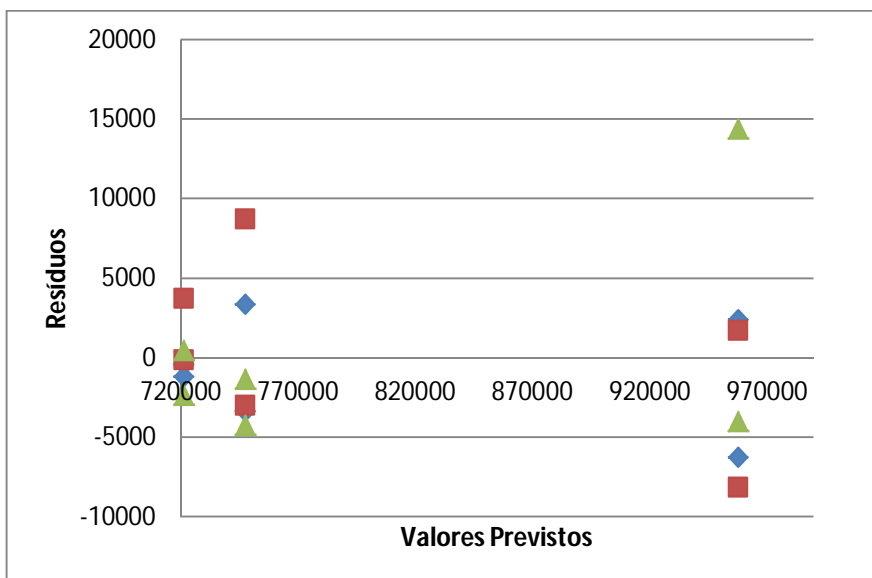


Figura 4.35: Variância das experiências do 2,6 - TDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.

O gráfico anterior parece não indicar uma forte violação do pressuposto da homogeneidade da variância, visto que não apresenta qualquer estrutura especial.

Para se aplicar estes resultados a amostras reais tem-se de fazer uma avaliação mais cuidada. Isto porque, como é sabido existem materiais que se encontram em contacto com alimentos de dois tipos: uns à base de MDI e outros à base de TDIs. Quando se quer analisar materiais que tenham por base o MDI é aplicado a combinação de níveis seguinte.

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Quando se pretende analisar materiais que tenham por base TDIs, tendo em conta que estes materiais podem ter na sua constituição tanto Dímero como 2,4 – TDI e 2,6 – TDI, pelos resultados do DOE existem diferentes combinações de níveis para a maximização de cada um. Isto é, existem duas combinações possíveis: uma para a maximização do 2,4 – TDI e do 2,6 – TDI e outra diferente para a maximização do Dímero. Assim, tem que ser feita uma análise mais pormenorizada para se chegar a uma única combinação de níveis para analisar este tipo de materiais.

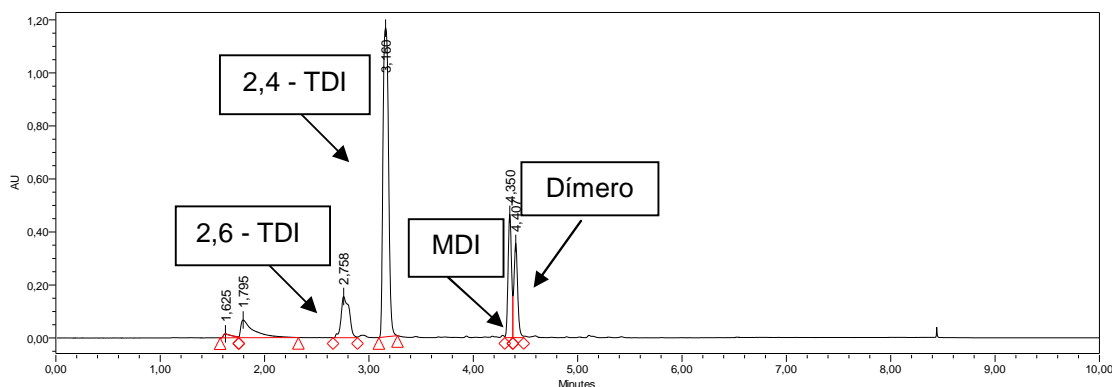


Figura 4.36: Cromatograma de uma experiência aplicada no DOE.

Através da observação, por exemplo, do cromatograma acima pode-se verificar que se deve dar especial importância à resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o do 2,6 – TDI, isto porque, são os dois picos que, em materiais em contacto com alimentos com base em TDI, têm uma resolução menor. Assim sendo, para se escolher qual das duas combinações é aquela que não afecta a resolução entre os dois picos é calculada para cada uma das experiências a resolução entre os picos a um comprimento de onda de 240 nm, visto que é a este comprimento de onda que se obtém a maximização tanto de um pico como do outro. E por fim, é escolhida a experiência que tiver a maior resolução.

A resolução entre os picos é calculada segundo a Equação 4.1.

$$R_s = \frac{2(t_{rB} - t_{rA})}{W_A + W_B}$$

Equação 4.1: Resolução.

Onde A corresponde ao pico que elui mais cedo, B corresponde ao pico que elui mais tarde,  $t_{rB}$  é o tempo de retenção do pico B,  $t_{rA}$  é o tempo de retenção do pico A,  $W_A$  é a largura do pico A e  $W_B$  é a largura do pico B. Todos estes valores são dados que o *software* EMPOWER dá quando faz a integração da área dos picos obtidos.

Assim, em primeiro lugar tem-se a combinação de níveis que deu como sendo a melhor para a análise do Dímero.

- Temperatura da Coluna: 40 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,01 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Ora esta combinação de níveis corresponde à experiência seguinte.

Tabela 4.39: Experiência que corresponde à melhor combinação de níveis para o Dímero.

Exp.	A	B	C
a	1	-1	-1

A resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI para cada réplica desta experiência encontra-se na tabela seguinte.

Tabela 4.40: Valores da resolução entre o pico do 2,4 - TDI e do 2,6 - TDI para a experiência a.

1	2	3
2,0058	2,0000	2,0593

Em segundo lugar, a melhor combinação de níveis para analisar tanto o 2,4 – TDI como o 2,6 – TDI é:

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Esta combinação corresponde à seguinte experiência.

Tabela 4.41: Experiência que corresponde à melhor combinação de níveis para o 2,4 - TDI e o 2,6 - TDI.

Exp.	A	B	C
c	-1	-1	1

Para esta experiência cada réplica tem os seguintes valores no que respeita à resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI.

Tabela 4.42: Valores da resolução entre o pico do 2,4 - TDI e do 2,6 - TDI para a experiência c.

1	2	3
2,3114	2,3420	2,3004

Como se pode observar pelas Tabelas 4.41 e 4.42 a segunda tabela é aquela que apresenta valores de resolução superiores. Assim, pode-se concluir que a melhor combinação de níveis para analisar materiais em contacto com alimentos cuja base é de TDI é:

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Em suma, tanto para materiais que têm como base o MDI como o TDI a melhor combinação de níveis é a mesma. A única diferença entre a análise destes dois tipos de materiais é que quando se analisa o MDI ou o Dímero dever-se-á utilizar o detector PDA a 254 nm, quando se analisa o 2,4 – TDI ou o 2,6 – TDI dever-se-á utilizar o detector PDA a 240 nm.

#### 4.3.2. Maximização da resolução

Visto que em muitas das experiências não se conseguiu separar todos os isocianatos de uma forma satisfatória, resolveu-se estudar também a resolução entre os picos. Assim neste subcapítulo o objectivo é chegar à melhor combinação de níveis para cada conjunto de dois picos adjacentes para que a resolução entre eles seja máxima.

- **2,4 – TDI e 2,6 – TDI**

Estas experiências foram na mesma analisadas com um detector de PDA a dois comprimentos de onda, um a 240 nm e outro a 254 nm. Um dos objectivos desta experiência é também conseguir perceber qual o melhor comprimento de onda onde a resolução entre, neste caso, o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI é máxima. Para tal foram analisadas as respostas a cada comprimento de onda que se apresentam nas Tabelas 4.43 e 4.44.

Tabela 4.43: Valores da resolução entre o 2,4 – TDI e o 2,6 – TDI nas experiências a 240 nm.

Detector UV-Vis a 240 nm				Respostas			
Exp.	A	B	C	1	2	3	Soma
1	-1	-1	-1	3,3915	3,4091	3,5397	10,3404
a	1	-1	-1	1,9474	1,9382	2,1732	6,0589
b	-1	1	-1	1,8532	1,8511	1,8973	5,6017
ab	1	1	-1	2,0281	2,0343	2,0734	6,1358
c	-1	-1	1	2,2989	2,2892	2,3131	6,9011
ac	1	-1	1	2,2180	2,0364	2,0433	6,2977
bc	-1	1	1	2,0923	2,1383	1,8169	6,0475
abc	1	1	1	2,2171	2,1026	2,1767	6,4964

Tabela 4.44: Valores da resolução entre o 2,4 – TDI e o 2,6 – TDI nas experiências a 254 nm.

Detector UV-Vis a 254 nm				Respostas			
Exp.	A	B	C	1	2	3	Soma
1	-1	-1	-1	2,2600	2,2644	2,2965	6,8210
a	1	-1	-1	2,0058	2,0000	2,0593	6,0651
b	-1	1	-1	1,9471	1,8608	2,0811	5,8890
ab	1	1	-1	2,0827	2,1096	2,1330	6,3254
c	-1	-1	1	2,3114	2,3420	2,3004	6,9538
ac	1	-1	1	2,2204	2,0675	2,0764	6,3642
bc	-1	1	1	2,0894	1,9712	1,9282	5,9888
abc	1	1	1	2,2379	2,1401	2,2227	6,6006

Nas tabelas anteriores é visível que o melhor comprimento de onda para analisar a resolução entre estes dois picos é a 240 nm.

Tendo em conta esta observação a restante análise vai ser executada apenas aos resultados que dizem respeito a um comprimento de onda de 240 nm. Os resultados a um comprimento de onda de 254 nm encontram-se no anexo K.

O primeiro passo para a obtenção da combinação dos melhores níveis para a análise da resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI é a elaboração de uma ANOVA e da correspondente ANOVA condensada para a identificação dos factores significativos.



Tabela 4.45: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	0,6344	1	0,6344	72,6268	Significativo
B	1,1778	1	1,1778	134,8461	Significativo
AB	1,4347	1	1,4347	164,2597	Significativo
C	0,2388	1	0,2388	27,3383	Significativo
AC	0,5379	1	0,5379	61,5814	Significativo
BC	0,6689	1	0,6689	76,5868	Significativo
ABC	0,5901	1	0,5901	67,5616	Significativo
Erro	0,1398	16	0,0087		
Total	5,4224	23			

<b>F(0,05;1;16)</b>	4,4940
---------------------	--------

Como se pode verificar todos os factores e suas interacções deram significativos, isto quer dizer que a tabela anterior já é a ANOVA condensada.

Fazendo agora a soma de todas as respostas que correspondem a cada nível de cada factor obtém-se a Tabela 4.46.

Tabela 4.46: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o 2,4 – TDI e o 2,6 – TDI a 240 nm.

<b>A+B-C-</b>	6,0589
<b>A+B+C-</b>	6,1358
<b>A+B+C+</b>	6,4964
<b>A+B-C+</b>	6,2977
<b>A-B-C-</b>	10,3404
<b>A-B+C-</b>	5,6017
<b>A-B+C+</b>	6,0475
<b>A-B-C+</b>	6,9011

A selecção do melhor nível é feita escolhendo aquele que tem um valor superior de resposta. Neste caso e sabendo que a interacção entre o maior número de factores é aquela que prevalece consegue-se chegar à melhor combinação de níveis para este caso. Assim para este caso, a melhor combinação de níveis é a seguinte.

Tabela 4.47: Melhor combinação de níveis para a resolução do 2,4 – TDI e o 2,6 - TDI a 240 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	-1
B	-1
C	-1

Detalhando, a melhor combinação de níveis para a análise da resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 240 nm é:

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,01 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

A realização da análise dos resíduos relativos a este caso, é efectuada analisando três aspectos importantes, a verificação da normalidade, gráfico de resíduos e ordem das experiências e o gráfico dos resíduos e os valores previstos ou estimados.

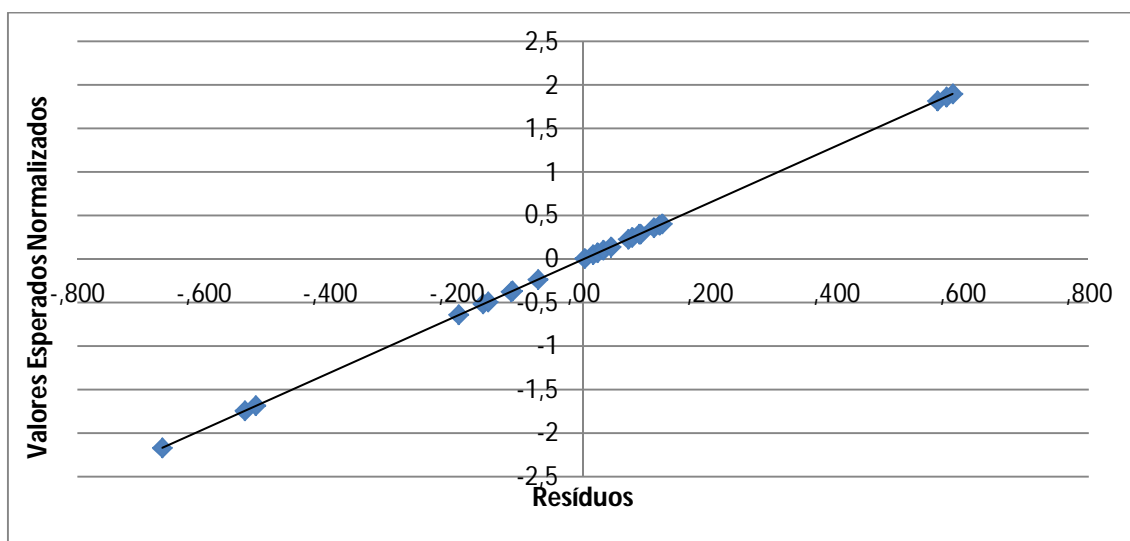


Figura 4.37: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI a 240 nm. Gráfico de probabilidade da distribuição normal.

O gráfico anterior indica que o pressuposto da normalidade é razoavelmente satisfeito, visto que, os resíduos se dispõem aproximadamente em linha recta.

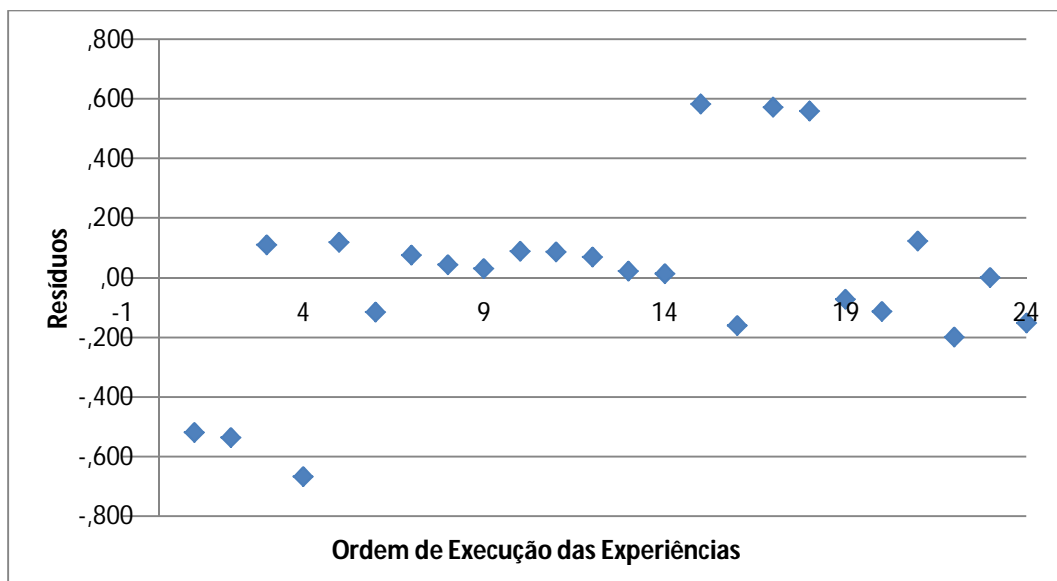


Figura 4.38: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

Pela observação do gráfico anterior pode-se concluir que a hipótese de independência é razoavelmente satisfeita uma vez que os resíduos dispõem-se no gráfico de forma aleatória, sem demonstrarem qualquer tendência especial.

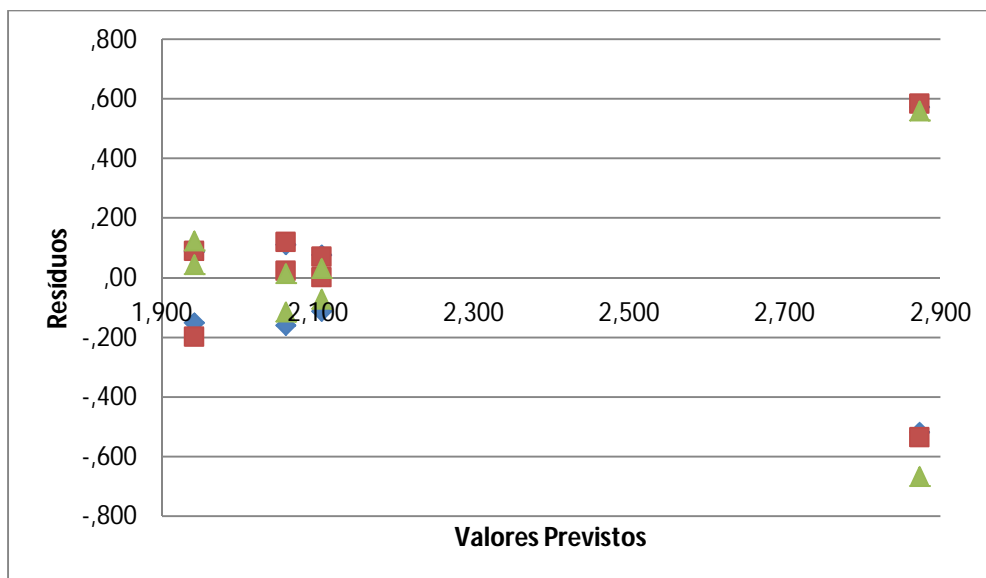


Figura 4.39: Variância das experiências da resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.

O gráfico anterior parece não indicar uma forte violação do pressuposto da homogeneidade da variância, visto que não apresenta qualquer estrutura especial.

