

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Tecnología Química.

Esta Tesis ha sido presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de Doctor en Tecnología Química.

**CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS SINTÉTICOS Y
NATURALES POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE
EXCLUSIÓN. ESTIMACIÓN DEL ENSANCHAMIENTO
INSTRUMENTAL Y OTROS PROBLEMAS**

Por

Bioq. Mariana Yossen

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC), dependiente de la Universidad Nacional del Litoral (UNL) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Director de Tesis: Dr. Jorge R. Vega

Co-Director de Tesis: Dr. Gregorio R. Meira

Miembros del Jurado: Dr. José L. Alessandrini

Dr. Luis M. Gugliotta

Ing. Rolando J. González

A Alejandro y a mis Padres

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a todos aquellos que han colaborado en la realización de este trabajo, y en especial a:

- Mi director, Dr. Jorge R. Vega, y mi codirector, Dr. Gregorio R. Meira, por su permanente estímulo y apoyo.
- A mi compañera de oficina: Carla, por escucharme y por su colaboración.
- A los demás miembros del Grupo de Polímeros: Marcelo, José Luis, Luis, Diana, Patricia, Verónica, Carolina, Natalia y Roque, por su colaboración.
- A la Dra. Noemí Andreucetti, Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Quitina (LIBAQ, Departamento de Química, Univ. Nacional del Sur), por proveerme las muestras de quitosanos.
- Al plantel docente de la Cátedra de Química Analítica I, de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL), por su constante estímulo.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por la ayuda económica brindada.
- A mis padres y hermanas, por su colaboración desde los comienzos de mi carrera y su apoyo incondicional.
- A mis suegros, cuñadas y cuñados, por su constante preocupación y sus palabras de aliento.
- A los abuelos (los que están y los que no), por haberme escuchado siempre.
- A Alejandro, por ser parte de mi vida y estar siempre a mi lado.

Resumen

En esta tesis, se desarrollan diversos aspectos relacionados con la cromatografía líquida de exclusión con múltiple detección (MD-SEC), como técnica para la caracterización molecular de polímeros. Se analiza la utilización de diferentes sensores de masa (refractómetro diferencial, DR, y detector UV), y de masa molar (detector de viscosidad específica, SV, y de dispersión de luz, LS). En particular, se ataca el problema de las calibraciones en MD-SEC, la determinación de la función de ensanchamiento instrumental (E.I.), la caracterización de polímeros cromatográficamente complejos, y el análisis de polímeros hidrosolubles, con un enfoque tanto teórico como experimental.

En el Capítulo II, se estudia experimentalmente, la propagación de los errores de calibración sobre la distribución de masas molares (DMM), utilizando estándares angostos de poliestireno (PS). Las notables diferencias halladas en las distintas calibraciones calculadas, se atribuyen a diferentes fuentes de error. En SEC / DR, los errores se deben a las diferentes masas molares medias (M) informadas por los proveedores de los estándares, que originan incertidumbres tanto en el modo de asignar cada M a un volumen de retención (V), como en la forma de la calibración (lineal o no lineal). En SEC con detección de masa molar, existen varias fuentes de error: (i) las constantes de calibración de los sensores; (ii) la concentración de los estándares; (iii) las constantes de Mark-Houwink-Sakurada (MHS); (iv) el E.I.; y (v) el volumen interdetector (IDV). A partir de simulaciones numéricas, se estudiaron en forma independiente los efectos de los principales errores sobre las calibraciones *ad hoc* típicas de los sistemas de MD-SEC. Los ejemplos simulados permitieron justificar las importantes diferencias observadas en las calibraciones obtenidas experimentalmente. Los errores de estimación son mucho más severos en polímeros que exhiben una DMM angosta.

En el Capítulo III, se propone un método teórico para estimar la función (asimétrica) de E.I. en SEC, a partir de la calibración de masa molar y de los cromatogramas de concentración y de masa molar de un conjunto de estándares angostos. En el rango estrecho de cada estándar, la función de E.I. se asumió uniforme pero asimétrica. Cada función de E.I. uniforme se estimó a través de un procedimiento de optimización no lineal que compara uno (de los 2) cromatogramas medidos con su predicción teórica basada en el otro cromatograma. El método se validó con ejemplos numéricos que simulan el análisis de estándares angostos. La función de E.I. se asumió de forma arbitraria, o representada por una Gaussiana modificada exponencialmente (EMG). El método de estimación de la función de E.I. se extendió a SEC con triple detección. En esta metodología no se necesita, en principio, conocer la calibración de masa molar pero requiere la pendiente de MHS, α , del polímero analizado. Además, se propone un método para corregir por E.I. un cromatograma medido sin conocer explícitamente la función de E.I., cuando se cuenta con los cromatogramas DR + LS (o DR + SV), la calibración de masa molar y la constante α de MHS (en el caso de detección DR + SV).

En el Capítulo IV, se aplicó el método teórico de estimación de la función de E.I. a dos conjuntos de experimentos independientes, que involucran diferentes cromatógrafos, columnas y detectores: (i) SEC / (DR + LS) con estándares angostos de PS y sus fracciones aun más angostas, obtenidas por cromatografía de interacción por gradiente de temperatura, y (ii) SEC / (DR + SV) con estándares comerciales de PS. El IDV es en general desconocido, especialmente para detectores en paralelo. Para detectores en serie, el límite superior del IDV está dado por la separación entre los picos de los cromatogramas de LS (o SV) y el DR. En el caso de detección DR + LS (configuración en serie) se obtuvo un único valor de IDV y se estimó la función de E.I. EMG para cada uno de los estándares analizados. En el caso de detección DR + SV (configuración en paralelo)

es imposible obtener un único valor de IDV, ya que este parámetro depende del M del estándar analizado (en general, a mayor M , mayor IDV). Finalmente, los parámetros de la EMG estimada se interpolaron para obtener la función de E.I. no uniforme en todo el rango de fraccionamiento. Las funciones de E.I. estimadas resultaron más asimétricas a V menores (mayores M).

En el Capítulo V, se propusieron modelos representativos del proceso de fraccionamiento SEC ideal de dos polímeros cromatográficamente complejos: un copolímero lineal dibloque, y un homopolímero ramificado, con ramas trifuncionales largas. Se derivaron las expresiones para calcular los cromatogramas libres de E.I. provistos por diversos sensores (DR, UV, LS, y SV); y se cuantificaron los errores cometidos cuando se estiman la DMM, la DCQ y la DGR por métodos convencionales, en base a ejemplos simulados. Un copolímero dibloque de estireno-butadieno (SB) analizado por SEC / (DR + UV) con el enfoque clásico de interpolar las calibraciones de los homopolímeros con la composición química, subestima las masas molares medias. Mejores estimaciones de la DMM se logran cuando se agrega un tercer sensor de LS. La DCQ estimada difiere notablemente de la “real”, debido a la incapacidad de SEC para fraccionar por composición química. En el caso de un homopolímero ramificado analizado por SEC / DR, las masas molares medias calculadas por combinación de la calibración universal con las constantes de MHS, resultaron subestimadas; y las estimaciones más exactas de la DMM se lograron cuando se agregó un tercer sensor SV. Tampoco en este caso, el sensor SV contribuye a mejorar la DGR estimada, resultando valores medios del número de ramas notoriamente inferiores a los reales.

En el Capítulo VI, se analizaron por SEC polímeros solubles en agua. Se evaluaron las características de fraccionamiento de las columnas, y se atacó el problema de la calibración del sistema acuoso con diferentes estándares cromatográficos de

polisacáridos neutros (pululanos lineales y dextranos ramificados), utilizando distintas fases móviles, y tratando de verificar el fraccionamiento por exclusión pura. Para las columnas utilizadas, dicho fraccionamiento se logró utilizando agua como fase móvil; mientras que en una fase móvil ácida, se observó una cierta interacción por repulsión electrostática. Se estimaron masas molares absolutas de poli(ácido acrílico) por SEC / DR, utilizando información sobre sus constantes de MHS y las calibraciones de pululanos. Se caracterizaron por SEC / DR, muestras de quitosanos y de oligoquitosanos obtenidos por depolimerización inducida con distintas dosis de radiación γ . Se estimaron las DMMs en base a la calibración directa con pululanos, verificándose que las masas molares medias y la polidispersión disminuyen con la dosis de radiación. Las mismas muestras se analizaron por SEC / (DR + LS) donde se detectó la presencia de agregados de mayor M . Aunque las masas molares medias estimadas difirieron de los valores obtenidos con la calibración directa, se conservó la tendencia de M decrecientes para dosis de radiación crecientes. Por último, se analizaron biopolímeros neutros (dextranos y almidón de mandioca). Se determinó la DMM de una muestra comercial de dextrano por SEC / DR, utilizando la calibración directa obtenida con estándares de dextranos. En el caso del almidón, previo a su análisis por SEC se aplicó una técnica de separación destinada a fraccionar sus dos componentes principales: amilosa y amilopectina. Todas las muestras se analizaron por SEC / DR. Los cromatogramas del almidón total mostraron una bimodalidad indicativa de que la fracción de amilopectina en solución aumenta con el incremento de la temperatura de tratamiento de las muestras. Los cromatogramas de las fracciones permitieron una cuantificación aproximada de las masas molares de amilosa y amilopectina, en base a las calibraciones con dextranos y pululanos. Valores absolutos más confiables de las masas molares medias sólo pueden ser obtenidos por SEC con detección de masa molar.

Índice General

Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	iii
Índice General	vii
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tablas	xx
Abreviaturas.....	xxiii
Prólogo	1
CAPÍTULO I. Cromatografía Líquida de Exclusión con Múltiple Detección.	
Consideraciones Generales.....	4
I.1. Introducción	4
I.1.a. Conceptos Básicos.....	5
I.1.a.i) Polímeros Simples y Complejos	6
I.1.a.ii) Distribución de Masa Molar	7
I.1.a.iii) Partición Controlada por la Entropía	11
I.1.a.iv) Viscosidad Intrínseca y Volumen Hidrodinámico	12
I.1.a.v) Resolución y Eficiencia de Columna en SEC	16
I.1.b. Detectores.....	17
I.1.b.i) Refractómetro Diferencial (DR)	18
I.1.b.ii) Sensor UV	19
I.1.b.iii) Detectores de Dispersión de Luz (LS).....	21
I.1.b.iv) Detectores de Viscosidad Específica (SV).....	24
I.1.c. Calibraciones de Masa Molar.....	27
I.1.c.i) Calibración Directa: $\log M(V)$	27
I.1.c.ii) Calibración Universal: $\log J(V)$	28
I.1.c.iii) Calibraciones “ <i>Ad Hoc</i> ”	29
I.2. Tratamiento de Datos en SEC.....	30
I.2.a. Estimación de la Distribución de Masas Molares (DMM).....	30
I.2.a.i) DMM de un Homopolímero Lineal	30
I.2.a.ii) DMM de un Copolímero.....	31
I.2.a.iii) DMM de un Homopolímero Ramificado.....	32

I.2.b. Estimación de Masas Molares Medias Globales.....	33
I.2.c. Estimación de Otras Distribuciones	34
I.2.c.i) DCQ en Copolímeros	34
I.2.c.ii) DGR en Homopolímeros Ramificados	34
I.2.d. Principales Fuentes de Error en SEC	35
I.2.d.i) Fuentes de Error Básicas.....	35
I.2.d.ii) El Volumen Interdetector (IDV).....	37
I.2.d.iii) El Ensanchamiento Instrumental (E.I.).....	38
I.3. Modelos de Fraccionamiento.....	39
I.3.a. Modelos de Fraccionamiento en las Columnas	39
I.3.a.i) Modelos de Equilibrio o Termodinámicos.....	39
I.3.a.ii) Modelos Estocásticos.....	43
I.3.b. Efectos Extra-Columnas.....	44
I.3.c. Modelos Fenomenológicos Globales	46
I.4. El Ensanchamiento Instrumental en SEC	48
I.4.a. Estimación del E.I.	49
I.4.b. Corrección por E.I.	52
I.5. Análisis de Polímeros Cromatográficamente Complejos	56
I.5.a. Copolímeros y Polímeros Ramificados.....	57
I.5.b. Biopolímeros y Polielectrolitos.....	59
CAPÍTULO II. Análisis y Evaluación de las Calibraciones Utilizadas en MD-	
SEC, y su Relación con el Ensanchamiento Instrumental	66
II.1. Introducción.....	66
II.2. Incertidumbres en la Determinación de la Calibración Directa en SEC / DR....	69
II.2.a. Propagación de Errores a la DMM Estimada.....	73
II.3. Incertidumbres en la Determinación de las Calibraciones Involucradas en	
SEC / (DR + SV)	75
II.3.a. Calibración de Masa Molar.....	75
II.3.b. Incertidumbre en la Calibración de Concentración	76
II.3.c. Calibración Universal	78
II.3.d. Propagación de Errores a la DMM Estimada	80
II.4. Estudio Teórico de los Errores Cometidos en las Curvas de Calibración “Ad	
Hoc” Medidas	82

II.4.a. Calibración “ <i>Ad Hoc</i> ” en SEC / (DR + LS)	83
II.4.b. Calibración “ <i>Ad Hoc</i> ” en SEC / (DR + SV)	86
II.4.c. Errores en la DMM Estimada Utilizando las Calibraciones “ <i>Ad Hoc</i> ”	89
II.4.c.i) Detección DR + LS	89
II.4.c.ii) Detección DR + SV	90
II.5. Conclusiones.....	92
CAPÍTULO III. Nuevos Desarrollos en la Estimación de la Función de E.I.	95
III.1. Introducción	95
III.2. Estimación Teórica de la Función de E.I. en SEC, a partir de Estándares Angostos de PS y con Calibración de Masa Molar Conocida y Detección de Masa y Masa Molar	97
III.2.a. Estimación de la Función de E.I. Arbitraria	98
III.2.b. Estimación de la Función de E.I. EMG	101
III.2.b.i) Criterios para la Selección Inicial de la Función de E.I.	101
III.2.c. Ejemplos Simulados	103
III.2.c.i) Estimación de la Función de E.I. Uniforme Arbitraria	107
III.2.c.ii) Estimación de la Función de E.I. Uniforme Mediante una EMG ...	111
III.2.c.iii) Chequeos de Robustez del Método Propuesto	112
III.3. Extensión del Método de Estimación de la Función de E.I. al caso de Triple Detección	115
III.4. Corrección por E.I. en MD-SEC de Polímeros Simples, sin Conocimiento Explícito de la Función de E.I.	119
III.4.a. Ejemplos de Simulación	122
III.5. Conclusiones	129
CAPÍTULO IV. Estimación de la Función de E.I.: Aplicaciones en los Casos de SEC / (DR+LS) y SEC / (DR+SV)	132
IV.1. Introducción	132
IV.2. Estimación Experimental del E.I. en SEC / DR + LS	135
IV.2.a. Medición de Estándares Angostos de PS	136
IV.2.b. Estimación de la Función de E.I.	137
IV.2.c. Estimación de las DMMs de los Estándares de PS	142

IV.3. Estimación Experimental del E.I. en SEC / (DR+SV).....	145
IV.3.a. Medición de Estándares Angostos de PS	146
IV.3.b. Obtención de la Función de E.I.	148
IV.3.c. Estimación de las DMMs de los Estándares de PS	153
IV.4. Conclusiones	155
CAPÍTULO V. Estudio Teórico sobre los Errores Cometidos en la	
 Caracterización por SEC de Copolímeros Lineales y de Homopolímeros	
 Ramificados.....	157
V.1. Introducción.....	157
V.2. Modelo de Fraccionamiento SEC de un Copolímero Dibloque.....	160
V.2.a. Predicción de Variables asociadas al Fraccionamiento de las Moléculas del Copolímero Dibloque.....	160
V.2.b. Cálculo de los Cromatogramas (Libres de E.I.) de un Copolímero Dibloque de SB	167
V.2.b.i) Cálculo de las Distribuciones Instantáneas	168
V.2.b.ii) Cálculo de los Cromatogramas	170
V.2.c. Ejemplo de Simulación.....	170
V.2.d. Análisis de los Errores Cometidos en la DMM y en la DCQ Estimadas .	175
V.3. SEC de Homopolímeros Ramificados.....	177
V.3.a. Predicción de Variables asociadas al Fraccionamiento de las Moléculas del Homopolímero Ramificado.....	177
V.3.b. Cálculo de los Cromatogramas (Libres de E.I.) de un Homopolímero Ramificado de PVAc	181
V.3.b.i) Cálculo de las Distribuciones Instantáneas	182
V.3.b.ii) Cálculo de los Cromatogramas	184
V.3.c. Ejemplo de Simulación.....	184
V.3.d. Análisis de los Errores Cometidos en la DMM y en la DGR Estimadas .	189
V.4. Conclusiones	191
CAPÍTULO VI. SEC de Fase Acuosa: Análisis de Algunos Polielectrolitos y	
 Biopolímeros	193
VI.1. Introducción	193
VI.2. Sistema Cromatográfico en Fase Acuosa.....	196

VI.2.a. Evaluación de las Columnas de Fraccionamiento. Cálculo del Número de Platos Teóricos	197
VI.2.b. Calibraciones con Estándares de Pululanos y Dextranos.....	199
VI.3. SEC de Polímeros Hidrosolubles.....	204
VI.3.a. Análisis de Polielectrolitos Aniónicos: Estimación de la DMM de PAA Comercial por SEC/DR.....	205
VI.3.b. Análisis de Biopolímeros Catiónicos: Estimación de la DMM de Quitosanos Irradiados por SEC / DR y SEC / (DR + LS).....	207
VI.3.b.i) Estimación de la DMM de Quitosanos por SEC / DR. Efecto de la R- γ sobre las Masas Molares Medias del Quitosano Irradiado	210
VI.3.b.ii) Análisis de Quitosanos por SEC / (DR + LS).....	213
VI.3.c. Análisis de Biopolímeros Neutros: Dextranos y Almidones.....	218
VI.3.c.i) DMM de una Muestra de Dextrano Comercial por SEC / DR.....	218
VI.3.c.ii) Muestras de Almidón de Mandioca. Descripción de la Técnica de Extracción y Separación de Amilosa y Amilopectina.....	220
VI.3.c.iii) Análisis de Amilosa y Amilopectina por SEC / DR	221
VI.4. Conclusiones	227
CAPÍTULO VII. Conclusiones y Sugerencias para Trabajos Futuros	230
APÉNDICE I. Descripción de las Diferentes Distribuciones Utilizadas en esta Tesis	237
I.1. Distribuciones de Longitud de Cadena y de Masas Molares Típicas	237
I.2. Distribuciones representativas de la Función de E.I.....	238
APÉNDICE II. Simulación de los Cromatogramas y de las Calibraciones <i>Ad Hoc</i> de un Homopolímero Lineal	241
APÉNDICE III. Construcción de la Matriz de E.I. no Uniforme	245
Nomenclatura	247
Referencias.....	261

Índice de Figuras

Figura I.1. Diagrama esquemático de un cromatógrafo para SEC. Los principales componentes son: una bomba isocrática, un inyector (manual o automático), las columnas de fraccionamiento, y el sistema de detección.....	6
Figura I.2. Calibración de masa molar típica.....	9
Figura I.3. Detectores de viscosidad. a) Viscosímetro de dos capilares en serie. b) Detector Viscotek, Modelo 200, con refractómetro diferencial y viscosímetro de puente de Wheatstone.....	26
Figura II.1. Cromatogramas DR de estándares de PS.	70
Figura II.2. Calibración directa con estándares de PS: a) polinomio de orden 3; b) polinomio de orden 1 (para sólo los 4 estándares intermedios).....	71
Figura II.3. Incertidumbres en los \overline{M}_n 's estimados a partir de las calibraciones directas: a) polinomio de orden 3, y b) polinomio de orden 1. (Los símbolos se corresponden con los de la Fig. II.2.).....	72
Figura II.4. a) Cromatograma másico [$s_{DR}(V)$] de la muestra de PS. DMMs halladas con diferentes calibraciones directas [(i) $\log \overline{M}_n(V_p)$; (ii) $\log \overline{M}_v(V_p)$; (iii) $\log M_p(V_p)$; (iv) $\log \overline{M}_n(V_m)$; (v) $\log \overline{M}_v(V_m)$; (vi) $\log M_p(V_m)$] ajustadas: b) con un polinomio de 3° orden; c) con un polinomio lineal.	74
Figura II.5. Análisis por SEC / (DR + SV) de 4 estándares de PS. Cromatogramas DR (líneas llenas), y SV (líneas de trazos); y calibración de masas molares, $\log M(V)$	76
Figura II.6. Calibraciones del detector DR para PS, en base a la “concentración	

preparada”, $m_{pi,C1}$; y a la “concentración gravimétrica”, $m_{pi,C2}$	78
Figura II.7. Incertidumbres en las calibraciones universales: $\log J_{nom}$ (sin corrección por concentración), $\log J_{nom1}$ y $\log J_{nom2}$ (corregidas por concentración) y $\log J_{MHS}$ (basada en las constantes de MHS de literatura).	80
Figura II.8. Análisis de PS por SEC / (DR + SV). a) Cromatogramas medidos, cociente de señales y polinomio ajustado; b) calibraciones directas y estimadas a partir de las calibraciones universales.	81
Figura II.9. DMMs estimadas a partir de las distintas calibraciones: a) $\log M(V)$; b) $\log M_{v,Jnom}(V)$; c) $\log M_{v,Jnom1}(V)$; d) $\log M_{v,Jnom2}(V_p)$; e) $\log M_{v,MHS}(V)$	82
Figura II.10. Cromatogramas medidos por SEC / (DR + LS) correspondientes a las 3 DMMs simuladas.	84
Figura II.11. Efecto del E.I. sobre la calibración <i>ad hoc</i> para las diferentes DMMs.	84
Figura II.12. Efecto del IDV sobre $\log M_w(V)$	85
Figura II.13. Efecto del error en la concentración ($\pm 10\%$) sobre $\log M_w(V)$	86
Figura II.14. Cromatogramas medidos por SEC / (DR + SV) correspondientes a las 3 DMMs simuladas.	87
Figura II.15. Efecto del E.I. sobre a) $\log M_{v,MHS}(V)$ y b) $\log M_{v,J}(V)$, para las 3 DMMs simuladas.....	87
Figura II.16. Efecto del error en el IDV sobre: a) $\log M_{v,MHS}(V)$ y b) $\log M_{v,J}(V)$	89
Figura II.17. Efecto del error en la concentración ($\pm 10\%$) sobre: a) $\log M_{v,MHS}(V)$ y b) $\log M_{v,J}(V)$	89
Figura III.1. Ejemplos simulados: datos crudos. (a) Calibración de masa molar,	

$\log M^c(V)$, función de E.I. no uniforme, $g(V, \bar{V})$, y cromatogramas corregidos de DR, $s_{DR}^c(V)|_{LN}$ y $s_{DR}^c(V)|_P$. (b) DMMs propuestas: distribución normal-logarítmica, $w_{LN}(\log M^c)$, y distribución de Poisson, $w_P(\log M^c)$ 104

Figura III.2. Ejemplos simulados: datos crudos. (a) Distribución normal-logarítmica. (b) Distribución de Poisson. Funciones de E.I. límites [$g_{LN}(V, V_1^c)$, $g_{LN}(V, V_p^c)$, $g_P(V, V_1^c)$, $g_P(V, V_p^c)$], cromatogramas “medidos” [$s_{DR}(V)$, $s_{LS}(V)$], y cromatogramas corregidos [$s_{DR}^c(V)$, $s_{LS}^c(V)$]..... 106

Figura III.3. Ejemplos simulados: estimaciones cuando se asumen funciones de E.I. arbitrarias. (a-c) DMM normal-logarítmica. (d-f) DMM de Poisson. (a,d) funciones de E.I. estimadas después del *Paso I* (curvas de trazos finos), y luego del *Paso II* (curvas de trazos gruesos). Las funciones de E.I. límite “verdaderas” se muestran en trazo continuo. (b,e) cromatogramas corregidos verdadero y estimado después de los *Pasos I* y *II*. (c,f) DMMs verdadera y estimada. 109

Figura III.4. Ejemplos simulados: estimaciones cuando se asumen funciones de E.I. representadas por EMG. (a) DMM normal-logarítmica. (b) DMM de Poisson. Funciones de E.I. estimadas después del *Paso I* (curvas de trazos finos), y después del *Paso II* (curvas de trazos gruesos). Las funciones de E.I. límite “verdaderas” se muestran en trazo continuo..... 112

Figura III.5. Corrección directa por E.I. Ejemplo DR + LS. a) Calibración de masa molar, $\log M^c(V)$, cromatogramas medidos [$s_{DR}(V)$, $s_{LS}(V)$] y cromatograma de LS estimado, $\hat{s}_{LS,DR}^c(V)$. b) DMMs verdadera [$s_{DR}^c(\log M^c)$] y estimada [$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$]..... 124

Figura III.6. Corrección directa por E.I. Ejemplo DR + SV. a) Calibración de masa

molar, $\log M^c(V)$, cromatogramas medidos [$s_{DR}(V)$, $s_{SV}(V)$] y cromatograma de SV estimado, $\hat{s}_{SV,DR}^c(V)$. (b) DMMs verdadera [$s_{DR}^c(\log M^c)$] y estimada [$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$].
 126

Figura IV.1. Cromatogramas medidos y calibración de masa molar, $\log M^c(V)$. a) Estándares base; b) Fracciones obtenidas por TGIC. 137

Figura IV.2. Efecto del IDV sobre la calibración *ad hoc*, $\log M_w$, para $\delta = 0$ mL, $\delta_1 = 0.175$ mL (IDV máximo), $\delta_2 = 0.170$ mL y $\delta_3 = 0.160$ mL. 138

Figura IV.3. Estimación de $g(V)$ (EMG) para el estándar PS31. Resultados intermedios para 3 IDV's. a) EMG estimada, $\hat{g}(V)$, cromatogramas DR y LS corregidos por IDV, $s_{DR}(V)$ y $s_{LS}(V)$; b) Cromatogramas DR y LS corregidos por E.I., $\hat{s}_{DR}^c(V)$ y $\hat{s}_{LS}^c(V)$; c) Calibraciones de masas molares: verdadera, $\log M^c(V)$ y estimadas, $\log \hat{M}^c(V)$ 139

Figura IV.4. Funciones de E.I. (EMGs) estimadas para cada estándar (líneas llenas) y función de E.I. no uniforme extrapolada (líneas de trazos). 141

Figura IV.5. Funciones de E.I. estimadas para cada estándar, asumiendo funciones EMGs (líneas llenas, gruesas) y función de E.I. extrapolada a través de una correlación lineal para todo el rango de medición (líneas de trazos). 142

Figura IV.6. Estándar PS31. (a) E.I., $\hat{g}(V)$, calibración de masa molar, $\log M^c(V)$, y cromatogramas DR ensanchado y corregido por E.I., $s_{DR}(V)$ y $\hat{s}_{DR}^c(V)$. (b) DMMs ensanchada y corregida por E.I., $s_{DR}(\log M^c)$ y $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$ 143

Figura IV.7. Detección DR + SV. Cromatogramas medidos (corregidos por línea de base y normalizados), y calibración de masa molar, $\log M^c(V)$ 147

Figura IV.8. Efecto del IDV sobre $\log M_{v,MHS}$, para $\delta_1 = -0.14$ mL (IDV mínimo),

$\delta_2 = -0.15$ mL (IDV máximo), y $\delta_3 = -0.16$ mL. 149

Figura IV.9. Estimación de $g(V)$ (EMG) para PS5 (resultados intermedios para 3 IDV's).
a) EMG estimada, $\hat{g}(V)$, cromatogramas DR y SV corregidos por IDV, $s_{DR}(V)$ y $s_{SV}(V)$;
b) Cromatogramas DR y SV corregidos por E.I., $\hat{s}_{DR}^c(V)$ y $\hat{s}_{SV}^c(V)$; c) Plot de MHS... 150

Figura IV.10. Pendientes de MHS estimadas, $\hat{\alpha}$ [paso (v) del algoritmo] (en puntos), y sus correspondientes regresiones lineales (en líneas llenas). 152

Figura IV.11. Funciones de E.I. finales estimadas para cada estándar, asumiendo funciones EMGs (líneas llenas) y arbitrarias (líneas de trazos). 153

Figura IV.12. DMMs estimadas para el estándar PS5. (a) Función de E.I. final $\hat{g}(V)$, calibración de masa molar, $\log M^c(V)$, y cromatogramas de DR ensanchado y corregido por E.I., $s_{DR}(V)$ y $\hat{s}_{DR}^c(V)$. (b) DMMs ensanchada y corregida por E.I., $s_{DR}(\log M^c)$ y $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$ 154

Figura V.1. Fracción másica de S (a) y volumen hidrodinámico (b) de las moléculas (i,j) de un copolímero dibloque SB. 163

Figura V.2. (a) Viscosidad intrínseca del copolímero $\{[\eta]_{SB}(i,j)\}$; (b) Curvas de nivel para $[\eta]_{SB}(i,j)$ 164

Figura V.3. (a) Volumen de retención del copolímero $[V_{SB}(i,j)]$; (b) Curvas de nivel para $V_{SB}(i,j)$ 165

Figura V.4. a) DMMs univariadas de los homopolímeros PS y PB $[w_S(M_S), w_B(M_B)]$; b) DMM bivariadas del copolímero, $W_{SB}(i,j)$ 171

Figura V.5. DMM bivariadas instantáneas $W_V(i,j)$, para 4 V diferentes: (a) $V = 47.86$ mL; (b) $V = 48.59$ mL; (c) $V = 29.41$ mL; (d) $V = 51.05$ mL. 172

- Figura V.6.** Distribuciones del copolímero SB: (a) DMMs univariables instantáneas y global; (b) DCQs univariables instantáneas y global..... 173
- Figura V.7.** a) Cromatogramas medidos; b) calibraciones de PS y PB [$\log M_S(V)$, $\log M_B(V)$] y del copolímero [$\log M_w(V)$, $\log M_1(V)$ y $\log M_2(V)$]; c) masa instantánea [$w(V)$], y fracción másica de S instantánea [$p_S(V)$]..... 174
- Figura V.8.** Comparación entre distintas distribuciones reales y estimadas del copolímero dibloque SB. a) DMMs; b) DCQs..... 176
- Figura V.9.** Homopolímero ramificado de PVAc. Viscosidad intrínseca (a) y volumen de retención (b) de las moléculas $\{M,r\}$ 179
- Figura V.10.** Homopolímero ramificado de PVAc. Viscosidad intrínseca (a) y volumen de retención (b) de las moléculas $\{M,r\}$. Curvas paramétricas de r 181
- Figura V.11.** a) DMMs individuales (por rama), $w_r(M)$; b) Distribución conjunta de masas molares y grados de ramificación, $W(M,r)$ 185
- Figura V.12.** a) Distribuciones instantáneas, $W_V(M,r)$, y DMM global, $w(M)$; b) DMM instantáneas, $w_V(M)$, y DMM global, $w(M)$ 186
- Figura V.13.** a-d) DGRs discretas instantáneas, $w_V(r)$, para 4 V 's arbitrarios; e) DGR global, $w(r)$; f) masas instantáneas de las moléculas con número de ramas r fijos, $w_r(V)$, y global, $w(V)$ 187
- Figura V.14.** a) Cromatogramas medidos [$s_{DR}(V)$, $s_{SV}(V)$] y calibración universal $\log J(V)$; b) Cromatograma DR [$s_{DR}(V)$] y calibraciones *ad hoc* de masa molar [$\log M_{v,r}(V)$] y de ramas [$r(V)$]..... 188
- Figura V.15.** a) DMMs verdadera, $w(M)$, y estimada por SEC / DR, $\hat{w}(M)$, y por SEC / (DR + SV), $\hat{w}(M_v)$; b) DGRs verdadera, $w(r)$, y estimada por SEC / (DR + SV),

$\hat{w}(r)$	190
Figura VI.1. Cromatogramas de DR para etilenglicol ($M = 62.07$ g/mol).	198
Figura VI.2. Cromatogramas DR de estándares de Pululanos en las tres FMs.	202
Figura VI.3. Cromatogramas DR de estándares de Dextranos, y calibración directa, $\log M_p(V)$, en la FM1.	202
Figura VI.4. Calibraciones directas de estándares de Pululanos en las tres FMs.	203
Figura VI.5. Calibraciones universales: a) individuales, para Pululanos y Dextranos en las FM1 y FM2; b) única para todos los estándares.	203
Figura VI.6. Cromatogramas DR de PAA en la FM4, y calibración universal obtenida en la FM2.	206
Figura VI.7. Cromatogramas DR de PAA en la FM4 (línea llena) y en la FM2 (línea de trazos).	206
Figura VI.8. DMMs estimadas para las dos muestras de PAA: M1 y M2. En líneas de trazos se indican las DMMs correspondientes a las repeticiones.	207
Figura VI.9. Cromatogramas DR de quitosanos en la FM3: a) Grupo A; b) Grupo B; c) Grupo C. (Las líneas de trazos indican repeticiones).	211
Figura VI.10. SEC/DR de quitosanos. Efecto de la dosis de R- γ sobre las masas molares medias.	212
Figura VI.11. Correlación de Charlesby–Pinner con la dosis de R- γ [Ec. (VI.3)].	212
Figura VI.12. Cromatogramas DR y LS de los quitosanos: a), b) Grupo A; c), d) Grupo B; e), f) Grupo C.	215
Figura VI.13. Estimación de la DMM del quitosano HEE por SEC / (DR + LS): a)	

Cromatogramas DR y LS, y calibraciones <i>ad hoc</i> ; b) DMM estimada, comparada con la obtenida por SEC/DR (base pululanos).....	216
Figura VI.14. SEC / (DR + LS) de quitosanos. Efecto de la dosis de R- γ sobre las masas molares medias.....	218
Figura VI.15. Análisis de una muestra comercial de Dextrano. a) Cromatograma másico corregido por línea de base, y calibración directa obtenida con estándares de dextranos; b) DMM estimada, $s_{DR}(\log M)$	219
Figura VI.16. Cromatogramas DR de las muestras de almidón, correspondientes a los sobrenadantes [etapa c) de la técnica de extracción].....	222
Figura VI.17. Absorbancia y área de los cromatogramas DR correspondientes a los sobrenadantes [etapa c) de la técnica de extracción].....	223
Figura VI.18. Cromatogramas DR de los sobrenadantes de la muestra de almidón tratada con n-butanol [etapa d) de la técnica de extracción].....	224
Figura VI.19. Cromatogramas DR de los precipitados de la muestra de almidón tratada con n-butanol [etapa d) de la técnica de extracción].....	224
Figura VI.20. Absorbancia y área de los cromatogramas DR correspondientes a los precipitados redisueltos [etapa d) de la técnica de extracción].....	226
Figura AI.1. Distribuciones de masas molares: a) en eje M , y b) en eje $\log M$	238
Figura AI.2. Funciones de E.I. típicas. EMG de diferentes asimetrías y de medias nulas.	240

Índice de Tablas

Tabla II.1. Estándares de PS utilizados para calcular las calibraciones directas. Masas molares reportadas por el proveedor y volúmenes asociados al cromatograma DR.	69
Tabla II.2. Parámetros de ajuste de las calibraciones directas.....	72
Tabla II.3. Masas molares medias, \overline{M}_n , \overline{M}_w y $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ para una muestra desconocida de PS.	73
Tabla II.4. Análisis de estándares de PS, con detección DR + SV.....	76
Tabla II.5. Calibración del detector de DR para PS.	78
Tabla II.6. Concentración y viscosidad intrínseca medidas de los patrones de PS.	79
Tabla II.7. Masas molares medias estimadas de una muestra de PS por SEC / (DR + SV).	81
Tabla II.8. SEC / (DR + LS). Efecto del E.I. sobre las masas molares medias de las DMMs: a) teóricas, y b) estimadas con $\log M_w(V)$	84
Tabla II.9. SEC / (DR + SV). Efecto del E.I. sobre las masas molares medias de las DMMs: a) teóricas, y estimadas con b) $\log M_{v,MHS}(V)$, y c) $\log M_{v,I}(V)$	88
Tabla II.10. Errores en las masas molares estimadas por SEC / (DR + LS).	90
Tabla II.11. Errores en las masas molares estimadas por SEC / (DR + SV).	91
Tabla III.1. Expresiones finales para el numerador del segundo término de la Ec. (III.7.b), cuando el cromatograma k_1 se estima a partir del cromatograma k_2	100
Tabla III.2. Simulación de un análisis por SEC: Datos crudos ($\Delta V = 0.02$ mL).....	105

Tabla III.3. Ejemplos Simulados: ajustes intermedios y resultados finales.	110
Tabla III.4. Ejemplos simulados: Chequeos de robustez	114
Tabla III.5. Expresiones finales para $\mathbf{G}_{k_1, [k_2, k_3]}^*$ de la Ecs (III.17.b, c), cuando el cromatograma k_1 se estima a partir del cromatograma k_2, k_3	118
Tabla III.6. Numerador del segundo término de la Ec. (III.25.a), cuando el cromatograma k_1 se estima a partir del cromatograma k_2	122
Tabla III.7. Corrección directa por E.I. Masas molares medias de las DMMs real y estimada, y error cuadrático medio de estimación.	127
Tabla III.8. Corrección directa por E.I. Chequeos de robustez.	128
Tabla IV.1. Características de los estándares de PS utilizados. Detección DR + LS.	136
Tabla IV.2. Estimación simultánea de la función de E.I. EMG y del IDV.	140
Tabla IV.3. Masas molares medias de los estándares PS16-PS200.	144
Tabla IV.4. Características de los estándares de PS utilizados. Detección DR + SV.	147
Tabla IV.5. Estimación simultánea de la función de E.I. EMG y del IDV.	152
Tabla IV.6. Masas molares medias para los estándares PS1 – PS9.	155
Tabla V.1. Valores medios y polidispersidades de las DMMs de los bloques PS y PB, y de la distribución bivariable.	171
Tabla V.2. Valores medios de las DMMs y DCQs reales y estimadas.	177
Tabla V.3. Características de las DMM Schulz-Flory correspondientes a cada r	185
Tabla V.4. Valores medios de las DMMs y DGRs reales y estimadas.	190
Tabla VI.1. Número de platos teóricos (N) para las columnas UltraHydrogel.	198

Tabla VI.2. SEC/DR de estándares de Pululanos en las tres FMs.....	199
Tabla VI.3. SEC/DR de estándares de Dextranos en la FM1.....	200
Tabla VI.4. Constantes de MHS de Pululanos y Dextranos.....	200
Tabla VI.5. Coeficientes de las calibraciones lineales directas $[\log M_p(V)]$, y universales $[\log J_p(V)]$, para estándares de Pululanos y Dextranos.....	204
Tabla VI.6. Masas molares medias de las muestras de PAA.....	207
Tabla VI.7. Características de la obtención de los tres grupos de Quitosanos.....	208
Tabla VI.8. Dosis de R- γ y masas molares medias (por SEC / DR) de los quitosanos. .	209
Tabla VI.9. Masas molares medias de quitosanos por SEC / (DR + LS).....	217
Tabla VI.10. Masas molares medias de dextranos por SEC / DR.....	220
Tabla VI.11. Masas molares medias de amilopectina y amilosa.....	226

Abreviaturas

1DUVS: espectrofotometría UV por la derivada primera.

CH₃COOH/CH₃COONa: ácido acético / acetato de sodio.

CH₃COONH₄: acetato de amonio.

C–O–C: enlaces glicosídicos.

CQ: Composición química.

DCQ: distribución de composición química.

DD: grado de deacetilación.

DGR: distribución de grado de ramificación.

DMM: distribución de masas molares.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DR + LS: detección DR y LS.

DR + SV: detección DR y SV.

DR + UV: doble detección DR y UV.

DR: refractómetro diferencial.

E.I.: ensanchamiento instrumental.

EMG: función Gaussiana modificada exponencialmente.

FM: Fase móvil.

FTIR: espectroscopía IR con Transformada de Fourier.

GFC: cromatografía de filtración por geles.

GPC: cromatografía de permeación por geles.

HPLC: cromatografía líquida de alta performance.

- IDV: volumen interdetector.
- IR: espectrofotómetro infrarrojo.
- LAC: Cromatografía líquida de adsorción.
- LALLS: detector dispersión de luz de bajo ángulo.
- LB: línea de base.
- LS: detector dispersión de luz.
- MALLS: detector dispersión de luz multiángulo.
- MD-SEC: SEC con detección múltiple.
- MHS: Mark-Houwink-Sakurada.
- NaN₃: Azida sódica.
- Na₂SO₄: Sulfato de sodio.
- NMR: resonancia magnética nuclear.
- OS: detector de presión osmótica.
- PAA: poli(ácido acrílico).
- PMMA: polimetilmetacrilato.
- PB: Polibutadieno.
- PS: Poliestireno.
- PVAc: poliacetato de vinilo.
- PVC: poli(cloruro de vinilo).
- RALLS: detector dispersión de luz de ángulo fijo.
- R-γ: Radiación gamma.
- SB: Estireno-butadieno.
- SEC / DR: SEC con detección DR.

SEC / LALLS: SEC con detección LALLS.

SEC / LS: SEC con detección LS.

SEC / MALLS: SEC con detección MALLS.

SEC: cromatografía líquida de exclusión.

SV: detector de viscosidad específica.

TALLS: detector dispersión de luz de dos ángulos.

TGIC: Cromatografía de interacción por gradiente de temperatura.

THF: tetrahidrofurano.

UH: UltraHydrogel.

UV: espectrofotómetro ultravioleta.

WCLD: distribución de longitud de cadena en peso.

Prólogo

La cromatografía líquida de exclusión (SEC) es una técnica analítica que permite fraccionar las moléculas de polímero de acuerdo a su tamaño en solución y es actualmente la técnica más utilizada para determinar la distribución de masas molares (DMM) de un polímero. Otras aplicaciones de SEC incluyen la determinación de las distribuciones de composición química (DCQ) de un copolímero, del grado de ramificación (DGR) de un polímero ramificado, la identificación de aditivos presentes en un polímero, el pretratamiento de biopolímeros (SEC preparativa), etc.

Los avances tecnológicos que han contribuido al desarrollo de SEC son: a) la introducción de rellenos de baja interacción y de alta resolución; b) el desarrollo de detectores en línea sensibles a las masas molares; y c) la aplicación de técnicas digitales para el tratamiento de los datos. A pesar del empleo masivo de SEC en la caracterización molecular de polímeros, existen muchos problemas aún no completamente resueltos asociados al fraccionamiento, la calibración, la detección, la corrección por ensanchamiento instrumental (E.I.), etc. Si bien estos inconvenientes surgen ya al analizar polímeros “cromatográficamente simples” (homopolímeros lineales), el problema se dificulta aún más en el caso de los polímeros “cromatográficamente complejos” (copolímeros, polímeros ramificados, mezclas de polímeros, polielectrolitos, etc.).

Típicamente, la calibración de los sistemas cromatográficos se efectúa en base a estándares comerciales de la misma naturaleza química del polímero a analizar y de características moleculares conocidas. En general, los procedimientos de calibración tienen ambigüedades, porque no siempre se conocen con precisión las masas molares de los estándares, y estas incertidumbres originan importantes errores en las DMMs estimadas. En tal sentido, el problema de la calibración cromatográfica no puede

considerarse totalmente resuelto; y muchas veces resulta imposible tener una cota ajustada de las incertidumbres involucradas, aun en el caso más simple de los homopolímeros lineales. Con la aparición de los sensores de masa molar, el problema de la calibración en SEC lejos de resolverse, se ha diversificado. La calibración *ad hoc* obtenida con un sensor de masa molar se obtiene a partir del cociente entre dos señales cromatográficas, y las estimaciones son inciertas debido a los desplazamientos relativos de las señales medidas, y a la baja relación señal/ruido en las colas de los cromatogramas.

El E.I. se debe fundamentalmente a la dispersión axial en las columnas de fraccionamiento; e introduce importantes errores cuando se estiman DMMs muy angostas, o DMMs más anchas que poseen picos u hombros angostos. El efecto del E.I. sobre la DMM estimada es variado. En el caso de SEC con detección másica, la DMM estimada resulta más ancha que la real; sin embargo, cuando se utilizan sensores de masa molar, el E.I. produce un angostamiento ficticio de la DMM. Los problemas asociados al E.I. constituyen un área de investigación de interés actual, en particular para mejorar la caracterización molecular de polímeros angostos. Las herramientas utilizadas incluyen el modelado (tanto fenomenológico como detallado) del proceso de fraccionamiento por tamaños, como también un uso intensivo de técnicas de tratamiento de datos, particularmente para la resolución de problemas inversos mal condicionados.

La caracterización molecular de polímeros cromatográficamente complejos por SEC es un ámbito de investigación relativamente poco explorado. Se acepta normalmente que la técnica SEC es incapaz de fraccionar copolímeros o polímeros ramificados por tamaño molecular. Sin embargo, la descripción del fraccionamiento de tales moléculas no ha sido intensivamente tratada en la literatura; y en tal sentido, no se tienen precisiones acerca de los errores cometidos en la estimación de las propiedades moleculares de estos polímeros a través de las metodologías típicamente utilizadas.

Por último, otra dificultad se presenta cuando se desea caracterizar por SEC polímeros hidrosolubles, debido a que comienzan a jugar mecanismos de fraccionamiento alternativos a la exclusión pura, tales como interacciones electrostáticas polímero / solvente / relleno, y consecuentemente efectos de adsorción, desorción, repulsión, exclusión iónica, etc. En este trabajo se investigan las mejores condiciones para el análisis de algunos polímeros solubles en agua, tanto aniónicos [poli(ácido acrílico)], como catiónicos (quitosanos), o neutros (almidones y dextranos). El *Grupo de Polímeros* del INTEC (donde se desarrolla esta tesis) no cuenta con experiencia previa en la caracterización de polímeros por SEC en fase acuosa, y en tal sentido los desarrollos que se presentan constituyen un primer avance hacia una explotación futura más intensiva de la técnica.

CAPÍTULO I. Cromatografía Líquida de Exclusión con Múltiple Detección. Consideraciones Generales

I.1. Introducción

La cromatografía líquida de exclusión (SEC; del inglés *Size Exclusion Chromatography*) es una técnica analítica que permite fraccionar las moléculas de polímero de acuerdo a su tamaño en solución (las más grandes eluyen primero y las más pequeñas al final), para luego analizar las diferentes fracciones del eluyente. Idealmente, el fraccionamiento es controlado solamente por interacciones entrópicas, y no debe involucrar ninguna interacción entálpica. Desde su aparición a mediados de los 60's, la técnica ha sido ampliamente investigada y mejorada (Yau *et al.*, 1979, Provder, 1984, 1987; Wu, 1995). La antigua denominación cromatografía de permeación por geles (GPC; del inglés *Gel Permeation Chromatography*) se debió a que los rellenos de las columnas originales eran geles orgánicos blandos. El nombre de cromatografía de filtración por geles (GFC; del inglés *Gel Filtration Chromatography*) se aplica usualmente al análisis de biopolímeros hidrófilicos.

SEC es actualmente la técnica analítica más utilizada para determinar la distribución de masas molares (DMM) de un polímero. Otras aplicaciones de SEC incluyen la determinación de las distribuciones de composición química (DCQ) de un copolímero, del grado de ramificación (DGR) de un polímero ramificado, la identificación de aditivos presentes en un polímero, el pretratamiento de biopolímeros (SEC preparativa), etc.

El equipamiento más antiguo incluía solamente detectores instantáneos de concentración como refractómetros diferenciales y espectrofotómetros de una única longitud de onda UV. De esta forma, SEC es una técnica relativa (o no absoluta), en el

sentido que se requiere una calibración de masas molares para transformar las abscisas de los cromatogramas (eje de tiempo o volumen de retención) en masas molares. Recientemente, el desarrollo de detectores “sensibles a las masas molares” (tales como viscosímetros y sensores de dispersión de luz), han convertido a SEC en una técnica absoluta para determinar la DMM, y en algunos casos también permite determinar otras características tales como las ramificaciones. El alto costo de estos sensores explica su escasa difusión.

I.1.a. Conceptos Básicos

Un sistema de SEC es esencialmente un cromatógrafo líquido de alta performance con columnas conteniendo un relleno poroso cuyo tamaño de poro se encuentra en el orden del volumen hidrodinámico de las moléculas de polímero analizadas. En la Figura I.1 se muestra un esquema típico. El solvente filtrado y desgasificado circula desde el reservorio hacia una bomba isocrática de alta presión. La bomba impulsa a la fase móvil a través de una serie de capilares hacia el inyector, columnas y detectores. El inyector introduce la solución de polímero en la corriente de alta presión. Una precolumna y un filtro (con diámetros de poro entre 0.5 y 2 μm) evitan el ingreso de partículas en las columnas. El relleno de las columnas analíticas consiste en partículas porosas con diámetros entre 5 y 30 μm , que permiten separar el analito de acuerdo a su tamaño, eluyendo primero las moléculas más grandes y finalmente las más pequeñas. Las variables de operación típicas son: caudal, 1 mL/min; concentración de la muestra, 1 mg/mL; y tiempo de fraccionamiento, 1 h. Los detectores se pueden clasificar en dos grandes grupos: sensibles a la concentración, y sensibles a la masa molar. Finalmente la muestra y la fase móvil luego de pasar por los detectores, son transportadas hacia el reservorio de descarte.

La operación del sistema cromatográfico se efectúa con una PC, que permite

monitorear las variables del proceso (caudal, presión, temperatura, etc.), sincronizar la inyección con el tiempo de adquisición, digitalizar y almacenar las señales de los detectores; y visualizar los resultados del análisis.

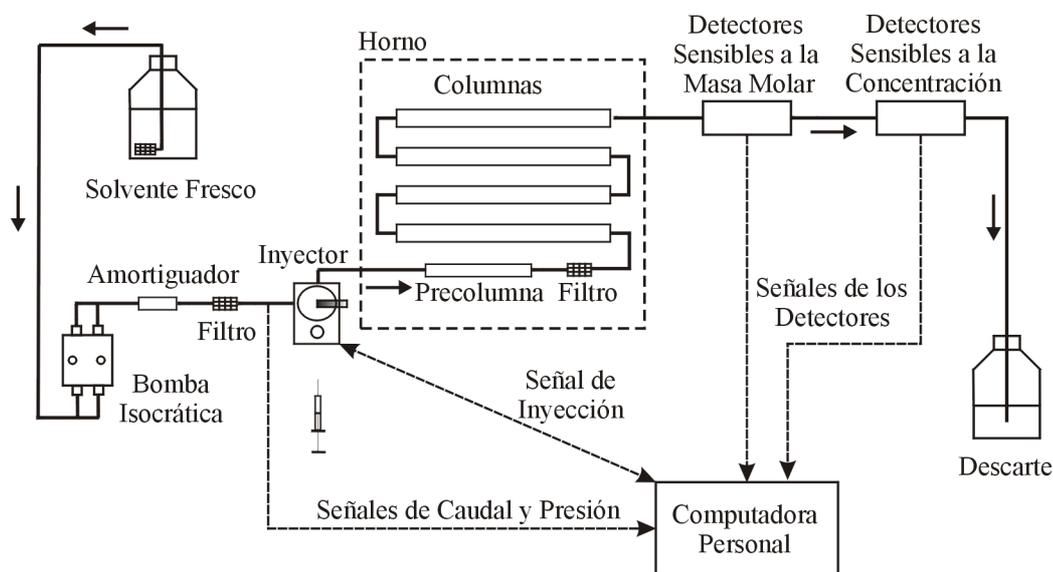


Figura I.1. Diagrama esquemático de un cromatógrafo para SEC. Los principales componentes son: una bomba isocrática, un inyector (manual o automático), las columnas de fraccionamiento, y el sistema de detección.

I.1.a.i) Polímeros Simples y Complejos

Un polímero es cromatográficamente “simple” cuando todas las moléculas en la celda de detección tienen el mismo volumen hidrodinámico (resolución perfecta), y además existe una relación uno a uno entre el volumen hidrodinámico y la masa molar. Polímeros simples son básicamente los homopolímeros lineales flexibles, y en este caso la DMM define completamente su estructura macromolecular. En contraste, las mezclas de polímeros, los copolímeros, y los polímeros ramificados son cromatográficamente “complejos” en el sentido que (para un volumen hidrodinámico dado), una amplia variedad de masas molares coexiste en la celda del detector. Aparte de la DMM, se requieren distribuciones adicionales para caracterizar a estos polímeros complejos. Por

ejemplo, para los copolímeros debe determinarse la DCQ, mientras que para los homopolímeros ramificados se estima la DGR, o el número de ramas por molécula (Berek, 2000; Meira, 1991; Radke *et al.*, 1996).

Cuando un polímero simple es analizado bajo condiciones de SEC ideal, cada fracción del eluyente tiene una masa molar uniforme, y por lo tanto, en principio se pueden obtener DMMs exactas. En contraste, cuando por ejemplo se analiza un homopolímero aleatorio ramificado, a todo volumen de retención existirá una variedad de masas molares en la celda de detección (desde moléculas lineales de baja masa molar hasta moléculas altamente ramificadas de mayor masa molar). Por esto, los polímeros complejos generan en las celdas de detección el denominado “fenómeno de polidispersidad local”, aún bajo condiciones de fraccionamiento perfecto (Mourey y Balke, 1998; Netopilík, 1998a). En este caso, los sensores proveen señales que son proporcionales a alguna propiedad promedio instantánea, tales como la composición química media o la masa molar media en peso.

I.1.a.ii) Distribución de Masa Molar

La DMM es normalmente la característica macromolecular más importante presentada por todos los polímeros sintéticos y naturales. Estrictamente, las DMMs son discretas. La DMM en número representa el número de moles (o cualquier otra variable proporcional, como la fracción molar, la molaridad, etc.) vs. la masa molar. La DMM en peso representa la masa (o cualquier otra variable proporcional, como la fracción másica, la concentración, etc.) vs. la masa molar. Para homopolímeros, la masa molar es proporcional a la longitud de cadena, y por lo tanto es un múltiplo de la masa molar de la unidad repetitiva (Apéndice I). La macroestructura de un copolímero lineal está dada por la distribución bivariable de masas molares y composición química (Meira, 1991; Kilz, 2001). Las distribuciones univariadas de masas molares y de composición química se

obtienen por la integración apropiada de la distribución bivariable. En el caso de un copolímero estadístico (aún bajo resolución perfecta), la masa instantánea depende de la composición química y esta última variable puede cambiar con el volumen hidrodinámico. Por esta razón, en la celda de detección existirá una distribución de masas molares con distinta composición. Claramente, SEC es incapaz de separar todas las masas molares posibles.

La DMM acumulada, $W(M)$ continua se define como:

$$W(M) = \int_0^M \frac{dw^0(M)}{dM} dM = \text{masa de muestra con masas molares} < M \quad (\text{I.1})$$

donde dw^0/dM vs. M representa la DMM diferencial continua en masa en un eje lineal de masa molar, M . Alternativamente, la DMM diferencial continua en eje M logarítmico, $dw/d\log M$ vs. $\log M$, es más utilizada en SEC. Es necesario relacionar las ordenadas de ambas DMMs continuas, para que el área bajo la curva sea proporcional a la masa (o a la concentración).

La calibración de masa molar, $M(V)$, relaciona la masa molar con el volumen de retención, V , y se obtiene a partir de la inyección de estándares angostos de masa molar conocida, y usualmente se representa en eje logarítmico como $\log M(V)$ (Fig. I.2.). Para dos pares cualesquiera (M_1, V_1) y (M_2, V_2) de $M(V)$, la masa de moléculas contenida en el rango $[M_1-M_2]$ (o equivalentemente, en $[\log M_1-\log M_2]$) debe ser igual a la masa de moléculas que eluyen en el rango de volumen de retención $[V_1-V_2]$; y por lo tanto:

$$-\int_{M_1}^{M_2} \frac{dw^0(M)}{dM} dM = -\int_{\log M_1}^{\log M_2} \frac{dw(\log M)}{d\log M} d\log M = \int_{V_1}^{V_2} c(V) dV \quad (\text{I.2})$$

donde $c(V)$ es el cromatograma continuo (concentración másica). El signo menos en la Ec. (I.2) indica que incrementos positivos de dM corresponden a incrementos negativos de dV . A partir de la Ec. (I.2), las ordenadas de las dos representaciones de DMMs continuas

están interrelacionadas a través de:

$$\frac{dw}{d\log M} = \frac{dM}{d\log M} \frac{dw^0}{dM} = 2.3026 M \frac{dw^0}{dM} \quad (\text{I.3})$$

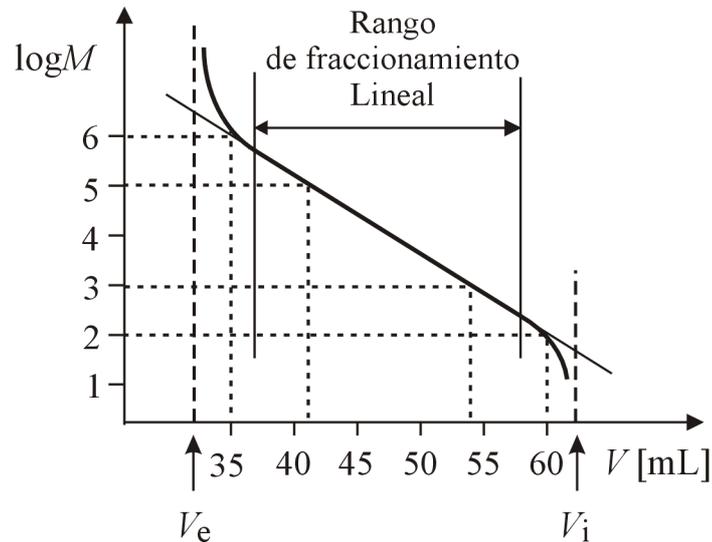


Figura I.2. Calibración de masa molar típica.

Asumiendo ahora que la $c(V)$ continua es muestreada a intervalos regulares ΔV , se obtiene el cromatograma discreto $c_j(V_j)$; donde j ($= 1, 2, \dots$) son los puntos de muestreo. Considerando que la masa total de muestra está concentrada en los j puntos de discretización, $w_j(M_j)$ es la DMM discreta en eje lineal M , y la masa, w_j , de cada punto es:

$$w_j = - \left[\frac{dw^0(M)}{dM} \right]_j \Delta M_j = c_j \Delta V \quad (\text{I.4})$$

donde $[dw^0(M)/dM]_j$ es la ordenada (en M_j) de la DMM continua con eje M lineal.

Mientras ΔV es constante para todo j , esto no es cierto para los correspondientes ΔM_j , debido a la naturaleza logarítmica de la calibración de masa molar. Por tal motivo, una DMM continua con eje lineal M no puede graficarse directamente a partir de $w_j(M_j)$

discreta uniendo los valores sucesivos de w_j ; sino que debe efectuarse una corrección de ordenadas, que se deriva de la Ec. (I.4):

$$\left[\frac{dw^0(M)}{dM} \right]_j = - \frac{c_j(V)}{\Delta M_j / \Delta V} \left(\frac{\Delta \log M_j}{\Delta \log M_j} \right) = - \frac{0.4343}{M_j(V)} \frac{c_j(V)}{\Delta \log M_j / \Delta V} \quad (\text{I.5})$$

La primera igualdad de la Ec. (I.5) indica que cada altura del cromatograma discreto c_j debe dividirse por la pendiente de la curva de calibración $\Delta M_j / \Delta V$. El último término de la Ec. (I.5) resulta del hecho que $\Delta \log M_j / \Delta M_j \cong 0.4343 / M_j$. También, es de notar que $\Delta \log M_j / \Delta V$ es la pendiente de la calibración de masa molar en la forma $\log M_j(V_j)$. Cuando $\log M_j(V_j)$ es lineal, entonces $\Delta \log M_j / \Delta V$ es una constante, y la corrección por alturas de la Ec. (I.5) involucra básicamente una división por M_j .

La corrección por alturas requerida en la Ec. (I.5) se simplifica cuando se representa la DMM discreta con un eje M logarítmico. A partir de la versión discreta de la Ec. (I.2), resulta:

$$\left[\frac{dw(\log M)}{d \log M} \right]_j = - \frac{c_j}{\Delta \log M_j / \Delta V} \quad (\text{I.6})$$

En la Ec. (I.6), $\Delta \log M_j / \Delta V$ es una constante para una calibración lineal, y por lo tanto $[dw/d \log M]_j$ vs. $\log M_j$ puede representarse directamente con una poligonal uniendo las alturas del cromatograma c_j , sin necesidad de corrección por alturas.

Ahora, se derivarán las expresiones para calcular las diferentes masas molares medias. El k -ésimo momento (λ_k) de la DMM discreta $w_j(M_j)$ es:

$$\lambda_k \equiv \sum_j M_j^k w_j = \sum_j M_j^k c_j \Delta V = - \sum_j M_j^k \left[\frac{dw^0(M)}{dM} \right]_j \Delta M_j \quad (\text{I.7})$$

donde se acepta que k puede tomar cualquier valor real. A partir de la Ec. (I.7), resulta:

$$\begin{array}{l} \text{Masa molar media} \\ \text{en número:} \end{array} \quad \bar{M}_n = \frac{\lambda_0}{\lambda_{-1}} = \frac{\sum w_j}{\sum w_j / M_j} = \frac{\sum c_j}{\sum c_j / M_j} \quad (\text{I.8.a})$$

$$\begin{array}{l} \text{Masa molar media} \\ \text{en peso:} \end{array} \quad \bar{M}_w = \frac{\lambda_1}{\lambda_0} = \frac{\sum M_j w_j}{\sum w_j} = \frac{\sum M_j c_j}{\sum c_j} \quad (\text{I.8.b})$$

$$\begin{array}{l} \text{Masa molar media} \\ \text{z:} \end{array} \quad \bar{M}_z = \frac{\lambda_2}{\lambda_1} = \frac{\sum M_j^2 w_j}{\sum M_j w_j} = \frac{\sum M_j^2 c_j}{\sum M_j c_j} \quad (\text{I.8.c})$$

$$\begin{array}{l} \text{Masa molar media} \\ \text{en viscosidad} \end{array} \quad \bar{M}_v = \left[\frac{\lambda_\alpha}{\lambda_0} \right]^{1/\alpha} = \left[\frac{\sum M_j^\alpha w_j}{\sum w_j} \right]^{1/\alpha} = \left[\frac{\sum M_j^\alpha c_j}{\sum c_j} \right]^{1/\alpha} \quad (\text{I.8.d})$$

El lado derecho de las Ecs (I.8) se utiliza para calcular las masas molares medias directamente a partir de las alturas de los cromatogramas y de la calibración de masa molar, sin necesidad previa de representar la DMM con un eje M lineal. Esto evita los errores numéricos asociados con la transformación no lineal de la Ec. (I.5).

I.1.a.iii) Partición Controlada por la Entropía

La distribución de tamaños de poros de las partículas del relleno debe encontrarse en el orden del volumen hidrodinámico de las moléculas del analito. Las macromoléculas más pequeñas presentan una mayor probabilidad de circular a través de la mayoría de los poros, mientras que las moléculas más grandes circulan a través de una fracción reducida de poros. Así, las moléculas más grandes eluyen primero, mientras que las pequeñas salen al final del cromatograma.