- **2,4 – TDI e MDI**

De forma a obter o melhor comprimento de onda para analisar a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o MDI foram analisadas as respostas a cada comprimento de onda que se apresentam nas Tabelas 4.48 e 4.49.

Tabela 4.48: Valores da resolução entre o 2,4 – TDI e o MDI nas experiências a 240 nm.

Detector UV-Vis a 240 nm				Respostas			
Exp.	A	B	C	1	2	3	Soma
1	-1	-1	-1	7,0381	7,0463	7,1022	21,1865
a	1	-1	-1	9,2782	9,1930	9,4726	27,9438
b	-1	1	-1	7,0609	6,8366	6,9113	20,8088
ab	1	1	-1	8,9455	8,6981	8,8900	26,5336
c	-1	-1	1	7,4277	7,3511	7,1057	21,8845
ac	1	-1	1	9,8617	9,7837	9,7918	29,4372
bc	-1	1	1	6,7289	6,6081	6,6600	19,9970
abc	1	1	1	9,4926	9,7007	9,3122	28,5055

Tabela 4.49: Valores da resolução entre o 2,4 – TDI e o MDI nas experiências a 254 nm.

Detector UV-Vis a 254 nm				Respostas			
Exp.	A	B	C	1	2	3	Soma
1	-1	-1	-1	7,1855	7,1797	7,2234	21,5886
a	1	-1	-1	9,3385	9,3882	9,2766	28,0034
b	-1	1	-1	7,0892	6,6753	6,8668	20,6314
ab	1	1	-1	8,9310	8,7532	8,8332	26,5173
c	-1	-1	1	7,4744	7,4430	7,0947	22,0120
ac	1	-1	1	9,6159	9,5681	9,5960	28,7800
bc	-1	1	1	7,1053	7,0012	6,9241	21,0306
abc	1	1	1	9,2965	9,4166	9,2965	28,0096

Nas tabelas anteriores é visível que o melhor comprimento de onda para analisar a resolução entre estes dois picos é a 240 nm.

Tendo em conta esta observação a restante análise vai ser executada apenas aos resultados que dizem respeito a um comprimento de onda de 240 nm, os resultados a 254 nm encontram-se no anexo L.

Tabela 4.50: ANOVA para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	33,9463	1	33,9463	2203,3173	Significativo
B	0,8844	1	0,8844	57,4036	Significativo
AB	0,0002	1	0,0002	0,0159	
C	0,4680	1	0,4680	30,3769	Significativo
AC	0,5337	1	0,5337	34,6422	Significativo
BC	0,0443	1	0,0443	2,8766	
ABC	0,1647	1	0,1647	10,6912	Significativo
Erro	0,2465	16	0,0154		
Total	36,2882	23			

**F(0,05;1;16)** 4,4940

Tabela 4.51: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	33,9463	1	33,9463	2099,2319	Significativo
B	0,8844	1	0,8844	54,6918	Significativo
C	0,4680	1	0,4680	28,9419	Significativo
AC	0,5337	1	0,5337	33,0057	Significativo
ABC	0,1647	1	0,1647	10,1862	Significativo
Erro	0,2911	18	0,0162		
Total	36,2882	23			

**F(0,05;1;18)** 4,4139

Pela ANOVA condensada chega-se à conclusão que os factores significativos para a análise da resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a um comprimento de onda de 240 nm são: o factor A, o B, o C, a interacção entre os factores A e B e a interacção entre os três factores. Fazendo agora a soma de todas as respostas que correspondem a cada nível de cada factor obtém-se a Tabela 4.52.

Tabela 4.52: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm.

<b>A+B-C-</b>	27,9438
<b>A+B+C-</b>	26,5336
<b>A+B+C+</b>	28,5055
<b>A+B-C+</b>	29,4372
<b>A-B-C-</b>	21,1865
<b>A-B+C-</b>	20,8088
<b>A-B+C+</b>	19,9970
<b>A-B-C+</b>	21,8845

Neste caso e sabendo que a interacção entre o maior número de factores é aquela que prevalece consegue-se chegar à melhor combinação de níveis para este caso. Assim para este caso, a melhor combinação de níveis é a seguinte.

Tabela 4.53: Melhor combinação de níveis para a resolução do 2,4 – TDI e o MDI a 240 nm.

<b>Melhores Níveis</b>	<b>Nível</b>
A	1
B	-1
C	1

Detalhando, a melhor combinação de níveis para a análise da resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a um comprimento de onda de 240 nm é:

- Temperatura da Coluna: 40 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,01 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Foram analisados, igualmente, os resíduos relativos a este caso. Para tal foram avaliados os três aspectos importantes, a verificação da normalidade, gráfico de resíduos e ordem das experiências e o gráfico dos resíduos e os valores previstos ou estimados.

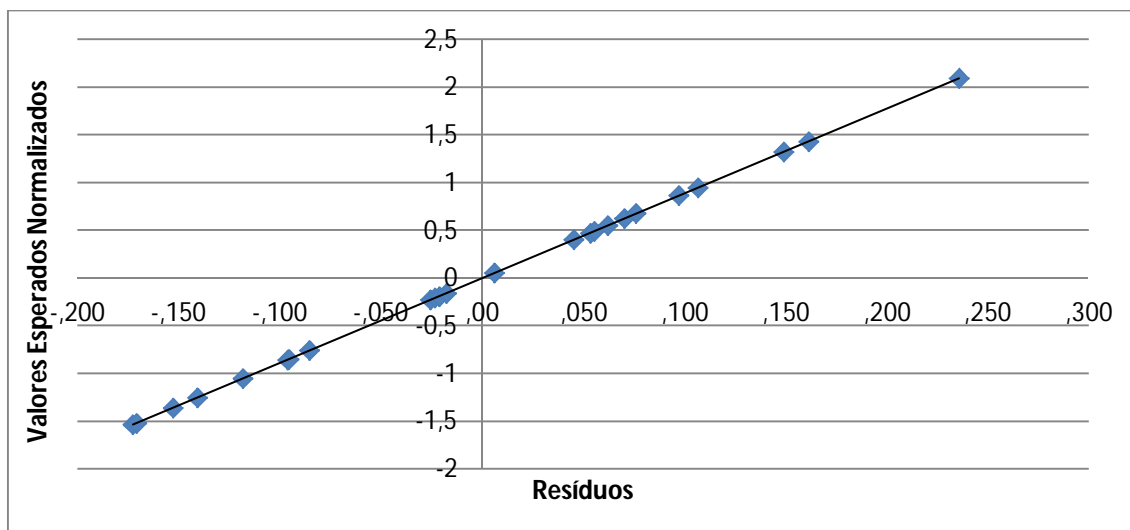


Figura 4.40: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm. Gráfico de probabilidade da distribuição normal.

O gráfico anterior indica que o pressuposto da normalidade é razoavelmente satisfeito, visto que, os resíduos se dispõem aproximadamente em linha recta.

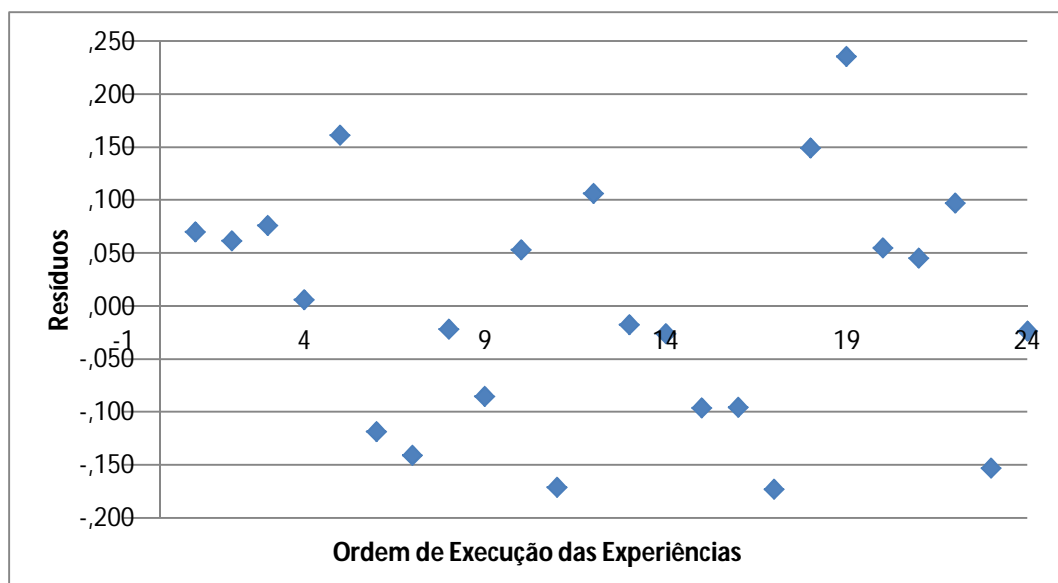


Figura 4.41: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

Pela observação do gráfico anterior pode-se concluir que a hipótese de independência é razoavelmente satisfeita uma vez que os resíduos dispõem-se no gráfico de forma aleatória, sem demonstrarem qualquer tendência especial.

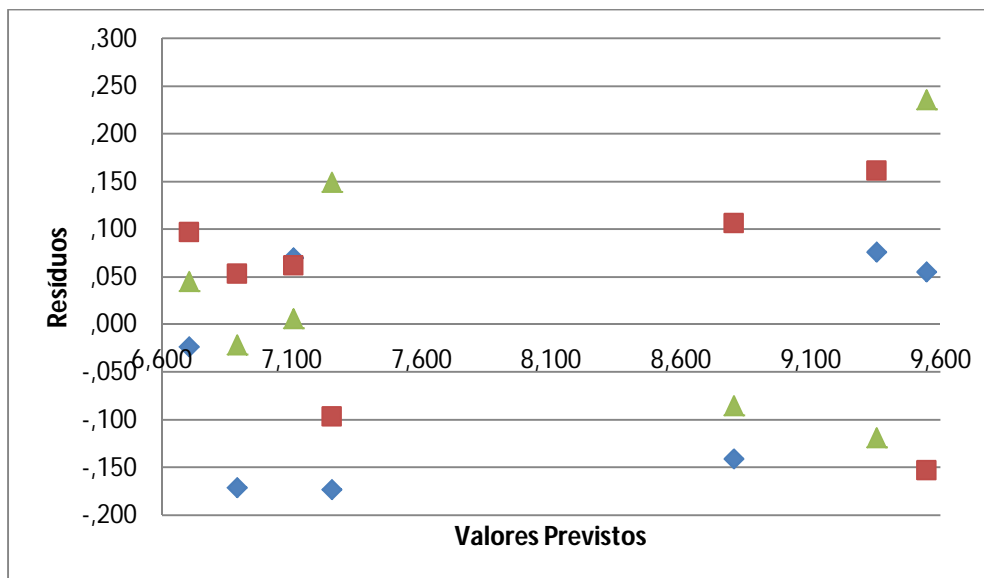


Figura 4.42: Variância das experiências da resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.

O gráfico anterior parece não indicar uma forte violação do pressuposto da homogeneidade da variância, visto que não apresenta qualquer estrutura especial.

- **MDI e Dímero**

Por último, foi executada uma análise à resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero.

Para se obter o melhor comprimento de onda para efectuar esta análise foram analisadas as respostas que se apresentam nas Tabelas 4.54 e 4.55.

Tabela 4.54: Valores da resolução entre o MDI e o Dímero nas experiências a 240 nm.

Detector UV-Vis a 240 nm				Respostas			Soma
Exp.	A	B	C	1	2	3	
1	-1	-1	-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
a	1	-1	-1	0,4364	0,4389	0,6290	1,5042
b	-1	1	-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ab	1	1	-1	0,7836	0,6421	0,7059	2,1315
c	-1	-1	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ac	1	-1	1	0,4450	0,5411	0,5394	1,5255
bc	-1	1	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
abc	1	1	1	0,7460	0,6914	0,7281	2,1655



Tabela 4.55: Valores da resolução entre o MDI e o Dímero nas experiências a 254 nm.

Detector UV-Vis a 254 nm				Respostas			Soma
Exp.	A	B	C	1	2	3	
1	-1	-1	-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
a	1	-1	-1	0,4230	0,4790	0,6247	1,5267
b	-1	1	-1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ab	1	1	-1	0,7917	0,6116	0,7131	2,1164
c	-1	-1	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
ac	1	-1	1	0,4157	0,5065	0,5023	1,4246
bc	-1	1	1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
abc	1	1	1	0,7370	0,6720	0,7195	2,1285

Nas tabelas anteriores é visível que o melhor comprimento de onda para analisar a resolução entre estes dois picos é a 240 nm.

Tendo em conta esta observação a restante análise vai ser realizada apenas aos resultados que dizem respeito a um comprimento de onda de 240 nm, os resultados a 254 nm encontram-se no anexo M.

Tabela 4.56: ANOVA para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	2,2367	1	2,2367	850,8218	Significativo
B	0,0669	1	0,0669	25,4569	Significativo
AB	0,0669	1	0,0669	25,4569	Significativo
C	0,0001	1	0,0001	0,0485	
AC	0,0001	1	0,0001	0,0485	
BC	0,0000	1	0,0000	0,0025	
ABC	0,0000	1	0,0000	0,0025	
Erro	0,0421	16	0,0026		
Total	2,4129	23			

**F(0,05;1;16)** 4,4940

Tabela 4.57: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	2,2367	1	2,2367	1056,7849	Significativo
B	0,0669	1	0,0669	31,6193	Significativo
AB	0,0669	1	0,0669	31,6193	Significativo
Erro	0,0423	20	0,0021		
Total	2,4129	23			

<b>F(0,05;1;20)</b>	4,3512
---------------------	--------

Pela ANOVA condensada chega-se à conclusão que os factores significativos para a análise da resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 240 nm são: o factor A, o B e a interacção entre os factores A e B. Fazendo agora a soma de todas as respostas que correspondem a cada nível de cada factor obtém-se a Tabela 4.58.

Tabela 4.58: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o MDI e o Dímero a 240 nm.

<b>A-</b>	0,0000
<b>A+</b>	7,3267
<b>B-</b>	3,0297
<b>B+</b>	4,2970
<b>A-B-</b>	0,0000
<b>A-B+</b>	0,0000
<b>A+B-</b>	3,0297
<b>A+B+</b>	4,2970

Neste caso, como o factor A e o factor B são significativos e a sua interacção também, o que prevalece é sempre a interacção. No entanto, pela observação da tabela anterior pode-se verificar que não existe conflito, ou seja, tanto para o factor A como para o factor B quando analisados em separado o melhor nível é igual quando analisada a interacção. Sabe-se ainda que como o factor C não é significativo nem nenhuma interacção que o inclua, considera-se que o melhor nível para este factor é aquele que se considera como o mais económico. Assim para este caso, a melhor combinação de níveis é a seguinte.

Tabela 4.59: Melhor combinação de níveis para a resolução entre o MDI e o Dímero a 254 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	mais económico
B	-1
C	1

Para o factor A o nível que é considerado o mais económico é o nível -1, pois como este factor é a temperatura da coluna e o mais económico é utilizar uma temperatura mais baixa.

Em mais detalhe, a melhor combinação de níveis para a análise da resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 240 nm é:

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Para a realização da análise dos resíduos relativos a este caso, é necessário incluir três aspectos importantes, a verificação da normalidade, gráfico de resíduos e ordem das experiências e o gráfico dos resíduos e os valores previstos ou estimados.

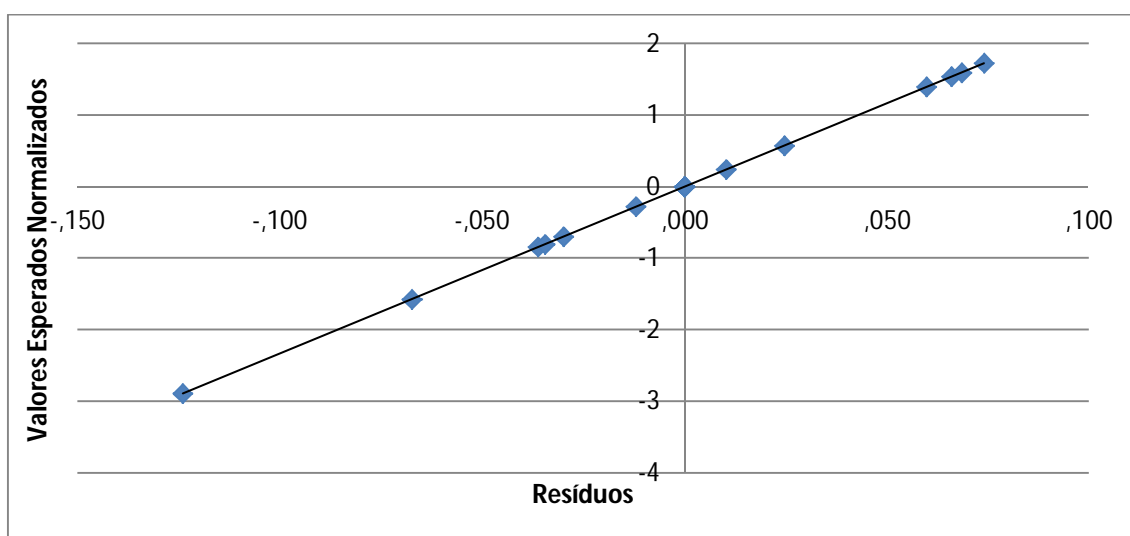


Figura 4.43: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 240 nm. Gráfico de probabilidade da distribuição normal.

O gráfico anterior indica que o pressuposto da normalidade é razoavelmente satisfeito, visto que, os resíduos se dispõem aproximadamente em linha recta.