En SEC ideal, el fraccionamiento se produce por tamaños, y no involucra interacciones entálpicas entre el analito y la fase estacionaria. El volumen al cual eluye cada molécula puede calcularse según (Janča, 1984; Malawer, 1995; Berek, 2000):

$$V = V_e + K_{\text{SEC}} V_p; \quad (V_p = V_i - V_e); \quad (0 < K_{\text{SEC}} < 1) \quad (\text{I.9})$$

donde V_e es el volumen de exclusión total; V_p es el volumen de poro; V_i es el volumen de permeación total (Fig. I.2); y K_{SEC} es el coeficiente de distribución o partición SEC (una función del volumen hidrodinámico) del soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil.

Se han desarrollado muchos modelos teóricos que predicen el coeficiente de partición K_{SEC} como una función del mecanismo de fraccionamiento, de los efectos extra-columna, de la asimetría de los picos cromatográficos, etc. (Cassasa, 1976; Potschka, 1993; Busnel *et al.*, 2001; Netopilík, 2002; Vander Heyden *et al.*, 2003; Felinger, 1998). Generalmente, estos modelos consideran procesos tales como la transferencia de masa entre las fases, la dispersión molecular, y la difusión interna en el relleno de la columna. Un buen modelo teórico debe predecir tanto los cromatogramas medidos como las curvas de calibración. La principal dificultad de los modelos teóricos es la estimación de sus parámetros fisicoquímicos.

I.1.a.iv) Viscosidad Intrínseca y Volumen Hidrodinámico

En una solución polimérica diluida, la viscosidad específica mide el incremento relativo de la viscosidad absoluta de la solución (η) con respecto a la viscosidad absoluta del solvente puro (η_0):

$$\eta_{\text{sp}} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \quad (\text{I.10})$$

La viscosidad intrínseca, o número de viscosidad límite (IUPAC) se define (en el límite de dilución perfecta), como:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{sp}}}{c} \quad (\text{I.11})$$

donde c es la concentración másica del polímero. La viscosidad intrínseca de una molécula

lineal en solución está relacionada con la masa molar a través de la ecuación de Mark–Houwink–Sakurada (MHS):

$$[\eta] = KM^\alpha \quad (\text{I.12})$$

donde K y α son función del solvente, del polímero, de la temperatura, y del segundo coeficiente del virial, A_2 (Brandrup e Immergut, 1989; Burchard, 1999). Los valores de K , α y A_2 están disponibles en literatura para diferentes combinaciones polímero-solvente-temperatura (Brandrup e Immergut, 1989).

En la condición θ (termodinámicamente ideal), no existen interacciones netas entre el solvente “pobre” y el polímero, resultando: $\alpha \cong 0.5$ y $A_2 = 0$ (Berek, 2000; Burchard, 1999); y la conformación de las moléculas disueltas es intermedia entre una conformación totalmente colapsada y una totalmente hinchada. Para evitar todas las interacciones posibles polímero-polímero, se emplean buenos solventes que hinchan y solvatan a las moléculas de polímero, resultando $0.6 < \alpha < 0.8$ y $A_2 > 0$.

Si se considera un grupo de cadenas de polímeros lineales y flexibles de masa molar uniforme (o constante) bajo condiciones θ , la ecuación de Flory–Fox relaciona el radio de giro medio cuadrático R_g^2 (definido como la distancia media de las cadenas de polímero desde su centro de gravedad a su extremo) de una molécula en solución con la viscosidad intrínseca y la masa molar, según (Burchard, 1999; Flory y Fox, 1951):

$$R_g^3 = \frac{1}{6^{3/2}} \left(\frac{[\eta]M}{\Phi} \right) \quad (\text{I.13.a})$$

con:

$$\Phi = \Phi_0 (1 - 2.63 \alpha' + 2.86 \alpha'^2) \quad (\text{I.13.b})$$

$$\alpha' = \frac{2\alpha - 1}{3} \quad (\text{I.13.c})$$

donde α' ($= 0 - 0.2$) es un parámetro de interacción que tiene en cuenta las desviaciones con respecto a la condición θ ($\alpha' = 0$); y Φ_0 ($= 2.55 \times 10^{21}$) es una constante para $M > 10^4$ g/mol. Para moléculas ramificadas flexibles, Φ_0 aumenta con el grado de ramificación (Burchard, 1999).

La ecuación de Einstein relaciona el producto $[\eta]M$ con el volumen de una esfera sólida hidrodinámicamente-equivalente de radio R y volumen V_h (Flory y Fox, 1951):

$$[\eta]M = \frac{10}{3} \pi N_{\text{Av}} R^3 = 2.5 N_{\text{Av}} V_h \quad (\text{I.14})$$

donde V_h es el volumen hidrodinámico de la molécula de polímero y N_{Av} es el número de Avogadro. Comparando las Ecs (I.13.a) y (I.14), se puede ver que R_g^3 en la Ec. (I.13.a) es otra medida del volumen hidrodinámico.

Para una masa molar dada, una molécula ramificada presenta valores de V_h y de $[\eta]$ inferiores a los de su homólogo lineal. Una medida de esta contracción volumétrica está dada por el parámetro de ramificación, g , definido como:

$$g = \frac{R_{g,b}^2}{R_{g,\ell}^2} \leq 1; \quad (M_b = M_\ell) \quad (\text{I.15})$$

donde los subíndices “b” y “ℓ” indican molécula ramificada y lineal, respectivamente. Para distintas topologías de ramas que incluyen puntos de ramificación tri- y/o tetrafuncionales, Zimm y Stockmayer (1949) desarrollaron expresiones teóricas que correlacionan g con el número medio –en número, $b_n(M)$, o en peso, $b_w(M)$ – de ramas por molécula. Para puntos de ramificación trifuncionales, estas expresiones son:

$$g(M) = \left[\left(1 + \frac{b_n(M)}{7} \right)^{0.5} + \frac{4b_n(M)}{9\pi} \right]^{-0.5} \quad (\text{I.16.a})$$

$$g(M) = \frac{6}{b_w(M)} \left[\frac{1}{2} \left(\frac{2 + b_w(M)}{b_w(M)} \right)^{0.5} \ln \left(\frac{[2 + b_w(M)]^{0.5} + [b_w(M)]^{0.5}}{[2 + b_w(M)]^{0.5} - [b_w(M)]^{0.5}} \right) - 1 \right] \quad (\text{I.16.b})$$

Para polímeros con ramas largas aleatorias y puntos de ramificación tetrafuncionales, resulta:

$$g(M) = \left[\left(1 + \frac{b_n(M)}{6} \right)^{0.5} + \frac{4b_n(M)}{3\pi} \right]^{-0.5} \quad (\text{I.17.a})$$

$$g(M) = \frac{\ln[1 + b_w(M)]}{b_w(M)} \quad (\text{I.17.b})$$

Un segundo parámetro de ramificación, g' , se define a partir de la relación de volúmenes hidrodinámicos (o de viscosidades intrínsecas), como:

$$g' = \frac{V_{h,b}}{V_{h,\ell}} = \frac{[\eta]_b M_b}{[\eta]_\ell M_\ell} = \frac{[\eta]_b}{[\eta]_\ell} \leq 1; \quad (M_b = M_\ell) \quad (\text{I.18})$$

A diferencia de g , el parámetro g' se puede determinar fácilmente a partir de mediciones de viscosidades intrínsecas. A la fecha, no existen expresiones teóricas que relacionen g' con el número de ramas por molécula; y en su lugar, se relacionan los dos parámetros de contracción, a través de un parámetro empírico, ε , según:

$$g' = g^\varepsilon \quad (\text{I.19})$$

En teoría y bajo condiciones θ , las Ecs (I.13.a, I.15, I.18, I.19) sugieren que $\varepsilon = 3/2$. Desafortunadamente, ε ha sido estimado sólo para unos pocos sistemas polímero-solvente (Burchard, 1999); y además, se reportaron variaciones de ε con la masa molar (Tackx y Tacx, 1998; Vega *et al.*, 2001a).

I.1.a.v) Resolución y Eficiencia de Columna en SEC

La resolución en SEC mide la capacidad de un sistema de fraccionamiento para separar dos picos angostos y cercanos. La resolución puede mejorarse tanto por el aumento de la eficiencia de la columna (por ej., utilizando rellenos con partículas porosas más pequeñas); y/o aumentando la longitud de la columna (lo que origina una disminución en la pendiente de calibración).

Si se considera el análisis de dos polímeros uniformes de diferentes masas molares, la resolución de la columna (R_{col}) se define por (Dawkins, 1978):

$$R_{col} = \frac{2(\bar{V}_1 - \bar{V}_2)}{\Delta w_1 + \Delta w_2} \quad (I.20)$$

donde \bar{V}_i y Δw_i ($i = 1, 2$) son el volumen de retención medio y la amplitud media del pico (medida en los puntos de inflexión), respectivamente.

La eficiencia de la columna se mide por el número de platos teóricos (N). Este concepto fue introducido por Martin y Synge en 1941 para cromatografía de partición líquido-líquido, despreciando la difusión de solvente entre los platos (Martin y Synge, 1941; Mori, 1988; Felinger, 1998). La columna se considera dividida en una serie de capas consecutivas (o “platos”), y en cada plato se alcanza un equilibrio de separación perfecto. La eficiencia de la columna aumenta con N . En general, N aumenta con la temperatura y con la reducción de: el tamaño de partícula, la masa molar, el caudal del solvente, y la viscosidad del solvente. Para un polímero uniforme, N está dado por (Dawkins, 1978):

$$N = 16L \left(\frac{\bar{V}}{\Delta w} \right)^2 \quad (I.21)$$

donde L es la longitud de la columna. El espesor (o altura) de cada plato es $H = L / N$. Existen otros métodos de cálculo de N , donde \bar{V}_i se toma como el volumen

correspondiente al máximo del pico y Δw representa la amplitud del pico medida en las alturas correspondientes a la mitad de la altura máxima del pico.

Idealmente, la muestra empleada para determinar N debe cumplir con los siguientes requisitos: (a) ser de baja masa molar, uniforme, y libre de isómeros o impurezas; (b) no presentar interacciones indeseables con el material de relleno, tales como adsorción o intercambio iónico; y (c) brindar una buena respuesta al detector utilizado. En SEC en fase orgánica con rellenos basados en poliestireno y THF o cloroformo como fase móvil, las condiciones mencionadas se logran empleando benceno, metanol, y acetona. En SEC en fase acuosa, la muestra óptima depende de la naturaleza del relleno y de las condiciones experimentales, aunque en general se utilizan los siguientes compuestos: etilenglicol, p-toluensulfonato de sodio, glucosa, y fenilalanina.

I.1.b. Detectores

En general, los detectores utilizados en SEC son los mismos que en cromatografía líquida de alta performance (HPLC); aunque sólo un número limitado de detectores se emplean en SEC de polímeros. Estos detectores se pueden dividir en dos grupos: a) másicos; y b) de masa molar. Los detectores másicos se pueden dividir en: i) universales: refractómetro diferencial, detector de densidad, y detector evaporativo de dispersión de luz; y ii) selectivos: espectrofotómetro ultravioleta (UV), y espectrofotómetro infrarrojo (IR). Los detectores de masa molar miden: i) viscosidad específica (viscosímetros de capilar único, de dos capilares, y diferencial); ii) dispersión de luz (de bajo ángulo, de ángulo fijo, de dos ángulos, y multiángulo); y c) de presión osmótica, no disponible aún comercialmente.

Los sensores de masa molar son particularmente útiles cuando la naturaleza de la muestra es desconocida y/o cuando se analizan polímeros cromatográficamente complejos. En ambos casos, es necesario utilizar además un sensor másico para realizar el

tratamiento de los datos.

I.1.b.i) Refractómetro Diferencial (DR)

El DR es el sensor “universal” en SEC, ya que el índice de refracción de una solución de cualquier polímero es generalmente mayor que el índice de refracción del solvente puro. Para homopolímeros, la variación del índice de refracción Δn es proporcional al cambio de la concentración del polímero:

$$\Delta n(V) = \frac{\partial n}{\partial c} c(V) \quad (\text{I.22})$$

donde $\partial n/\partial c$ es el incremento específico del índice de refracción con la concentración. Cada combinación polímero-solvente tiene un valor de $\partial n/\partial c$ característico que depende de la temperatura y de la longitud de onda. Desafortunadamente, $\partial n/\partial c$ también presenta una ligera dependencia con la masa molar, aumentando con M para oligómeros, y alcanzando un valor constante para $M > 20000$ g/mol. Si este efecto no es corregido, las colas de baja masa molar del cromatograma de concentración resultan levemente subestimadas y en consecuencia el \bar{M}_n global es sobrestimado. Para copolímeros, la Ec. (I.22) solamente es válida cuando todos los comonómeros presentan igual $\partial n/\partial c$, y/o cuando la composición química no cambia con la masa molar (Meira y Vega, 2004).

Si se denomina $s_{\text{DR}}(V)$ al cromatograma de DR corregido por línea de base, entonces para homopolímeros, la señal de DR es proporcional a la concentración másica instantánea:

$$s_{\text{DR}}(V) = K_{\text{DR}} c(V) \quad (\text{I.23})$$

donde K_{DR} depende de la ganancia del instrumento y del $\partial n/\partial c$; pero sólo se requiere su valor cuando se necesitan conocer valores absolutos de $c(V)$. Un valor constante de K_{DR} se puede obtener experimentalmente inyectando una serie de soluciones del polímero

analizado de concentraciones conocidas, y midiendo las áreas bajo los $s_{DR}(V)$ correspondientes. Luego, K_{DR} es la pendiente de la recta de regresión lineal resultante. Con este procedimiento, no se requiere conocer el valor de $\partial n/\partial c$, pero la calibración obtenida sólo puede aplicarse al polímero analizado.

En el caso de copolímeros compuestos por dos comonómeros A y B que exhiben diferentes $\partial n/\partial c$, $s_{DR}(V)$ resulta (Meira y Vega, 2004; Meira *et al.*, 2004):

$$s_{DR}(V) = K_{DR,A} p_A(V) c(V) + K_{DR,B} [1-p_A(V)] c(V) \quad (I.24)$$

donde $p_A(V)$ es la fracción másica instantánea de A, y $K_{DR,A}$, $K_{DR,B}$ son las constantes de calibración del sensor DR respecto de A y B (obtenidas inyectando masas conocidas de los homopolímeros de A y B, respectivamente).

La señal de un DR presenta una fuerte dependencia con la temperatura, y la deriva en su línea de base generalmente es indicativa de un control de temperatura deficiente en la celda de detección. La sensibilidad de un DR a la concentración de polímero es relativamente baja ($\cong 10^{-3}$ mg/mL). Un DR exhibe una respuesta lineal en un amplio rango de concentraciones que cubre dos o tres órdenes de magnitud (Meira *et al.*, 2004).

1.1.b.ii) Sensor UV

Muchos solventes orgánicos son transparentes a la radiación UV, mientras que algunos polímeros absorben a longitudes de onda (λ) específicas del espectro UV. Por esta razón, los sensores UV se utilizan para detectar tanto la concentración total instantánea (en el caso de homopolímeros) como la concentración de grupos atómicos específicos (en copolímeros). La absorbancia (A) está relacionada con la concentración instantánea de los grupos químicos que absorben, c_i , a través de la ley de Beer:

$$A(V, \lambda) = \log \frac{I_0}{I_t(V, \lambda)} = \ell \sum_i \delta_i(\lambda) c_i(V) \quad (\text{I.25})$$

donde I_t e I_0 son las intensidades de la luz transmitida a través de las celdas que contienen la solución de polímero y el solvente puro, respectivamente; ℓ es la longitud de la celda; y δ_i es la absorptividad molar de los grupos que absorben, que depende del polímero, del solvente, y de la longitud de onda (Snyder *et al.*, 1997).

A λ fijo, los sensores UV son superiores a los DR para determinar la concentración instantánea de homopolímeros, debido a su menor sensibilidad a los cambios de temperatura. Para un dado sistema homopolímero-solvente y a una única longitud de onda, la señal de un cromatograma UV es:

$$s_{UV}(V) = K_{UV} c(V) \quad (\text{I.26})$$

donde la constante de calibración K_{UV} puede estimarse siguiendo un procedimiento similar al previamente descrito para K_{DR} .

En el caso de copolímeros compuestos por dos comonómeros A y B que exhiben diferentes absorptividades, $s_{UV}(V)$ resulta (Meira *et al.*, 2004):

$$s_{UV}(V) = K_{UV,A} p_A(V) c(V) + K_{UV,B} [1-p_A(V)] c(V) \quad (\text{I.27})$$

donde $K_{UV,A}$, $K_{UV,B}$ son las constantes de calibración del sensor UV respecto de A y B, (obtenidas inyectando masas conocidas del homopolímero A y B), respectivamente.

Una aplicación importante de los sensores UV es la determinación de la composición instantánea de un copolímero (ver Sección I.2.c.). Con los espectrofotómetros en línea con arreglo de diodos UV-Vis se puede obtener el espectro completo UV-Vis instantáneo del eluyente, y resultan particularmente útiles para determinar la naturaleza química de copolímeros y de aditivos de baja masa molar.

En general, los sensores UV exhiben una alta sensibilidad lineal sobre un

amplio rango de concentración, y son poco sensibles a las variaciones en el caudal y la temperatura. Los solventes deben presentar una baja absorbancia a las λ de trabajo; y por esta razón los solventes aromáticos, cetonas, dimetilformamida, ésteres, y cloroformo no pueden utilizarse a $\lambda < 250$ nm. También, algunos contaminantes de solventes (por ejemplo, los peróxidos en THF) pueden afectar considerablemente la señal UV.

1.1.b.iii) Detectores de Dispersión de Luz (LS)

La señal de LS es el exceso de Rayleigh (ΔR_θ), que mide (a uno o más ángulos de detección θ) el exceso de la intensidad de luz dispersada por la solución de polímero con respecto al solvente puro. Para soluciones diluidas se verifica (Burchard, 1999; Jackson y Barth, 1995, 2004; Wyatt, 2003):

$$\frac{K_{LS} c(V)}{\Delta R_\theta(V)} = \frac{1}{M_w(V) P(\theta)} + 2A_2 c(V) \quad (\text{I.28.a})$$

con:

$$\frac{1}{P(\theta)} \cong 1 + \frac{16\pi^2 n_0^2}{3\lambda_0^2} R_{g,z}^2(V) \text{sen}^2(\theta/2) \quad (\text{I.28.b})$$

$$K_{LS} = \frac{4\pi^2 n_0^2 (\partial n / \partial c)^2}{\lambda_0^4 N_{Av}} \quad (\text{I.28.c})$$

donde K_{LS} es la constante óptica dada por la Ec. (I.28.c); $P(\theta)$ es una función de dispersión, que describe la variación angular de la intensidad de luz dispersada, y depende del tamaño y la forma de las moléculas de polímero disuelto; A_2 es el segundo coeficiente del virial; n_0 es el índice de refracción del solvente; λ_0 es la longitud de onda; y $R_{g,z}^2$ es el radio de giro z-medio cuadrático.

La masa molar media instantánea, $M_w(V)$, se obtiene efectuando la doble

extrapolación $\{c \rightarrow 0, \text{ y } \theta \rightarrow 0\}$ en las Ecs (I.28), y a las bajas concentraciones empleadas en cromatografía, es posible despreciar el término de interacción polímero-polímero, $2 A_2 c$. Con estas consideraciones, la señal del LS se reduce a:

$$s_{\text{LS}}(V) = \Delta R_0(V) = K_{\text{LS}} c(V) M_w(V) \quad (\text{I.29})$$

Si se combina la Ec. (I.29) con la señal de DR [Ec. (I.23)] se obtiene:

$$M_w(V) = \frac{K_{\text{DR}} s_{\text{LS}}(V)}{K_{\text{LS}} s_{\text{DR}}(V)} \quad (\text{I.30})$$

Entonces, una medición absoluta de la masa molar se obtiene a partir del cociente entre las señales de LS y DR, y en tal caso no se requiere la calibración directa.

Para cumplir con la condición de $\theta \rightarrow 0$, se han desarrollado dos tipos de sensores. En los detectores de LS a bajo ángulo (LALLS), las mediciones se realizan a ángulos suficientemente pequeños (por ejemplo, entre 3 y 7°). En los detectores de LS multiángulo (MALLS), las mediciones se realizan a varios ángulos fijos, y se debe efectuar la extrapolación a $\theta = 0$.

Existen instrumentos comerciales con 2, 3, 7, y 18 ángulos de medición, θ_i . $M_w(V)$ y $R_{g,z}^2(V)$ pueden obtenerse a partir de $c(V)$ y del grupo de cromatogramas de LS, $\Delta R_{\theta,i}(V)$, a través de la versión simplificada del procedimiento de Zimm-plot (Wyatt, 2003). A cada V , la función experimental $[K_{\text{LS}} c(V) / \Delta R_{\theta,i}(V)]$ vs. $\sin^2(\theta_i/2)$ se ajusta con una recta por regresión lineal; y $M_w(V)$ se obtiene a partir de la ordenada mientras que $R_{g,z}^2(V)$ se obtiene de la pendiente [ver Ecs (I.28)].

La representación de $\log R_{g,z}^2$ vs. $\log M$ se denomina gráfico de conformación, y brinda información sobre la linealidad de las moléculas, en forma similar a la información dada por el gráfico de MHS, $\log[\eta]$ vs. $\log M$. Para moléculas lineales, las

pendientes de los gráficos de conformación varían entre 0.5 y 0.6, mientras que las moléculas ramificadas exhiben pendientes menores. Debido a que $R_{g,z}^2$ se obtiene por interpolación a varios ángulos de medición, esta variable no puede obtenerse con detectores LALLS. Además, muchos sensores LS pueden emplearse fuera de línea, y en este caso se pueden determinar los promedios globales para el polímero total, \bar{M}_w y $R_{g,z}^2$.

La calibración de un sensor LS consiste en estimar la constante óptica de la Ec. (I.28.c). Debido a la dependencia cuadrática de K_{LS} con $\partial n/\partial c$, se requieren mediciones exactas de $\partial n/\partial c$ para obtener estimaciones exactas de M_w . Los valores de $\partial n/\partial c$ para varios sistemas polímero-solvente y a varias longitudes de onda se encuentran tabulados (Brandrup e Immergut, 1989).

Para tener en cuenta las posibles variaciones en $\partial n/\partial c$ debido a variaciones en λ (por ejemplo, cuando la λ a la cual se conoce el $\partial n/\partial c$ difiere de la del sensor LS), se puede emplear la siguiente correlación (Brandrup e Immergut, 1989):

$$\frac{\partial n}{\partial c} = k' + \frac{k''}{\lambda^2} \quad (\text{I.31})$$

donde k' y k'' son la ordenada y la pendiente, respectivamente, del gráfico lineal de $\partial n/\partial c$ vs. $(1/\lambda^2)$. Para una solución polimérica dada, $\partial n/\partial c$ varía linealmente con n_0 . Por esta razón, el $\partial n/\partial c$ de un sistema dado polímero-solvente puede estimarse por interpolación entre valores conocidos de $\partial n/\partial c$ del polímero en diferentes solventes.

Para copolímeros, la estimación de $M_w(V)$ en línea por SEC / (DR + LS) solamente es posible cuando (Jackson y Barth, 1995, 2004; Wyatt, 2003): 1) ambos comonómeros exhiben el mismo $\partial n/\partial c$; o 2) el copolímero es homogéneo (es decir, su DCQ es muy angosta). En estos casos, el copolímero puede tratarse como un pseudo-homopolímero, y pueden aplicarse las Ecs (I.28). De lo contrario, solamente se puede

determinar una masa molar instantánea aparente, $M_w^*(V)$, que depende de n_0 . Finalmente, el \bar{M}_w global de un copolímero puede estimarse a partir de mediciones de LS fuera de línea en al menos tres solventes de diferentes n_0 (Jackson y Barth, 1995).

Un detector LS típico consiste de: i) una fuente de luz monocromática (normalmente, una luz láser polarizada verticalmente), que incide directamente sobre la celda de detección; y ii) uno o más fotodetectores que recogen la luz dispersada por las moléculas en solución, a cada ángulo θ . Por convención, $\theta = 0^\circ$ es la dirección de la luz transmitida. En LALLS, la luz dispersada es medida a $3 < \theta < 7^\circ$. Bajo estas condiciones, $P(\theta) \cong 1$ en la Ec. (I.28.b), y M_w se calcula con la Ec. (I.29). En la práctica, con los sensores LALLS se obtienen buenas señales para polímeros de alta masa molar ($M > 20000$ g/mol, y $R_g > 20$ nm).

En LS de ángulo recto (RALLS), las mediciones a $\theta = 90^\circ$ brindan una mayor relación señal/ruido que a bajos ángulos. Estas señales se aplican principalmente a la medición de oligómeros, ya que para moléculas pequeñas $P(\theta) \cong 1$ y puede aplicarse la Ec. (I.29).

En LS a dos ángulos (TALLS), las mediciones se realizan a dos ángulos (90° y 15°), y es posible estimar M_w y $R_{g,z}$ a través de las Ecs (I.28). Mejores estimaciones de ambas variables se obtienen cuando se mide a varios ángulos (MALLS), ya que en este caso se cuenta con mayor información. En la práctica, algunos ángulos pueden brindar escasa información útil, y se los suele descartar durante el procesamiento de los datos.

I.1.b.iv) Detectores de Viscosidad Específica (SV)

Distintos tipos de viscosímetros permiten medir o estimar en línea la viscosidad específica, η_{sp} . Dado que la η_{sp} es adimensional [Ec. (I.10)], no se requiere ninguna constante de calibración; y se puede asumir el cromatograma de viscosidad,

$s_{SV}(V)$, como la señal de viscosidad específica instantánea $\eta_{sp}(V)$; es decir:

$$s_{SV}(V) = \eta_{sp}(V) \quad (\text{I.32})$$

A las bajas concentraciones empleadas en cromatografía, la $[\eta]$ instantánea [Ec. (I.11)] se puede obtener directamente a partir de la relación de señales (sin el requisito de la extrapolación a concentración cero):

$$[\eta](V) \cong \eta_{sp}(V)/c(V) = K_{DR} [s_{SV}(V)/s_{DR}(V)] \quad (\text{I.33})$$

Resultados algo más exactos se obtienen a través de las siguientes expresiones de “un punto” (Brandrup e Immergut, 1989), desarrolladas para estimar $[\eta]$ mediante una única medición de concentración y viscosidad:

$$[\eta](V) = \frac{2^{0.5}}{c(V)} \left[\frac{\eta(V)}{\eta_0} - 1 - \ln\left(\frac{\eta(V)}{\eta_0}\right) \right]^{0.5} = \frac{2^{0.5}}{c(V)} [\eta_{sp}(V) - \ln(\eta_{sp}(V) + 1)]^{0.5} \quad (\text{I.34})$$

donde la primera igualdad se utiliza cuando se miden $c(V)$, $\eta(V)$, y η_0 ; y la segunda igualdad cuando se miden $c(V)$ y $\eta_{sp}(V)$.

Todos los viscosímetros en línea se basan en la ley de Poiseuille, que calcula la caída de presión (ΔP) causada por una solución polimérica de viscosidad η , que circula a un caudal q a través de un capilar de radio r_c y longitud ℓ_c :

$$\Delta P(V) = \frac{8 \ell_c}{\pi r_c^4} q \eta(V) \quad (\text{I.35})$$

La Ec. (I.35) indica que $\Delta P(V) \propto \eta(V)$, para un capilar dado y a caudal constante.

Los viscosímetros en línea más primitivos tenían un capilar único (Letot *et al.*, 1980; Lesec *et al.*, 1988; Lesec y Volet, 1990; Kuo *et al.*, 1990), y presentaban: (i) baja sensibilidad (debido a la señal extremadamente baja de ΔP); (ii) alta sensibilidad de ΔP a fluctuaciones en el caudal; y (iii) alta sensibilidad de η y η_0 a los cambios de

temperatura. Estos problemas fueron superados considerablemente en los viscosímetros de capilares múltiples (Lsec, 2001), que miden simultáneamente η y η_0 , o η_{sp} . En el circuito de circulación del solvente se incluye un reservorio de volumen mucho mayor al del capilar, que permite medir la viscosidad del solvente mientras eluye la solución polimérica. En estos reservorios, la solución se diluye tanto que a la salida se tiene prácticamente solvente puro. Estos reservorios deben purgarse frecuentemente para eliminar cualquier traza de polímero.

La Fig. I.3.a) muestra un esquema de un viscosímetro de dos capilares idénticos conectados en serie, con un reservorio intermedio. Las mediciones son las caídas de presión en cada capilar. En el primer capilar, $\Delta P \propto \eta$, mientras que en el segundo, $\Delta P_0 \propto \eta_0(V)$. Así, $\eta_{sp} = (\eta/\eta_0) - 1 = (\Delta P/\Delta P_0) - 1$. En esta configuración, las oscilaciones en la temperatura y en el caudal se compensan automáticamente, ya que se presentan simultáneamente en ambos sensores.

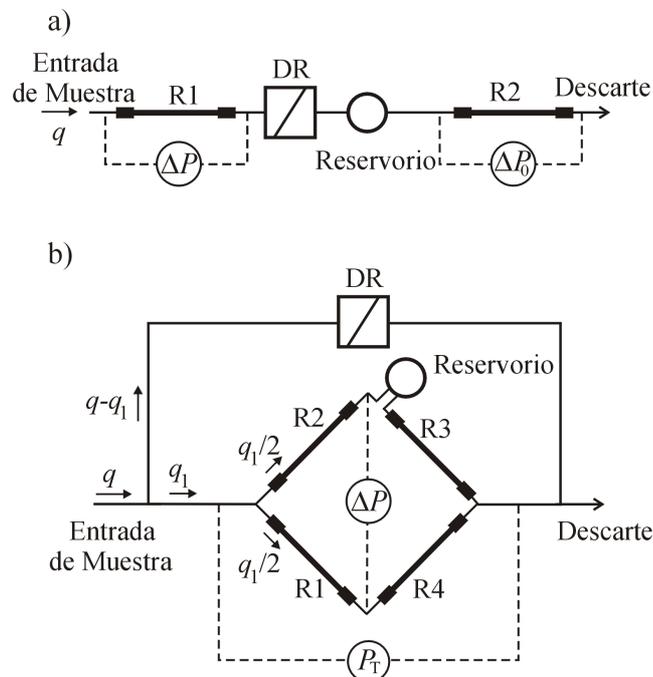


Figura I.3. Detectores de viscosidad. a) Viscosímetro de dos capilares en serie. b) Detector Viscotek, Modelo 200, con refractómetro diferencial y viscosímetro de puente de Wheatstone.

En la Fig. I.3.b) se muestra el esquema de un viscosímetro de puente Wheatstone (Haney, 1985 a,b), con cuatro capilares R1- R4 en puente, y un reservorio en serie anterior al capilar R3. Inicialmente, el solvente puro circula a través de los 4 capilares, y $\Delta P \cong 0$ porque los puntos medios de las ramas del puente están perfectamente balanceados. Cuando la solución de polímero llega al viscosímetro, los capilares R1, R2, y R4 se llenan, pero el capilar R3 continúa con solvente debido al efecto de dilución del reservorio. De esta forma, se produce una diferencia de presión (ΔP) en el puente, y la η_{sp} resulta (Haney, 1985b):

$$\eta_{sp}(V) = \frac{4 \Delta P(V)}{P_T(V) - 2 \Delta P(V)} \quad (I.36)$$

donde P_T es la caída total de presión en el sensor. Como $P_T \approx$ constante, y $P_T \gg \Delta P$, entonces $\eta_{sp} \propto \Delta P$. Debido a su configuración, este instrumento posee una sensibilidad elevada, pero los desbalances en el caudal (por cada rama del viscosímetro y con respecto al DR), pueden originar errores importantes.

I.1.c. Calibraciones de Masa Molar

Para estimar la DMM en un cromatógrafo equipado únicamente con un detector de concentración, se requiere de una calibración de masa molar. Tal calibración depende del sistema cromatográfico, de la naturaleza de los estándares de calibración, y de las condiciones operativas (caudal, temperatura, etc). Para polímeros sintéticos, los kits de calibración más comunes contienen estándares angostos de poliestireno (PS) sintetizados por polimerizaciones aniónicas. Para ciertos polímeros, sólo se dispone de estándares con DMMs anchas.

I.1.c.i) Calibración Directa: $\log M(V)$

La calibración directa (Fig. I.2) se obtiene a partir de estándares angostos de

la misma naturaleza química que el polímero analizado. Cada estándar de masa molar M_i origina un cromatograma angosto de volumen de retención medio V_i . Luego, se obtiene la calibración por interpolación de los pares de datos experimentales (M_i, V_i) con una expresión analítica. La función $\log M(V)$ resultante es normalmente lineal en su zona central, aunque a veces es interpolada con polinomios de orden 3 (polinomios de mayor orden pueden producir oscilaciones poco realistas en la curva ajustada).

Generalmente, se desconoce la DMM exacta de los estándares comerciales, y sólo algunas masas molares medias son provistas por los fabricantes. En general, existe incertidumbre para obtener los valores experimentales de M_i y V_i . Para estándares de baja masa molar, los valores de \bar{M}_n son razonablemente exactos (determinados por ejemplo por osmometría de presión de vapor), mientras que los valores de \bar{M}_w (obtenidos por LS) son relativamente erróneos. Lo opuesto sucede con los estándares de altas masas molares. Algunos proveedores reportan la masa molar del pico (M_p). Alternativamente, se suele asignar al pico del cromatograma la media geométrica de las masas molares medias $(\bar{M}_n \bar{M}_w)^{0.5}$; pero esta expresión es estrictamente válida para cromatogramas normal-logarítmicos (Dawkins, 1984).

Si se dispone de estándares de masas molares diversas es posible cubrir el rango dinámico de cualquier conjunto de columnas. Se debe evitar la degradación de los estándares de masas molares ultra-altas durante su disolución y fraccionamiento.

1.1.c.ii) Calibración Universal: $\log J(V)$

La proporcionalidad entre $[\eta]M$ y V_h en la Ec. (I.14) sustenta el principio de calibración “universal” propuesto por Benoit *et al.* (1967). Aún bajo resolución perfecta, un polímero cromatográficamente complejo exhibe una DMM en la celda del detector. En este caso, Hamielec y Ouano (1978) probaron que M en la Ec. (I.14) debería ser

reemplazado por la masa molar media en número instantánea $M_n(V)$.

La calibración universal, $\log J(V)$, está relacionada con la calibración directa, $\log M(V)$, a través de las constantes de MHS como:

$$\log J(V) = \log\{[\eta] M\}(V) = \log\{K M^{\alpha+1}(V)\} = \log K + (\alpha+1) \log M(V) \quad (\text{I.37})$$

por lo que si se conocen $\log J(V)$ y $\log M(V)$, se pueden determinar las constantes de MHS, a partir de la pendiente y ordenada de la gráfica de $\log J(V)$ vs. $\log M(V)$.

La calibración universal se requiere cuando no se dispone de estándares del polímero analizado y/o cuando se desconoce su naturaleza. También se aplica a copolímeros, polímeros ramificados, y biopolímeros; o cuando un polímero desconocido es analizado por viscometría en línea. Claramente, esta calibración es “universal” sólo para un cromatógrafo dado bajo condiciones operativas específicas (Provdor y Kuo, 1999). La forma de $\log J(V)$ es similar a la forma de $\log M(V)$ presentada en la Fig. I.2. En efecto, cuando $\log M(V)$ es lineal y los coeficientes de MHS de los estándares son constantes, entonces $\log J(V)$ también es lineal.

1.1.c.iii) Calibraciones “Ad Hoc”

Las calibraciones *ad hoc* dependen de la DMM del polímero analizado, se obtienen por cociente de las señales medidas a partir de los sensores de masa y masa molar, y representan las masas molares medias instantáneas asociadas con el sistema de detección usado (Baumgarten *et al.*, 2002; Jackson y Barth, 1995, 2004; Lehmann *et al.*, 1996).

En el caso de detección DR + LS la calibración *ad hoc*, $\log M_w(V)$, se obtiene a partir de la Ec. (I.30) como:

$$\log M_w(V) = \log \left[\frac{K_{DR}}{K_{LS}} \frac{s_{LS}(V)}{s_{DR}(V)} \right] = K_w + \log \left[\frac{s_{LS}(V)}{s_{DR}(V)} \right] \quad (I.38)$$

donde $K_w = \log(K_{DR} / K_{LS})$.

En el caso de detección DR + SV, se obtiene la masa molar media instantánea basada en viscosidad $M_v(V)$. Para ello, se calcula $[\eta](V)$ a partir de la Ec. (I.33); y se relaciona $[\eta]$ con M a través de: a) las constantes de MHS [Ec. (I.12)], o b) la calibración universal $\log J(V)$. Utilizando estas relaciones, resultan dos calibraciones *ad hoc* posibles:

$$\log M_{v,MHS}(V) = \log \left[\frac{K_{DR}}{K} \left(\frac{s_{SV}(V)}{s_{DR}(V)} \right) \right]^{1/\alpha} = K_v + \alpha^{-1} \log \left[\frac{s_{SV}(V)}{s_{DR}(V)} \right] \quad (I.39.a)$$

$$\begin{aligned} \log M_{v,J}(V) &= \log J(V) - \log \left(K_{DR} \frac{s_{SV}(V)}{s_{DR}(V)} \right) = \\ &= \log J(V) - \log K_{DR} - \log \left[\frac{s_{SV}(V)}{s_{DR}(V)} \right] \end{aligned} \quad (I.39.b)$$

Donde $K_v = \alpha^{-1} \log(K_{DR} / K)$; y los subíndices MHS y J indican con que dato se obtuvo la calibración.

Las Ecs (I.38, I.39) sólo son aplicables en la región media de los cromatogramas, debido a que en sus extremos la relación señal/ruido es baja y los cocientes de señales resultan funciones oscilatorias y no lineales. En el Capítulo II se analizarán diferentes fuentes de error que afectan a las calibraciones *ad hoc* calculadas.

I.2. Tratamiento de Datos en SEC

I.2.a. Estimación de la Distribución de Masas Molares (DMM)

I.2.a.i) DMM de un Homopolímero Lineal

La DMM de un homopolímero lineal puede estimarse combinando una señal másica con: (1) la calibración directa, $\log M(V)$, originando $w(\log M)$; y (2) una calibración *ad hoc*, $\log M_w(V)$, $\log M_{v,MHS}(V)$, $\log M_{v,J}(V)$, originando $w(\log M_w)$, $w(\log M_{v,MHS})$ o $w(\log M_{v,J})$. En el caso (2), las calibraciones *ad hoc* exhiben oscilaciones en las colas de los cromatogramas, y puede adoptarse como solución despreciar las colas de la DMM, con la consiguiente subestimación de la polidispersidad global. Una solución más adecuada consiste en extrapolar la tendencia exhibida por la calibración en la región media del cromatograma. Por ejemplo, Brun *et al.* (2000) estimaron un polinomio $\log M_w(V)$ que minimiza los errores cuadráticos medios entre $\Delta R_\theta(V)$ medido y su predicción de acuerdo a la Ec. (I.30); y luego lo extrapolaron hacia las colas del cromatograma.

1.2.a.ii) DMM de un Copolímero

La determinación de la DMM de un copolímero resulta más engorrosa debido a que también presenta una DCQ (para una misma masa molar existirán moléculas con distinta composición).

Para estimar la masa molar instantánea suele emplearse la calibración universal, o los coeficientes de MHS del copolímero analizado. Para copolímeros en bloque, se ha propuesto estimar los coeficientes de MHS por interpolación (con la composición química) entre los parámetros de los homopolímeros correspondientes (Goldwasser y Rudin, 1983).

En el caso de un copolímero bloque (AB) con detección DR + UV, y donde ambos comonómeros exhiben diferentes $\partial n/\partial c$ y absorptividades, las Ecs (I.24, I.26) permiten calcular el cromatograma másico, $c(V)$, a partir de una combinación lineal de los cromatogramas $s_{DR}(V)$ y $s_{UV}(V)$, y de las calibraciones $K_{DR,A}$, $K_{DR,B}$, $K_{UV,A}$, y $K_{UV,B}$:

$$c(V) = \frac{K_{UV,A} - K_{UV,B}}{K_{DR,B} K_{UV,A} - K_{DR,A} K_{UV,B}} s_{DR}(V) + \frac{K_{DR,B} - K_{DR,A}}{K_{DR,B} K_{UV,A} - K_{DR,A} K_{UV,B}} s_{UV}(V) \quad (I.40)$$

La calibración de masa molar del copolímero, $\log M_{AB}(V)$, se puede calcular por interpolación de las calibraciones individuales, $\log M_{PA}(V)$ y $\log M_{PB}(V)$ con la composición química $p_A(V)$, como (Runyon *et al.*, 1969):

$$\log M_{AB}(V) = p_A(V) \log M_{PA}(V) + [1 - p_A(V)] \log M_{PB}(V) \quad (I.41)$$

En base al concepto de calibración universal, y para aquellos casos en que las calibraciones de los homopolímeros son lineales y paralelas, se desarrolló la siguiente expresión (Chang, 1971):

$$M_{AB}(V) = \frac{M_{PA}(V)}{1 + (r - 1)[1 - p_A(V)]} \quad (I.42)$$

donde $r = M_{PA}(V) / M_{PB}(V) = \text{cte.}$

1.2.a.iii) DMM de un Homopolímero Ramificado

La determinación de la DMM de un homopolímero ramificado es dificultosa debido a que también presenta una DGR (para una misma masa molar existirán moléculas con distinto número de ramas). Un homopolímero ramificado puede ser tratado como un homopolímero lineal desde el punto de vista de la estimación de la DMM cuando: (1) la DMM y la DGR instantáneas son muy angostas, o (2) el número medio de ramas por molécula aumenta en forma monótona con la masa molar.

La DMM de un homopolímero ramificado suele obtenerse combinando sensores DR + SV. La masa es provista directamente por el DR; mientras que la masa molar se estima con alguna de las calibraciones ad hoc [Ecs (I.39)]. Similarmente a lo comentado para copolímeros, deben compensarse las oscilaciones en las colas de los cromatogramas. Por ejemplo, Meira *et al.* (2004) consideraron la DMM de poli(acetato de

vinilo), ajustando $\log\{[\eta]_b\}(V)$ con un polinomio de orden 3 y extrapolando $\log\{[\eta]_b\}(V)$ y $\log M_{v,j}$ hacia las colas de los cromatogramas.

I.2.b. Estimación de Masas Molares Medias Globales

En el caso de detección DR + LS, el cromatograma másico no se necesita para calcular el \overline{M}_w global. En efecto, a partir de la Ec. (I.29), resulta:

$$\overline{M}_w = \frac{\int_0^{\infty} s_{LS} dV}{K_{LS} W} \quad (\text{I.43})$$

donde W la masa total inyectada. Este cálculo es particularmente útil cuando fracciones másicas reducidas de alta masa molar permanecen en el sensor DR sin ser detectadas.

En el caso de detección DR + SV, es posible estimar el \overline{M}_n global de un polímero sin requerir su cromatograma de concentración. Por ejemplo, la expresión desarrollada por Goldwasser es (Balke *et al.*, 1994; Jackson y Barth, 1995):

$$\overline{M}_n = \frac{W}{\int_0^{\infty} [\eta_{sp}(V)/J(V)] dV} \quad (\text{I.44})$$

La ecuación de Goldwasser, acarrea tres fuentes de error: (i) la reducida sensibilidad del detector de SV a las bajas masas molares; (ii) la dispersión axial en los cromatogramas; y (iii) la exactitud de la calibración universal. Comparando este valor con el \overline{M}_n calculado a partir de la DMM estimada por DR + SV, puede evidenciarse la heterogeneidad de la composición química de un copolímero, cuando los dos \overline{M}_n se desvían en forma significativa (el \overline{M}_n calculado por el método de Goldwasser no es afectado por la composición química de la muestra).

I.2.c. Estimación de Otras Distribuciones

I.2.c.i) DCQ en Copolímeros

La DCQ de un copolímero AB describe la masa w_{AB} de moléculas de copolímero con fracción másica p_A y se representa como $w_{AB}(p_A)$. Para calcular la DCQ por SEC, se debe verificar que: (i) la DCQ instantánea sea angosta; y (ii) la composición química varíe en forma monótona con V (Meira y Vega, 2004). Con doble detección DR + UV, la masa se calcula con la Ec. (I.40); mientras que $p_A(V)$ se evalúa a partir de las Ecs (I.24, I.27), según:

$$p_A(V) = \frac{K_{UV,B} - K_{DR,B} [s_{UV}(V)/s_{DR}(V)]}{(K_{UV,B} - K_{UV,A}) + (K_{DR,A} - K_{DR,B}) [s_{UV}(V)/s_{DR}(V)]} \quad (I.45)$$

Según la Ec. (I.45), $p_A(V)$ resulta de una combinación no lineal del cociente de las señales de ambos sensores, por lo que sólo son posibles estimaciones aceptables en la región media del cromatograma.

I.2.c.ii) DGR en Homopolímeros Ramificados

La DGR en un homopolímero ramificado describe la masa w de las moléculas de polímero que contienen b ramas por molécula; y se representa como $w(b)$, con $b = b_n, b_w$. Las DGR puede estimarse por SEC / (DR + SV). La señal del DR provee directamente la masa. Para calcular b , se puede aplicar el siguiente procedimiento: (i) determinar $[\eta]_b(V)$ y $M_{v,J}(V)$, a partir de las Ecs (I.33) y (I.39.b), respectivamente; (ii) determinar $[\eta]_b(M)$; (iii) calcular $g(M)$ a través de la siguiente expresión [derivada de las Ecs (I.12), (I.18), y (I.19)]:

$$g(M) = \left[\frac{[\eta]_b(M_{v,J})}{K_\ell M_{v,J}^\alpha} \right]^{1/\epsilon} \quad (I.46)$$

y (iv) calcular la variación instantánea de $b_n(M)$ o $b_w(M)$ a través de las expresiones de Zimm-Stockmayer [Ecs (I.16, I.17)]. Finalmente, combinando la DMM $w(M)$ y la función $b_n(M)$ [o $b_w(M)$], se calcula la DGR $w(b_n)$ [o $w(b_w)$].

Para calcular la DGR por SEC, se debe verificar que: 1) la DGR instantánea debe ser angosta; y 2) b_n [o b_w] debe aumentar en forma monótona con $\log M$. Afortunadamente, es el caso de muchos homopolímeros ramificados producidos por polimerización por radicales libres, donde las reacciones de ramificación involucran a cadenas de polímero acumulado, y por lo tanto existe mayor probabilidad de formación de cadenas largas que cortas. Mientras los valores instantáneos b_n (o b_w) son números reales, el número de ramas es estrictamente un número entero b . Por esta razón, la distribución de ramas es una distribución discreta.

I.2.d. Principales Fuentes de Error en SEC

I.2.d.i) Fuentes de Error Básicas

Los cromatogramas obtenidos en SEC incluyen errores debidos a: (a) el trazado de la línea de base, (b) la variación del volumen de retención, (c) la variación en el caudal, y (d) el ruido de medición.

La línea de base (LB) presenta incertidumbres cuando los picos tienen deriva (o cuando se presentan picos negativos), y su importancia radica en que se afectan directamente las ordenadas del cromatograma corregido por LB.

El volumen de retención de un polímero puede cambiar con la variación de las condiciones experimentales. El V aumenta con el incremento de la concentración de la solución (“efecto de concentración”). La magnitud del desplazamiento del pico hacia mayores V , es más pronunciada en el caso de los polímeros de mayor masa molar (Mori, 1984). Cuando se inyecta un mayor volumen de solución, también se observa un aumento

apreciable de V , aún para polímeros de baja masa molar (“efecto de sobrecarga”) (Mori, 1977). Por tal motivo es importante utilizar el mismo volumen de inyección tanto para la muestra como para los estándares de calibración. El aumento en el volumen inyectado también produce una disminución en el número de platos teóricos, originando masas molares y DMMs desviadas de los valores reales.

El V aumenta con el incremento del caudal (Mori, 1977), debido a efectos de no-equilibrio, originados por la difusión lenta del polímero dentro y fuera de los poros de las partículas del relleno. Con una disminución del caudal, la eficiencia y la resolución se incrementan (Mori, 2001).

Se han observado aumentos de V con la temperatura de la columna (Mori, 2001), debido a dos efectos: a) una expansión o contracción de la fase móvil en la columna; y b) mecanismos de interacción secundarios entre el soluto y la fase estacionaria. Otros factores que afectan el V son: la viscosidad de la fase móvil; el tamaño de los poros del relleno; y el tamaño efectivo de las moléculas en solución.

Las variaciones en el caudal pueden ser causadas por un mal funcionamiento de la bomba. Además de esta anomalía, los viscosímetros en línea exhiben el llamado “efecto Lesecc” (Lesecc, 1994; Netopilík *et al.*, 2000), que se produce cuando las fracciones de mayor masa molar ingresan a los capilares y originan una brusca caída de presión debido al incremento de la viscosidad de la solución de polímero. Como consecuencia, se produce un corrimiento del cromatograma de viscosidad hacia mayores V , y puede confundirse con el efecto del volumen interdetector. La intensidad de este efecto depende de tres parámetros fundamentales: a) la concentración; b) la masa molar; y c) la polidispersidad de la muestra. Generalmente, cuando estos tres factores se incrementan, el “efecto Lesecc” es mayor.

El ruido de medición es propio de todos los sensores electrónicos, y se

manifiesta por oscilaciones aleatorias de la señal medida, de amplitud moderada y frecuencia relativamente elevada.

I.2.d.ii) El Volumen Interdetector (IDV)

El IDV es una variable crucial en SEC con detección múltiple (MD-SEC). El IDV depende del volumen de los capilares que conectan los sensores y de la configuración de los detectores (si están colocados en serie o en paralelo).

Existen diferentes métodos para hallar el IDV: a) la evaluación directa del volumen de los capilares a través de sus dimensiones físicas (Cheung *et al.*, 1993); b) la medición del tiempo que tarda una molécula monodispersa en alcanzar un detector y otro (Brun, 1998); c) la superposición de las curvas de calibración de $[\eta]$ obtenidas con PS polidisperso y con estándares angostos de PS; y d) por recuperación de las constantes de MHS en una muestra de PS (Lew *et al.*, 1993).

La configuración utilizada para conectar los sensores puede afectar la exactitud con que se determina el IDV. Las configuraciones en serie parecen ser superiores a las configuraciones en paralelo, aunque tienen otros problemas asociados, como por ejemplo, la mayor propagación de los efectos de la dispersión axial (Jackson y Balke, 1995; Netopilík, 1998b).

El error en el IDV afecta a las curvas de calibración *ad hoc*, observándose una disminución de la pendiente con valores crecientes del IDV (Netopilík, 1998b). Cuando la calibración de masa molar se calcula como $\log M_{v,J}$ [Ec. (I.39.b)], la pendiente disminuye a medida que aumenta el error en el IDV, mientras que lo contrario se observa en las calibraciones obtenidas $\log M_{v,MHS}$ [Ec. (I.39.a)], y $\log M_w$ [Ec. (I.38)] (Netopilík, 2001). Estos errores son analizados con mayor detalle en el Capítulo II.

I.2.d.iii) El Ensanchamiento Instrumental (E.I.)

El E.I. engloba un conjunto de efectos indeseados en SEC, y da lugar a que moléculas con igual V_h eluyan a distinto V , distorsionándose así el concepto de fraccionamiento por V_h . El E.I. se debe principalmente a la dispersión axial en las columnas (Potschka, 1993; Busnel *et al.*, 2001; Netopilík, 2002; Striegel, 2001; Baumgarten *et al.*, 2002), aunque también incluye efectos extra-columna tales como inyecciones finitas, celdas de detección finitas, flujos parabólicos en los capilares, efectos de extremos de columna, y densidad heterogénea del relleno de las columnas (Hupe *et al.*, 1984).

Se han desarrollado distintos modelos matemáticos que describen con detalle el proceso de fraccionamiento SEC. Su objetivo es estimar los cromatogramas conociendo *a priori* la DMM, las interacciones polímero-solvente-relleno, las características de las columnas, y las condiciones del caudal (Potschka, 1993; Netopilík, 2002; Dondi *et al.*, 2002; Pasti *et al.*, 2003). Algunos modelos se comentan en la Sección I.3. Desafortunadamente, son modelos muy complejos que incluyen demasiados parámetros (normalmente difíciles de estimar), por lo que su aplicación para la corrección del E.I. ha sido muy escasa.

Afortunadamente, el E.I. puede despreciarse en el caso más normal de cromatogramas suaves y anchos. Pero cuando se desean obtener resultados cuantitativos a partir de cromatogramas muy angostos o multimodales, entonces todos los cromatogramas deben ser corregidos por E.I. previo al cálculo de las masas molares y de otras características del polímero.

Cuando se analiza un homopolímero lineal, y aun en ausencia de fraccionamientos secundarios (o entálpicos), el E.I. determina que una variedad de volúmenes hidrodinámicos estén presentes instantáneamente en la celda del detector. El

E.I. suaviza y ensancha todos los cromatogramas medidos. El efecto es sobreestimar la polidispersidad global cuando las masas molares se calculan a partir de la señal de concentración y de la calibración directa; y subestimar la polidispersidad global cuando se emplean detectores sensibles a la masa molar (Jackson y Yau, 1993; Netopilík, 1997). Dada la importancia del E.I. en esta tesis, sus efectos se discutirán más profundamente en la Sección I.4.

I.3. Modelos de Fraccionamiento

Cuando se inyecta un pequeño volumen de muestra en un cromatógrafo, se forma una banda al principio de la columna. A medida que esta banda avanza por la columna, su amplitud aumenta y la concentración disminuye (Yau, 1979). Los cromatogramas son el resultado del complejo proceso físico-químico de fraccionamiento, y generalmente no pueden plantearse *a priori* funciones que describan el perfil de concentración del soluto al salir de la columna. Para describir el fraccionamiento se desarrollaron modelos matemáticos que permiten estimar los cromatogramas a partir del conocimiento *a priori* de la DMM del polímero, de las interacciones polímero-solvente-fase estacionaria, de las características de la columna y de su relleno, y del caudal.

En esta sección, se comentan someramente algunos modelos de fraccionamiento disponibles en la literatura; aunque no serán explotados en el resto de la tesis.

I.3.a. Modelos de Fraccionamiento en las Columnas

I.3.a.i) Modelos de Equilibrio o Termodinámicos

Estos modelos consideran los procesos de difusión y de transferencia de masa que tienen lugar en el interior de la columna (Potschka, 1993). El proceso de “difusión eddy” se produce cuando las moléculas de la muestra circulan por caminos diferentes y a

distintas velocidades a través del lecho de la columna. Dado que algunas moléculas se mueven más rápido que otras en un dado período de tiempo, la amplitud de la banda inicial se va incrementando.

Una segunda contribución se debe a la resistencia del soluto a la transferencia de masa en la fase móvil. El líquido cercano a la superficie de las partículas de relleno se mueve más lentamente que en la parte central de la corriente, y entonces las moléculas de soluto en el centro migrarán más lejos que las otras. Este proceso también se conoce como “transferencia de masa extrapartícula”.

La tercera contribución es la resistencia del soluto a la transferencia de masa en la fase estacionaria, debida a la lenta difusión en los poros de las partículas del relleno. Moléculas grandes de soluto con coeficientes de difusión bajos, producen un efecto más pronunciado. Este proceso también se conoce como “transferencia de masa intrapartícula”, y es el principal contribuyente al E.I. en SEC de macromoléculas.

En la teoría de los “platos” ya comentada en la sección I.1.a.v), el volumen total de la fase móvil en la columna se expresa como $V_m = N v_m$, donde v_m es el volumen de fase móvil en cada plato. El volumen total de la fase estacionaria es $V_s = N v_s$, donde v_s es el volumen de fase estacionaria en cada plato. El balance de masa en cada plato resulta (Felsing, 1998):

$$V_m \frac{dc_j}{dt} + V_s \frac{dq_j}{dt} = F_v (c_{j-1} - c_j) \quad (\text{I.47})$$

donde c_j y q_j son las concentraciones de soluto en el equilibrio en las fases móvil y estacionaria, respectivamente, en cada plato j ; y F_v es el caudal de la fase móvil. El perfil de retención del soluto, $c(V)$, resulta (Felsing, 1998):

$$c(V) = \frac{W}{\sqrt{2\pi V_p^2 / N}} \exp \left[-\frac{N}{2} \left(\frac{V - V_p}{V_p} \right)^2 \right] \quad (\text{I.48})$$

donde V_p es el volumen de retención de pico; y W es la masa de la muestra. La concentración $c(V)$ exhibe una distribución normal con media, V_p y varianza, V_p^2/N .

Otro modelo de “balance de masas” considera a la distribución del soluto entre las fases móvil y estacionaria como un continuo, y calcula la migración del soluto a lo largo de la columna. El modelo incluye los efectos de convección (debido a la velocidad de la fase móvil y la porosidad ϵ_r del relleno); y de difusión (debido al flujo de soluto por dispersión axial). El modelo asume que la columna es radialmente homogénea, la compresibilidad de la fase móvil es despreciable, el coeficiente de difusión axial y la temperatura son constantes, y la difusión en la fase estacionaria es nula, resultando (Felinger, 1998):

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \frac{1 - \epsilon_r}{\epsilon_r} \frac{\partial q}{\partial t} + u \frac{\partial c}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \quad (\text{I.49})$$

donde c y q son la concentración del soluto en la fase móvil y en la fase estacionaria, respectivamente; u es la velocidad lineal de la fase móvil; D_a es el coeficiente de dispersión axial; y z es la coordenada de longitud de la columna. Resolviendo la Ec. (I.49) bajo condiciones de longitud infinita y considerando que se inyecta un pulso infinitesimal a $z = 0$, se obtiene una ecuación idéntica a la Ec. (I.48).

El modelo de “velocidad general” tiene en cuenta los efectos de los fenómenos de transporte y cinéticos que contribuyen al E.I.: la difusión eddy, la difusión molecular longitudinal o axial, y la resistencia a la transferencia de masa. Soluciones aproximadas predicen cromatogramas *cuasi*-gaussianos (Felinger, 1998). Una aplicación clásica es la ecuación de van Deemter, que describe la altura de los platos teóricos a través

de tres términos (Yau, 1979):

$$H = A + \frac{B}{u} + C u \quad (\text{I.50})$$

donde los términos A, B y C están asociados con la difusión eddy, la difusión longitudinal del soluto en la fase móvil (debido al movimiento browniano de las moléculas), y la transferencia de masa, respectivamente. La difusión eddy es independiente de la velocidad de la fase móvil, y depende del diámetro de las partículas y de la calidad del empaquetamiento de las columnas (Potschka, 1993). La difusión longitudinal disminuye cuando aumenta el caudal, debido al menor tiempo disponible para que se produzca la difusión; y depende del coeficiente de difusión del soluto (D_m) en la fase móvil (Potschka, 1993). La transferencia de masa, aumenta con el caudal. En SEC, la difusión longitudinal de macromoléculas con $M > 30000$ g/mol (Striegel, 2001) es despreciable debido a que D_m varía en forma inversamente proporcional con M , y la dispersión es controlada por el término de transferencia de masa (Yau, 1979). El término C resulta de la contribución de los efectos extrapartícula o transferencia de masa en la fase móvil, presentes también en rellenos de sólidos no porosos (factor C_M); y de los efectos de la fase móvil estancada o transferencia de masa en la fase estacionaria (factor C_{SM}) (Yau, 1979; Potschka, 1993). Entonces:

$$H = A + \frac{B}{u} + C_M u + C_{SM} u \quad (\text{I.51})$$

Los factores C_M y C_{SM} dependen del diámetro de las partículas y de los coeficientes de difusión del soluto extrapartícula y en la fase móvil estancada, respectivamente (Yau, 1979; Potschka, 1993).

I.3.a.ii) Modelos Estocásticos

El modelo estadístico de cromatografía fue desarrollado por Giddings y Eyring (1955). Esta teoría considera la migración aleatoria de una única molécula a lo largo de la columna cromatográfica representada por pasos de ingreso – egreso sobre sitios idénticos de la fase estacionaria, independientes de los mecanismos fisicoquímicos responsables de la retención. La teoría estocástica tiene en cuenta el carácter dinámico del proceso cromatográfico, y permite determinar la forma exacta del pico (Dondi *et al.*, 2002).

Para modelar el transporte del soluto desde el fluido a la fase estacionaria se considera: (i) la difusión de las moléculas en el sentido axial en el fluido; (ii) la difusión no estacionaria a través de las líneas de flujo; (iii) la convección por avance según las líneas de flujo; y (iv) el proceso de retención. Para la difusión, se asume que las partículas se mueven en incrementos fijos (hacia delante o atrás, y hacia arriba o abajo), según pasos aleatorios (*random walk*). La convección se modela permitiendo que la partícula se mueva en una línea de flujo por un período de tiempo finito. A bajas concentraciones, las líneas de flujo no son afectadas por la presencia de partículas pequeñas. El proceso de retención se modela generalmente a través de una función de distribución de probabilidad de Poisson, que tiene en cuenta los procesos de adsorción y desorción del soluto en la fase estacionaria. El tiempo que el soluto reside en la fase estacionaria se obtiene por suma de las probabilidades de adsorción – desorción. Para un número aproximado de 500 pasos de adsorción (mucho menor que el número de adsorciones por molécula en una columna) la solución exacta del modelo estocástico se aproxima a un modelo Gaussiano (Felsing, 1998).

Los modelos estocásticos (Dondi *et al.*, 2002; Pasti *et al.*, 2003), asumen la siguientes hipótesis: (i) todos los poros del material de relleno son idénticos (caso

monoporo), o existen dos tipos de poros con distinta porosidad y cantidad relativa (caso biporo); (ii) el tiempo de residencia de las macromoléculas en la zona móvil es igual para todas las macromoléculas (modelo de velocidad constante en la zona móvil), o las macromoléculas están distribuidas al azar según una distribución Gaussiana con un valor medio de tiempo de residencia (modelo estocástico dispersivo); (iii) el número de pasos (o número de visitas a los poros) sigue una distribución de Poisson, y el tiempo de permanencia una distribución exponencial, o se proponen distribuciones generales con media y desviación estándar finitas (modelo SEC estocástico general).

Si los pasos de adsorción siguen una distribución de Poisson, y además el tiempo de residencia de una molécula en un sitio sigue una distribución exponencial, entonces el modelo estocástico coincide con el de Giddings y Eyring (1955) (Felinger, 1998). El modelo de platos de Martin y Synge (1941) también se puede derivar como un caso especial del modelo estocástico, al asumir un número de pasos de adsorción constante, y una distribución exponencial del tiempo de adsorción (Felinger, 1998).

Dondi *et al.* (2002) desarrollaron una teoría estocástica general para SEC que considera los procesos de ingreso y egreso de las moléculas en los poros, la dispersión en la zona móvil y la distribución de tamaño de poro. Esta teoría permite derivar distintos parámetros cromatográficos tales como la altura de platos y la asimetría de picos. Se investigaron columnas con dos tipos de poros y sus efectos sobre la selectividad y eficiencia en la separación. La teoría fue validada experimentalmente (Pasti *et al.*, 2003) utilizando un set de estándares de PS y distintas columnas con diferentes tamaños de poros.