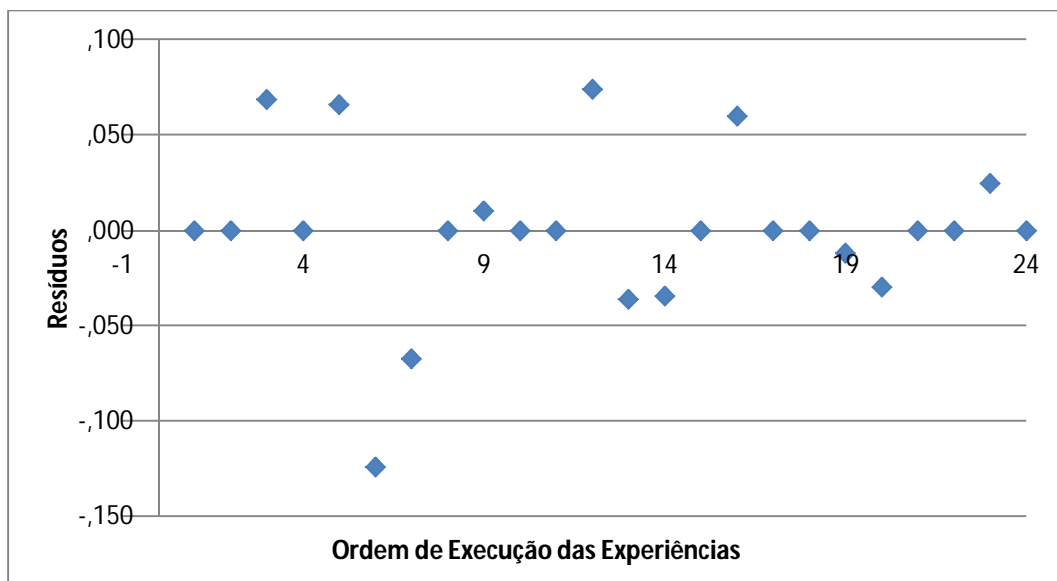


Figura 4.44: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

Pela observação do gráfico anterior pode-se concluir que a hipótese de independência é razoavelmente satisfeita uma vez que os resíduos dispõem-se no gráfico de forma aleatória, sem demonstrarem qualquer tendência especial.

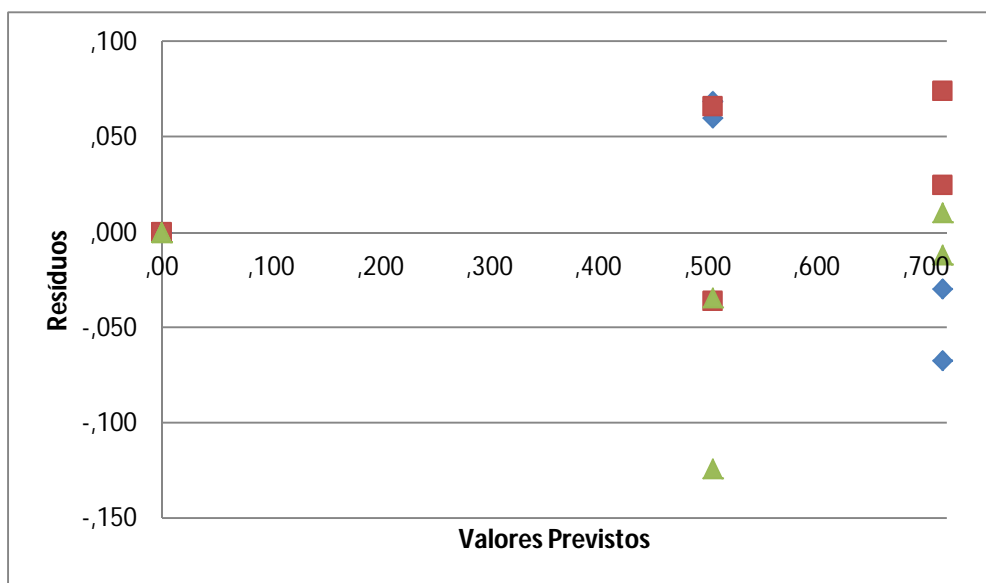


Figura 4.45: Variância das experiências da resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.

O gráfico anterior parece não indicar uma forte violação do pressuposto da homogeneidade da variância, visto que não apresenta qualquer estrutura especial.

Em suma, nas Tabelas 4.60 e 4.61 são apresentadas resumidamente as melhores combinações de níveis para cada caso.

Tabela 4.60: Resumo da melhor combinação de níveis para a maximização da área.

Maximização de área	Factor A	Factor B	Factor C
MDI	-1	-1	1
Dímero	1	-1	-1
2,4 - TDI	-1	-1	1
2,6 - TDI	-1	-1	1

Tabela 4.61: Resumo da melhor combinação de níveis para a maximização da resolução.

Maximização da resolução	Factor A	Factor B	Factor C
2,4 - TDI e 2,6 - TDI	-1	-1	-1
2,4 - TDI e MDI	1	-1	1
MDI e Dímero	1	1	-1

#### 4.4. Aplicações

A fim de testar o método de análise cromatográfica de isocianatos livres optimizado, foi analisada uma amostra real de um poliuretano na forma de espuma e quantificado o teor de isocianatos nela contida.

Depois de analisados os cromatogramas das amostras injectadas foram realizados os cálculos para se converter área de pico em percentagem de isocianato livre, através da realização de uma calibração, cuja curva se apresenta na Figura 4.46.

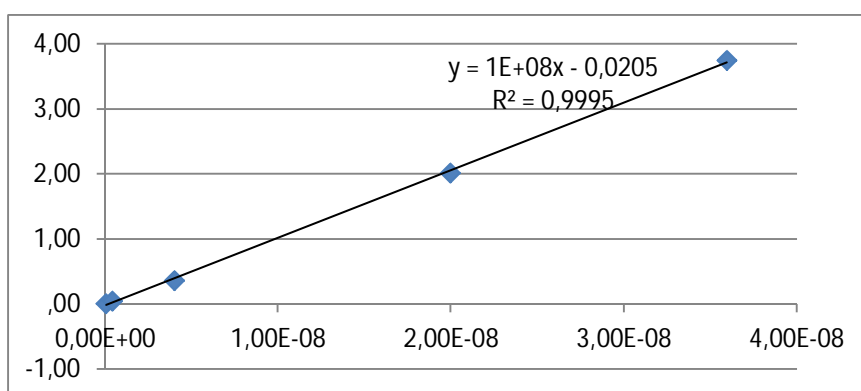


Figura 4.46: Curva de calibração para a espuma analisada.

Como se pode observar a partir do gráfico a curva de calibração é linear, apresentando um  $R^2$  de 0,9995, e um bom ajuste dos pontos experimentais.

Para a espuma de PU foram realizadas três amostras, isto é, foram executadas três repetições. A recuperação de padrão interno destas três repetições encontra-se num intervalo entre 99,781 % e 100,790 %. Estes valores da recuperação de padrão interno permitem concluir que este processo de análise foi otimizado bastante satisfatoriamente.

No que diz respeito à percentagem de isocianato livre (% fm – MDI) os valores obtidos para cada repetição realizada encontram-se na Tabela 4.62.

Tabela 4.62: Valores de % fm - MDI e recuperação de HDI para cada réplica realizada de espuma.

	peso	%fm-MDI	Rec. HDI
1	0,2100	0,921	100,8
2	0,1365	0,908	100,7
3	0,4233	0,949	99,8
Média		0,926	100,4

Pela análise dos valores indicados na tabela pode-se afirmar que a espuma de PU analisada está de acordo com os valor de referência para o monómero livre (1%) e que, como era de esperar, quanto maior a massa de espuma de PU pesada para a preparação da amostra mais elevado o valor obtido para a percentagem de isocianato livre. Pode-se ainda concluir que o método se encontra bem otimizado pois a % fm – MDI entre cada repetição não varia consideravelmente.

Foram ainda analisados outros materiais, tais como, colas e pré-polímeros. Os resultados que se obtiveram para estes materiais não foram satisfatórios.

## 5. Conclusões e Recomendações para trabalhos futuros

Neste capítulo serão apresentadas as conclusões gerais deste trabalho, assim como algumas recomendações que podem ser tidas em consideração para trabalhos futuros.

### 5.1. Pré-experiências com derivatizantes

Da análise de todas as pré-experiências pode-se concluir que quando se utiliza o MAMA como derivatizante as melhores condições para que haja uma maior resposta, isto é, para que se consiga detectar todos os isocianatos livres são:

- Solvente A: Solução de 3% de trietilamina em água (p/v) com pH = 3,0 acertado com ácido ortofosfórico;
- Solvente B: Acetonitrilo;
- Solvente A a 20 % e o solvente B a 80 % , com um tempo de análise de 15 minutos;
- Detector: PDA a 254 nm;
- Fluxo: 0,33 mL/min;
- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Método de preparação: método 2.

No que diz respeito à utilização do derivatizante 1,2 – PP, as condições que conduzem a uma melhor detecção dos isocianatos são:

- Solvente A: Solução aquosa de acetato de amónio a 0,1 % com pH = 6,0 acertado com ácido acético;
- Solvente B: Acetonitrilo;
- Gradiente:

Tabela 5.1: Gradiente aplicado em experiências com 1,2 - PP.

Tempo (min)	Solução A (%)	Solução B (%)
0	65	35
0,01	65	35
4,69	30	70
5,16	5	95
7,03	5	95
7,05	65	35
10	65	35

- Detector: PDA a 254 nm;
- Fluxo: 0,4 mL/min;
- Temperatura da Coluna: 40 °C;
- Método de preparação: método 2.

Quando se utilizou o derivatizante DBA não se conseguiu obter um cromatograma onde o pico do MDI fosse razoável, além disso, o método de preparação das amostras, como já foi mencionado, exige executar alguns processos complexos, morosos e que levam a diversas perdas de amostra. Por estas duas razões, optou-se por não se continuar a utilizar DBA.

Entre os outros dois derivatizantes, o MAMA e o 1,2 – PP, chegou-se à conclusão que as experiências com o 1,2 – PP foram aquelas onde se obteve melhores resultados. Por esta razão o Desenho de Experiências foi aplicado apenas a este derivatizante.

## **5.2. Desenho de Experiências**

### **5.2.1. Maximização da área**

Quando aplicado o desenho de experiências ao MDI, o comprimento de onda para o qual o MDI tem uma maior resposta é a 254 nm. A melhor combinação de níveis para se conseguir obter a maximização da área do pico do MDI é a seguinte:

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Quando se passa para a aplicação do mesmo desenho de experiências ao Dímero, o comprimento de onda onde o Dímero tem a sua maximização da área é também a 254 nm. A melhor combinação de níveis para se conseguir tal maximização é:

- Temperatura da Coluna: 40 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,01 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Relativamente à aplicação do desenho de experiências ao 2,4 – TDI, o melhor comprimento de onda foi a 240 nm. Quanto à melhor combinação de níveis para se conseguir obter a maximização da área é a que se indica abaixo.

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Por último, o melhor comprimento de onda para analisar o 2,6 – TDI e obter a maximização da resposta do mesmo é a 240 nm. A melhor combinação de níveis para obter essa maximização é:

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.



### **5.2.2. Maximização da resolução**

Se o objectivo for apenas ter uma resolução maior entre os picos e não obter uma maximização da área destes, então as melhores combinações de níveis serão as seguintes.

Para o caso de se querer uma maior resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI, o comprimento de onda onde essa resolução é superior é a 240 nm. A melhor combinação de níveis para se obter a maximização da resolução entre estes dois picos é apresentada abaixo.

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,01 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

No que diz respeito ao pico do 2,4 – TDI e ao pico do MDI, o comprimento de onda para o qual a resolução entre estes dois picos é máxima é a 240 nm. Já a melhor combinação de níveis é a seguinte.

- Temperatura da Coluna: 40 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Por fim, para obter a resolução máxima entre o pico do MDI e o pico do Dímero, o comprimento de onda onde tal acontece é a 240 nm. A combinação de níveis para que esta resolução seja máxima é abaixo apresentada.

- Temperatura da Coluna: 40 °C;
- Fluxo: 0,4 mL/min;
- Solvente: 0,01 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

### **5.3. Aplicações**

Para materiais em contacto com alimentos que tenham como base o MDI, o melhor comprimento de onda para analisar estes materiais é 254 nm. A melhor combinação de níveis para se conseguir obter a maximização da área do MDI é a seguinte.

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

Para materiais que tenham como base o TDI, o melhor comprimento de onda para se realizar a análise é a 240 nm. A melhor combinação de níveis é a seguinte.

- Temperatura da Coluna: 30 °C;
- Fluxo: 0,3 mL/min;
- Solvente: 0,1 % Ac. NH<sub>4</sub>, a pH = 6,0.

#### **5.4. Recomendações para trabalhos futuros**

No decorrer deste trabalho surgiram algumas complicações no que diz respeito à aplicação dos resultados obtidos do DOE.

Quando analisadas amostras com valores de referência de isocianato livre entre os 30 e 40 %, como por exemplo colas e pré-polímeros, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Foi verificada uma grande disparidade entre os valores de isocianato livre obtidos quando analisadas réplicas da mesma amostra, o que não seria de esperar.

Uma razão para que tal aconteça é que o DOE foi optimizado para concentrações de isocianato baixas, isto porque a solução de isocianato injectada tinha uma concentração de 8 mg/L.

Tendo em conta este factor, pode-se concluir que este método cromatográfico de análise se encontra optimizado para baixas percentagens de isocianato, concretamente para amostras que contenham até aproximadamente 2% de isocianato livre. Para amostras com uma percentagem superior sugere-se que seja aplicado um novo DOE para soluções que tenham uma concentração superior à que foi utilizada anteriormente.

Como existem muitos outros isocianatos que podem ser utilizados industrialmente, sugere-se que este estudo seja efectuado para outros tipos destas substâncias.

## Bibliografia

- [1] Salthammer T., Wisvnach C., Miertzsch H., "Absorption and fluorescence of 1-(2-pyridyl)-piperazine and four diisocyanate derivatives in solution", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* (1997) **107**, 159-164.
- [2] Damant A. P., Jickells S. M., Castle L., "Liquid-Chromatographic determination of residual isocyanate monomers in plastics intended for food contact use", *Journal of AOAC International* (1995) **78**, 711-719.
- [3] Henneken H., Vogel M., Karst U., "Determination of airborne isocyanates", *Anal Bioanal Chem* (2007) **387**, 210-236.
- [4] Mark H. F., "Encyclopedia of Polymer Science and Technology", Hardcover, (2004)
- [5] Health and Safety Laboratory, "Organic isocyanates in air", MDHS 25/3, (1999), ISBN 0 7176 1668 1.
- [6] Health and Safety Executive, "Isocyanates: health hazards and precautionary measures", EH16, (1997), ISBN 0 7176 1184 1.
- [7] Health and Safety Executive, "Preventing asthma at work: how to control respiratory sensitisers", HSE Books, (1994), ISBN 0 7176 0661 9.
- [8] Tremblay P., Lesage J., Ostiguy C., Van Tra H., "Investigation of the competitive rate of derivatization of several secondary amines with phenylisocyanate (PHI), hexamethylene-1,6-diisocyanate (HDI), 4,4'-methylenebis(phenyl isocyanate) (MDI) and toluene diisocyanate (TDI) in liquid medium", *Analyst* (2003) **128**, 142-149.
- [9] British Standard, "Materials and articles in contact with foodstuffs – Plastics substances subject to limitation – Part 8: Determination of isocyanates in plastics", BS EN 13130-8:2004.
- [10] Method 207 – Method for Measuring Isocyanates in Stationary source Emissions.
- [11] Spanne, M; Tinnerberg, H; Dalene, M; Skarping, G, "Determination of Complex Mixtures of Airborne Isocyanates and Amines. Part 1", *Analyst*, (1996) **121**, 1095-1099;
- [12] Karlsson, D; Spanne, M; Dalene, M; Skarping, G, "Determination of Complex Mixtures of Airborne Isocyanates and Amines. Part 4", *Analyst* (1998) **123**, 117-123;
- [13] Meyer V. R., "Practical High-Performance Liquid Chromatography", Wiley, (2010).

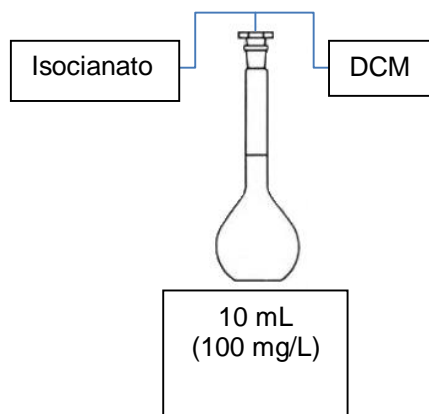
- [14] Degani A. L. G., Cass Q. B., Vieira P. C., "Cromatografia: um breve ensaio", *Química Nova na Escola* (1998) **7**.
- [15] Swartz M. E., "Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC): An Introduction", *Separation Science Redefined* (2005) 8-14.
- [16] Maldaner L., Jardim, I. C. S. F., "O Estado da arte da cromatografia Líquida de ultra eficiência", *Quim. Nova* (2009) **32**, 214-222.
- [17] Series 200A Fluorescence Detector, User's Guide, Perkin Elmer, (2006).
- [18] Hibbert D. B., "Experimental design in chromatography: A tutorial review", *Journal of Chromatography B* (2012) doi 10.1016/j.jchromb.2012.01.020.
- [19] Pereira Z. L., Requeijo J. G., "Qualidade: Planeamento e Controlo Estatístico de Processos", Prefácio, (2008).
- [20] Dejaegher B., Heyden Y. V., "Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2011) **56**, 141-158.
- [21] Asçi B., Dönmez Ö. A., Bozdogan A., Sungur S., "Experimental Design of Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Conditions for Simultaneous Determination of Ibuprofen, Pseudoephedrine Hydrochloride, Chlorpheniramine Maleate, and Nipagen", *Journal of Analytical Chemistry* (2010) **65**, 743-748.
- [22] Robinson, L. W., "Concise Experimental Designs", *Quality Engineering* (2003) **15**, 403-406.

## Anexos

### Anexo A: Protocolo Experimental referente às pré-experiências com MAMA

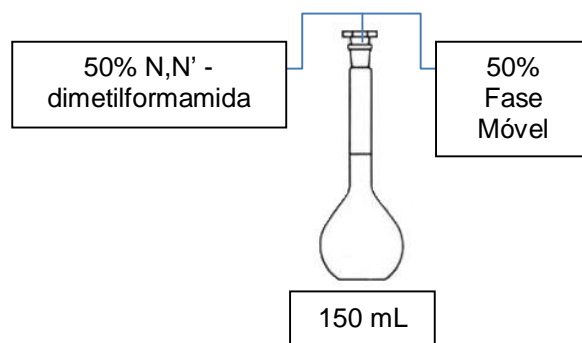
#### Método 1

- **Preparação das soluções padrão de isocianatos**



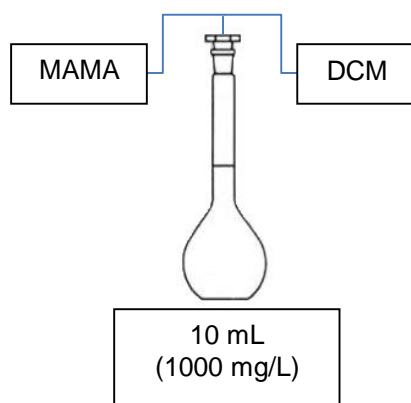
**NOTA:** Todas soluções mãe e restantes devem ser armazenados na ausência de luz e humidade a -20 °C. São estáveis durante 1 mês nestas condições. Assegurar que a ponta da agulha da seringa é imersa em DCM antes de dispensar.