1.3.b. Efectos Extra-Columnas

Diversos efectos extra-columna inciden sobre la asimetría de los picos, y contribuyen al E.I. debido a su efecto de mezcla. Por ejemplo, el volumen de todas las

conexiones en un cromatógrafo, o el volumen de la celda del detector pueden incrementar la amplitud y la asimetría de los picos. Las tuberías introducen un E.I. Gaussiano, mientras que el mezclado en la celda de detección introduce un decaimiento exponencial (Felinger, 1998). Un método para calcular el E.I. extra-columna consiste en acoplar el inyector con el detector, obviando las columnas (Prüß, 2003).

Asumiendo que todas las contribuciones a la varianza del pico son independientes, la varianza total del pico (σ_p^2) es entonces la suma de las varianzas aportadas por las columnas (σ_{col}^2), los capilares (σ_{cap}^2), la inyección (σ_{iny}^2) [volumen de muestra], la celda del detector (σ_{det}^2), y las conexiones (σ_{con}^2) (Hupe *et al.*, 1984). En la práctica el volumen de muestra es el principal contribuyente a la varianza extra-columna, ($\sigma_{extra-col}^2$) (Scott, 2001), resultando:

$$\sigma_p^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{extra-col}^2 = \sigma_{col}^2 + \sigma_{cap}^2 + \sigma_{iny}^2 + \sigma_{det}^2 + \sigma_{con}^2 \cong \sigma_{col}^2 + \sigma_{iny}^2 \quad (I.52)$$

Busnel *et al.* (2001) estudiaron el efecto del ensanchamiento extra-columna en SEC utilizando estándares ultra-angostos de PS, reemplazando las columnas por capilares de distinta longitud. Las moléculas del soluto que entran cerca de la zona central del capilar permanecen en la zona de alta velocidad y las cercanas a las paredes permanecen en zonas de menor velocidad por lo que se introduce una asimetría. La relajación de la señal después del final de la inyección se ajusta correctamente con una función exponencial decreciente, que depende de la geometría del equipo y de la naturaleza del soluto. El volumen de relajación se incrementa fuertemente con las altas masas molares (Busnel, 2001).

La dispersión extra-columna también se estudió para sistemas acuosos utilizando estándares de dextrans, en un amplio rango de masas molares, a distintos

caudales, fases móviles y capilares con distintas longitudes y diámetros (Grznárová, 2004). Las correlaciones existentes para dispersión en tubos en flujo laminar (Levenspiel *et al.*, 1957; Games *et al.*, 1982), sobreestiman la varianza de la señal de concentración, principalmente con el aumento de la masa molar del soluto y con el caudal. El error se debe al efecto de convección natural originado por las distintas densidades de las soluciones de dextrano inyectadas y del agua. Se observó una disminución significativa de la dispersión cuando el capilar se enrolla en forma circular.

I.3.c. Modelos Fenomenológicos Globales

Los modelos fenomenológicos consideran al sistema cromatográfico como una “caja negra”, y describen el fraccionamiento sin tener en cuenta ningún parámetro termodinámico y/o cinético. Como la principal fuente de E.I. es la dispersión axial en las columnas, estos modelos predicen el E.I. a través de una función que afecta a todos los cromatogramas en forma idéntica. Debido al E.I., en la celda del sensor se tendrá una distribución instantánea de volúmenes hidrodinámicos (y por lo tanto una distribución de masas molares). Para un sensor másico, el cromatograma $s_{DR}(V)$ (*i.e.*, la masa instantánea w vs. el volumen de retención V) es una versión ensanchada del cromatograma másico verdadero (o corregido), $s_{DR}^c(V)$, según (Tung, 1966):

$$s_{DR}(V) = \int_0^{\infty} g(V, \bar{V}) s_{DR}^c(\bar{V}) d\bar{V} \quad (I.53)$$

donde $g(V, \bar{V})$ es la función de E.I. (en general, no uniforme y asimétrica); y \bar{V} representa un volumen de retención medio. A cada \bar{V} , se puede definir una función $g(V)$ diferente. Para una función $g(V)$ simétrica, \bar{V} se asigna normalmente al valor máximo (o moda). Para funciones $g(V)$ asimétricas, \bar{V} podría ser asignado a la moda, a la media o a cualquier otra medida de tendencia central. Esta ambigüedad sobre las funciones

asimétricas, es un problema aún no resuelto. Para funciones de E.I. uniformes (o independientes del volumen de retención) la Ec. (I.52) se reduce a una simple integral de convolución.

Si el polímero analizado es estrictamente monodisperso (en volumen hidrodinámico), entonces el cromatograma corregido $s_{DR}^c(V)$ es una función impulso, y $s_{DR}(V)$ es una medida directa de la función de E.I. a un \bar{V} dado. De esta forma se podría obtener una $g(V, \bar{V})$ global, por interpolación a partir de un set de estándares monodispersos. Desafortunadamente, los estándares uniformes sólo se encuentran disponibles para bajas masas molares (por ej., un solvente puro) y para algunos biopolímeros. En general, la función de E.I. es difícil de determinar.

La ecuación de Tung fue extendida a MD-SEC, donde se considera que todo cromatograma genérico $s_k^c(V)$ es ensanchado por la misma función de E.I., según (Hamielec, 1980, 1984; Hamielec *et al.*, 1981; Netopilík, 1982):

$$s_k(V) = \int_0^\infty g(V, \bar{V}) s_k^c(\bar{V}) d\bar{V}, \quad (k = DR, LS, SV, OS) \quad (I.54)$$

donde el $s_k(V)$ es cualquier cromatograma medido; $s_k^c(V)$ es el correspondiente cromatograma corregido por E.I.; y DR, LS, SV, y OS indican un refractómetro diferencial, un detector de dispersión de luz, un detector de viscosidad específica, o un detector osmométrico (todavía no disponible comercialmente).

Cuando se analizan homopolímeros lineales con señales no afectadas por E.I., la siguiente expresión relaciona el cromatograma másico corregido $s_{DR}^c(V)$ con cualquier cromatograma de masa molar corregido $s_k^c(V)$ ($k = LS, SV, OS$) (Netopilík, 1982; Hamielec, 1984; Meira y Vega, 2005):

$$s_k^c(V) = K_k [M(V)]^{a_k} s_{DR}^c(V) \quad (a_{DR} = 0; a_{LS} = 1; a_{SV} = \alpha; a_{OS} = -1) \quad (I.55)$$

donde K_k es la ganancia del detector; $M(V)$ es la calibración de masa molar no afectada por E.I.; y $a_{SV} = \alpha$ es el exponente de MHS. Con la Ec. (I.55) se obtiene una calibración de masa molar $\log M(V)$ independiente de la DMM, que en principio es idéntica a la que se obtiene a partir de estándares uniformes en un cromatógrafo real con E.I.

I.4. El Ensanchamiento Instrumental en SEC

El E.I. se debe principalmente a la dispersión axial en las columnas y determina, en el caso de homopolímeros lineales, la presencia de una variedad de V_h en la celda del detector generando cromatogramas ensanchados. Baumgarten *et al.* (2002) publicaron una revisión del “estado del arte” sobre E.I. en SEC.

El E.I. dificulta el procesamiento de los datos de los cromatogramas obtenidos en SEC. Debido al ensanchamiento de los cromatogramas, las DMMs estimadas también resultan erróneas según sea el método de estimación empleado. Cuando la DMM se estima a partir $s_{DR}(V)$ y de la calibración directa, la polidispersidad resulta sobreestimada. Cuando la DMM se calcula directamente a partir del cromatograma másico (ensanchado) y de las calibraciones *ad hoc*, resulta distorsionada con respecto a la DMM verdadera $w^c(\log M)$. En este caso, la DMM estimada es más angosta que la real cuando se utiliza $\log M_w(V)$ o $\log M_{v,MHS}(V)$; o más ancha que la real cuando se utiliza $\log M_{v,r}(V)$. A pesar del E.I., si una variable instantánea es estimada exactamente, su correspondiente variable global también es exacta. Así, la DMM representada por $w(\log M_w)$ presenta un valor global exacto de \bar{M}_w pero un \bar{M}_n global sobreestimado; mientras que la DMM representada por $w(\log M_n)$ tiene un \bar{M}_n global exacto pero un \bar{M}_w global subestimado. En ambos casos, la polidispersidad global resulta subestimada (Prougenes *et al.*, 1998, Netopilík, 1998a).

La corrección de los cromatogramas por E.I. es importante cuando se analizan muestras extremadamente angostas (como estándares cromatográficos) o muestras que presentan múltiples picos angostos. En el caso más común de muestras anchas de polímeros sintéticos, la corrección por E.I. no tiene importancia.

El problema de corrección por E.I. consiste en obtener las DMMs corregidas. Para ello se requiere estimar la función de E.I., luego corregir los cromatogramas medidos a través de procedimientos de inversión numérica, y finalmente estimar la DMM corregida.

I.4.a. Estimación del E.I.

En esta sección se describirán una serie de métodos propuestos en la bibliografía para estimar la función de E.I.

Un método experimental (basado en una técnica de reciclo de un estándar comercial) fue utilizado para determinar el E.I. (Alba y Meira, 1986). Esta técnica permite calcular el E.I. debido solamente a las columnas, a partir de la información contenida en el cromatograma másico (sensor UV) original y el primer reciclo de un estándar angosto, cuando el cromatógrafo opera con y sin las columnas (en este último caso debe considerarse el E.I. introducido por la bomba). El método es válido sólo para funciones de tiempo continuas y es limitado por el hecho de que se requieren dos deconvoluciones mal condicionadas para compensar el E.I. introducido por la bomba y la tubería de reciclo.

Determinaciones experimentales más recientes, en base a fracciones angostas de estándares sintéticos, indican que la función de E.I. es asimétrica, y puede ajustarse (en el rango de fraccionamiento lineal) con Gaussianas modificadas exponencialmente (EMG) (Busnel *et al.*, 2001). En la zona de altas masas molares, el E.I. es más angosto y más asimétrico, y no puede aproximarse con EMGs.

Para SEC con detección de masa molar, Netopilík (1982) propuso un procedimiento iterativo para estimar simultáneamente la calibración $\log M(V)$ y la desviación estándar de la función de E.I. uniforme y Gaussiana (σ_g). El procedimiento es aplicable sólo a homopolímeros lineales y consiste en: (i) seleccionar un valor de σ_g ; (ii) estimar $s_{DR}^c(V)$ y $s_k^c(V)$ por inversión de las Ecs (I.53) y (I.54), respectivamente; (iii) calcular la calibración de masa molar $\log M(V)$ con la Ec. (I.55); y (iv) iterar con distintos valores de σ_g hasta que la pendiente de $\log M(V)$ coincida con la calibración de masa molar verdadera (determinada en forma independiente). Este método fue evaluado por simulación de una DMM angosta de Schulz-Zimm; y mientras que la DMM original se recuperó en forma aceptable, la desviación estándar resultó errónea (Netopilík, 1982).

Billiani *et al.* (1988) propusieron determinar simultáneamente la calibración de masas molares lineal y la varianza σ_g^2 de la función de E.I. Gaussiana y uniforme, usando SEC / LALLS y muestras comerciales de PS con DMMs anchas y angostas. Las señales de LS se relacionan con σ_g^2 y con los coeficientes de $M(V)$ por medio de las Ecs (I.54, I.55). El procedimiento es aplicable sólo a homopolímeros lineales y consiste en: (i) obtener $M_w(V)$ [Ec. (I.38)] para una muestra ancha de PS, que resulta similar a $M(V)$; (ii) calcular $s_{LS}(V)$ con la Ec. (I.54) a partir de $M(V)$ del paso (i), para distintos valores de σ_g , hasta lograr el mejor ajuste entre $s_{LS}(V)$ calculado y medido, para una muestra angosta de PS; (iii) repetir el paso (ii) para distintos estándares de PS y obtener σ_g final como el promedio de las σ_g para cada estándar; y (iv) ajustar $s_{LS}(V)$ calculado con la Ec. (I.54) y σ_g del paso (iii), con $s_{LS}(V)$ medido para la muestra ancha de PS hasta que la pendiente de $M_w(V)$ coincida con la calibración de masa molar verdadera (determinada en forma independiente). Este procedimiento produce un incremento de la pendiente de $M_w(V)$ para la muestra ancha de PS, mientras que para muestras angostas la dispersión axial produce la

disminución de la pendiente de $M_w(V)$. Por consiguiente este tipo de muestras se recomiendan para la estimación de σ_g^2 . El IDV se determinó por una correlación cruzada entre las señales LS y DR en un experimento sin las columnas. El procedimiento se aplicó al estudio de muestras de PS, PMMA y PVC (Billiani *et al.*, 1990); y con todos los polímeros estudiados se obtuvo la misma calibración universal. Además, para PS y PMMA, σ_g^2 disminuyó con el V ; mientras que para PVC, σ_g^2 dependió de la concentración utilizada, y para altas concentraciones σ_g^2 aumentó con V .

Cuando la forma de una DMM angosta es *a priori* conocida (por ejemplo, una distribución de Poisson con eje lineal de masas molares), entonces σ_g^2 de la función de E.I. uniforme y Gaussiana puede estimarse a partir de la diferencia entre el cromatograma de masa (o de masa molar), y su predicción teórica en ausencia de E.I. (Schnöll-Bitai, 2003). El método fue aplicado a estándares comerciales de PS combinando columnas de diferentes porosidades y se determinó que σ_g^2 permanece constante, aumenta o disminuye con V dependiendo del rango de fraccionamiento y de la porosidad de las columnas (Schnöll-Bitai, 2005). Más recientemente, el método se extendió a funciones de E.I. EMG (Vega y Schnöll-Bitai, 2005). Para muestras que exhiben una WCLD de Poisson o normal-logarítmica, se derivaron correlaciones teóricas que permiten estimar los parámetros de la EMG en base al ancho máximo, la varianza, y los puntos de inflexión de los cromatogramas de DR (Vega y Schnöll-Bitai, 2005). Estos métodos no requieren inversiones numéricas, pero se restringen a imponer una forma a la DMM analizada.

Por último, la función de E.I. podría ser predicha en forma teórica a través de un modelo del fraccionamiento (Potschka, 1993; Dondi *et al.*, 2002; Pasti *et al.*, 2003). Desafortunadamente, estos modelos incluyen un gran número de parámetros físico-químicos de difícil determinación, por lo que actualmente son de poco uso.

I.4.b. Corrección por E.I.

La corrección por E.I. consiste en hallar la DMM verdadera (o corregida) a partir de las mediciones reales (o ensanchadas). En general, se considera que la calibración de masa molar, $\log M(V)$, obtenida a partir de estándares angostos no resulta afectada por el E.I. Cuando se determina la DMM a partir del cromatograma másico ensanchado $s_{DR}(V)$ y de una calibración $\log M(V)$, la distribución resulta más ancha que la real, por lo que el \bar{M}_n es subestimado y el \bar{M}_w es sobreestimado. El proceso de corrección por E.I. es: (i) a partir de $s_{DR}(V)$ y $g(V, \bar{V})$ conocidos, se calcula $s_{DR}^c(V)$ por inversión de la Ec. (I.53); y (ii) a partir de $s_{DR}^c(V)$ y $\log M(V)$, se obtiene la DMM verdadera, $s_{DR}^c(\log M)$.

Las técnicas numéricas de inversión permiten corregir los cromatogramas medidos previo al cálculo de la DMM; y admiten formas arbitrarias tanto para los cromatogramas como para las funciones de E.I. La desventaja, es el mal condicionamiento de las inversiones numéricas, que amplifican el ruido de medición. Algunos trabajos han evaluado los errores en MD-SEC con formas arbitrarias de la DMM. En estos casos, las calibraciones obtenidas con sensores de masa molar no son rectas, ni aún en el caso de analizar homopolímeros lineales con sensores ideales libres de ruido (Prougenes *et al.*, 1998). Más recientemente, se ha propuesto un método para corregir por E.I. en MD-SEC para el caso general de una DMM arbitraria con E.I. no uniforme y asimétrico (Vega y Meira, 2001).

Existen técnicas de corrección por E.I. que evitan las inversiones numéricas, y corrigen las DMMs en un único paso en base a: a) rotar la calibración lineal (cuando sólo se dispone del cromatograma másico y de la calibración lineal) (Yau *et al.* 1977; Prougenes *et al.* 1998; Jackson y Yau, 1993); o b) modificar el IDV (cuando se emplean sensores de masa molar) (Cheung *et al.*, 1993; Netopilík, 1997, 1998b; Jackson, 1999;

Netopilík *et al.*, 2000). La principal ventaja de estas técnicas es que producen soluciones suaves y únicas. Sin embargo, brindan sólo soluciones aproximadas y su validez se restringe al caso de funciones de E.I. Gaussianas y uniformes, calibraciones lineales, y DMM normal-logarítmica..

El procedimiento de deconvolución para calcular $s_{DR}^c(V)$ a partir de $s_{DR}(V)$ y $g(V, \bar{V})$ es numéricamente mal condicionado. Tradicionalmente, sólo los cromatogramas de concentración han sido corregidos por E.I., por inversión numérica de la ecuación de Tung (Ishige *et al.*, 1971; Alba y Meira, 1984; Hamielec, 1984; Gugliotta *et al.* 1990; Meira y Vega, 2001, 2005). Recientemente, con la aparición de los sensores sensibles a las masas molares, se han corregido los cromatogramas de SV y LS (Netopilík, 1998b; Meira y Vega, 2001, 2005; Vega y Meira, 2001).

Si se considera la corrección de los cromatogramas máscicos independientemente de las calibraciones, se debe tener en cuenta la inversión directa de la Ec. (I.53); *i.e.*: el cálculo de $s_{DR}^c(V)$ conociendo $s_{DR}(V)$ y $g(V, \bar{V})$. Para efectuar la inversión numérica de la Ec. (I.53), se la transforma en la siguiente expresión discreta:

$$\mathbf{s}_{DR} = \mathbf{G} \mathbf{s}_{DR}^c \quad (\text{I.56})$$

donde \mathbf{s}_{DR} es un vector columna ($m \times 1$) que contiene las ordenadas de $s_{DR}(V)$ muestreado a intervalos ΔV regulares en el rango de volumen de retención $[V_1 - V_m]$; \mathbf{s}_{DR}^c es un vector columna ($p \times 1$) que contiene las ordenadas de $s_{DR}^c(V)$ calculado en los mismos puntos de V pero en un rango más angosto $[\bar{V}_1 - \bar{V}_p]$; y \mathbf{G} es una matriz rectangular ($m \times p$) que representa a $g(V, \bar{V})$ con V en $[V_1 - V_m]$, y \bar{V} en $[V_1^c - V_p^c]$.

Similarmente, para el caso más general de la Ec. (I.54), la forma discreta es:

$$\mathbf{s}_k = \mathbf{G} \mathbf{s}_k^c; \quad (k = \text{DR, LS, SV, OS}) \quad (\text{I.57})$$

donde \mathbf{s}_k es un vector columna ($m \times 1$) que contiene las ordenadas de $s_k(V)$; \mathbf{s}_k^c es un vector columna ($p \times 1$) que contiene las ordenadas de $s_k^c(V)$.

Para poder invertir las Ecs (I.56) y (I.57), se debe definir en forma adecuada la matriz \mathbf{G} . Para ello, primero es recomendable ajustar $g(V, \bar{V})$ con una función analítica continua, y luego calcular las alturas de cada función $g(V)$ a partir de esta expresión. Muchas expresiones analíticas (por ejemplo, una distribución Gaussiana) no son estrictamente nulas en el rango de V de interés, lo que producirá matrices \mathbf{G} con componentes positivas pequeñas. En lugar de esto, es preferible colocar ceros a todos los elementos casi nulos de \mathbf{G} (por ejemplo, aquellos valores menores al 1% del máximo de las alturas). Además, es preferible elegir una \mathbf{G} de dimensiones mínimas, en el sentido que: a) las p columnas deben cubrir estrictamente el rango de los cromatogramas corregidos $[V_1 - V_p]$; y b) las m filas deben cubrir estrictamente el rango de los cromatogramas medidos $[V_1 - V_m]$ (Vega y Meira, 2001). Debido a que en general las funciones de E.I. son asimétricas y no uniformes, es conveniente especificar cada $g(V)$ para que contenga $(c + 1 + d)$ puntos no nulos, donde c y d son los números de puntos antes y después de \bar{V} , respectivamente. Así, el número de columnas de \mathbf{G} resulta: $p = m - c - d$, y la matriz \mathbf{G} se define como sigue en la Ec. (I.58) donde cada j -ésima columna de \mathbf{G} contiene $(c + 1 + d)$ alturas distintas de cero de $g(V, \bar{V})$, a $\bar{V} = V_j^c$. La inversión directa de la Ec. (I.56) a través por ejemplo de la pseudo-inversa: $\hat{\mathbf{w}}^c = [\mathbf{G}^T \mathbf{G}]^{-1} \mathbf{G}^T \mathbf{w}$ (donde “^” indica el valor estimado) no es recomendable ya que la matriz cuadrada $[\mathbf{G}^T \mathbf{G}]$ es generalmente mal condicionada, y se originarían soluciones muy oscilatorias y con picos negativos. La propagación de errores está determinada por: (a) el número de condición de

$\mathbf{G}^T\mathbf{G}$ (*i.e.* la relación entre el mayor y menor autovalor de $\mathbf{G}^T\mathbf{G}$; y (b) el tipo y la amplitud del ruido que contamina a $s_{DR}(V)$).

$$\mathbf{G} = \begin{bmatrix} g(V_1, V_1^c) & \cdots & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & 0 & & \vdots \\ g(V_{c+1}, V_1^c) & & g(V_j, V_j^c) & & \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & 0 \\ g(V_{c+1+d}, V_1^c) & & g(V_{c+j}, V_j^c) & & g(V_p, V_p^c) \\ 0 & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \vdots & & g(V_{c+j+d}, V_j^c) & & g(V_{c+p}, V_p^c) \\ & & 0 & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdots & 0 & \cdots & g(V_m, V_p^c) \end{bmatrix}; \quad (m > p) \quad (\text{I.58})$$

Un método numérico desarrollado por Vega y Meira (2001) no impone ninguna restricción sobre la forma de la DMM o la función de E.I., y sólo requiere que $\log M(V)$ sea lineal en el rango de los cromatogramas medidos. El método consiste en: (i) estimar $s_{DR}^c(V)$ y $s_k^c(V)$ por inversión de las Ecs (I.53) y (I.54), respectivamente; (ii) calcular la calibración de masa molar no sesgada $\log \hat{M}(V)$ a través de la Ec. (I.55), y utilizar la región media del cromatograma para ajustar una calibración lineal $\log \hat{M}_{lin}(V)$; y (iii) a partir de $\hat{w}^c(V)$ y $\log \hat{M}_{lin}(V)$, estimar la DMM no sesgada $\hat{w}^c(\log \hat{M}_{lin})$. Este método fue evaluado por simulación numérica, considerando una DMM bimodal, una calibración lineal y una función de E.I. no uniforme y asimétrica. La calibración $\log \hat{M}(V)$ resultó casi solapada a la calibración verdadera $\log M(V)$ en la región media del cromatograma, mientras que diverge hacia las colas. La DMM estimada $\hat{w}^c(\log \hat{M}_{lin})$ resultó suave y se ajustó bien a la DMM verdadera $w^c(\log M)$ y sus masas molares medias resultaron similares a los valores reales (Vega y Meira, 2001).

La estimación de cualquier cromatograma corregido requiere invertir la matriz \mathbf{G} , es decir [Ecs (I.56, 57)]:

$$\hat{\mathbf{s}}_{\text{DR}}^{\text{c}} = \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{\text{DR}} \quad (\text{I.59.a})$$

$$\hat{\mathbf{s}}_k^{\text{c}} = \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_k \quad (\text{I.59.b})$$

donde $\mathbf{G}^{[-1]}$ ($p \times m$) representa una pseudo-inversa regularizada de \mathbf{G} . En la bibliografía, se han propuesto varios procedimientos numéricos para resolver el problema inverso (Gugliotta *et al.*, 1990; Baumgarten *et al.*, 2002; Meira y Vega, 2001, 2005). Los métodos numéricos son generales en el sentido que permiten funciones de E.I. no uniformes y asimétricas. Las soluciones involucran normalmente un compromiso entre cromatogramas corregidos excesivamente “ricos” (con oscilaciones de alta frecuencia y picos negativos), y una solución excesivamente suave (donde pueden perderse algunas componentes de alta frecuencia del cromatograma corregido).

En esta tesis, se utiliza el método de descomposición en valores singulares (Mendel, 1995), para resolver los problemas inversos. Por ejemplo, para el caso de la Ec. (I.59.a), resulta:

$$\hat{\mathbf{s}}_{\text{DR}}^{\text{c}} = \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{\text{DR}} = \sum_{j=1}^r \frac{\mathbf{u}_j^{\text{T}} \mathbf{s}_{\text{DR}}}{\sigma_j} \mathbf{v}_j; \quad (r \leq p); \quad (\sigma_1 \geq \sigma_2 \geq \dots \geq \sigma_r \geq \dots \geq \sigma_p \geq 0) \quad (\text{I.60})$$

donde \mathbf{u}_j y \mathbf{v}_j son los autovectores de $\mathbf{G}\mathbf{G}^{\text{T}}$ y $\mathbf{G}^{\text{T}}\mathbf{G}$, respectivamente; y los σ_j 's son los valores singulares de \mathbf{G} (o raíz cuadrada de los autovalores de $\mathbf{G}^{\text{T}}\mathbf{G}$). En la sumatoria de la Ec. (I.60), el número de términos “efectivos” está limitado a r , para evitar la amplificación del ruido de medición. El parámetro r se selecciona por prueba y error entre una solución altamente oscilatoria (para r elevados) y una excesivamente suave (para r pequeños).

1.5. Análisis de Polímeros Cromatográficamente Complejos

Si un homopolímero lineal es idealmente fraccionado según su volumen hidrodinámico, entonces también resulta fraccionado según su masa molar.

Desafortunadamente, esto no ocurre con los polímeros cromatográficamente complejos. Los inconvenientes asociados al fraccionamiento de copolímeros y homopolímeros ramificados ya han sido comentados en las secciones I.2.a.ii) y I.2.a.iii), respectivamente. En el caso de polielectrolitos (macromoléculas que contienen grupos aniónicos o catiónicos), los fenómenos de adsorción y desorción dificultan el fraccionamiento según el volumen hidrodinámico (Yau *et al.*, 1979; Berek y Marcinka, 1984). Dentro de los polielectrolitos, se encuentran los polímeros solubles en agua. La DMM suele determinarse por SEC en fase acuosa, donde compiten varios mecanismos junto con el proceso de exclusión por tamaños, tales como la inclusión y la exclusión iónica, el intercambio iónico, y la adsorción (Nagy, 1995, 1999; Wu, 1995, 1999; Lin, 1995; Lawrey, 1995). Generalmente, el principio de la calibración universal no puede verificarse fácilmente, y resulta crítica la elección de los estándares de calibración, de la fase móvil, y de los rellenos de las columnas (Nagy, 1995).

I.5.a. Copolímeros y Polímeros Ramificados

El análisis de polímeros complejos por SEC ha sido extensamente estudiado en la literatura (Radke, 1996; Brun, 1999 a,b). La complejidad del problema reside en el efecto de “mezcla” que ocurre en la celda de detección (aun en ausencia de E.I.), pudiendo coexistir especies de diferente M , de diferente composición química, y de diferente número de ramas (Burchard, 1999). En el caso de los copolímeros, interesa estimar tanto la DMM como la DCQ (Balke, 1987; Bielsa y Meira, 1992; Brun, 1999a, b; Meira y Vega, 2004). Desafortunadamente, aun la estimación de la DMM es difícil porque: (a) el fraccionamiento de los copolímeros no se produce por M ; y (b) los clásicos DR no proveen señales proporcionales a la masa, como se comentó en las secciones I.1.b. y I.2.a.ii). Además, en general no se dispone de estándares de copolímeros, y entonces debe recurrirse a la calibración universal. En algunos casos, el análisis se facilita porque es

posible estimar una calibración *ad hoc* para el copolímero [por ejemplo, si se trata de copolímeros lineales di-bloque, cuando se conocen las calibraciones de los homopolímeros correspondientes, y se determina la variación de la composición química con V por cociente de señales (Meira y Vega, 2004)]. Si la composición instantánea del copolímero se puede medir en forma exacta (por ej. a partir de la relación de las señales de UV y DR), la composición global también será exacta, a pesar de la presencia de E.I. (Meira y Vega, 2004).

Para homopolímeros ramificados, el problema consiste en estimar tanto la DMM como la DGR (Quivoron, 1984; Podzimek, 1994; Mourey y Coll, 1995; Degoulet *et al.*, 1995; Tackx y Tacx, 1998). La dificultad es que SEC no fracciona ni por M ni por número de ramas; y por tal motivo, se debe recurrir a la calibración universal, y a la utilización de múltiples sensores. Para describir el problema del fraccionamiento cromatográfico de moléculas ramificadas, se suele calcular su volumen hidrodinámico mediante la teoría de Zimm y Stockmayer (1949), más el conocimiento de las constantes de MHS correspondientes a una molécula lineal de la misma masa molar que la ramificada (Burchard, 1999). Si bien este problema ha sido descrito en la bibliografía, se desconoce la existencia de trabajos que hayan tratado de resolver el problema de “deconvolución” consistente en hallar la DMM y/o la DGR a partir de los cromatogramas medidos.

El caso de los copolímeros ramificados es aún más complejo, porque deben determinarse la DMM, la DCQ, y la DGR. Un ejemplo de este tipo es el copolímero de injerto presente en el PS de alto impacto. Este copolímero está constituido por ramas de PS injertadas sobre cadenas de polibutadieno (PB). El fraccionamiento del copolímero de injerto y la estimación de las distribuciones antes mencionadas fueron investigadas con la ayuda de un modelo matemático representativo de la reacción de síntesis del polímero (Estenoz *et al.*, 2001, 2002; Vega *et al.*, 2001).

I.5.b. Biopolímeros y Polielectrolitos

Los polímeros solubles en agua comprenden una amplia variedad de materiales poliméricos y presentan diversas aplicaciones en las industrias química, alimenticia, farmacéutica, etc. Estos polímeros pueden ser aniónicos, neutros o catiónicos, y pueden contener grupos hidrofílicos o hidrofóbicos. La DMM afecta las propiedades físicas como la viscosidad de los fundidos, la resistencia a la tensión, la resistencia química, la fuerza adhesiva, y el poder dispersante. Además, las ramificaciones y la estereorregularidad juegan un rol importante en su comportamiento físico (Volet y Lesec, 1994).

Los polímeros sintéticos solubles en agua incluyen alcohol polivinílico, poliacrilamida, poli(ácido acrílico), polivinilpirrolidona, poli(óxido de etileno), y varios copolímeros de éstos. Sus aplicaciones son variadas y dependen de sus propiedades reológicas, actividad superficial y viscosidad (Meehan, 1995; Kilz, 1999). El poli(ácido acrílico) [PAA] se comporta como un polielectrolito aniónico por la presencia de grupos carboxílicos (Buchholz, 1992). En SEC de PAA, la repulsión electrostática entre dichos grupos, la interacción con la fase estacionaria, el pH y la fuerza iónica de la fase móvil afectan el volumen hidrodinámico del polímero, y el volumen de retención.

Los polímeros naturales solubles en agua -biopolímeros-, juegan un rol básico en el esquema de la naturaleza. Este grupo de macromoléculas incluye a las proteínas, los ácidos nucleicos, y los polisacáridos. La mayoría de los polímeros naturales se encuentran formando parte de mezclas, y antes de realizar estudios de sus estructuras o mediciones fisicoquímicas, deben ser aislados sin modificaciones desde su fuente natural, empleándose muchas veces SEC preparativa (MacGregor y Greenwood, 1980).

Los polisacáridos (como la celulosa, la quitina y el almidón) son los biopolímeros más abundantes y conocidos. Algunos polisacáridos tienen importancia

comercial. Por ejemplo, el almidón es explotado en la fabricación de papel y en la industria alimenticia (como agente de retención de humedad, de textura, gelificante, espesante, adhesivo).

El quitosano es un derivado deacetilado de la quitina y es biocompatible, biodegradable, antifúngico, antimicrobiano y no tóxico. Es ampliamente utilizado en el procesamiento y conservación de alimentos, en el transporte de drogas medicinales, en la fabricación de vendas especiales, etc. (Ravi Kumar, 2000). Tiene una reducida solubilidad en medios acuosos, la cual se incrementa con el aumento del grado de deacetilación y con la reducción de la masa molar.

El dextrano es un polisacárido estudiado desde hace más de un siglo, debido a que es un contaminante indeseable en las refinerías de azúcar, donde afecta perjudicialmente la filtrabilidad y cristalización de la sacarosa. En la década del '50 adquirió especial importancia al convertirse en el primer polisacárido microbiano producido y empleado a escala industrial. Los dextranos de ciertas cepas y algunos derivados, se emplean en las industrias farmacéutica, agrícola, de cosméticos, fotográfica, de resinas sintéticas y veterinaria. El dextrano producido por *Leuconostoc mesenteroides* es de particular importancia por su uso como sustituto del plasma sanguíneo.

El almidón es uno de los componentes básicos de la alimentación humana que se encuentra en granos de cereales, leguminosas, tubérculos, frutas, etc.; en forma de gránulos insolubles en agua, densamente empacados cuya forma y dimensión son características de la especie. El almidón es una mezcla de dos biopolímeros (la amilosa y la amilopectina), basados en el monómero α ,D-glucosa (Banks y Greenwood, 1975). La amilosa es un glucano con uniones α -1,4 glucosídicas, y una muy pequeña cantidad de ramas cortas. Su masa molar está entre 10^5 y 10^6 g/mol (Roger *et al.*, 1996; Suortti *et al.*, 1998). En contraste, la amilopectina es un polímero altamente ramificado, cuya cadena

principal consiste en uniones α -1,4 glucosídicas con puntos de ramificación dados por enlaces α -1,6 glucosídicos; y su masa molar es cercana a los 10^8 g/mol (Roger *et al.*, 1999). La proporción amilosa/amilopectina en los almidones depende de la fuente botánica. El contenido de amilosa influye en las propiedades nutricionales y de uso de los almidones; por ejemplo, la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática, o el comportamiento como agente gelificante (Gérard *et al.*, 2001).

Los almidones en su forma nativa se encuentran en forma de gránulos semicristalinos. Según las condiciones de preparación de las soluciones, las estructuras nativas son bastante estables, y conservan fragmentos de la estructura supramolecular. En general, es difícil encontrar las condiciones óptimas de disolución. Las regiones cristalinas requieren condiciones de disolución más agresiva, bajo las cuales las macromoléculas de las regiones amorfas sean parcialmente degradadas. Los solventes comunes para el almidón son el agua, el hidróxido de sodio o de potasio, y el dimetilsulfóxido (DMSO), aunque son necesarios tratamientos adicionales (calentamiento, agitación y centrifugación) para disolver los fragmentos supramoleculares. Las soluciones de almidón son mucho más estables en DMSO que en agua, debido a que el DMSO es un buen aceptor de enlaces de hidrógeno (Merienne *et al.*, 2000). En solución acuosa pueden ocurrir cambios estructurales por agregación, y en solución alcalina el almidón se oxida (Radosta *et al.*, 2001).

Durante la gelatinización, los gránulos de almidón se hinchan y se enriquecen en amilopectina, mientras que la amilosa difunde fuera de los gránulos. El término retrogradación se utiliza para describir los cambios que ocurren al enfriar y almacenar el almidón gelatinizado. La amilosa retrograda rápidamente (precipita irreversiblemente), debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de moléculas vecinas; mientras que la amilopectina permanece por más tiempo en solución (Fredriksson

et al., 1998).

La amilosa forma complejos insolubles con timol o con n-butanol, permaneciendo la amilopectina en solución. El procedimiento inverso se logra con la concanavalina A, que interactúa específicamente con los grupos no reductores de las unidades α -D-glucosídicas (Colonna *et al.*, 1985; Matheson, 1990). La amilopectina se elimina por precipitación, y se determina el contenido de amilosa midiendo la cantidad de carbohidratos en el sobrenadante. Estos fraccionamientos permiten el estudio de los dos componentes del almidón por separado (Suortti *et al.*, 1998; Gérard *et al.*, 2001). Tanto la amilosa como la amilopectina son fácilmente depolimerizadas por ácidos y álcalis diluidos.

Una característica importante de la amilosa, es su capacidad de formar un complejo de color azul con el yodo en presencia de una pequeña cantidad de yoduro que luego es medido por espectrofotometría o por potenciometría. El método de Knutson (1986) utiliza las propiedades del DMSO al 90% como solvente del almidón y toma la ventaja del hecho que el ión tri-yoduro (I_2^{3-}) se forma espontáneamente cuando el yodo se disuelve en DMSO. Este ión es necesario para la iniciación de la formación del complejo amilosa-yodo. En este método, las muestras se disuelven simplemente en una solución de I_2 -DMSO y se diluyen con agua para formar el complejo, y la absorbancia se mide a 600 nm (Knutson, 1999).

Los dextranos son polisacáridos extracelulares sintetizados por ciertas bacterias cuando crecen en sacarosa, actuando como cubierta protectora. Consisten esencialmente de cadenas ramificadas de residuos de D-glucopiranososa unidos por enlaces α -(1 \rightarrow 6), y las ramas son formadas por enlaces α -(1 \rightarrow 2), α -(1 \rightarrow 3), α -(1 \rightarrow 4). Existen muchos dextranos diferentes, cuya estructura depende de la cepa bacteriana. En algunos dextranos, las unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1 \rightarrow 3), pueden formar parte de la

cadena lineal, mientras que en otros, estos enlaces dan estructuras ramificadas. Los enlaces α -(1 \rightarrow 2) o α -(1 \rightarrow 4), generalmente, constituyen puntos de ramificación y las ramas de cuatro o cinco unidades de glucosa son las más comunes, aunque pueden encontrarse ramas más largas. Los dextranos son bastante polidispersos, con masas molares medias en número de alrededor de 5×10^5 g/mol.

El quitosano es un polisacárido compuesto por unidades glucosamina y N-acetil-glucosamina con uniones β ,1-4 glicosídicas, que se obtiene por deacetilación de la quitina, y se comporta como un policationido debido a la presencia del grupo amino en su cadena. La deacetilación de la quitina se realiza por medio de un tratamiento con soluciones concentradas de hidróxido de sodio (40% – 50%). La eficiencia de deacetilación depende de varios factores, siendo los más importantes: la concentración y la temperatura del álcali, el tiempo de reacción y el tratamiento previo de purificación de la quitina. La disminución de la masa molar inducida por la depolimerización del quitosano permite obtener oligoquitosanos, los cuales además de mayor solubilidad, parecen tener una incrementada actividad antifúngica y antimicrobiana respecto al quitosano original (Hai *et al.*, 2003).

Los quitosanos de menor masa molar pueden obtenerse utilizando métodos químicos, enzimáticos o aplicando radiación gamma (R- γ), sobre quitosanos de mayor masa molar. El tratamiento químico con ácidos minerales concentrados es un método común y rápido para producir una serie de oligómeros del quitosano, pero presenta como inconvenientes el alto costo, el bajo rendimiento, y los desechos ácidos (Jeon y Kim 2000; Sashiwa *et al.*, 2001). En el caso de la degradación enzimática del quitosano, se han obtenido quitosanos de bajas masas molares con altas solubilidades utilizando quitinasas, quitosanasas, glucanasas, lipasas, y algunas proteasas (Pantaleone *et al.*, 1992; Ilyina *et al.*, 2000). Los métodos enzimáticos son preferibles a los químicos porque la hidrólisis

puede controlarse más fácilmente y también se minimizan las alteraciones en la naturaleza química del producto de la reacción. Sin embargo, la acción de las enzimas sobre la quitina es muy lenta y los rendimientos no son buenos (Pantaleone *et al.*, 1992; Aiba, 1994; Sakai *et al.*, 1991). La radiación es efectiva para degradar quitosanos, y presenta buenos rendimientos y sin causar la degradación del producto (Choi *et al.*, 2002). La depolimerización por γ produce principalmente la ruptura de los enlaces glicosídicos [C–O–C] (von Sonntag, 1980). Para confirmar esto, se realizaron los espectros FTIR antes y después de la irradiación. Los picos de transmitancia para quitosano que aparecen a 3445, 1622 y 1082 cm^{-1} pueden atribuirse a los grupos hidroxilo, amino y C–O–C, respectivamente (Peniche-Convras *et al.*, 1992). El pico máximo a 1622 cm^{-1} se tomó como referencia debido al hecho que los grupos amino no cambian después de la degradación. La escisión de los enlaces glicosídicos da origen a la formación de grupos hidroxilo que se manifiesta como un aumento en la proporción del pico del grupo hidroxilo respecto del pico de referencia. Simultáneamente se percibe la disminución de la proporción del pico del grupo C–O–C respecto de la referencia (Wasikiewicz *et al.*, 2005).

Los quitosanos se caracterizan usualmente por el grado de deacetilación (DD) y por su masa molar. El DD se define como el porcentaje de unidades de glucosamina en la molécula de quitosano. Los quitosanos con mayor DD y con menor masa molar tienen mayor solubilidad en medios acuosos levemente ácidos (Ravi Kumar, 2000). El DD determina si el biopolímero es quitina o quitosano. En general, se considera quitosano cuando $\text{DD} \geq 40$ (Peters, 1995). El DD define el uso del quitosano debido a su influencia sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas, tales como la resistencia a la tensión de películas (Mima *et al.*, 1983), la capacidad de quelar iones metálicos (Miyoshi *et al.*, 1992) y la actividad inmunológica (Nishimura *et al.*, 1984, 1985). Los métodos usados para determinar el DD del quitosano incluyen la espectroscopía IR (Baxter *et al.*, 1992;

Domard *et al.*, 1983; Sannan *et al.*, 1978; Rathke y Hudson, 1993), la espectrofotometría UV (Aiba, 1986), la espectrofotometría UV por derivada primera [1DUVS] (Muzzarelli y Rochetti, 1985; Tan *et al.*, 1998), la determinación enzimática (Nanjo *et al.*, 1991), la resonancia magnética nuclear (NMR) (Hiral *et al.*, 1991; Lavertu *et al.*, 2003), la reacción con ninhidrina (Curotto y Aros, 1993) y mediciones de dicroísmo circular (Domard, 1987). La DMM del quitosano es otra de las variables de interés, y se han reportado M_w en el rango de $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ g/mol (Brugnerotto *et al.*, 2001).

CAPÍTULO II. Análisis y Evaluación de las Calibraciones

Utilizadas en MD-SEC, y su Relación con el

Ensanchamiento Instrumental

II.1. Introducción

En general, una calibración SEC es una correlación entre una propiedad del polímero con el volumen de retención. Por ejemplo, la calibración de masas molares relaciona la masa molar, M , del polímero con el volumen de retención, V . En el caso de un cromatógrafo equipado solamente con un detector DR, la calibración se obtiene a partir de estándares angostos de polímeros de masa molar conocida. Frecuentemente, la calibración se interpreta como una propiedad del conjunto de columnas, pero también depende del sistema polímero / solvente y del instrumental, incluyendo el volumen muerto de todas las conexiones y del detector. Al igual que los cromatogramas, las curvas de calibración se informan en términos del volumen de retención y no del tiempo de retención, con el objetivo de minimizar los errores por cambios en el caudal.

Una dificultad para obtener la calibración es la baja disponibilidad de estándares angostos. Los estándares de calibración de PS tienen baja polidispersión y cubren un amplio rango de masas molares. Otros estándares con polidispersiones menores a 1.1 están disponibles para poli(α -metilestireno), poliisopreno, polibutadieno, polietileno, óxido de polietileno, polimetilmetacrilato y politetrahidrofurano. Para SEC en fase acuosa se dispone de proteínas monodispersas, pero las formas y conformaciones específicas de estas macromoléculas indican que una calibración de masas molares no es aplicable a otros tipos de polímeros. Otros estándares utilizados en SEC acuosa son óxido de polietileno, sulfonato de poliestireno, dextranos y pululanos (Belenkii, 1983; Meehan, 1999; Meira *et al.*, 2004).

A través de una adecuada calibración en SEC, se pueden obtener valores exactos y reproducibles de masas molares medias y DMMs, en el caso de homopolímeros lineales y copolímeros de composición uniforme. Dependiendo del tipo de polímero (simple o complejo), de los estándares disponibles, y de la instrumentación, existen distintas metodologías recomendadas para la calibración en SEC. En el caso de polímeros complejos, es esencial la utilización de sensores de masa molar, que permiten determinar la curva de calibración durante la medición. Paradójicamente, el uso de detectores de masa molar ha incrementado la necesidad de investigar distintas curvas de calibración (Lew *et al.*, 1993; Brun, 2000; Balke *et al.*, 1999), como así también el efecto del IDV (Cheung *et al.*, 1993).

En el caso de polímeros simples, la calibración directa se obtiene con un conjunto de estándares angostos de la misma naturaleza química que el polímero analizado, normalmente ajustando las masas molares, M , correspondientes a los picos de los cromatogramas con los volúmenes de retención, V , correspondientes a esos picos, a través de un polinomio:

$$\log M(V) = C_0 + C_1 V + C_2 V^2 + C_3 V^3 + \dots \quad (\text{II.1})$$

En la zona de fraccionamiento lineal de las columnas, resulta la curva de calibración lineal utilizada más frecuentemente:

$$\log M(V) = C_0 + C_1 V \quad (\text{II.2})$$

Las M medias de estándares angostos son muy similares entre sí, y es usual asignar cualquier M media disponible del estándar (M_p , \bar{M}_n , \bar{M}_v , o \bar{M}_w) al V de pico, V_p . Por ejemplo, para cromatogramas asimétricos, se ha propuesto asignar M_p a la mediana del cromatograma, V_m (Dawkins, 1984). En general, pueden definirse diversas calibraciones según se relacionen las distintas M medias con el V_p o el V_m . De esta manera, y aun en el

caso más simple de un homopolímero lineal, se observan dos incertidumbres en la construcción de la calibración directa: (i) aceptar (o no) su linealidad, y (ii) seleccionar la forma de asignar cada M media a un V dado.

En el caso de SEC de polímeros complejos, la especificación correcta de la calibración universal $[\eta]M$ vs. V incluye incertidumbres en el cálculo de $[\eta]$, tanto en el caso de detección DR + SV, donde $[\eta]$ se calcula a partir de la Ec. (I.33); como cuando se estima $[\eta] = K M^\alpha$ (Ec. I.12), debido a inexactitudes en las constantes de MHS.

Los detectores de masa molar se utilizan para calcular las calibraciones *ad hoc* a partir del cociente de las señales medidas [Ecs (I.38), (I.39), (AII.5)]. Estas calibraciones sólo brindan información sobre alguna M media instantánea (por ej., \bar{M}_n o \bar{M}_w), y además dependen de la DMM de la muestra analizada. En general, cuando se utilizan estas calibraciones, las polidispersidades de las DMMs estimadas resultan erróneas. Por ejemplo, los detectores de dispersión de luz producen valores exactos de \bar{M}_w , pero sobrestiman los valores de \bar{M}_n , y por consiguiente las polidispersidades se subestiman (Prougenes *et al.*, 1998). También, los viscosímetros específicos subestiman \bar{M}_w/\bar{M}_n cuando las M se calculan utilizando las constantes de MHS del polímero analizado [Ec. (I.39.a)]; o sobrestiman \bar{M}_w/\bar{M}_n al emplear una calibración universal [Ec. (I.39.b)] (Jackson y Yau, 1993; Netopilík, 1994, 1997).

Este Capítulo investiga los errores asociados al problema (relativamente básico, pero aún no totalmente resuelto), de la correcta especificación de las curvas de calibración utilizadas en SEC. En la primera parte, se investiga experimentalmente la influencia de diferentes calibraciones posibles sobre las DMMs estimadas para una muestra incógnita de PS, utilizando tanto detección DR como DR + SV. Luego, se realiza un estudio teórico de los efectos de distintas DMMs, del E.I. y de incertidumbres en el

IDV y en la concentración sobre las calibraciones *ad hoc* en MD – SEC.

II.2. Incertidumbres en la Determinación de la Calibración Directa en SEC / DR

El objetivo de esta sección es presentar un estudio experimental de las distintas calibraciones directas que pueden obtenerse por SEC – DR de estándares de PS, y su efecto sobre la DMM estimada de una muestra desconocida de PS.

El trabajo experimental se llevó a cabo con un cromatógrafo líquido de alta performance marca Waters ALC / GPC 244, equipado con un detector DR marca Viscotek. Se empleó un set de 6 columnas marca Shodex A 802 – A 806, con límites de exclusión en el rango de 5×10^3 a 5×10^6 g/mol. Se utilizó tetrahidrofurano (THF) como fase móvil con un caudal de 1 mL/min. Los estándares de PS (Waters Associates, Inc.) utilizados se indican en la Tabla II.1. En todos los casos, las concentraciones empleadas fueron cercanas a 1 mg/mL.

Tabla II.1. Estándares de PS utilizados para calcular las calibraciones directas. Masas molares reportadas por el proveedor y volúmenes asociados al cromatograma DR.

Estándar	$\bar{M}_n \pm 5\%$ [g/mol]	$\bar{M}_v \pm 5\%$ [g/mol]	M_p [g/mol]	V_p [mL]	V_m [mL]
1	9050	9100	8500	38.195	38.327
2	48600	49800	50000	33.350	33.388
3	92600	98700	95000	31.629	31.666
4	217600	233000	240000	29.136	29.225
5	243000	281000	340000	27.921	28.067
6	1.5×10^6	1.75×10^6	3.0×10^6	25.275	25.605

Los cromatogramas DR corregidos por línea de base se muestran en la Fig.

II.1. Las curvas de calibración directa se obtuvieron combinando los valores de \overline{M}_n , \overline{M}_v , y M_p con los volúmenes de retención correspondientes a los picos (V_p) y a las medianas (V_m) de los cromatogramas. Las curvas de regresión se ajustaron con un polinomio de orden 3 [Fig. II.2.a)] y los parámetros de ajuste se muestran en la Tabla II.2.

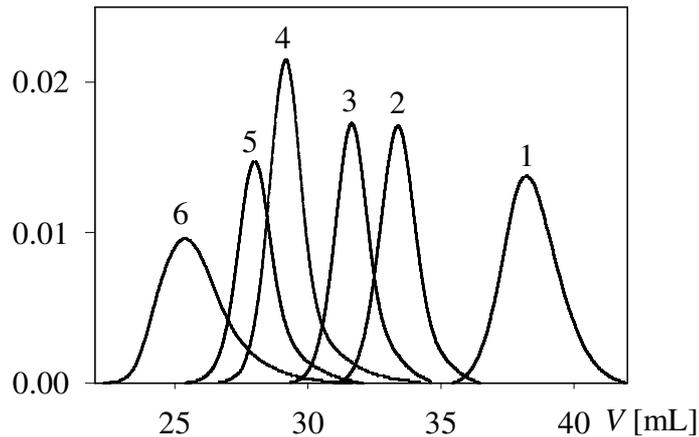


Figura II.1. Cromatogramas DR de estándares de PS.

En la Tabla II.1. se observa que el \overline{M}_n informado por el proveedor para el estándar 1 es mayor al M_p , introduciendo una primera incertidumbre dado que se espera $\overline{M}_n < M_p$. En la Fig. II.1. puede observarse que los cromatogramas de los estándares 1, 4 y 6 son más asimétricos, con colas hacia V más grandes. Esta asimetría también es detectable al comparar los valores de V_p y V_m dados en la Tabla II.1., donde $V_m > V_p$ para los estándares 1, 4 y 6; mientras que $V_m \cong V_p$ para los estándares 2, 3 y 5.

Los cromatogramas de los estándares 1 y 6 son los más anchos (Fig. II.1.); y probablemente se encuentren en zonas cercanas a los límites de fraccionamiento de las columnas. El estándar 6 exhibe la mayor diferencia entre V_p y V_m , y consecuentemente a bajos V se origina la mayor dispersión de las calibraciones (Fig. II.2.). En cambio, los cuatro estándares intermedios (2 – 5) sugieren una cierta correlación lineal. Las rectas y parámetros de regresión se muestran en la Fig. II.2.b) y en la Tabla II.2., respectivamente.

Claramente, las calibraciones exhiben una notoria dispersión, que conducirá a una variación importante en cualquier DMM estimada.

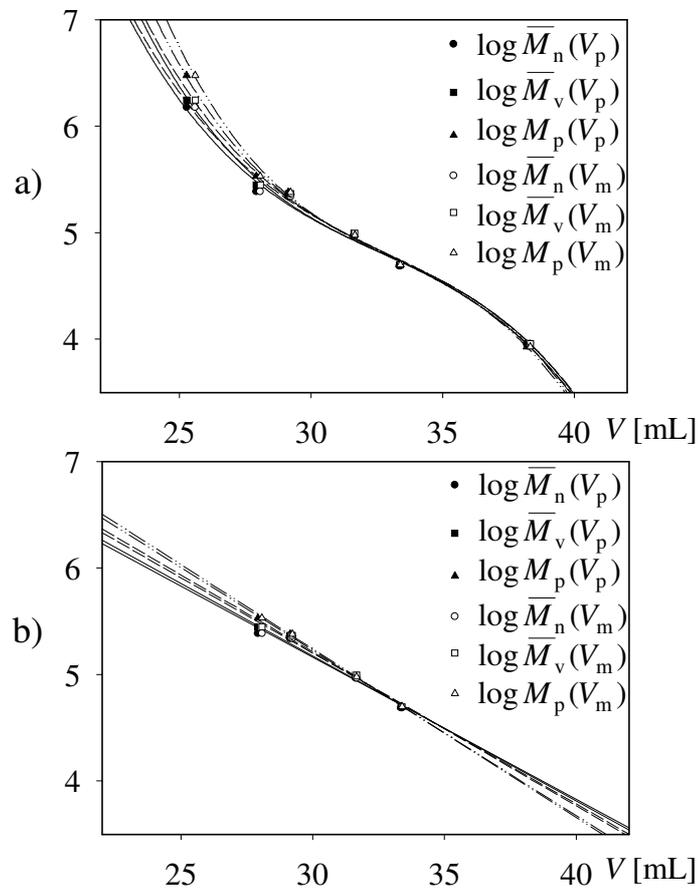


Figura II.2. Calibración directa con estándares de PS: a) polinomio de orden 3; b) polinomio de orden 1 (para sólo los 4 estándares intermedios).

A partir de las calibraciones de la Fig. II.2. y de los cromatogramas de DR (Fig. II.1.) se estimaron \bar{M}_n y \bar{M}_v para todos los estándares. En general, la recuperación de los valores provistos por el fabricante es muy pobre, obteniéndose errores cercanos al 30%. Sólo con las calibraciones lineales, se logra recuperar los \bar{M}_n de los estándares 2 y 3 con un $\pm 10\%$ de error. En la Fig. II.3 se presentan los \bar{M}_n calculados para los estándares 1-5 con las distintas calibraciones. Las barras de error representan el $\pm 5\%$ informado por el fabricante. Sólo en el caso del estándar 2, todos los \bar{M}_n estimados se ubican en esa

banda de error. Los \overline{M}_v calculados presentaron una dispersión similar a la de los \overline{M}_n .

Tabla II.2. Parámetros de ajuste de las calibraciones directas.

Calibración	Polinomio de orden 3				Polinomio de orden 1	
	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₀	C ₁
$\log \overline{M}_n(V_p)$	53.6321	-4.2664	0.1274	-1.3032×10^{-3}	9.1647	-0.1334
$\log \overline{M}_v(V_p)$	52.3799	-4.1208	0.1223	-1.2459×10^{-3}	9.4419	-0.1414
$\log M_p(V_p)$	68.7574	-5.5787	0.1654	-1.6710×10^{-3}	9.8791	-0.1551
$\log \overline{M}_n(V_m)$	60.1395	-4.8264	0.1433	-1.4523×10^{-3}	9.2611	-0.1362
$\log \overline{M}_v(V_m)$	58.9600	-4.6873	0.1384	-1.3970×10^{-3}	9.5433	-0.1444
$\log M_p(V_m)$	78.0308	-6.3866	0.1887	-1.8926×10^{-3}	9.9870	-0.1582

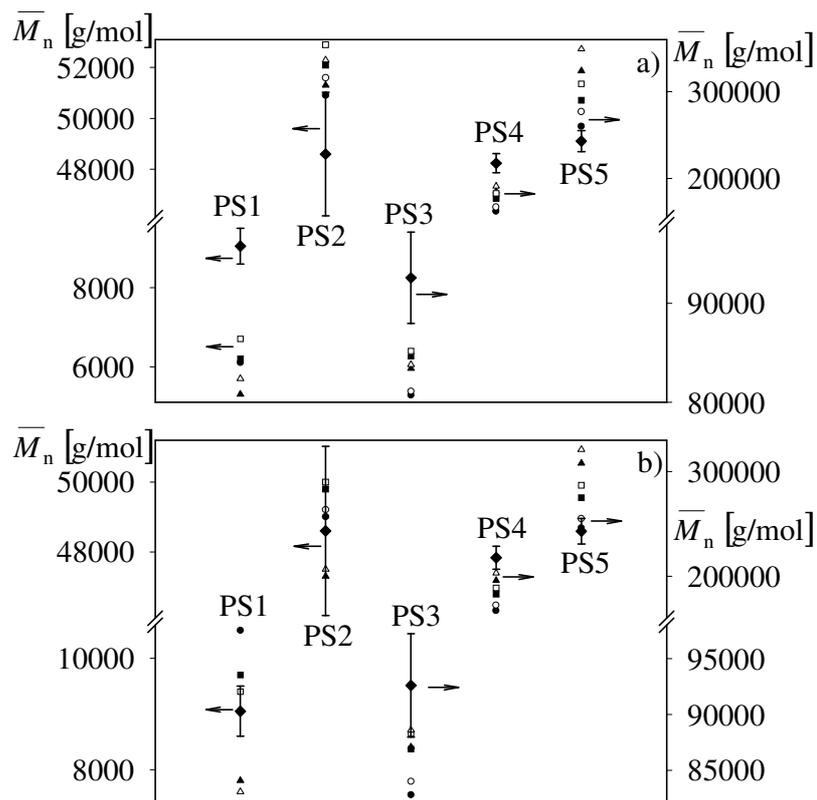


Figura II.3. Incertidumbres en los \overline{M}_n 's estimados a partir de las calibraciones directas: a) polinomio de orden 3, y b) polinomio de orden 1. (Los símbolos se corresponden con los de la Fig. II.2.).

II.2.a. Propagación de Errores a la DMM Estimada

Se analizó una muestra de PS lineal de características moleculares desconocidas. El cromatograma DR resultante se presenta en la Fig. II.4.a). La muestra eluye en un rango de $V = [26.0 - 38.5]$ mL, que excede apreciablemente el rango utilizado para calcular las calibraciones lineales. En las Figs II.4.b) y c) se muestran las DMMs obtenidas con las calibraciones no lineales, y con las calibraciones lineales; respectivamente. La Tabla II.3. resume las masas molares medias y las polidispersiones de las DMMs estimadas. Las DMMs estimadas con las calibraciones no lineales resultan levemente más angostas que las estimadas con las calibraciones lineales.

Tabla II.3. Masas molares medias, \overline{M}_n , \overline{M}_w y $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ para una muestra desconocida de PS.

Calibración	\overline{M}_n		\overline{M}_w		$\overline{M}_w/\overline{M}_n$	
	No lineal	Lineal	No lineal	Lineal	No lineal	Lineal
(i) $\log \overline{M}_n(V_p)$	64800	64100	101000	101000	1.56	1.57
(ii) $\log \overline{M}_v(V_p)$	66900	65500	109000	108000	1.63	1.65
(iii) $\log M_p(V_p)$	66300	62400	114000	114000	1.72	1.83
(iv) $\log \overline{M}_n(V_m)$	66300	64500	104000	103000	1.57	1.60
(v) $\log \overline{M}_v(V_m)$	68400	65900	113000	111000	1.65	1.69
(vi) $\log M_p(V_m)$	68100	62700	119000	117000	1.75	1.87

En general, se observa que la variabilidad de los \overline{M}_n estimados (< 10%) es inferior a la de los \overline{M}_w (< 20%), debido a la menor diferencia existente entre las distintas calibraciones a altos V . Además, las masas molares medias obtenidas con las calibraciones lineales resultaron levemente menores que las calculadas con las calibraciones no lineales. La mayor polidispersión se obtuvo con la calibración $\log M_p(V_m)$, y la menor con la

calibración $\log \bar{M}_n(V_p)$, debido a que se trata de las calibraciones límites (ver Fig. II.2.).

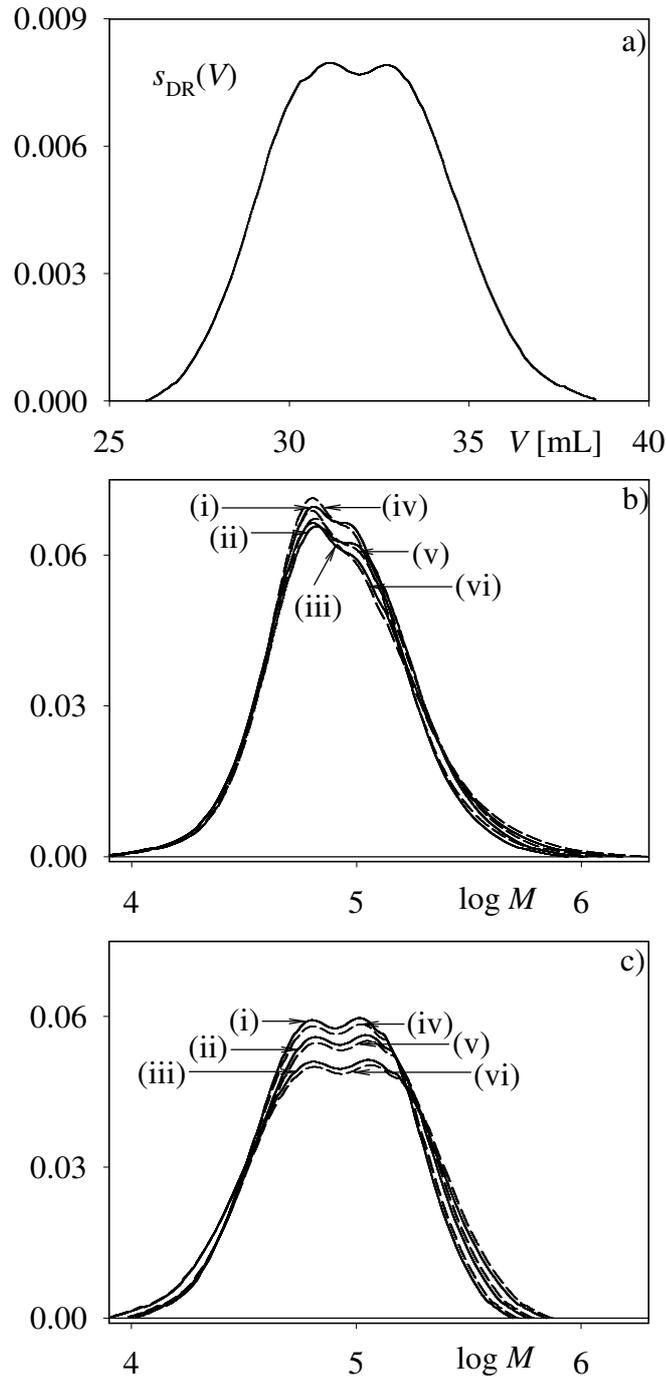


Figura II.4. a) Cromatograma másico [$s_{DR}(V)$] de la muestra de PS. DMMs halladas con diferentes calibraciones directas [(i) $\log \bar{M}_n(V_p)$; (ii) $\log \bar{M}_v(V_p)$; (iii) $\log M_p(V_p)$; (iv) $\log \bar{M}_n(V_m)$; (v) $\log \bar{M}_v(V_m)$; (vi) $\log M_p(V_m)$] ajustadas: b) con un polinomio de 3° orden; c) con un polinomio lineal.