- **Solução de dissolução dos derivatizados**



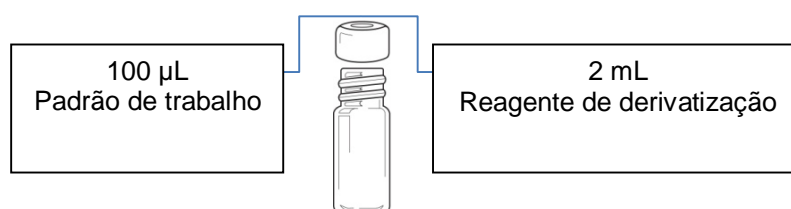
**NOTA:** Preparar diariamente.

- **Solução de reagente de derivatização**



**NOTA:** Preparar diariamente.

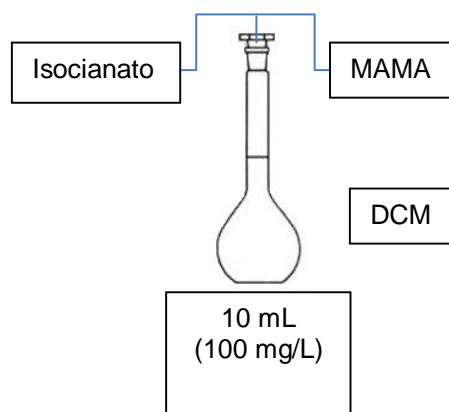
- **Preparação das amostras a injectar no UPLC**



- Agitar;
- Repousar 60 minutos na ausência de luz;
- Evaporar em corrente de azoto;
- Adicionar 10 mL de solvente de dissolução;
- Agitar;
- Filtrar cerca de 2 mL desta solução com filtro de seringa 0,2 µm para vial e injectar.

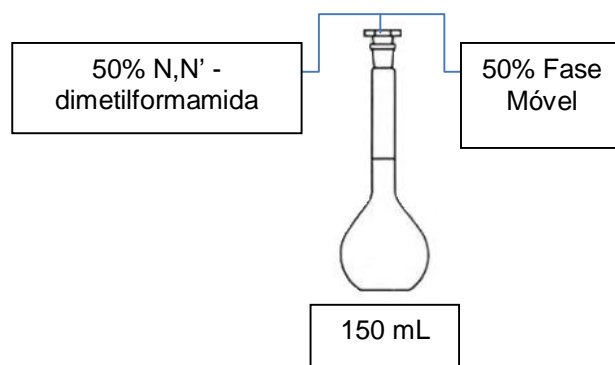
## Método 2

- **Preparação das soluções padrão de isocianatos**



**NOTA:** Todos os stocks e padrões devem ser armazenados na ausência de luz e humidade a 20°C. São estáveis durante 1 mês nestas condições. Assegurar que a ponta da agulha da seringa é imersa em DCM antes de dispensar.

- **Solução de dissolução dos derivatizados**



**NOTA:** Preparar diariamente.

- **Preparação de amostras para injeção no UPLC**

- Agitar;
- Repousar 60 minutos na ausência de luz;
- Evaporar em corrente de azoto;
- Adicionar 10 mL de solvente de dissolução;
- Agitar;
- Filtrar cerca de 2 mL desta solução com filtro de seringa 2 µm para vial e injectar.

## Anexo B: Cromatogramas das pré-experiências com MAMA

### Primeira Pré-experiência

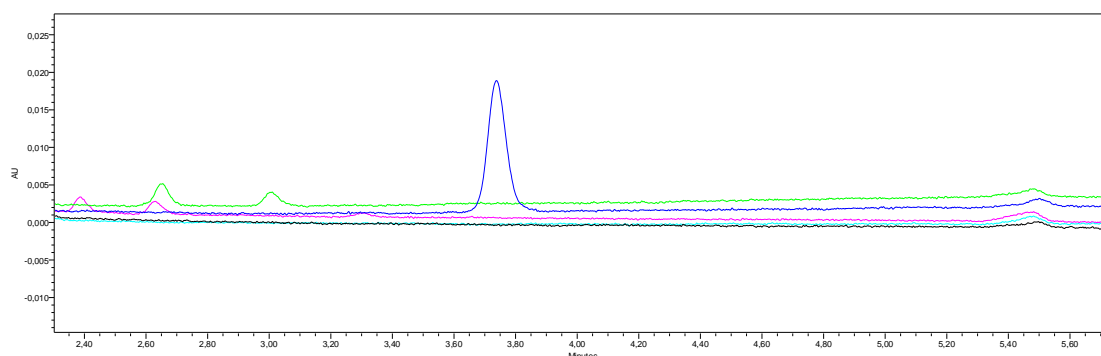


Figura B1: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

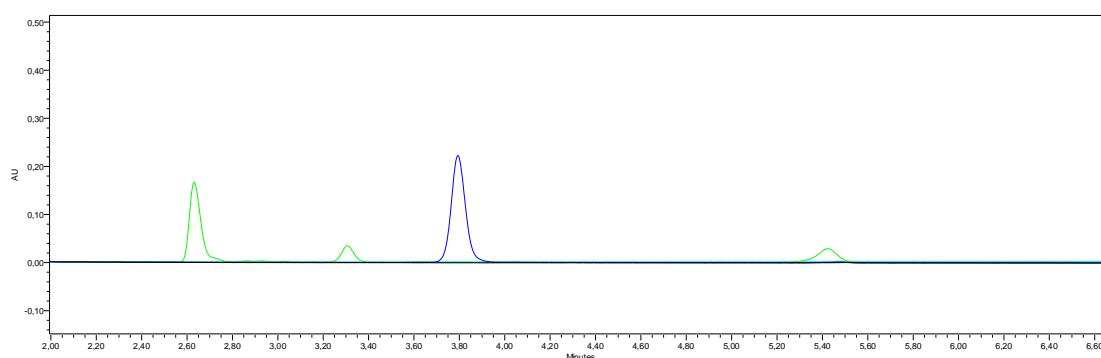


Figura B2: Primeira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.



### Terceira Pré-experiência

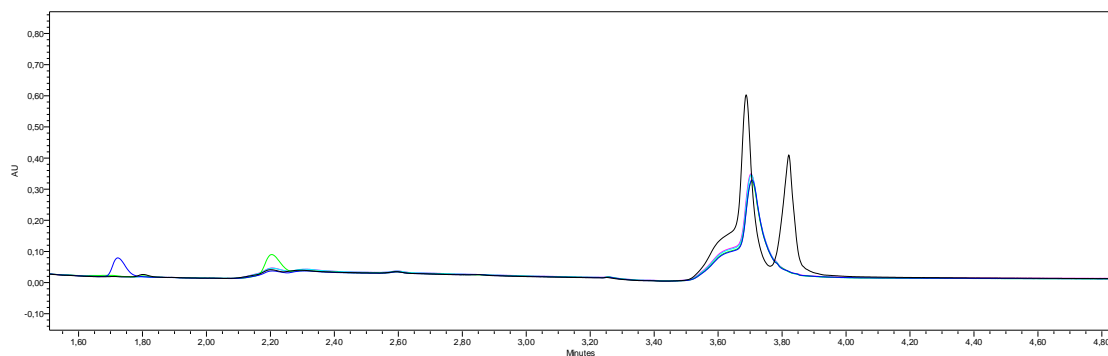


Figura B3: Terceira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 1 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

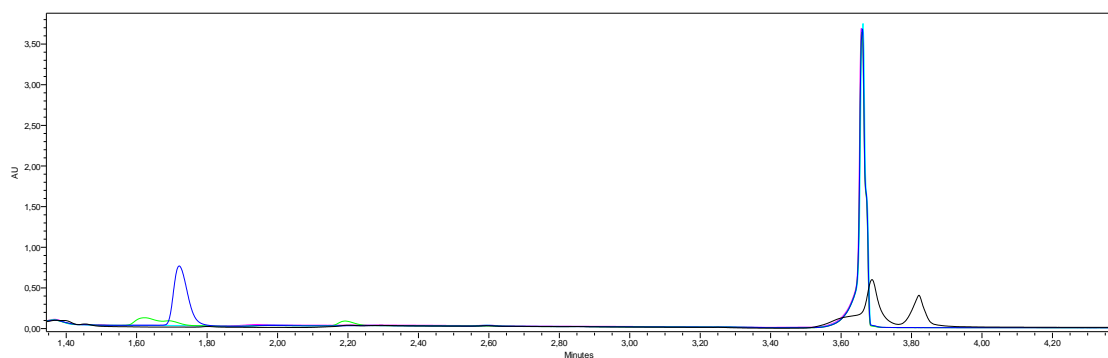
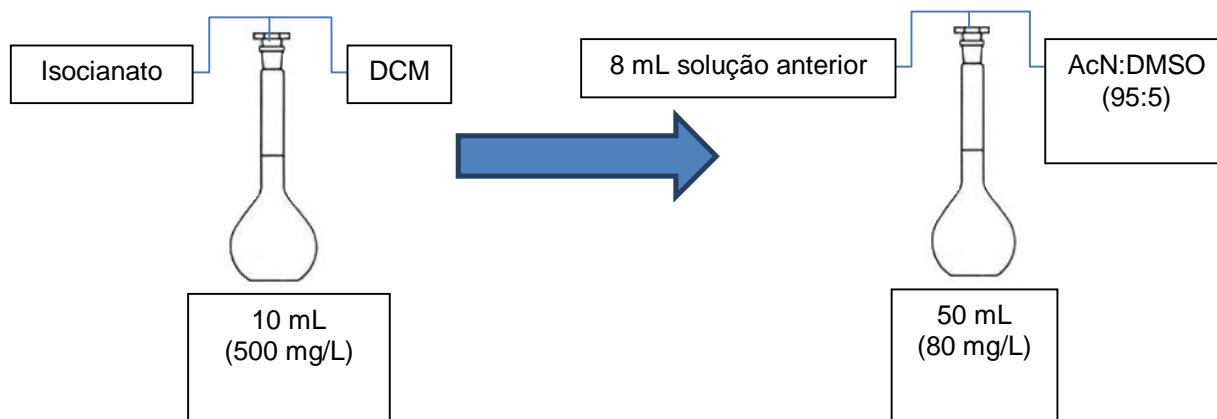


Figura B4: Terceira pré-experiência do MAMA, cromatograma do método 2 a 240 nm. MAMA - curva a preto, MDI - azul escuro, Dímero - verde, 2,4 – TDI - azul claro e 2,6 – TDI - rosa.

## Anexo C: Protocolo Experimental referente às pré-experiências do 1,2 – PP

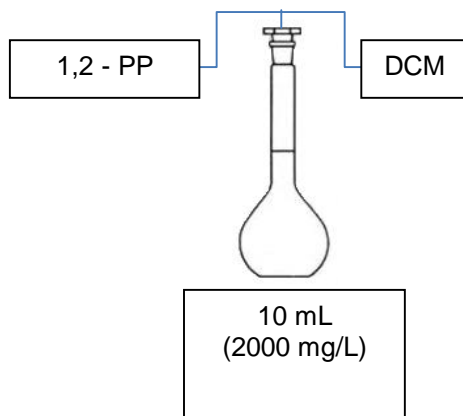
### Método 1

- **Preparação das soluções padrão de isocianatos**



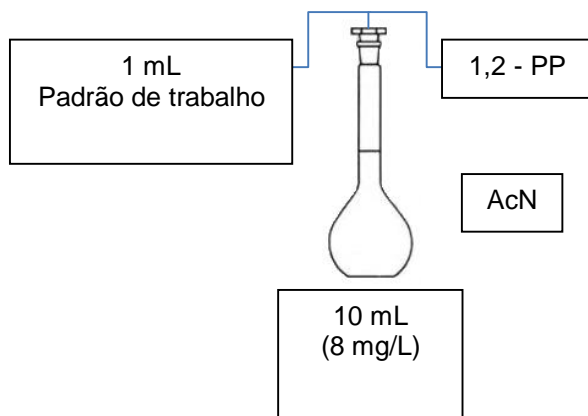
**NOTA:** Todos os stocks e padrões devem ser armazenados na ausência de luz e humidade a 20°C. São estáveis durante 1 mês nestas condições. Assegurar que a ponta da agulha da seringa é imersa em DCM antes de dispensar.

- **Solução de reagente de derivatização**



**NOTA:** Preparar diariamente.

- **Preparação de amostras para injectar no UPLC**

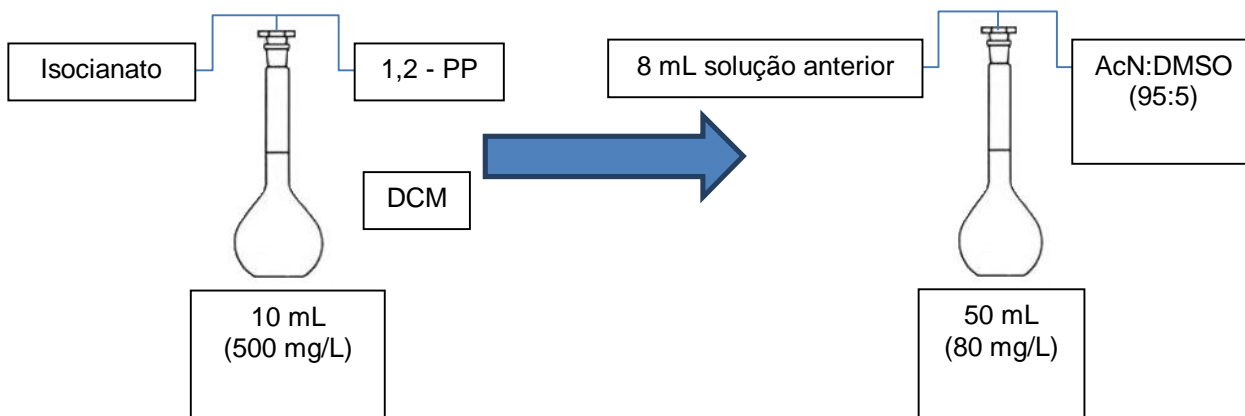


- Agitar;
- Filtrar cerca de 2 mL desta solução por filtro de seringa 2 µm para vial e injectar.

**NOTA:** Preparar diariamente.

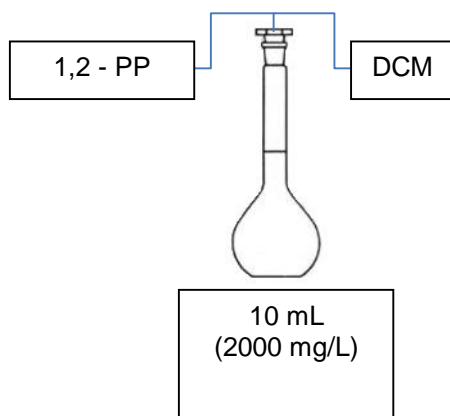
## Método 2

- **Preparação das soluções padrão de isocianatos e derivatizante**



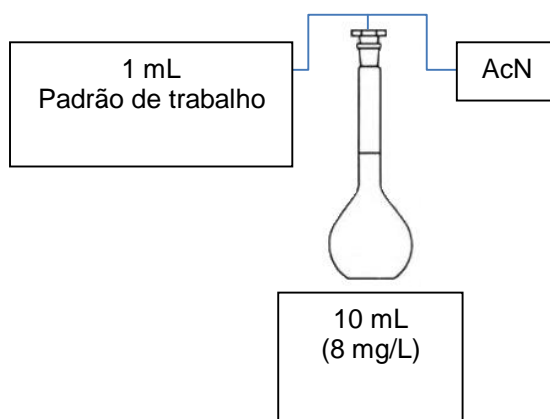
**NOTA:** Todos os stocks e padrões devem ser armazenados na ausência de luz e humidade a 20°C. São estáveis durante 1 mês nestas condições. Assegurar que a ponta da agulha da seringa é imersa em DCM antes de dispensar.

- **Solução de reagente de derivatização**



**NOTA:** Preparar diariamente.

- **Preparação de amostras para injectar no UPLC**



- Agitar;
- Filtrar cerca de 2 mL desta solução por filtro de seringa 2  $\mu$ m para vial e injectar.

**NOTA:** Preparar diariamente.

## Anexo D: Cromatogramas das pré-experiências do 1,2 – PP

### Primeira Pré-experiência

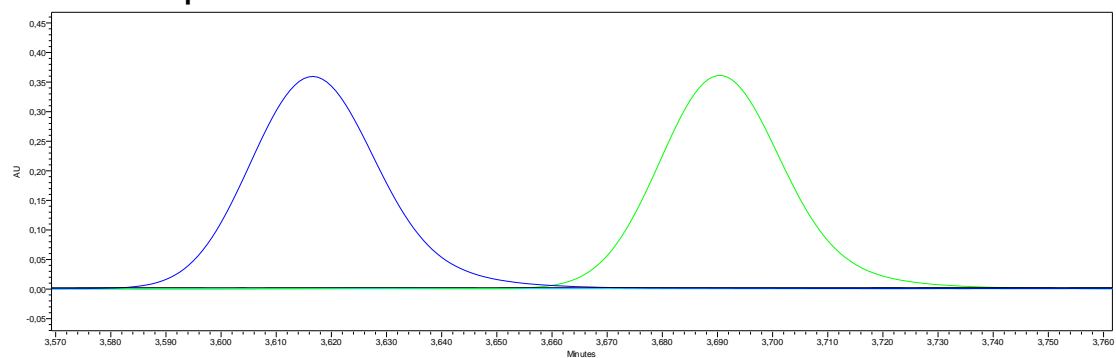


Figura D1: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 240 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde.

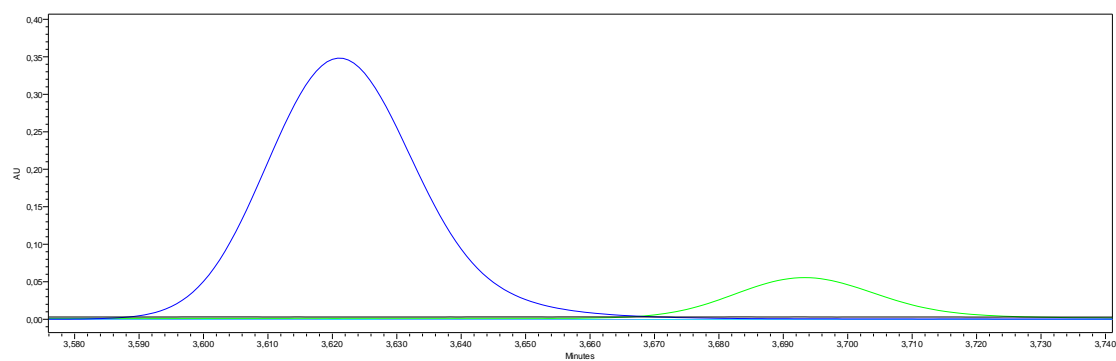


Figura D2: Primeira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 240 nm. 1,2 - PP - curva a preto, MDI - azul escuro e Dímero - verde.

## Segunda Pré-experiência

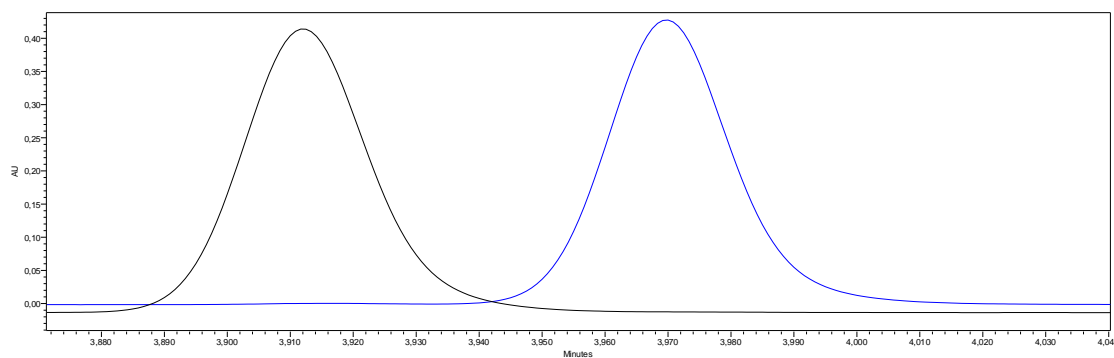


Figura D3: Segunda pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 240 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

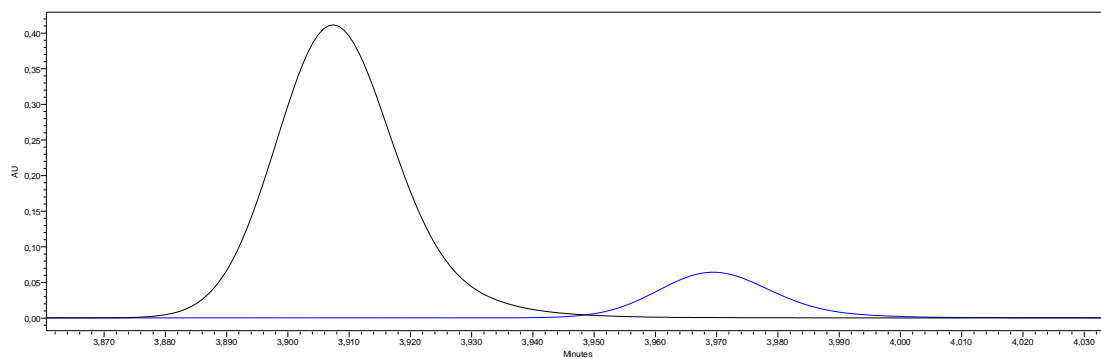


Figura D4: Segunda pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 240 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

### Terceira Pré-experiência

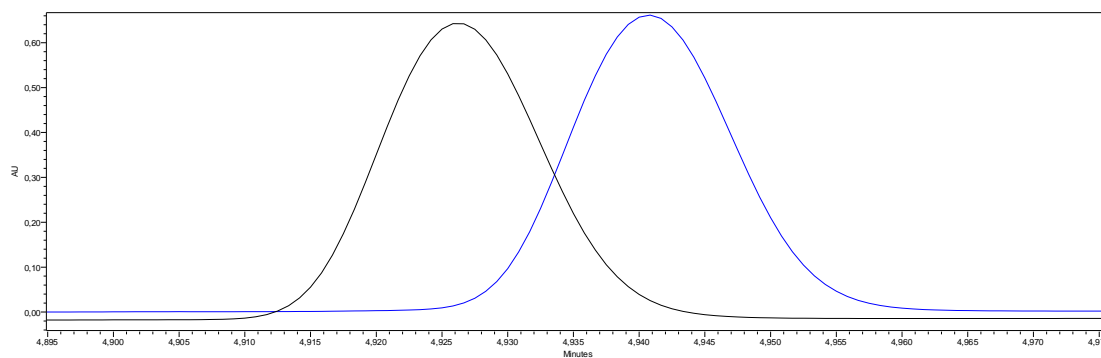


Figura D5: Terceira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 1 a 240 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

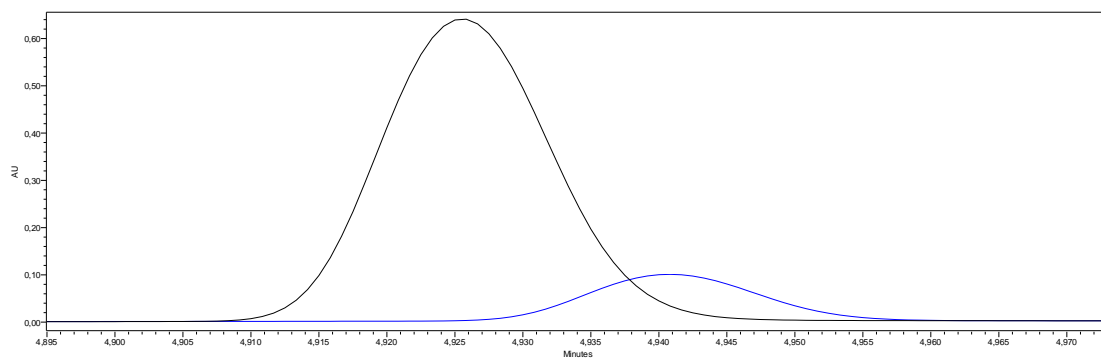
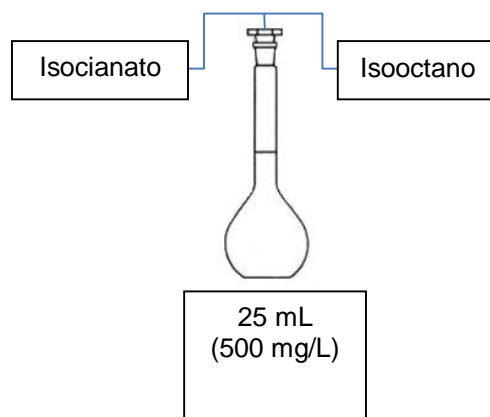


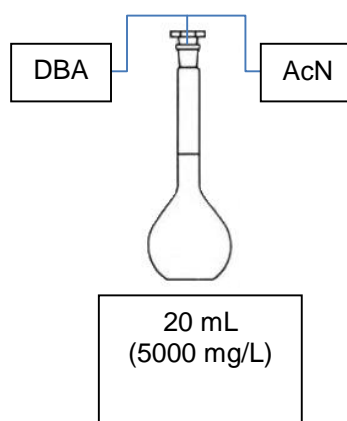
Figura D6: Terceira pré-experiência do 1,2 – PP, cromatograma do método 2 a 240 nm. MDI – curva a preto e Dímero - azul.

## Anexo E: Protocolo Experimental referente às pré-experiências com DBA

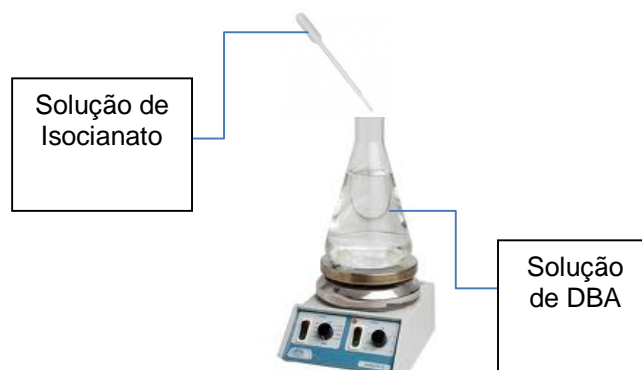
- **Preparação das soluções padrão de isocianatos**



- **Solução de reagente de derivatização**



- **Solução Derivatizada**





- **Preparação de amostras para injectar no UPLC**
  - Evaporar a mistura num evaporador rotativo;
  - Dissolver o sólido, adicionando pequenas quantidades de etanol aquoso 70 %;
  - Filtrar a quente, removendo alguma impureza insolúvel;
  - Arrefecer lentamente até à temperatura ambiente;
  - Colocar em banho de gelo;
  - Recolher os cristais, filtrar em funil de Büchner;
  - Pesar uma quantidade exacta de derivatizados e diluir em acetonitrilo (1000 mg/L) e posteriormente em acetonitrilo : água (50:50) (100 mg/L);
  - Agitar;
  - Filtrar cerca de 2 mL desta solução por filtro de seringa 2 µm para vial e injectar.