II.3. Incertidumbres en la Determinación de las Calibraciones Involucradas en SEC / (DR + SV)

En esta sección se presenta un estudio experimental de las incertidumbres asociadas a las diferentes calibraciones utilizadas en SEC / (DR + SV), y de los errores inducidos sobre la DMM estimada. El equipamiento SEC empleado fue el descrito en la Sección II.2, pero ahora se utilizó el detector Viscotek Modelo 200 [Capítulo I, sección I.1.b.iv)]. Cuando se utiliza un sensor viscosimétrico en línea, es necesario conocer con precisión la concentración de polímero inyectada, dado que interviene directamente en el cálculo de la viscosidad intrínseca [ver Ec. (I.33)].

II.3.a. Calibración de Masa Molar

En la Tabla II.4., se detallan las masas molares nominales de los patrones reportadas por el proveedor (Perkin Elmer), y las características generales de preparación de las soluciones. Se pesó una masa de cada estándar, y se la diluyó en una cantidad conocida de THF. La “concentración calculada” es el cociente entre la masa de polímero y el volumen de solvente. De cada solución, se tomó una alícuota con una jeringa micrométrica, y se la inyectó en el cromatógrafo. Se pesó la jeringa llena (antes de la inyección) y vacía (después de inyectar), y por diferencia se determinó la masa de solución inyectada. Conociendo la densidad del THF ($\rho_s = 0.88 \text{ g/mL}$), se calcularon el volumen inyectado, y la masa de patrón inyectada (= concentración calculada \times volumen inyectado). Para cada estándar, se midieron los cromatogramas DR y SV, y utilizando el programa Unical (Viscotek Corp), se determinó el volumen de pico V_p (mL) del cromatograma de DR y la viscosidad intrínseca media $[\eta]_0$ (dL/g).

En la Fig. II.5. se muestran los cromatogramas DR y SV corregidos por línea de base, junto con la calibración de masas molares obtenida a partir de los datos de la

Tabla II.4., resultando:

$$\log M(V) = 10.8785 - 0.1898 V \quad (\text{II.3})$$

Tabla II.4. Análisis de estándares de PS, con detección DR + SV.

Estándar	M_{nom} [g/mol]	Masa polímero [mg]	Masa solvente [g]	Concentración calculada [mg/mL]	Volumen inyectado [mL]	V_p [mL]	$[\eta]_0$ [dL/g]
PS1	36000	7.6	4.8397	1.382	0.251	32.936	0.232
PS2	83000	7.8	4.6731	1.469	0.250	31.715	0.288
PS3	200000	6.5	3.4781	1.645	0.249	28.750	0.737
PS4	470000	6.7	3.2859	1.794	0.252	27.791	1.009

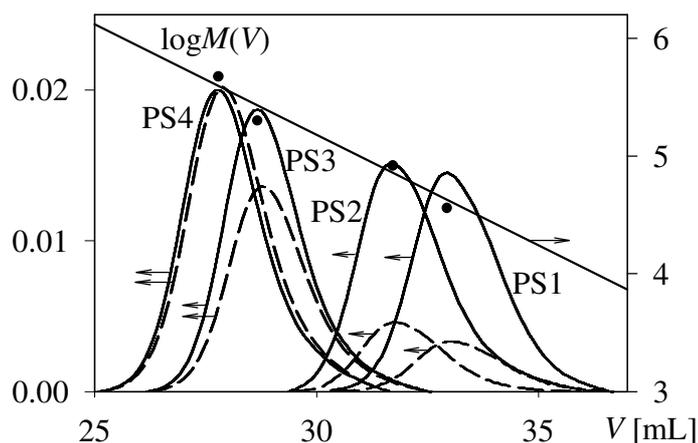


Figura II.5. Análisis por SEC / (DR + SV) de 4 estándares de PS. Cromatogramas DR (líneas llenas), y SV (líneas de trazos); y calibración de masas molares, $\log M(V)$.

II.3.b. Incertidumbre en la Calibración de Concentración

La “concentración calculada” (Tabla II.4.), presenta incertidumbres debidas a errores de pesada de la muestra y/o del solvente, a la posible evaporación de THF durante el filtrado de la muestra, y a la probable retención de polímero en el filtro. A los efectos de contar con una estimación más precisa de la concentración, se calibró el detector DR. Para

ello, se preparó inicialmente una solución madre de PS [$M_{\text{nom}} = 200000$ g/mol; “concentración preparada” $C_1 = 0.903$ mg/mL] y se determinó su concentración por un método gravimétrico, consistente en pesar inicialmente recipientes vacíos y agregarles una cantidad de la solución polimérica, registrando la masa total. Se dejó evaporar el solvente de todos los recipientes, y se los pesó hasta obtener constancia de la lectura. Como el solvente puede contener impurezas, se hizo también un blanco para determinar la cantidad de residuos presentes. En todos los casos (soluciones y solvente), se obtuvo la cantidad de residuos sólidos por diferencia de pesos. Finalmente la concentración de la solución determinada por el método gravimétrico fue $C_2 = 1.025$ mg/mL.

La calibración del detector DR, se realizó según el procedimiento que se describe a continuación. Se efectuaron cuatro inyecciones de la solución madre de diferentes masas, m_i , y se obtuvieron los cromatogramas DR. Se determinó: (i) m_i por diferencia de pesos de la jeringa antes y después de la inyección; (ii) el volumen inyectado: $V_i = m_i / \rho_s$; (iii) la masa de polímero inyectada: $m_{\text{pi}} = C_1 \times V_i$; y (iv) el área de cada cromatograma (A_i). Luego, se ajustó m_{pi} vs. A_i mediante una regresión lineal.

Los datos utilizados para construir la calibración se resumen en la Tabla II.5., y las curvas lineales de calibración ($m_{\text{pi},C1}$ y $m_{\text{pi},C2}$) se muestran en la Fig. II.6. Si bien las calibraciones no pasan por el origen (0, 0), el error es mínimo (< 1%). La calibración másica $m_{\text{pi},C2}$ se considera más exacta, debido al método más riguroso utilizado para determinar las masas inyectadas. En caso de utilizarse $m_{\text{pi},C1}$ para calcular la masa inyectada, se cometería un error del orden del 13 % por defecto. Este error es inadmisibles, puesto que se propaga directamente a las masas molares estimadas.

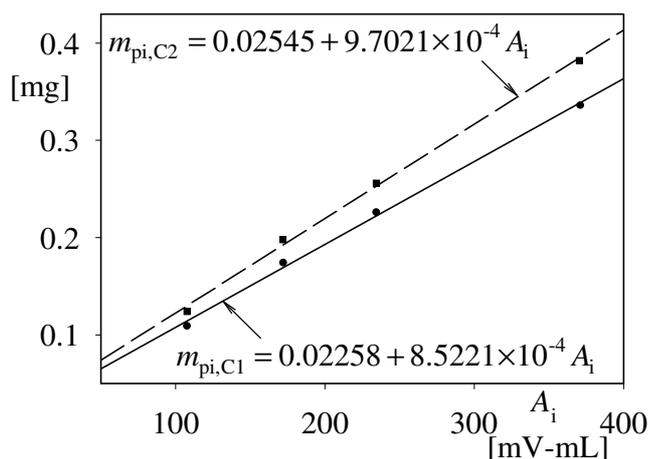


Figura II.6. Calibraciones del detector DR para PS, en base a la “concentración preparada”, $m_{pi,C1}$; y a la “concentración gravimétrica”, $m_{pi,C2}$.

Tabla II.5. Calibración del detector de DR para PS.

Inyección	Masa inyectada (m_i) [mg]	Volumen inyectado (V_i) [mL]	Concentración	Masa polímero (m_{pi}) [mg]	A_i [mV-mL]
1	0.1065	0.121	C ₁	0.109	107.741
			C ₂	0.124	107.720
2	0.1698	0.193	C ₁	0.174	172.193
			C ₂	0.198	171.956
3	0.2202	0.250	C ₁	0.226	234.478
			C ₂	0.256	234.344
4	0.328	0.372	C ₁	0.336	371.146
			C ₂	0.382	370.512

II.3.c. Calibración Universal

A partir de los datos de la Tabla II.4., se construyó la calibración universal, mediante una regresión lineal obteniéndose la recta $\log J_{nom}(V)$ [Fig. II.7]. La concentración de la solución de polímero inyectada influye en el valor de $[\eta]$ calculado, afectando también a la calibración universal. A partir de las curvas de calibración másica $m_{pi,C1}$ y $m_{pi,C2}$ y del área de los cromatogramas DR, se calcularon las concentraciones $C_{PS,1}$ y $C_{PS,2}$ y las viscosidades intrínsecas de los estándares, $[\eta]_1$ y $[\eta]_2$, respectivamente

(Tabla II.6.). Las concentraciones medidas $C_{PS,1}$ y $C_{PS,2}$ resultaron sensiblemente mayores a las concentraciones preparadas. Consecuentemente, las $[\eta]$ medidas, $[\bar{\eta}]_1$ y $[\bar{\eta}]_2$, resultaron inferiores a $[\bar{\eta}]_0$ (Tabla II.4.). A partir de M_{nom} , V_p (Tabla II.4.), $[\bar{\eta}]_1$ y $[\bar{\eta}]_2$ (Tabla II.6.) se obtuvieron las calibraciones universales corregidas por concentración, $\log J_{nom1}(V)$ y $\log J_{nom2}(V)$ [Fig. II.7]. Por último, se calculó la calibración universal en base a la Ec. (I.37), con las constantes de MHS de PS en THF a 25°C (Haney *et al.*, 1987): $\alpha = 0.712$ y $K = 1.279 \times 10^{-4}$ dL/g, y los datos de M_{nom} y V_p de cada estándar (Tabla II.4.), resultando la calibración $\log J_{MHS}(V)$ [Fig. II.7]. A continuación, se resumen las expresiones de todas las calibraciones universales calculadas:

$$\log J_{nom}(V) = 14.4443 - 0.3184 V$$

$$\log J_{nom1}(V) = 14.5608 - 0.3249 V$$

$$\log J_{nom2}(V) = 14.4178 - 0.3221 V$$

$$\log J_{MHS}(V) = 14.7309 - 0.3250 V$$

Tabla II.6. Concentración y viscosidad intrínseca medidas de los patrones de PS.

Estándar	$C_{PS,1}$	$C_{PS,2}$	$[\bar{\eta}]_1$ [dL/g]	$[\bar{\eta}]_2$ [dL/g]
	[mg/mL]			
PS1	1.783	2.014	0.178	0.159
PS2	1.768	2.014	0.237	0.208
PS3	1.954	2.223	0.623	0.551
PS4	2.168	2.483	0.863	0.730

Las pendientes de todas las calibraciones universales resultaron similares, pero se encuentran notoriamente separadas. Dado la escala logarítmica involucrada, estas diferencias son preocupantemente elevadas, en el sentido que conducirán a predicciones muy disímiles de las DMM estimadas. Todos los métodos utilizados para estimar las

calibraciones incluyen errores muy difíciles de eliminar y/o cuantificar. La calibración $\log J_{\text{MHS}}(V)$ es independiente de la concentración inyectada y no utiliza información de la señal de SV; pero se tiene aún la incertidumbre en las constantes de MHS para las condiciones de trabajo. La calibración $\log J_{\text{nom}2}(V)$ se obtuvo con un método gravimétrico metuculoso; sin embargo, es la más alejada de la calibración $\log J_{\text{MHS}}(V)$.

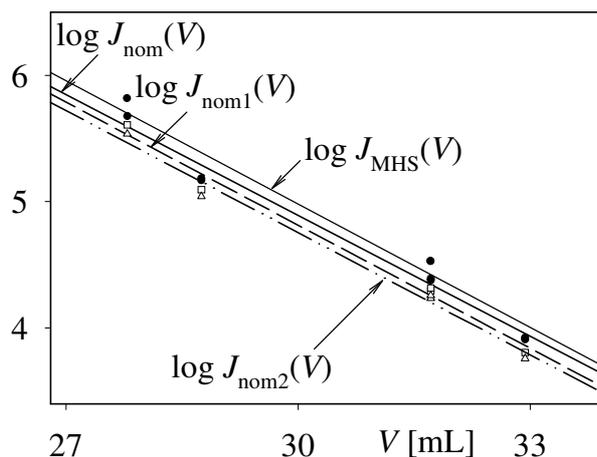


Figura II.7. Incertidumbres en las calibraciones universales: $\log J_{\text{nom}}$ (sin corrección por concentración), $\log J_{\text{nom}1}$ y $\log J_{\text{nom}2}$ (corregidas por concentración) y $\log J_{\text{MHS}}$ (basada en las constantes de MHS de literatura).

II.3.d. Propagación de Errores a la DMM Estimada

Se estimó la DMM de la muestra incógnita de PS de la sección II.2.a) utilizando tanto la calibración directa $\log M(V)$ [Ec. (II.3)], como las calibraciones universales de la Fig. II.7. El cociente entre las señales de DR y de SV [Ec. (I.39.b)] produce oscilaciones en las colas de los cromatogramas, por lo que se ajustó un polinomio en su parte central, y luego se lo extrapoló hacia las colas. En la Fig. II.8.a) se muestran los cromatogramas DR y SV, el cociente de señales, $\log\{\eta_{\text{sp}}(V) / c(V)\}$ (en líneas llenas), y su ajuste con un polinomio de tercer orden (en líneas de trazos). Las DMMs estimadas se muestran en la Fig. II.9. y sus masas molares medias en la Tabla II.7.

Tabla II.7. Masas molares medias estimadas de una muestra de PS por SEC / (DR + SV).

Calibración	\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_w / \bar{M}_n
$\log M_{\text{nom}}(V)$	41800	102000	2.44
$\log M_{v,J_{\text{nom}}}(V)$	48100	93300	1.94
$\log M_{v,J_{\text{nom}1}}(V)$	37800	77400	2.05
$\log M_{v,J_{\text{nom}2}}(V)$	33800	67600	2.00
$\log M_{v,J_{\text{MHS}}}(V)$	55700	114000	2.05

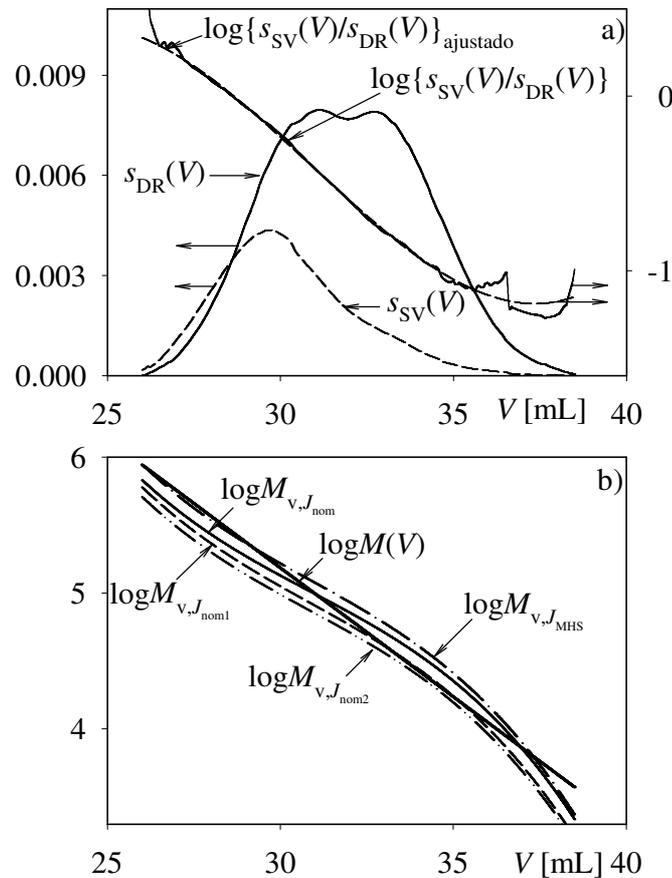


Figura II.8. Análisis de PS por SEC / (DR + SV). a) Cromatogramas medidos, cociente de señales y polinomio ajustado; b) calibraciones directas y estimadas a partir de las calibraciones universales.

Las DMMs calculadas a partir de las calibraciones universales resultaron más angostas que la DMM estimada con la calibración directa. Como era de prever, la dispersión en los valores medios es muy elevada, debido a las incertidumbres en las

calibraciones Además de los errores en la concentración, también juegan un papel importante el IDV y el E.I., cuyos efectos son evaluados con una metodología teórica en las secciones siguientes.

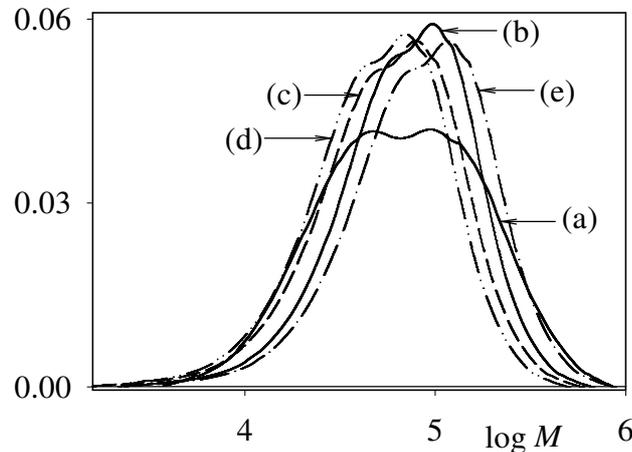


Figura II.9. DMMs estimadas a partir de las distintas calibraciones: a) $\log M(V)$; b) $\log M_{v,Jnom}(V)$; c) $\log M_{v,Jnom1}(V)$; d) $\log M_{v,Jnom2}(V_p)$; e) $\log M_{v,JMHS}(V)$.

II.4. Estudio Teórico de los Errores Cometidos en las Curvas de Calibración “Ad Hoc” Medidas

En esta sección se investigan los efectos del E.I., el IDV y la concentración sobre las curvas de calibración *ad hoc* [Sección I.1.c.iii)] en MD – SEC. Las simulaciones consideran el análisis de un homopolímero lineal, con las siguientes hipótesis: a) la calibración de masa molar es lineal; b) el fraccionamiento y la detección son ideales, pero los cromatogramas aparecen distorsionados por el E.I. y el ruido de medición; y c) los cromatogramas medidos son discretos, con un intervalo de volumen de retención fijo, ΔV . Se adoptaron las condiciones cromatográficas y la calibración directa presentados en Busnel *et al.* (2001) para el análisis de PS en THF a 25°C. Los cromatogramas medidos se simularon con la ecuación de Tung (1966) [Ec. (I.54)], donde la función de E.I. propuesta es una EMG no uniforme, $g_{EMG}(V)$ [Apéndice I]. Las expresiones correspondientes son:

$$\log M(V) = 10.562 - 0.4223 V \quad (\text{II.4.a})$$

$$\sigma = 0.165 - 0.0020 V \quad (\text{II.4.b})$$

$$\tau = 0.160 - 0.0015 V$$

Los cromatogramas de DR, LS y SV se simularon asumiendo tres estándares de PS con distribuciones de longitud de cadena en peso (WCLD) *a priori* conocidas (normal – logarítmica con $\sigma_{\text{LN}}^2 = 0.32$, $\bar{i} = 2100$; Poisson con $\lambda = 100$; y Schulz-Flory con $a = 2.5 \times 10^{-3}$), representadas por $w_{\text{LN}}(\log M)$, $w_{\text{SF}}(\log M)$, $w_{\text{P}}(\log M)$, respectivamente [Apéndice I]. Las simulaciones de los cromatogramas se efectuaron según se describe en el Apéndice II. Los cromatogramas corregidos de LS y SV, $[s_{\text{LS}}^c(V)$, $s_{\text{SV}}^c(V)]$, se calcularon a partir de la Ec. (AII.7.a), adoptando $K_{\text{LS}} = 0.02$. Los cromatogramas medidos libres de ruido se calcularon con la Ec. (AII.7.b) [Fig. II.10].

II.4.a. Calibración “Ad Hoc” en SEC / (DR + LS)

En la Fig. II.11. se muestra $\log M_w(V)$ obtenida como el cociente de las señales medidas [Ecs (I.38), (AII.5.a)]. El E.I. induce una no-linealidad y una rotación de $\log M_w(V)$ en el sentido anti-horario, que es más notoria para las DMMs más angostas. Las DMMs calculadas con estas calibraciones exhiben \bar{M}_n ’s sobrestimados; y las DMMs más afectadas son las más angostas, subestimándose su polidispersión [ver Tabla II.8.]. En el caso de una DMM ancha [$w_{\text{SF}}(\log M)$], $\log M_w(V)$ resulta levemente rotada respecto de $\log M(V)$, pudiendo despreciarse el efecto del E.I.

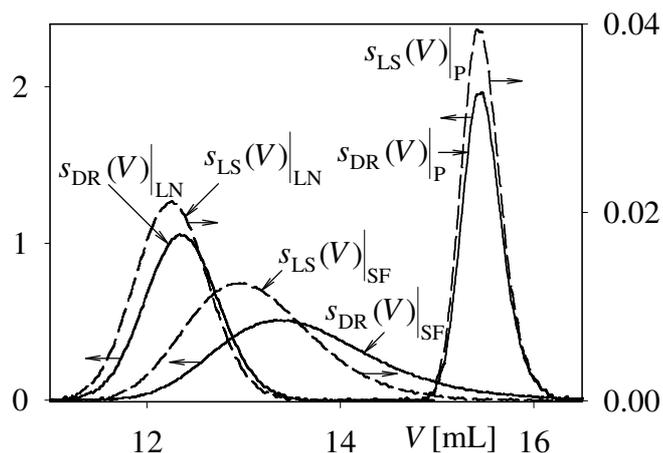


Figura II.10. Cromatogramas medidos por SEC / (DR + LS) correspondientes a las 3 DMMs simuladas.

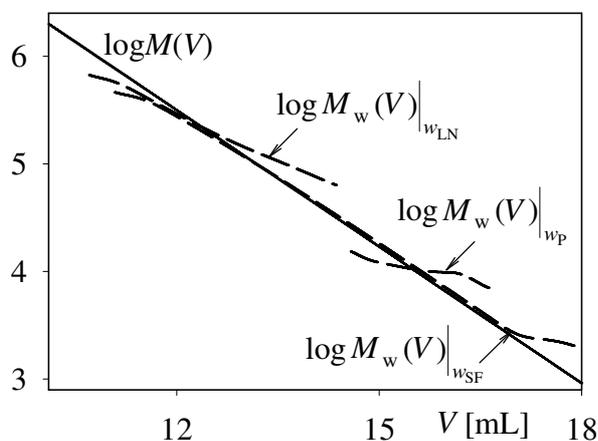


Figura II.11. Efecto del E.I. sobre la calibración *ad hoc* para las diferentes DMMs.

Tabla II.8. SEC / (DR + LS). Efecto del E.I. sobre las masas molares medias de las DMMs: a) teóricas, y b) estimadas con $\log M_w(V)$.

DMM	Poisson	Normal-logarítmica	Schulz-Flory
<i>a) Masas molares medias verdaderas</i>			
\bar{M}_n (g/mol)	10519	207780	42800
\bar{M}_w (g/mol)	10623	230110	85390
\bar{M}_w / \bar{M}_n	1.010	1.107	1.995
<i>b) Masas molares medias estimadas con $\log M_w(V)$</i>			
\bar{M}_n (g/mol)	10531	211970	42905
\bar{M}_w (g/mol)	10563	228890	85381
\bar{M}_w / \bar{M}_n	1.003	1.080	1.990

En el resto de esta sección, se considerará sólo el ejemplo de la DMM normal-logarítmica $[w_{LN}(\log M)]$, por exhibir resultados intermedios entre los correspondientes a las otras DMMs analizadas.

Otra fuente de error en las calibraciones *ad hoc* es el IDV. En la Fig. II.12. se muestra el efecto del error en el IDV sobre $\log M_w(V)$, para $s_{LS}(V)$ calculado con la Ec. (AII.6.a). Cuando $\delta_{LS} > 0$ [$s_{LS}(V)$ se encuentra desplazado erróneamente hacia menor V], la pendiente de $\log M_w(V)$ aumenta; mientras que lo contrario ocurre para $\delta_{LS} < 0$ (aunque en general, $\delta_{LS} < 0$ no tiene interés práctico, porque el detector LS precede al DR). El efecto del error en el IDV es mucho más marcado en el caso de una DMM angosta.

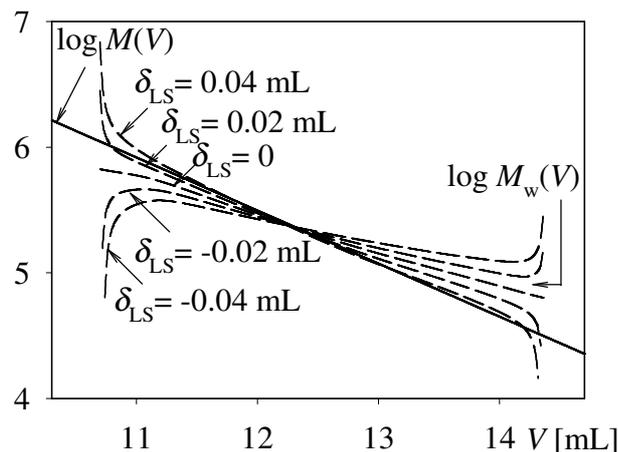


Figura II.12. Efecto del IDV sobre $\log M_w(V)$.

En la Fig. II.12. se observa que un $\delta_{LS} < 0$ es equivalente a un mayor E.I., mientras que un $\delta_{LS} > 0$ puede emplearse para compensar el efecto del E.I. (Jackson, 1999). Por ejemplo, $\delta_{LS} = 0.04$ mL permite prácticamente superponer $\log M_w(V)$ con la calibración no afectada por E.I., $\log M(V)$. Las desviaciones observadas en los extremos de $\log M_w(V)$ afectadas por δ_{LS} se deben a problemas numéricos de cómputo.

Una tercera posible fuente de error es la concentración de la muestra inyectada. En la Fig. II.13. se muestra el efecto del error en la concentración sobre

$\log M_w(V)$, observándose que si bien su pendiente no cambia, resulta desplazada hacia menores masas molares cuando el error en la concentración es por defecto y viceversa. El desplazamiento de $\log M_w(V)$ producirá el corrimiento de las DMMs hacia menores o mayores masas molares, sin afectar sensiblemente la polidispersión.

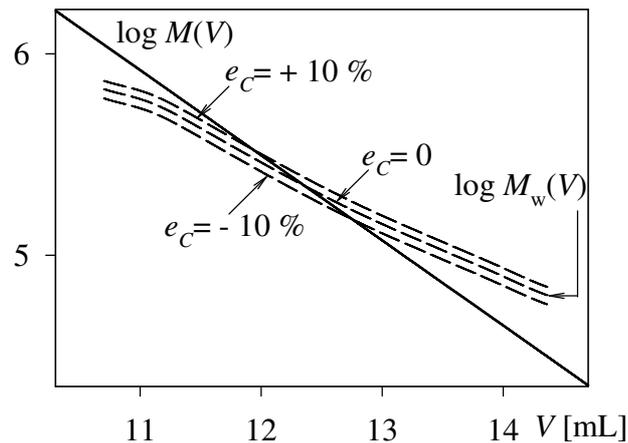


Figura II.13. Efecto del error en la concentración ($\pm 10\%$) sobre $\log M_w(V)$.

II.4.b. Calibración "Ad Hoc" en SEC / (DR + SV)

En el caso de detección DR + SV, las calibraciones *ad hoc* incluyen información sobre: (i) las constantes de MHS, obteniéndose $\log M_{v,MHS}(V)$ [Ec. (I.39.a)]; y (ii) la calibración universal, obteniéndose $\log M_{v,J}(V)$ [Ec. (I.39.b)]. Para observar el efecto del E.I. y la dependencia de $\log M_v(V)$ con las DMMs, se simularon los fraccionamientos de las mismas DMMs anteriormente utilizadas; es decir: (a) $w_{LN}(\log M)$, (b) $w_P(\log M)$, y (c) $w_{SF}(\log M)$. Con cada DMM y con la calibración de masa molar, $\log M(V)$, se obtuvieron los cromatogramas corregidos [$s_{SV}^c(V)$ y $s_{DR}^c(V)$], y medidos [$s_{SV}(V)$ y $s_{DR}(V)$], según se detalla en el Apéndice II, y que se muestran en la Fig. II.14. A partir de $s_{SV}(V)$, $s_{DR}(V)$, α , K y $\log J(V) = 14.189 - 0.723 V$, se calcularon las calibraciones *ad hoc* mostradas en la Fig. II.15.

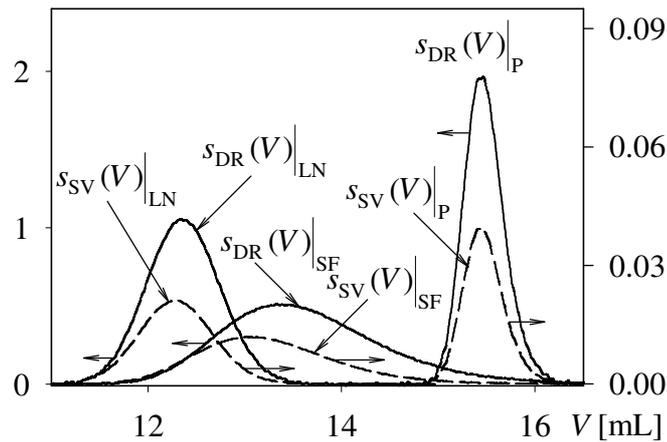


Figura II.14. Cromatogramas medidos por SEC / (DR + SV) correspondientes a las 3 DMMs simuladas.

Como en el caso DR + LS, el E.I. produce la rotación de las calibraciones *ad hoc* con respecto a $\log M(V)$. Mientras $\log M_{v,MHS}(V)$ rota en el sentido contrario a las agujas del reloj [Fig. II.15.a], $\log M_{v,J}(V)$ rota en el sentido horario [Fig. II.15.b]. La rotación más importante es observada en la DMM más angosta. Una DMM estimada con $\log M_{v,MHS}(V)$, exhibirá una polidispersión inferior a la real; mientras que lo contrario ocurriría al utilizarse $\log M_{v,J}(V)$. Para una DMM ancha, $\log M_v(V)$ resulta levemente rotada respecto de $\log M(V)$, pudiendo obviarse la corrección por E.I. [Tabla II.9].