## Anexo F: Cromatogramas das pré-experiências com DBA

### Terceira Pré-experiência

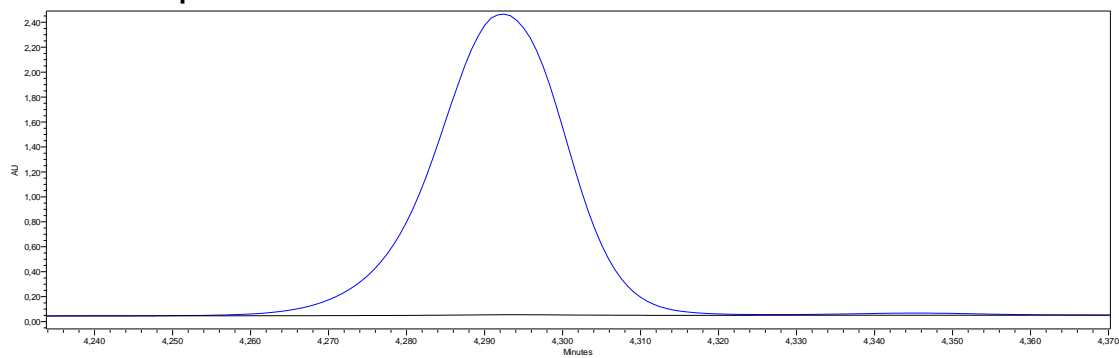


Figura F1: Terceira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

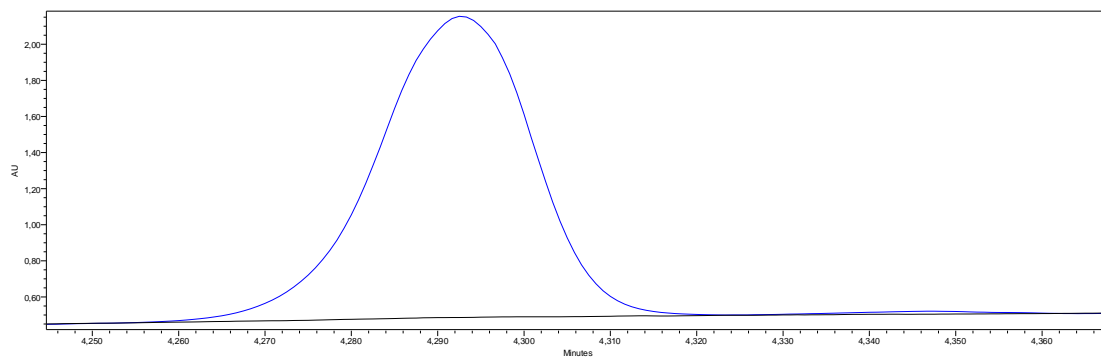


Figura F2: Terceira pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

### Quarta Pré-experiência

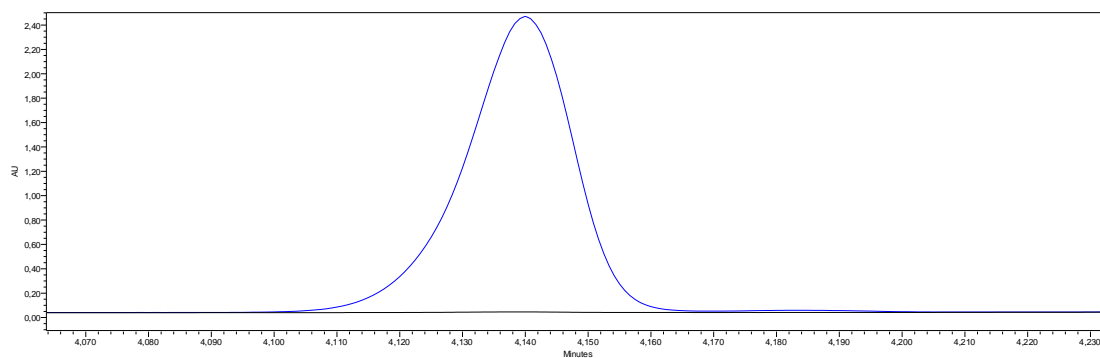


Figura F3: Quarta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

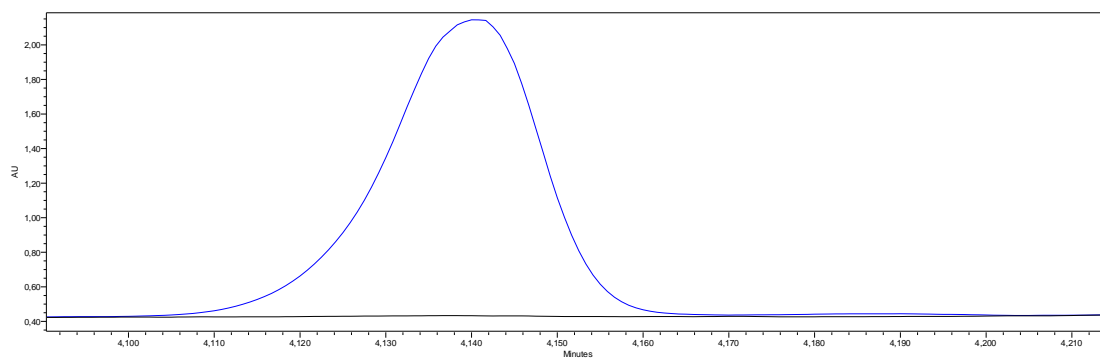


Figura F4: Quarta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

### Quinta Pré-experiência

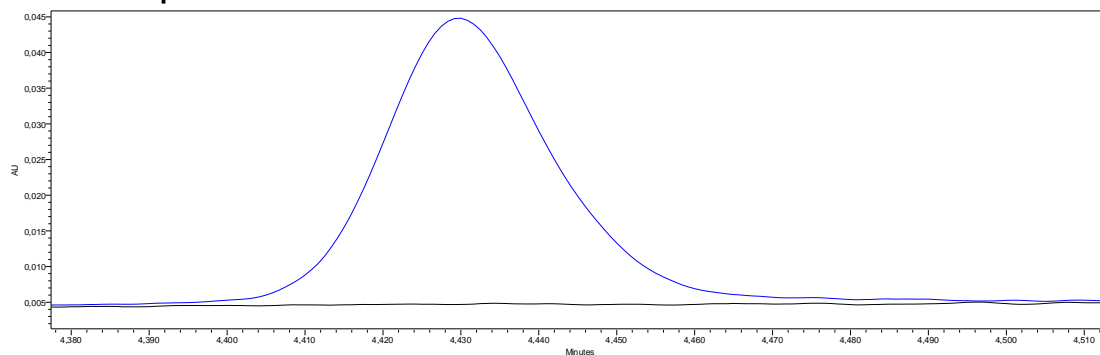


Figura F5: Quinta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

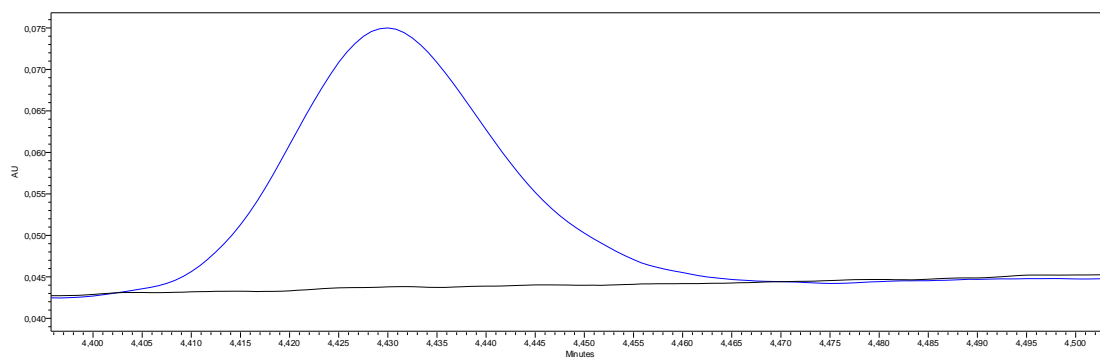


Figura F6: Quinta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

### Sexta Pré-experiência

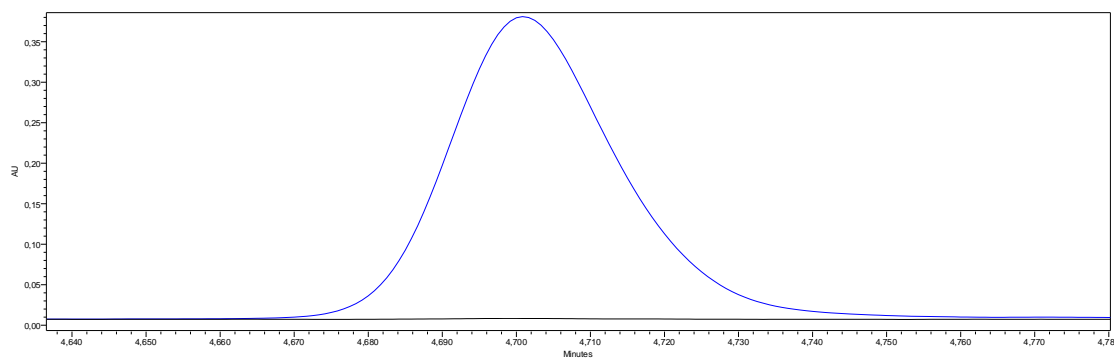


Figura F7: Sexta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

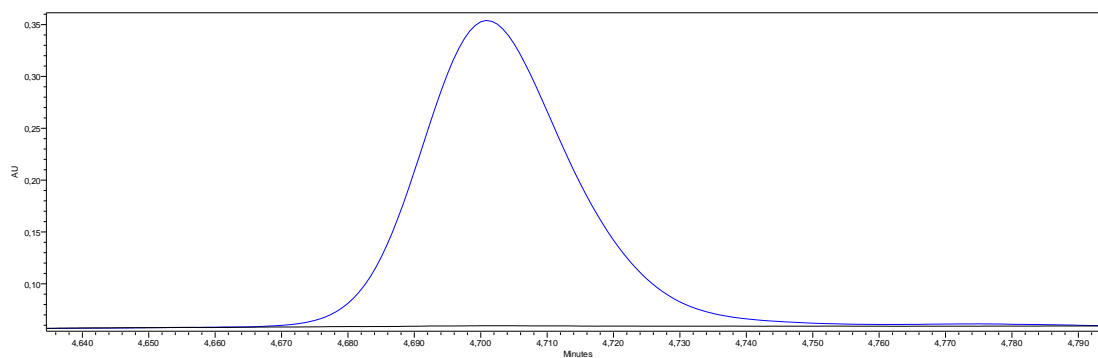


Figura F8: Sexta pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

### Sétima Pré-experiência

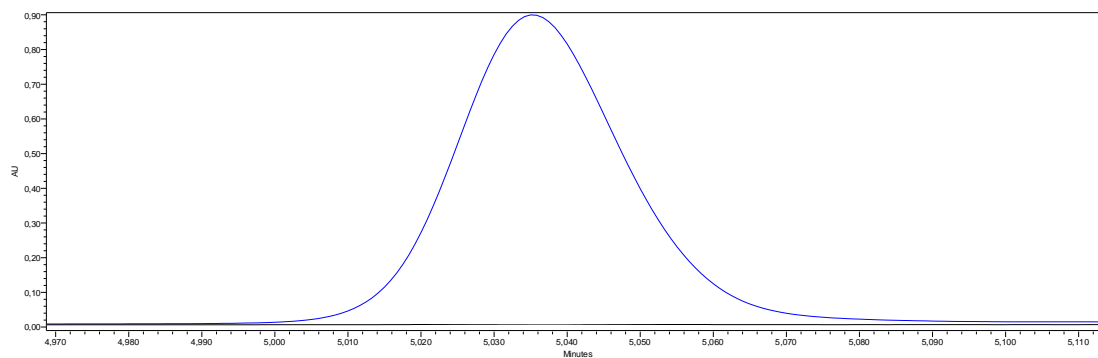


Figura F9: Sétima pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

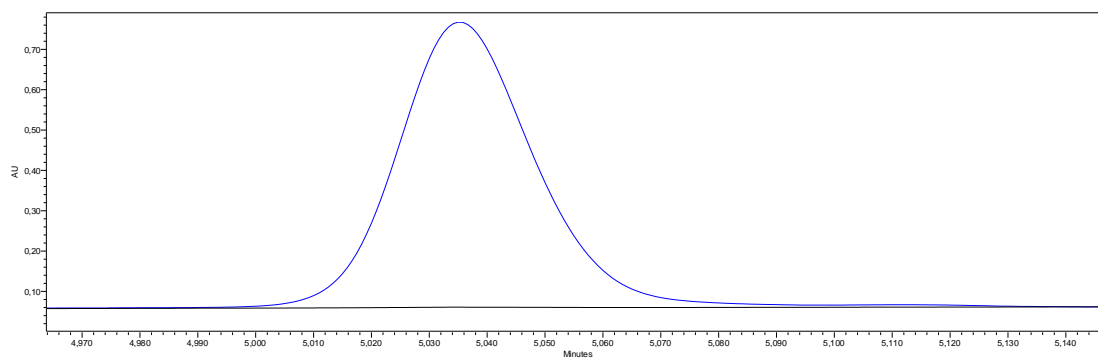


Figura F10: Sétima pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

### Oitava pré-experiência

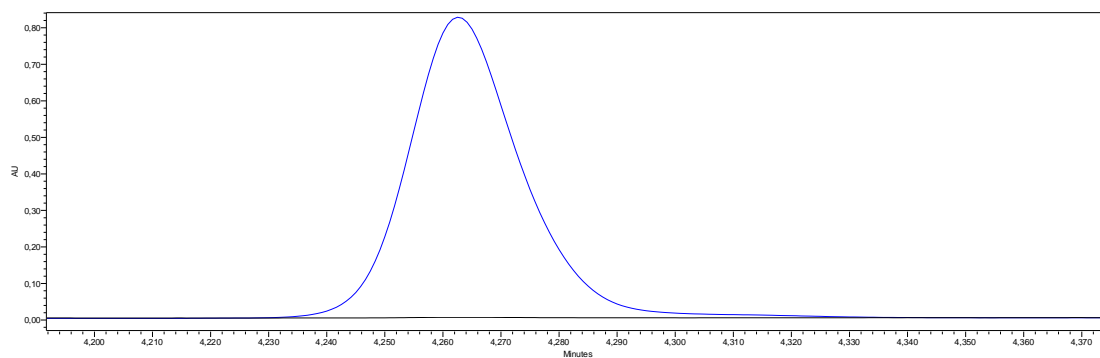


Figura F11: Oitava pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 254 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

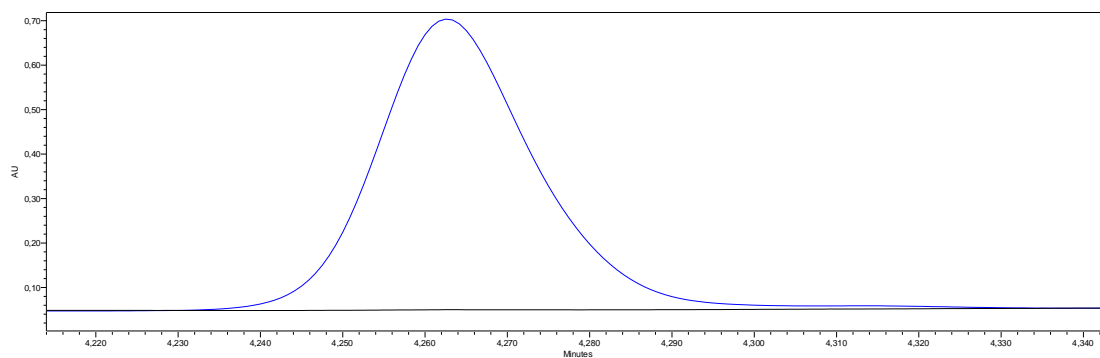


Figura F12: Oitava pré-experiência do DBA, cromatograma do método 1 a 240 nm. DBA - curva a preto e MDI - azul escuro.

## Anexo G: Análise do DOE referente à maximização da resposta do MDI a um comprimento de onda de 240 nm.

Tabela G1: ANOVA para o MDI a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	24417791441	1	24417791441	158,3642	Significativo
B	390932017477	1	390932017477	2535,4316	Significativo
AB	2033914723	1	2033914723	13,1912	Significativo
C	56345736	1	56345736	0,3654	
AC	141278597	1	141278597	0,9163	
BC	90557796	1	90557796	0,5873	
ABC	48633593	1	48633593	0,3154	
Erro	2467001005	16	154187563		
Total	420187540367	23			

**F(0,05;1;16)** 4,4940

Tabela G2: ANOVA condensada para o MDI a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	24417791441	1	24417791441	174,18	Significativo
B	390932017477	1	390932017477	2788,57	Significativo
AB	2033914723	1	2033914723	14,51	Significativo
Erro	2803816726	20	140190836		
Total	420187540367	23			

**F(0,05;1;20)** 4,3512

Tabela G3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o MDI a 240 nm.

<b>A-</b>	10306976
<b>A+</b>	9541452
<b>B-</b>	11455747
<b>B+</b>	8392681
<b>A-B-</b>	5864020
<b>A-B+</b>	4442956
<b>A+B-</b>	5591727
<b>A+B+</b>	3949725



Tabela G4: Melhor combinação de níveis para o MDI a 240 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	-1
B	-1
C	mais económico

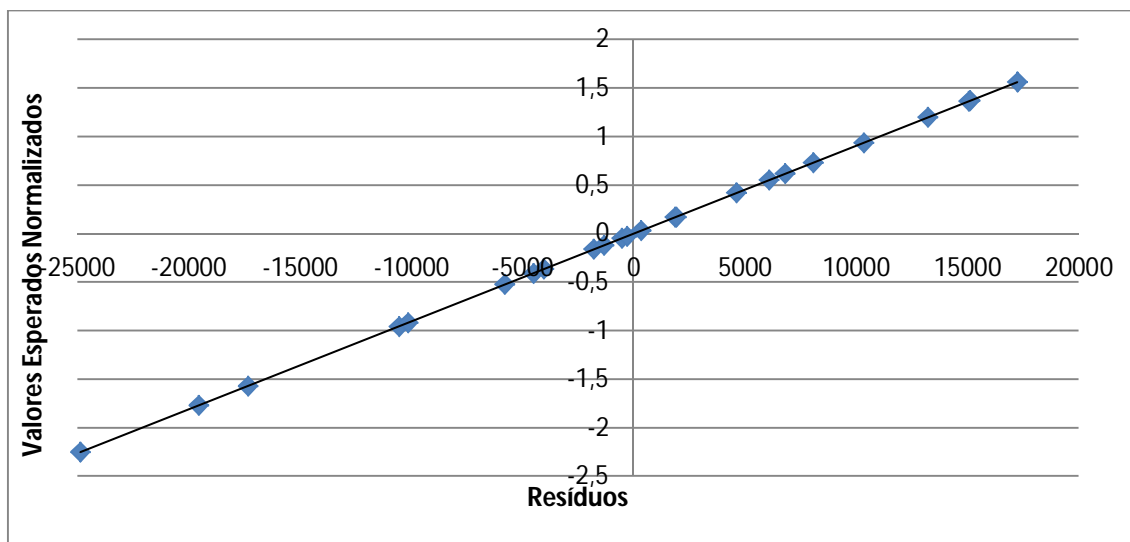


Figura G1: Verificação da Normalidade para o MDI a 240 nm. Gráfico de probabilidades da distribuição normal.

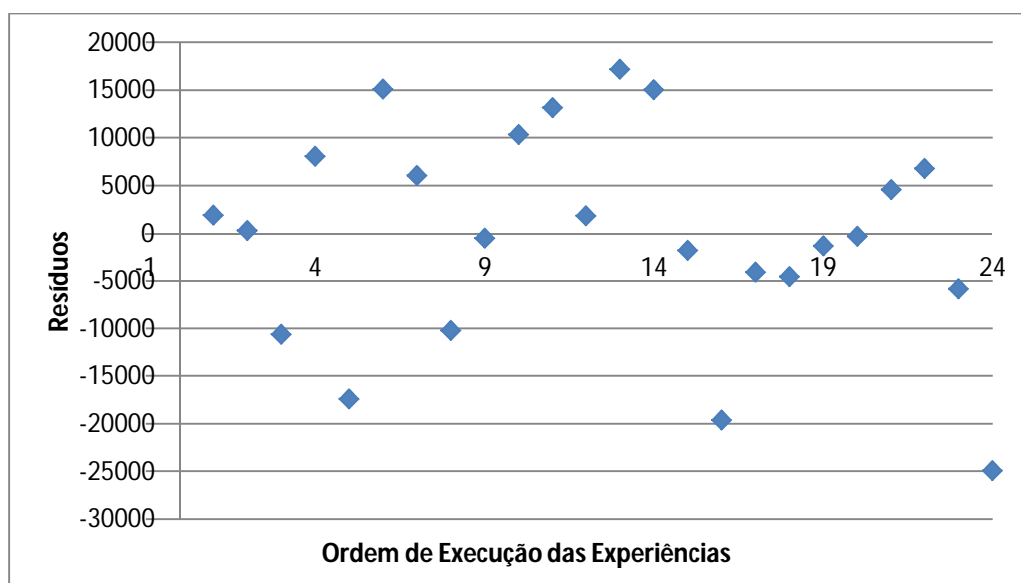


Figura G2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

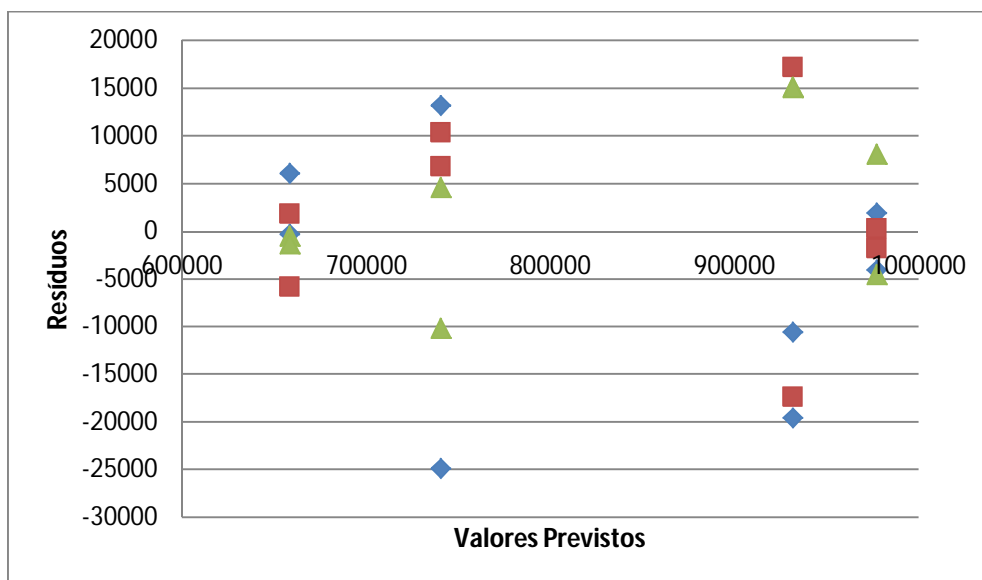


Figura G3: Variância das experiências do MDI a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.

## Anexo H: Análise do DOE referente à maximização da resposta do Dímero.

Tabela H1: ANOVA para o Dímero a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	32218636554	1	32218636554	208,8871	Significativo
B	144685494398	1	144685494398	938,0573	Significativo
AB	1537481957	1	1537481957	9,9681	Significativo
C	293483627	1	293483627	1,9028	
AC	85960378	1	85960378	0,5573	
BC	169861219	1	169861219	1,1013	
ABC	93307942	1	93307942	0,6050	
Erro	2467832126	16	154239508		
Total	181552058201	23			

<b>F(0,05;1;16)</b>	4,4940
---------------------	--------

Tabela H2: ANOVA condensada para o Dímero a um comprimento de onda de 240 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	32218636554	1	32218636554	207,1641	Significativo
B	144685494398	1	144685494398	930,3201	Significativo
AB	1537481957	1	1537481957	9,8859	Significativo
Erro	3110445293	20	155522265		
Total	181552058201	23			

<b>F(0,05;1;20)</b>	4,3512
---------------------	--------

Tabela H3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o Dímero a 240 nm.

A-	6790921
A+	7670266
B-	8162319
B+	6298867
A-B-	3909346
A-B+	2881574
A+B-	4252973
A+B+	3417293

Tabela H4: Melhor combinação de níveis para o Dímero a 240 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	2
B	0
C	mais económico

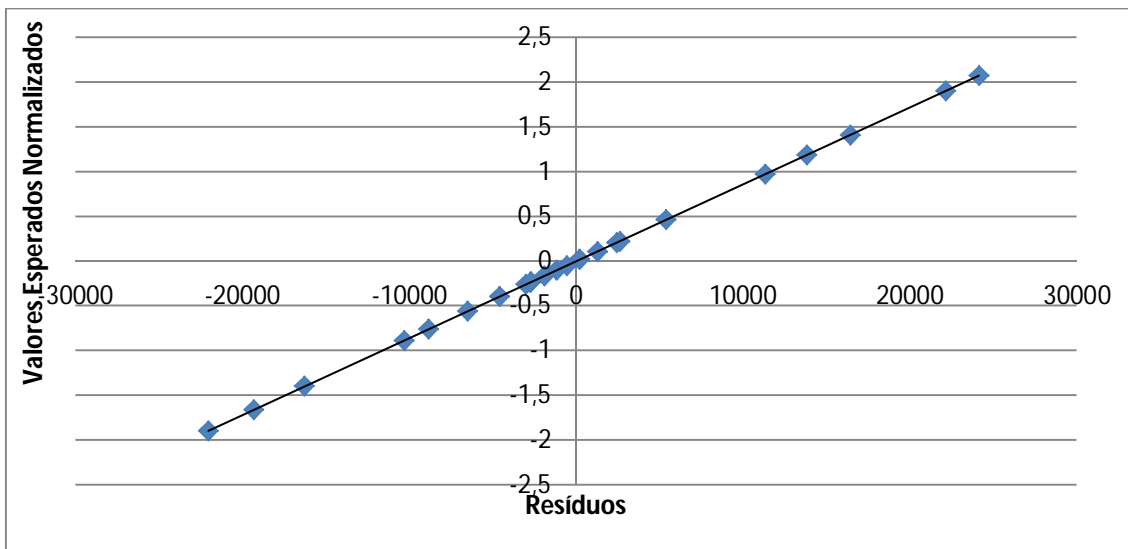


Figura H1: Verificação da Normalidade para o Dímero a 240 nm. Gráfico de probalidades da distribuição normal.

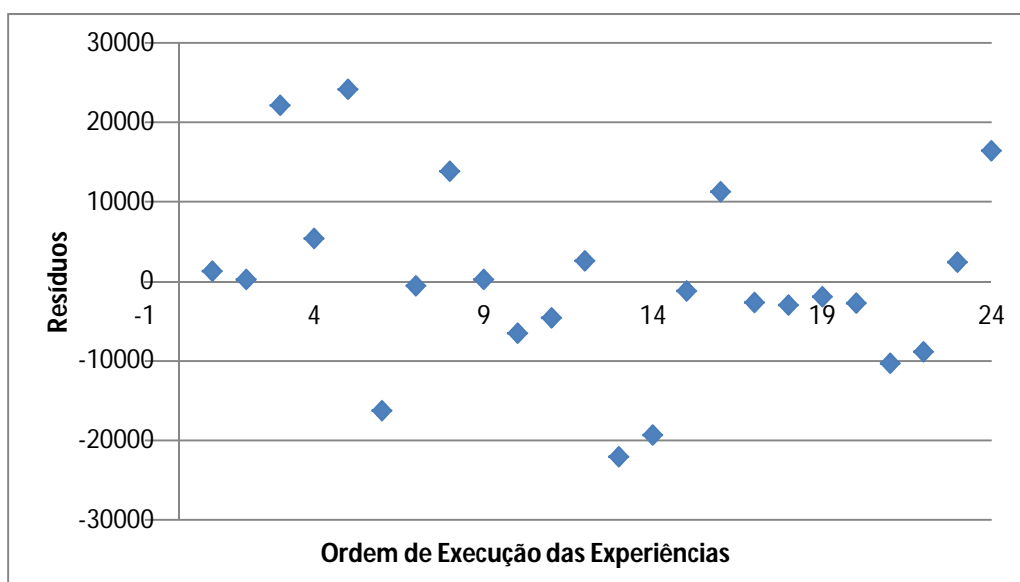


Figura H2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

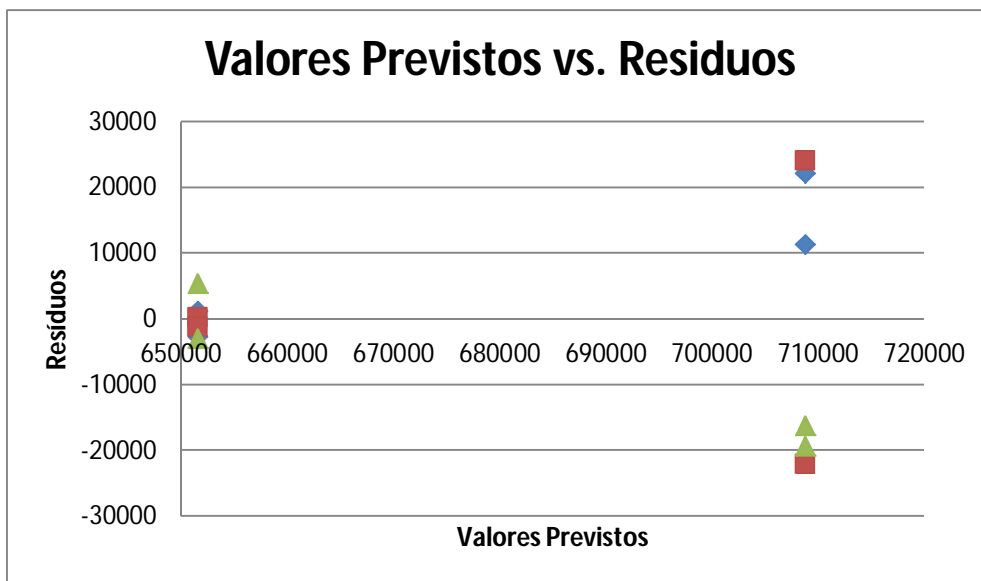


Figura H3: Variância das experiências do Dímero a 240 nm. Valores previstos vs. resíduos.

## Anexo I: Análise do DOE referente à maximização da resposta do 2,4 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Tabela I1: ANOVA para o 2,4 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	685180978	1	685180978	17,6960	Significativo
B	7262171012279	1	7262171012279	187558,4707	Significativo
AB	112829225	1	112829225	2,9140	
C	31802570898	1	31802570898	821,3579	Significativo
AC	15734252	1	15734252	0,4064	
BC	1195547562	1	1195547562	30,8771	Significativo
ABC	17863239	1	17863239	0,4613	
Erro	619512069	16	38719504		
Total	7296620250502	23			

<b>F(0,05;1;16)</b>	4,4940
---------------------	--------

Tabela I2: ANOVA condensada para o 2,4 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	685180978	1	685180978	17,00	Significativo
B	7262171012279	1	7262171012279	180146,58	Significativo
C	31802570898	1	31802570898	788,90	Significativo
BC	1195547562	1	1195547562	29,66	Significativo
Erro	765938785	19	40312568		
Total	7296620250502	23			

<b>F(0,05;1;19)</b>	4,3807
---------------------	--------

Tabela I3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o 2,4 – TDI a 254 nm.

<b>A-</b>	45716574
<b>A+</b>	45588338
<b>B-</b>	52253443
<b>B+</b>	39051469
<b>C-</b>	45215632
<b>C+</b>	46089280
<b>B-C-</b>	25865962
<b>B-C+</b>	26387481
<b>B+C-</b>	19349670
<b>B+C+</b>	19701799

Tabela I4: Melhor combinação de níveis para o 2,4 – TDI a 254 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	-1
B	-1
C	1

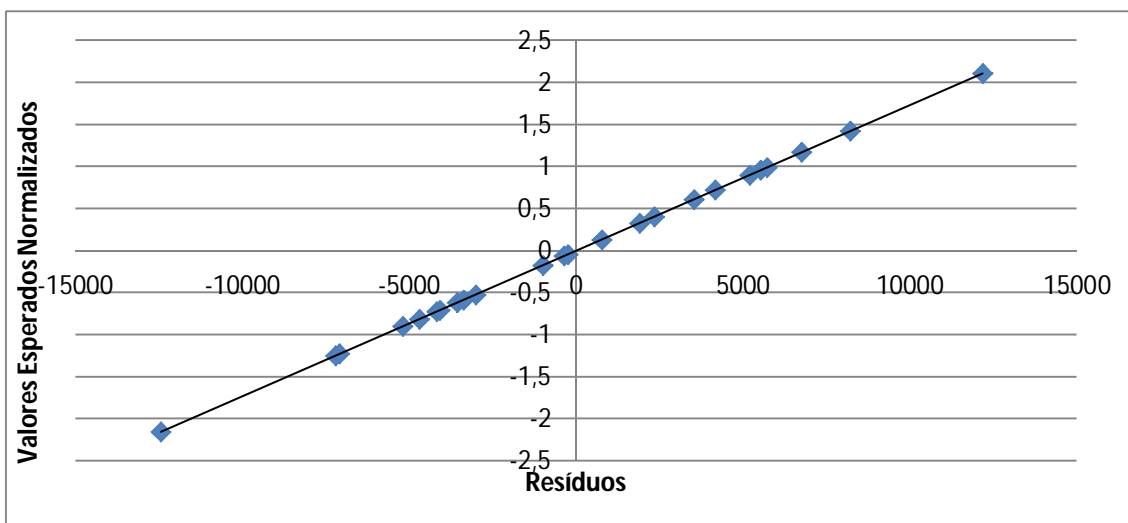


Figura I1: Verificação da Normalidade para o 2,4 - TDI a 254 nm. Gráfico de probabilidades da distribuição normal.

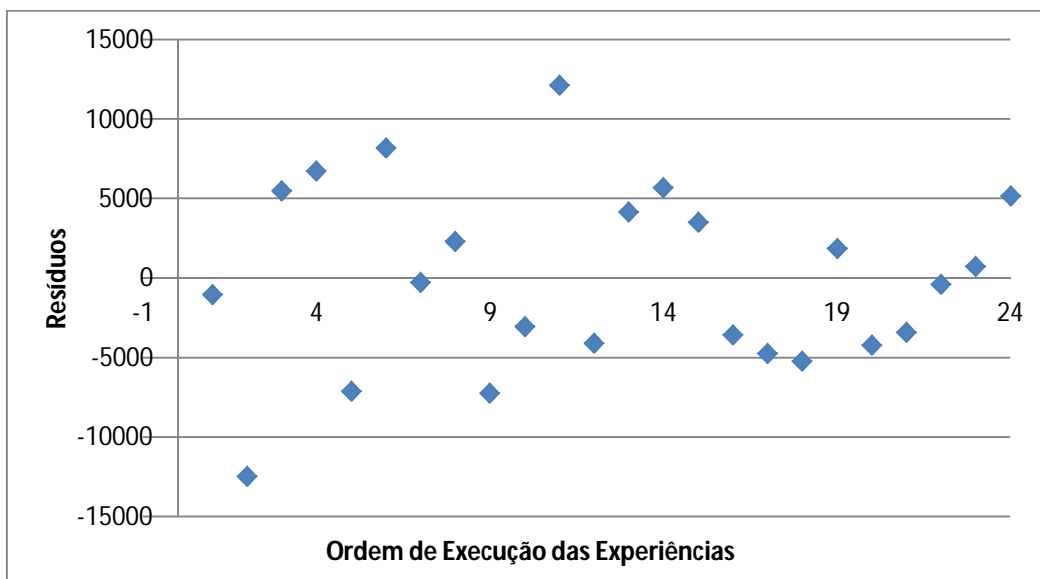


Figura I2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

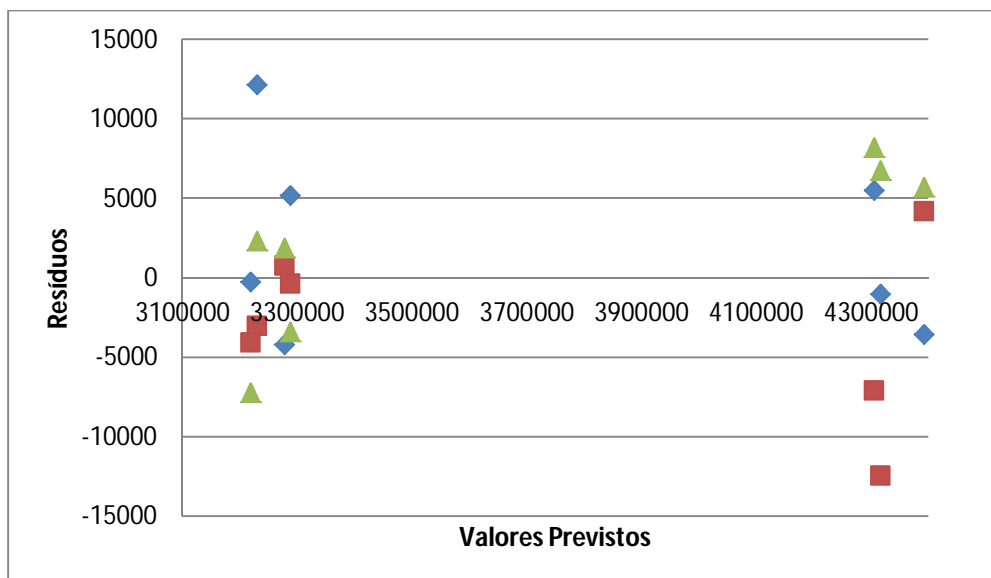


Figura I3: Variância das experiências do 2,4 - TDI a 254 nm. Valores previstos vs. resíduos.



## Anexo J: Análise do DOE referente à maximização da resposta do 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Tabela J1: ANOVA para o 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	3869256	1	3869256	0,6045	
B	278931961907	1	278931961907	43577,6981	Significativo
AB	73033493	1	73033493	11,4101	Significativo
C	4653581826	1	4653581826	727,0317	Significativo
AC	77689816	1	77689816	12,1375	Significativo
BC	454649093	1	454649093	71,0301	Significativo
ABC	8736870	1	8736870	1,3650	
Erro	102412738	16	6400796		
Total	284305934997	23			

<b>F(0,05;1;16)</b>	4,4940
---------------------	--------

Tabela J2: ANOVA condensada para o 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
B	278931961907	1	278931961907	43651,76	Significativo
AB	73033493	1	73033493	11,43	Significativo
C	4653581826	1	4653581826	728,27	Significativo
AC	77689816	1	77689816	12,16	Significativo
BC	454649093	1	454649093	71,15	Significativo
Erro	115018864	18	6389937		
Total	284305934997	23			

<b>F(0,05;1;18)</b>	4,4139
---------------------	--------

Tabela J3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para o 2,6 – TDI a 254 nm.

<b>B-</b>	10190047
<b>B+</b>	7602699
<b>A-B-</b>	5107899
<b>A-B+</b>	3793292
<b>A+B-</b>	5082148
<b>A+B+</b>	3809407
<b>C-</b>	8729276
<b>C+</b>	9063470
<b>A-C-</b>	4377842
<b>A-C+</b>	4523349
<b>A+C-</b>	4351434
<b>A+C+</b>	4540121
<b>B-C-</b>	4985360
<b>B-C+</b>	5204687
<b>B+C-</b>	3743916
<b>B+C+</b>	3858784

Tabela J4: Melhor combinação de níveis para o 2,6 – TDI a 254 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	1
B	-1
C	1

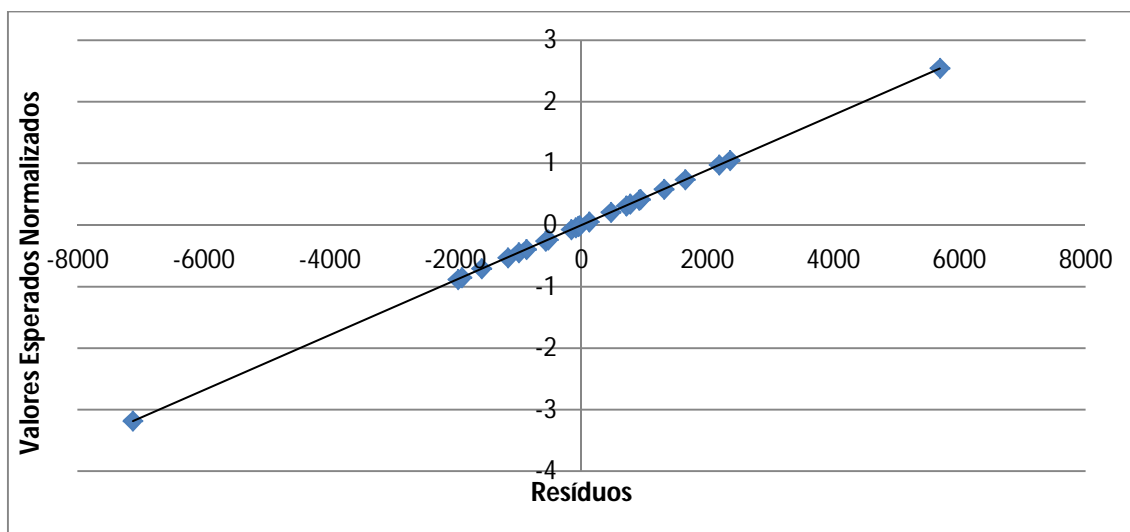


Figura J1: Verificação da Normalidade para o 2,6 – TDI a 254 nm. Gráfico de probabilidade da distribuição normal.G



Figura J2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

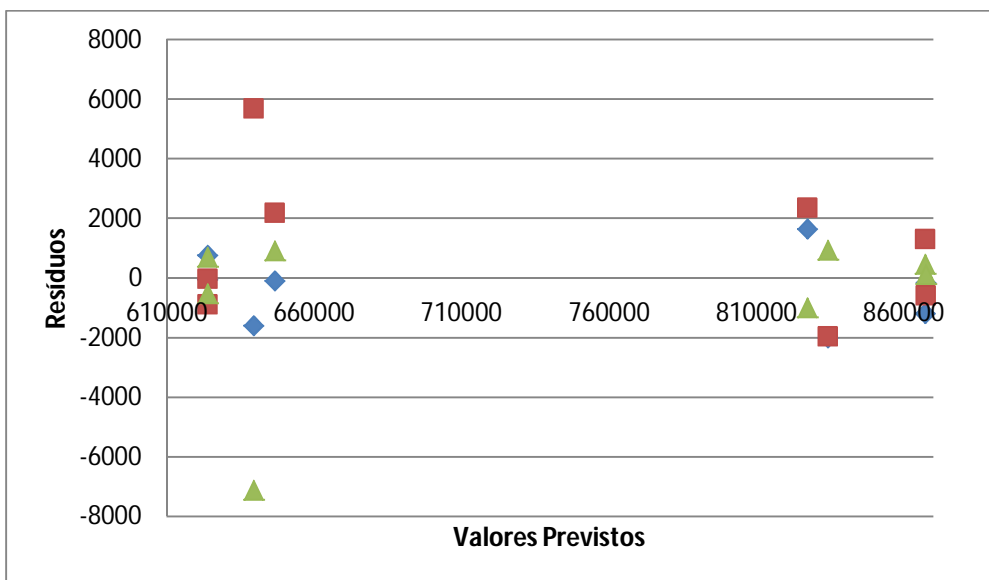


Figura J3: Variância das experiências do 2,6 - TDI a 254 nm. Valores previstos vs. resíduos.

## Anexo K: Análise do DOE referente à maximização da resolução entre o 2,4 – TDI e o 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Tabela K1: ANOVA para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	0,0037	1	0,0037	0,9206	
B	0,0817	1	0,0817	20,4332	Significativo
AB	0,2387	1	0,2387	59,7021	Significativo
C	0,0271	1	0,0271	6,7871	Significativo
AC	0,0049	1	0,0049	1,2162	
BC	0,0001	1	0,0001	0,0337	
ABC	0,0000	1	0,0000	0,0009	
Erro	0,0640	16	0,0040		
Total	0,4202	23			

$$F(0,05;1;16) = 4,4940$$

Tabela K2: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
B	0,0817	1	0,0817	22,4895	Significativo
AB	0,2387	1	0,2387	65,7101	Significativo
C	0,0271	1	0,0271	7,4701	Significativo
Erro	0,0727	20	0,0036		
Total	0,4202	23			

$$F(0,05;1;19) = 4,3807$$

Tabela K3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a 254 nm.

B-	26,2041
B+	24,8038
A-B-	13,7748
A-B+	11,8778
A+B-	12,4293
A+B+	12,9260
C-	25,1004
C+	25,9075

Tabela K4: Melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 – TDI a 254 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	-1
B	-1
C	1

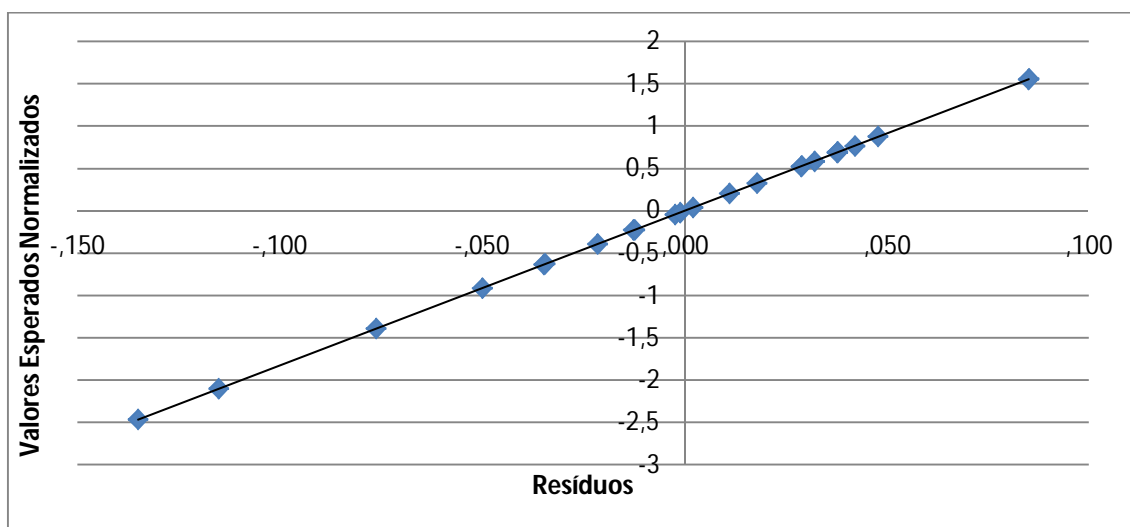


Figura K1: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI a 254 nm. Gráfico de probabilidade da distribuição normal.

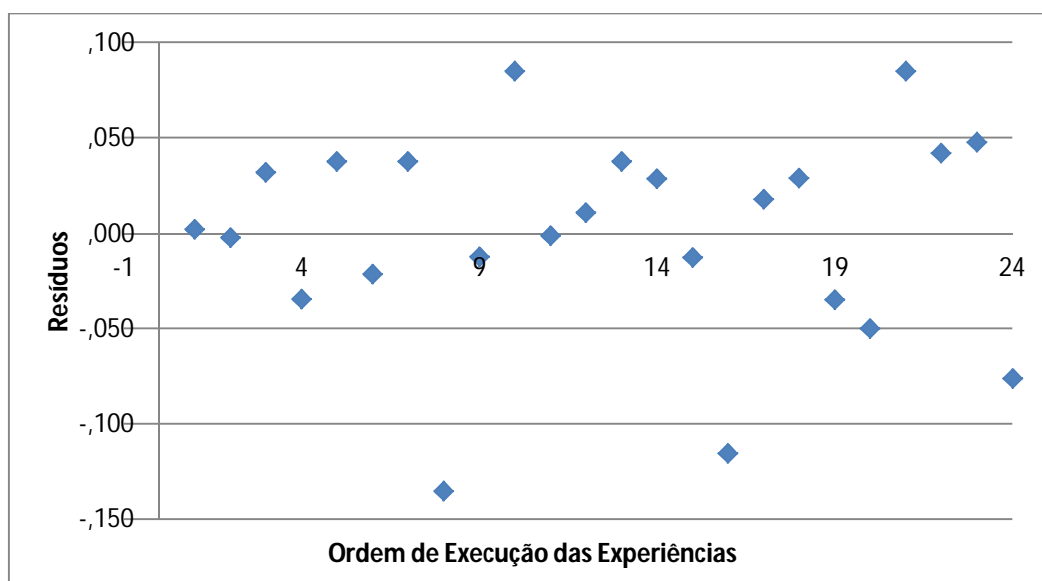


Figura K2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

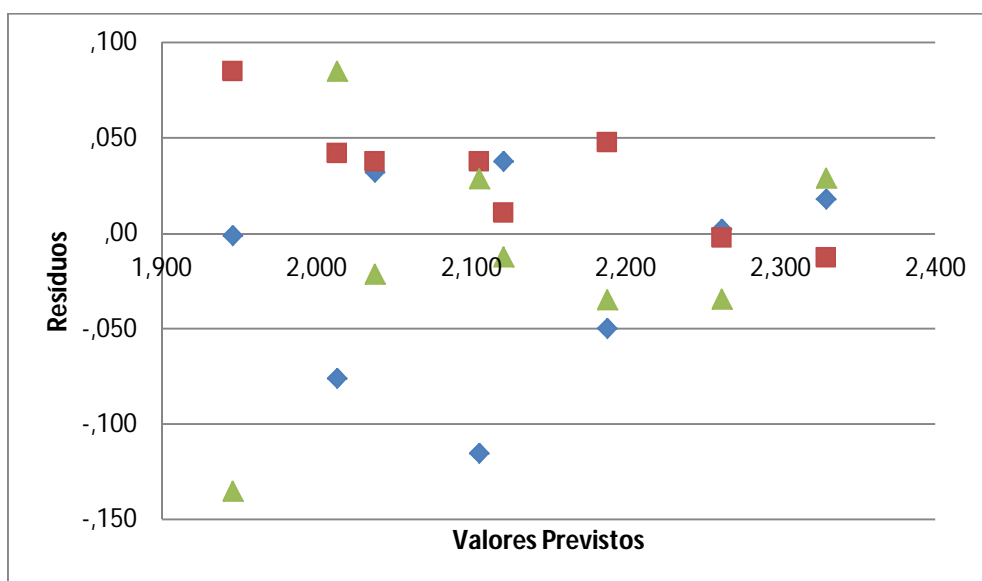


Figura K3: Variância das experiências da resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do 2,6 - TDI a 254 nm. Valores previstos vs. Resíduos.

## Anexo L: Análise do DOE referente à maximização da resolução entre o 2,4 – TDI e o MDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Tabela L1: ANOVA para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	28,2701	1	28,2701	2008,6131	Significativo
B	0,7333	1	0,7333	52,1036	Significativo
AB	0,0042	1	0,0042	0,2989	
C	0,3982	1	0,3982	28,2928	Significativo
AC	0,0871	1	0,0871	6,1917	Significativo
BC	0,0199	1	0,0199	1,4153	
ABC	0,0228	1	0,0228	1,6202	
Erro	0,2252	16	0,0141		
Total	29,7609	23			

**F(0,05;1;16)** 4,4940

Tabela L2: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	28,2701	1	28,2701	1973,8727	Significativo
B	0,7333	1	0,7333	51,2025	Significativo
C	0,3982	1	0,3982	27,8035	Significativo
AC	0,0871	1	0,0871	6,0846	Significativo
Erro	0,2721	19	0,0143		
Total	29,7609	23			

**F(0,05;1;19)** 4,3807

Tabela L3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 254 nm.

A-	85,2626
A+	111,3103
B-	100,3841
B+	96,1888
C-	96,7407
C+	99,8322
A-C-	42,2200
A-C+	43,0426
A+C-	54,5207
A+C+	56,7896

Tabela L4: Melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 254 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	1
B	-1
C	1

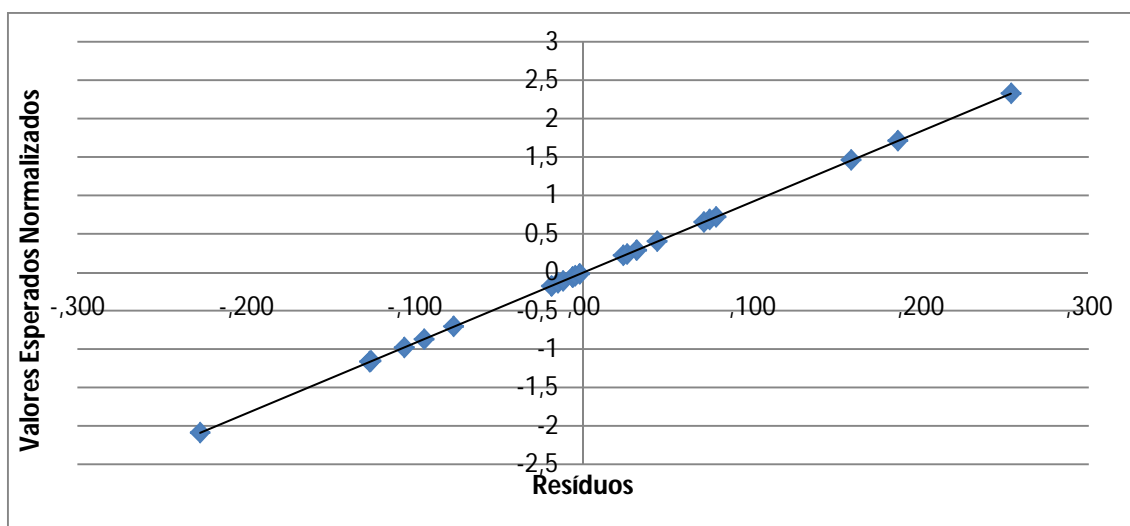


Figura L1: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 254 nm. Gráfico de probabilidade da distribuição normal.



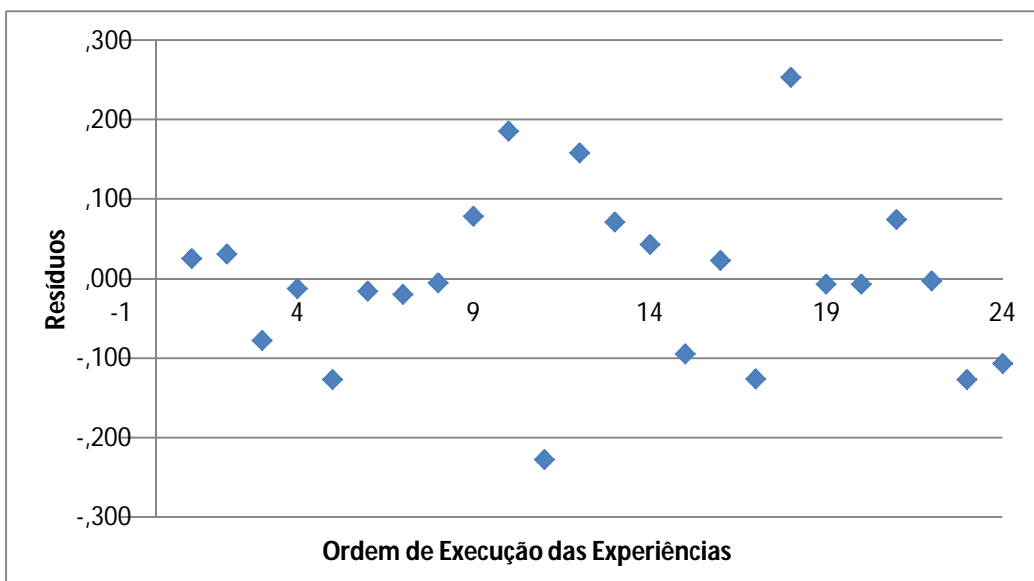


Figura L2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

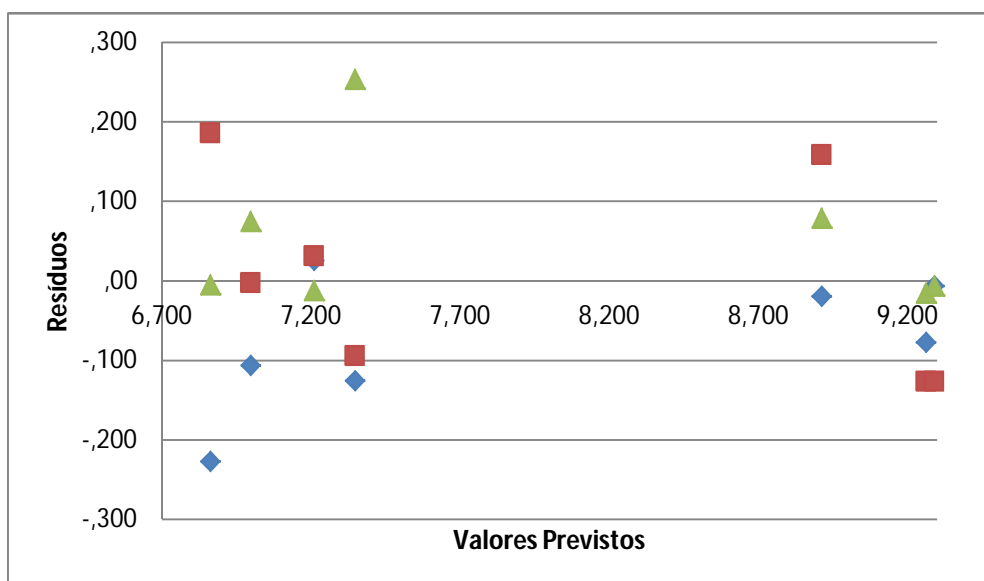


Figura L3: Variância das experiências d a resolução entre o pico do 2,4 – TDI e o pico do MDI a 254 nm. Valores previstos vs. Resíduos.

## Anexo M: Análise do DOE referente à maximização da resolução entre o MDI e o Dímero a um comprimento de onda de 254 nm.

Tabela M1: ANOVA para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	2,1577	1	2,1577	758,9190	Significativo
B	0,0697	1	0,0697	24,5270	Significativo
AB	0,0697	1	0,0697	24,5270	Significativo
C	0,0003	1	0,0003	0,1187	
AC	0,0003	1	0,0003	0,1187	
BC	0,0005	1	0,0005	0,1910	
ABC	0,0005	1	0,0005	0,1910	
Erro	0,0455	16	0,0028		
Total	2,3444	23			

<b>F(0,05;1;16)</b>	4,4940
---------------------	--------

Tabela M2: ANOVA condensada para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a um comprimento de onda de 254 nm.

Fonte de Variação	SS	g.l.	MS	F0	
A	2,1577	1	2,1577	913,2976	Significativo
B	0,0697	1	0,0697	29,5163	Significativo
AB	0,0697	1	0,0697	29,5163	Significativo
Erro	0,0473	20	0,0024		
Total	2,3444	23			

<b>F(0,05;1;20)</b>	4,3512
---------------------	--------

Tabela M3: Valores para se identificar a melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 254 nm.

A-	0,0000
A+	7,1961
B-	2,9512
B+	4,2449
A-B-	0,0000
A-B+	0,0000
A+B-	2,9512
A+B+	4,2449

Tabela M4: Melhor combinação de níveis para a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 254 nm.

Melhores Níveis	Nível
A	1
B	1
C	mais económico

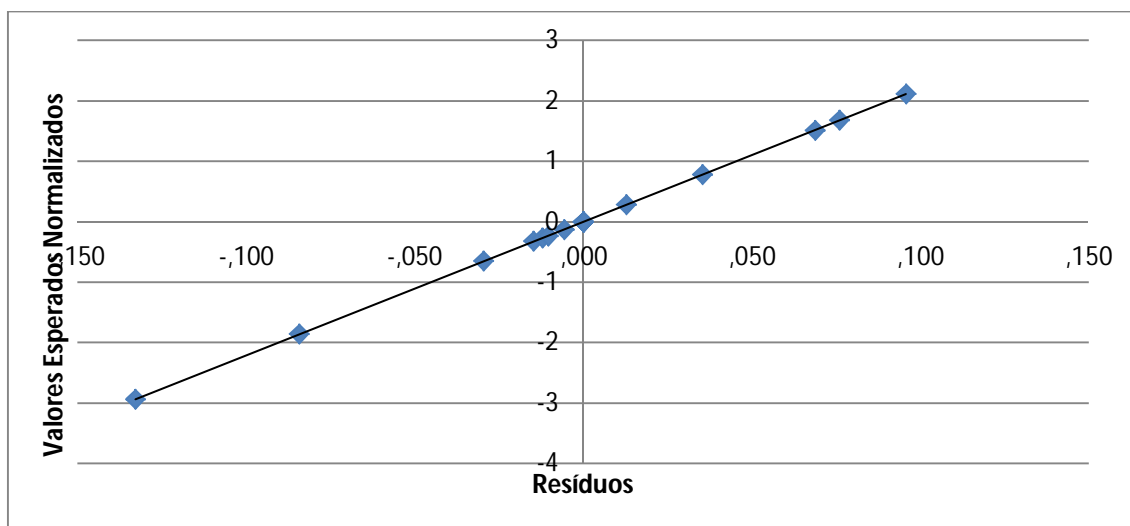


Figura M1: Verificação da Normalidade para a resolução entre o pico do MDI e o pico Dímero a 254 nm. Gráfico de probabilidades da distribuição normal.

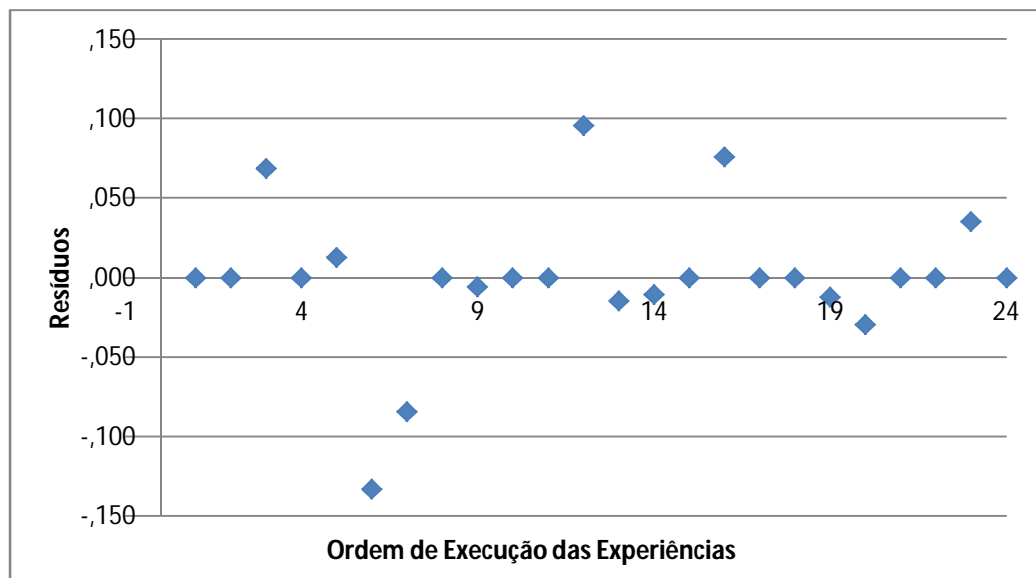


Figura M2: Verificação da ordem aleatória das experiências. Resíduos vs. sequência das experiências.

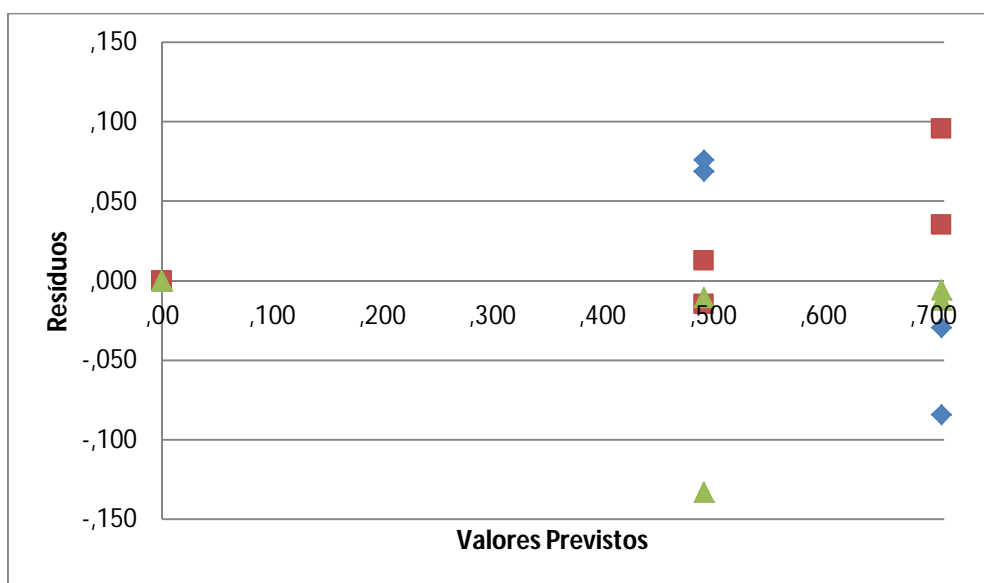


Figura M3: Variância das experiências de a resolução entre o pico do MDI e o pico do Dímero a 254 nm. Valores previstos vs. Resíduos.