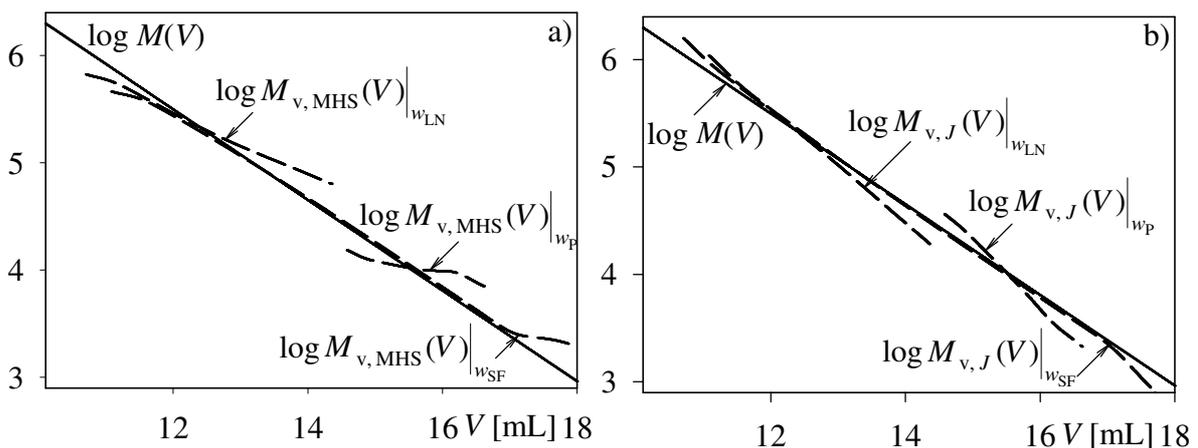


Figura II.15. Efecto del E.I. sobre a) $\log M_{v,MHS}(V)$ y b) $\log M_{v,J}(V)$, para las 3 DMMs simuladas.

A continuación, se considera solamente la DMM normal-logarítmica

$[w_{LN}(\log M)]$. En la Fig. II.16. se muestra el efecto del error en el IDV sobre las calibraciones *ad hoc*, cuando $s_{SV}(V)$ se obtiene con la Ec. (AII.6.b). En la Fig. II.16.a) se observa que para $\delta_{SV} > 0$, la pendiente de $\log M_{v,MHS}(V)$ aumenta con δ_{SV} . Un $\delta_{SV} < 0$ es equivalente a un mayor E.I., mientras que un $\delta_{SV} > 0$ puede emplearse para compensar el efecto del E.I. Un comportamiento inverso se observa para $\log M_{v,J}(V)$ [Fig. II.16.b)].

Los errores en la concentración no modifican las pendientes de las calibraciones *ad hoc* [Fig. II.17.]. Con errores por defecto en la concentración, $\log M_{v,MHS}(V)$ se desplaza hacia menores masas molares [Fig. II.17.a)]; mientras que $\log M_{v,J}(V)$ se desplaza hacia mayores masas molares [Fig. II.17.b)]. Estos desplazamientos producirán el corrimiento de las DMMs, resultando erróneas las masas molares medias, aunque las polidispersiones no son afectadas.

Tabla II.9. SEC / (DR + SV). Efecto del E.I. sobre las masas molares medias de las DMMs: a) teóricas, y estimadas con b) $\log M_{v,MHS}(V)$, y c) $\log M_{v,J}(V)$.

DMM	Poisson	Normal-logarítmica	Schulz-Flory
<i>a) Masas molares medias verdaderas</i>			
\bar{M}_n (g/mol)	10519	207780	42800
\bar{M}_w (g/mol)	10623	230110	85390
\bar{M}_w / \bar{M}_n	1.010	1.107	1.995

<i>b) Masas molares medias estimadas con $\log M_{v,MHS}(V)$</i>			
\bar{M}_n (g/mol)	10520	211140	42890
\bar{M}_w (g/mol)	10552	228080	85350
\bar{M}_w / \bar{M}_n	1.003	1.080	1.990

<i>c) Masas molares medias estimadas con $\log M_{v,J}(V)$</i>			
\bar{M}_n (g/mol)	10044	199610	42798
\bar{M}_w (g/mol)	11098	241140	85423
\bar{M}_w / \bar{M}_n	1.105	1.208	1.996

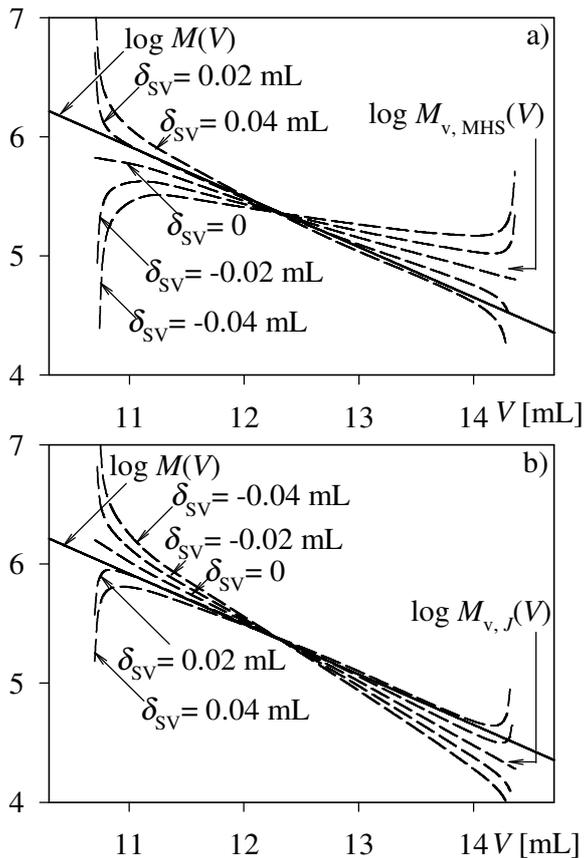


Figura II.16. Efecto del error en el IDV sobre: a) $\log M_{v,MHS}(V)$ y b) $\log M_{v,J}(V)$.

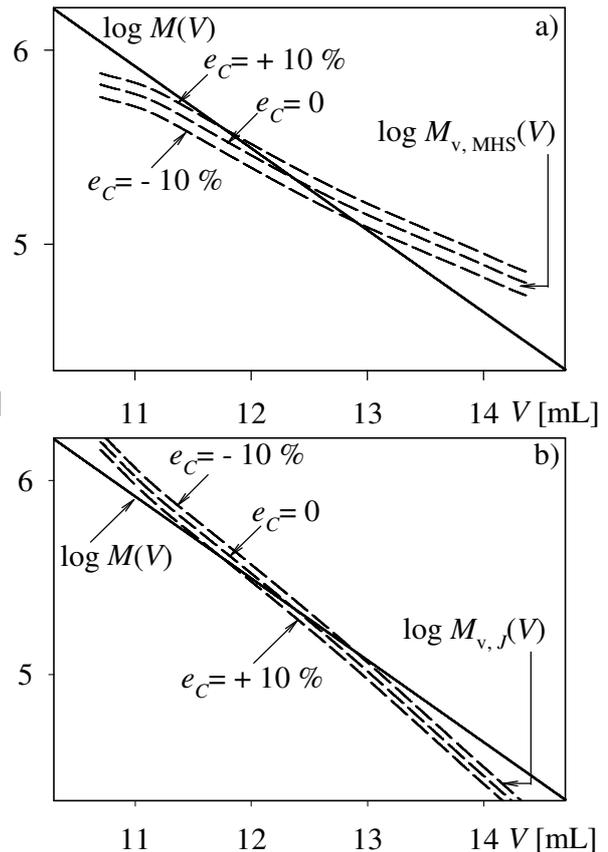


Figura II.17. Efecto del error en la concentración ($\pm 10\%$) sobre: a) $\log M_{v,MHS}(V)$ y b) $\log M_{v,J}(V)$.

II.4.c. Errores en la DMM Estimada Utilizando las Calibraciones "Ad Hoc"

Las DMMs se estimaron combinando la señal del sensor DR con las calibraciones *ad hoc*. Usualmente, las calibraciones son ruidosas en los extremos, por lo que se ajustó un polinomio de primer orden en el rango correspondiente al 75 % de las alturas de los cromatogramas de DR, y se lo extrapoló hacia los extremos obteniéndose $\log M_w(V)$, $\log M_{v,MHS}(V)$ y $\log M_{v,J}(V)$ lineales. Luego se calcularon las masas molares medias para las DMMs estimadas: $s_{DR}(\log M)$, $s_{DR}(\log M_w)$, $s_{DR}(\log M_{v,MHS})$ y $s_{DR}(\log M_{v,J})$.

II.4.c.i) Detección DR + LS

En la Tabla II.10. se resumen las masas molares medias estimadas de la

DMM normal-logarítmica. Debido al E.I., la polidispersión de $s_{DR}(\log M)$ es mayor a la verdadera, mientras que la polidispersión de $s_{DR}(\log M_w)$ resulta subestimada, debido a la rotación de $\log M_w(V)$ con respecto a $\log M(V)$ [Fig. II.11]. Asimismo, cuando el IDV es positivo, las polidispersiones resultan sobrestimadas. De esta manera, un IDV positivo pequeño puede compensar el efecto del E.I., y automáticamente proveer masas molares medias y polidispersidades prácticamente exactas. Esta compensación se observa en la Tabla II.10. para $\delta_{LS} \cong 0.02$ mL. Los errores en la concentración no afectan sensiblemente la polidispersión de la DMM estimada. Concentraciones inferiores a la verdadera originan masas molares medias subestimadas, y lo contrario sucede cuando el error en la concentración es por exceso.

Tabla II.10. Errores en las masas molares estimadas por SEC / (DR + LS).

DMM		\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_w / \bar{M}_n
$w(\log M)$		207780	230110	1.107
<i>a) Efecto del E.I.</i>				
$s_{DR}(\log M)$		205030	235020	1.146
$s_{DR}(\log M_w)$		211970	228890	1.080
<i>b) Efecto del IDV</i>				
	$\delta_{LS} = - 0.04$ mL	222720	229490	1.030
	$\delta_{LS} = - 0.02$ mL	217950	229210	1.052
	$\delta_{LS} = 0.02$ mL	205100	228600	1.115
	$\delta_{LS} = 0.04$ mL	197250	228250	1.157
<i>c) Efecto de la concentración</i>				
	- 10%	190780	206000	1.080
	+ 10%	233170	251780	1.080

II.4.c.ii) Detección DR + SV

En la Tabla II.11. se muestran los resultados correspondientes a la simulación

de la DMM normal-logarítmica, para el caso de detección DR + SV. Debido al E.I., $s_{DR}(\log M)$ exhibe una polidispersión sobrestimada. Cuando la DMM se calcula con $\log M_{v,MHS}(V)$, la polidispersión es subestimada, y lo contrario ocurre con $\log M_{v,J}(V)$, debido a las rotaciones contrapuestas originadas por el E.I. sobre $\log M_{v,MHS}(V)$ y $\log M_{v,J}(V)$ [Fig. II.15]. La polidispersión de la DMM calculada con $\log M_{v,MHS}(V)$ es sobrestimada para $\delta_{SV} > 0$, debido al incremento de la pendiente de $\log M_{v,MHS}(V)$ con $\delta_{SV} > 0$ [Fig. II.16.a)]. La DMM estimada $s_{DR}(\log M_{v,J})$ exhibe una polidispersión subestimada para $\delta_{SV} > 0$, debido a la menor pendiente de $\log M_{v,J}(V)$ [Fig. II.16.b)].

Tabla II.11. Errores en las masas molares estimadas por SEC / (DR + SV).

DMM		\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_w / \bar{M}_n
$w(\log M)$		207780	230110	1.107
<i>a) Efecto del E.I.</i>				
$s_{DR}(\log M)$		205030	235020	1.146
$s_{DR}(\log M_{v,MHS})$		211140	228080	1.080
$s_{DR}(\log M_{v,J})$		199610	241140	1.208
<i>b) Efecto del IDV</i>				
$s_{DR}(\log M_{v,MHS})$	$\delta_{SV} = -0.04$ mL	223050	226910	1.017
	$\delta_{SV} = -0.02$ mL	218110	227340	1.042
	$\delta_{SV} = 0.02$ mL	202580	229230	1.132
	$\delta_{SV} = 0.04$ mL	192400	230650	1.199
$s_{DR}(\log M_{v,J})$	$\delta_{SV} = -0.04$ mL	186300	249190	1.338
	$\delta_{SV} = -0.02$ mL	192750	244500	1.269
	$\delta_{SV} = 0.02$ mL	206620	239120	1.157
	$\delta_{SV} = 0.04$ mL	213960	238480	1.115
<i>c) Efecto de la concentración</i>				
$s_{DR}(\log M_{v,MHS})$	- 10%	182100	196710	1.080
	+ 10%	241380	260750	1.080
$s_{DR}(\log M_{v,J})$	- 10%	221790	267940	1.208
	+ 10%	181470	219220	1.208

En forma similar al caso de detección DR + LS, un IDV positivo pequeño podría compensar el efecto del E.I., y automáticamente proveer masas molares medias y polidispersidades prácticamente exactas, tal como ocurre con $\delta_{SV} \cong 0.02$ mL [Tabla II.11.]. Lo opuesto sucede para las DMMs estimadas con $\log M_{v,j}$, donde la compensación del E.I. se logra para IDV altos ($\delta_{SV} \cong 0.04$ mL, en el ejemplo analizado). Errores en la concentración originan errores en las masas molares medias, pero no inducen errores adicionales en la polidispersión.

II.5. Conclusiones

En este Capítulo se estudiaron distintos errores involucrados en la determinación de las curvas de calibración directa, universal y *ad hoc*, y su propagación a las DMMs estimadas por SEC. En general, las calibraciones en SEC son difíciles de determinar con exactitud, aun en el caso más sencillo de los homopolímeros lineales con disponibilidad de estándares de calibración.

Desde el punto de vista experimental, existen varias incertidumbres para obtener las calibraciones directas a partir de estándares comerciales. Cuando sólo se dispone de detección DR, las principales fuentes de error son: (i) la variabilidad (y probable inexactitud) de las masas molares medias de los estándares, reportadas por el proveedor; (ii) las posibilidades de asignar distintos V a distintos M ; y (iii) el orden del polinomio utilizado para ajustar la calibración. Estas incertidumbres son muy difíciles de eliminar, y darán lugar, consecuentemente, a DMMs erróneas. La práctica usual de utilizar calibraciones lineales puede ser una fuente adicional de error en el análisis de muestras anchas; y en tal caso, la extrapolación de la calibración a rangos de V extendidos debe ser analizada cuidadosamente.

La incorporación en SEC de los sensores de masa molar no resuelve

totalmente el problema de la calibración. Si bien permiten disponer de otras mediciones independientes, surgen nuevos parámetros inciertos, tales como: (i) las constantes de calibración de los sensores; (ii) la concentración de los estándares; (iii) las constantes de MHS; (iv) el E.I.; y (v) el IDV. Estos parámetros (que no afectan a la calibración directa), influyen notoriamente sobre la calibración universal y las calibraciones *ad hoc*. La obtención de una calibración más confiable requerirá el análisis de mediciones independientes, que permitan conciliar el conjunto de datos medidos con los correspondientes modelos de medición. Por ejemplo, podría incorporarse la medición de la $[\eta]$ de cada estándar fuera de línea (por viscosimetría capilar), la estimación de \bar{M}_n por técnicas de osmometría, etc.

En gran medida, las incertidumbres observadas en las calibraciones durante los análisis experimentales, pudieron ser justificadas a través de ejemplos simulados, donde se estudiaron los efectos causados por el E.I., y por errores en el IDV, y en la concentración. Los errores introducidos por el E.I. sólo son importantes en el análisis de muestras que incluyan picos angostos. Las calibraciones *ad hoc*, $\log M_w(V)$ y $\log M_{v,MHS}(V)$, exhiben un comportamiento similar frente a errores en el E.I., el IDV y la concentración; mientras que $\log M_{v,r}(V)$ lo hace en la forma opuesta. El E.I. y el IDV causan la rotación de las curvas de calibración *ad hoc*, originando errores en las masas molares medias y en la polidispersidad de las DMMs estimadas. Ambos parámetros resultan correlacionados en sus efectos; y en tal sentido, el IDV podría ser utilizado para compensar parcialmente al E.I. El error en la concentración produce desplazamientos hacia mayores o menores masas molares, pero no tiene un efecto apreciable sobre la polidispersidad de la DMM estimada.

Por último, cabe mencionar que en el caso de los polímeros complejos, el problema resulta aun más difícil, ya que en general no existen estándares adecuados, y la

respuesta de los sensores puede verse afectada por la composición química (en copolímeros), y por el grado de ramificación (en polímeros ramificados). Algunos aspectos relacionados con las calibraciones de polímeros complejos se exploran en forma teórica en el Capítulo V.

CAPÍTULO III. Nuevos Desarrollos en la Estimación **de la Función de E.I.**

III.1. Introducción

En SEC, la corrección por E.I. es importante cuando los cromatogramas son angostos, o son anchos pero multimodales con hombros y/o picos angostos. En el enfoque más general, la corrección por E.I. involucra las tres dificultades siguientes: 1) la estimación de la función de E.I.; 2) el cálculo de los cromatogramas corregidos a partir de los cromatogramas medidos y de la función de E.I.; y 3) la estimación de la DMM corregida. Los algoritmos numéricos asociados con los puntos 2) y 3) se han tratado en forma extensa en la literatura (Hamielec, 1984; Meira y Vega, 2001, 2005; Yau, *et al.*, 1977; Gugliotta, *et al.*, 1990; Jackson, 1999; Vega y Meira, 2001; Baumgarten *et al.*, 2002), y se discutieron parcialmente en el Capítulo I de esta tesis.

Si se dispusiera de estándares estrictamente monodispersos de diferentes masas molares, entonces sería simple determinar la función de E.I., ya que cualquier cromatograma $s_k(V)$ proporcionaría directamente la forma de las funciones de E.I. individuales; y la función de E.I. no uniforme sería obtenida por interpolación entre un grupo de tales cromatogramas. Desafortunadamente, los estándares monodispersos sólo están disponibles para los materiales de baja masa molar (por ejemplo, un solvente puro), y para algunos biopolímeros solubles en agua. Se han obtenido estándares sintéticos casi-uniformes por fraccionamiento de estándares angostos de PS en cromatografía de interacción por gradiente de temperatura (TGIC); y sus cromatogramas se pudieron ajustar adecuadamente por EMGs (Busnel *et al.*, 2001). Dentro del rango de calibración lineal, estas funciones resultaron sólo ligeramente no uniformes pero asimétricas, con el decaimiento exponencial hacia los volúmenes de retención más altos. Cerca del límite de

exclusión total, la función de E.I. se torna más angosta y asimétrica, y no podría aproximarse adecuadamente por una EMG (Busnel *et al.*, 2001). En general, los efectos del E.I. son particularmente serios cerca del límite de exclusión total.

Pueden estimarse funciones de E.I. de forma arbitraria a través de una técnica basada en el reciclo de estándares angostos (Alba y Meira, 1986). Sin embargo, este método requiere de 2 deconvoluciones mal-condicionadas: una destinada a compensar el E.I. en las columnas, y otra para compensar el ensanchamiento inducido por la bomba y la tubería de reciclo (distorsión ausente en una corrida normal de fraccionamiento).

Cuando la forma de una DMM angosta es *a priori* conocida (por ejemplo, es representada por una distribución de Poisson en un eje lineal de masa molar), se puede estimar una función de E.I. uniforme y Gaussiana comparando el cromatograma de DR con el cromatograma teórico que se obtendría en ausencia de E.I. (Schnöll-Bitai, 2003). Más recientemente, el método se extendió a funciones de E.I. representadas por EMGs asimétricas (Vega y Schnöll-Bitai, 2005). Para muestras que exhiben una WCLD de Poisson o una normal-logarítmica, se desarrollaron las correlaciones teóricas para determinar los parámetros de la EMG en base al ancho del pico, la varianza, y los puntos de inflexión del cromatograma de DR (Vega y Schnöll-Bitai, 2005). Estos métodos no requieren ninguna inversión numérica mal-condicionada, pero se restringen a imponer una forma a la DMM analizada.

Varias publicaciones han empleado los cromatogramas de masa molar para estimar funciones de E.I. uniformes y Gaussianas. Así, se ha propuesto un método (Lederer *et al.*, 1986; Billiani *et al.*, 1988) para estimar simultáneamente la desviación estándar de la función de E.I. Gaussiana y los coeficientes de calibración de masa molar a partir de los cromatogramas de DR y de LS y una calibración lineal de masa molar. También, se ha propuesto un procedimiento iterativo (Netopilík, 1982) para estimar

simultáneamente la DMM verdadera y la desviación estándar de una función de E.I. Gaussiana a partir de los cromatogramas de DR y de LS de un estándar angosto y una calibración lineal. El procedimiento es como sigue: (i) suponer una desviación estándar para la función de E.I.; (ii) estimar $s_{DR}^c(V)$ y $s_{LS}^c(V)$ por inversión de la Ec. (III.2); (iii) estimar $M^c(V)$ a través de la Ec. (III.3); y (iv) iterar hasta que la pendiente de $\log M^c(V)$ coincida con la de la calibración de masa molar (independientemente determinada). El método se evaluó teóricamente adoptando una DMM angosta de Schulz-Zimm. En este caso, la DMM original se recuperó bien, pero se observaron errores grandes en la estimación de la desviación estándar (Netopilík, 1982).

A continuación, se presenta un método teórico para estimar la función de E.I. en SEC. Los datos crudos son los cromatogramas (de concentración y de masa molar) de estándares angostos y la calibración de masa molar. La función de E.I. puede asumirse tanto arbitraria como representada por una EMG. En el Capítulo IV, se aplica este método para determinar simultáneamente la función de E.I. y el IDV a partir de estándares de PS cuando se cuenta con mediciones experimentales de: i) DR + LS; y ii) DR + SV.

III.2. Estimación Teórica de la Función de E.I. en SEC, a partir de Estándares Angostos de PS y con Calibración de Masa Molar Conocida y Detección de Masa y Masa Molar

Se considera el modelo de fraccionamiento SEC discreto descrito previamente en Meira y Vega (2005) y Vega y Meira (2001), y reproducido en el Apéndice II. Las hipótesis del modelo son: i) los detectores de masa y de masa molar son ideales en el sentido que responden a las Ecs (AII.3, 4), salvo por el hecho que sus señales están contaminadas con ruidos aleatorios aditivos de media cero; ii) los cromatogramas se han corregido exactamente por línea de base y por IDV; iii) los cromatogramas de masa y

de masa molar eluyen en un rango de volumen de retención común $[V_1-V_m]$, y se muestrean a intervalos de volumen regulares ΔV ; y iv) la calibración de masa molar $\log M^c(V)$ es conocida, y en general puede ser “no lineal.”

La estimación de cualquier cromatograma corregido k se obtiene por la inversión de la matriz \mathbf{G} correspondiente a través de [Ec. (AII.7.b)]:

$$\hat{\mathbf{s}}_k^c = \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_k ; \quad (k = \text{DR, LS, SV, OS}) \quad (\text{III.1})$$

donde $\mathbf{G}^{[-1]}$ es una matriz ($p \times m$) que representa una pseudo-inversa regularizada de \mathbf{G} ; y el símbolo “ \wedge ” indica “valor estimado”. Se han desarrollado varios procedimientos numéricos para calcular $\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_k$ (Meira y Vega, 2005; Gugliotta *et al.*, 1990). En este trabajo, se emplea la siguiente expresión correspondiente al método de inversión por descomposición en valores singulares (Mendel, 1995):

$$\hat{\mathbf{s}}_k^c = \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_k = \sum_{j=1}^r \frac{\mathbf{u}_j^T \mathbf{s}_k}{\sigma_j} \mathbf{v}_j ; \quad (r \leq p); \quad (\text{III.2})$$

$$(\sigma_1 \geq \sigma_2 \geq \dots \geq \sigma_r \geq \dots \geq \sigma_p \geq 0)$$

donde \mathbf{u}_j y \mathbf{v}_j son los autovectores de $\mathbf{G}\mathbf{G}^T$ y $\mathbf{G}^T\mathbf{G}$, respectivamente; y los σ_j 's son los valores singulares de \mathbf{G} (o raíz cuadrada de los autovalores de $\mathbf{G}^T\mathbf{G}$). En la sumatoria de la Ec. (III.2), el número de términos “efectivos” está limitado a r , para evitar la amplificación del ruido de medición. El parámetro r se selecciona por prueba y error entre una solución altamente oscilatoria (r elevados) y una excesivamente suave (r pequeños).

III.2.a. Estimación de la Función de E.I. Arbitraria

La función $g(V)$ uniforme puede asumirse como arbitraria o representarse por una EMG. Se considera primero una $g(V)$ arbitraria dada por $\mathbf{g} = [g_1, g_2, \dots, g_n]^T$. Los datos crudos son los cromatogramas medidos de masa \mathbf{s}_{DR} , de masa molar \mathbf{s}_k (con k tanto LS

como SV), y la calibración de masa molar \mathbf{M}^c .

Se denomina $\hat{\mathbf{s}}_{k,DR}$ ($k = LS$ o SV) a la estimación del cromatograma de masa molar, calculado a partir del cromatograma de DR medido. Tal estimación se obtiene reemplazando la Ec. (III.1) en las Ecs (AII.7), resultando:

$$\hat{\mathbf{s}}_{k,DR} = \mathbf{K}_k \mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{a_k} \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{DR} ; \quad (k = LS, SV) \quad (\text{III.3})$$

Se define el siguiente vector de error de estimación:

$$\tilde{\mathbf{e}}_{\mathbf{s}_{k,DR}} = \mathbf{s}_k - \hat{\mathbf{s}}_{k,DR} = \mathbf{s}_k - \mathbf{K}_k \mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{a_k} \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{DR} ; \quad (k = LS, SV) \quad (\text{III.4})$$

Idealmente, $\tilde{\mathbf{e}}_{\mathbf{s}_{k,DR}} \cong [0, \dots, 0]^T$. La Ec. (III.4) representa m ecuaciones algebraicas con n ($< m$) incógnitas, que son las ordenadas de g : g_1, g_2, \dots, g_n . Los posibles errores en la ganancia de los detectores, \mathbf{K}_k , se evitan normalizando la Ec. (III.4) como sigue:

$$\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k,DR}} = \frac{\mathbf{s}_k}{\|\mathbf{s}_k\|_1} - \frac{\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{a_k} \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{DR}}{\|\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{a_k} \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{DR}\|_1} ; \quad (k = LS, SV) \quad (\text{III.5})$$

donde $\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k,DR}}$ es el vector de error de estimación normalizado; y $\|\bullet\|_1$ es la norma-1 estándar de un vector, es decir: $\|\mathbf{x}\|_1 = \sum_i |x_i|$.

Finalmente, \mathbf{g} se obtiene a través del siguiente proceso de minimización:

$$\min_{\mathbf{g}} (e_{\mathbf{s}_{k,DR}}) = \min_{\mathbf{g}} (\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k,DR}}^T \mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k,DR}} + \phi_g^2); \quad (k = LS, SV) \quad (\text{III.6.a})$$

con

$$\phi_g^2 = \beta \sum_{i=1}^n (2g_i - g_{i+1} - g_{i-1})^2, \text{ y } g_0 = g_{n+1} = 0 \quad (\text{III.6.b})$$

donde $e_{\mathbf{s}_{k,DR}}$ es un funcional escalar asociado con el error cuadrático medio de $\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k,DR}}$. En

la Ec. (III.6.b), ϕ_g^2 es una función de filtrado escalar que se introduce para imponer alguna correlación entre 3 puntos consecutivos de \mathbf{g} ; y $\beta (\geq 0)$ es un factor de peso. El término entre paréntesis en la Ec. (III.6.b) es una estimación de la derivada segunda de $g(V)$, y por consiguiente el efecto de ϕ_g^2 durante el procedimiento de optimización, es reducir las oscilaciones de alta frecuencia en las estimaciones de $g(V)$.

El procedimiento propuesto está basado en estimar uno de los cromatogramas a partir del conocimiento del otro. Las Ecs (III.5) y (III.6) pueden generalizarse para cualquier par de detectores genéricos $\{k_1, k_2\}$, como sigue:

$$\min_{\mathbf{g}} (e_{s_{k_1, k_2}}) = \min_{\mathbf{g}} (\mathbf{e}_{s_{k_1, k_2}}^T \mathbf{e}_{s_{k_1, k_2}} + \phi_g^2) \quad (\text{III.7.a})$$

con:

$$\mathbf{e}_{s_{k_1, k_2}} = \frac{\mathbf{s}_{k_1}}{\|\mathbf{s}_{k_1}\|_1} - \frac{\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{(a_{k_1} - a_{k_2})} \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_2}}{\|\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{(a_{k_1} - a_{k_2})} \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_2}\|_1}; \quad (k_1, k_2 = \text{DR, LS, SV}) \quad (\text{III.7.b})$$

con ϕ_g^2 como en la Ec. (III.6.b).

Tabla III.1. Expresiones finales para el numerador del segundo término de la Ec. (III.7.b), cuando el cromatograma k_1 se estima a partir del cromatograma k_2 .

k_1	k_2	$\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{(a_{k_1} - a_{k_2})} \mathbf{G}^{[-1]}$
LS	DR	$\mathbf{G} [\mathbf{M}^c] \mathbf{G}^{[-1]}$
SV	DR	$\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^\alpha \mathbf{G}^{[-1]}$
LS	SV	$\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{(1-\alpha)} \mathbf{G}^{[-1]}$
DR	LS	$\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{-1} \mathbf{G}^{[-1]}$
DR	SV	$\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{-\alpha} \mathbf{G}^{[-1]}$
SV	LS	$\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{(\alpha-1)} \mathbf{G}^{[-1]}$

Para todas las posibles combinaciones de sensores DR, LS, y SV, la Tabla III.1. presenta las expresiones resultantes para $\mathbf{G} [\mathbf{M}^c]^{(a_{k_1}-a_{k_2})} \mathbf{G}^{-1}$ en la Ec. (III.7.b). Es de notar que para sensores SV, se requiere conocer además la pendiente α de MHS [ver Tabla III.1.]. Además, el producto $\mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{k_2}$ en la Ec. (III.7.b) es una estimación intermedia de $\mathbf{s}_{k_2}^c$, durante el proceso de optimización.

III.2.b. Estimación de la Función de E.I. EMG

Se asume que $g(V)$ está representada por una EMG de primer orden [Ec. (AI.2.a)], con volumen medio de $g(V)$, $\bar{V}_{EMG} = 0$. Esta restricción se impone en todas las funciones $g(V)$ individuales, para asegurar que el volumen de retención medio de los cromatogramas corregidos coincida con el volumen de retención medio de los cromatogramas medidos. Para una EMG, dicha condición se satisface automáticamente adoptando $\bar{V}_{EMG} = -\tau$; y en tal caso, $g(V)$ estará dada por la expresión de dos parámetros de la Ec. (AI.2.b). Dado que $g(V)$ es una función suave, el factor de filtro de la Ec. (III.6.b) no se requiere. Así, el problema de minimización de la Ec. (III.7.a) se reduce a la búsqueda de los siguientes dos parámetros:

$$\min_{\{\sigma_{BB}, \tau_{BB}\}} \left(e_{s_{k_1, k_2}} \right) = \min_{\{\sigma_{BB}, \tau_{BB}\}} \left(\mathbf{e}_{s_{k_1, k_2}}^T \mathbf{e}_{s_{k_1, k_2}} \right) \quad (III.8)$$

con $\mathbf{e}_{s_{k_1, k_2}}$ iguales a la Ec. (III.7.b).

III.2.b.i) Criterios para la Selección Inicial de la Función de E.I.

Para resolver las Ecs (III.7) y (III.8), se requieren suposiciones iniciales de la función de E.I. uniforme buscada (o equivalentemente del vector \mathbf{g} y la matriz uniforme \mathbf{G}). Para funciones de E.I. arbitrarias, se propone obtener una \mathbf{g} inicial como sigue: (i) se define un eje discreto de V en el mismo rango de V 's del cromatograma de DR, pero con

un intervalo ΔV más grande (resultando un número reducido de puntos); (ii) se calcula la \mathbf{g} inicial interpolando el cromatograma de DR en el nuevo eje V . Para funciones de E.I. representadas por una EMG, se propone seleccionar un par inicial de parámetros σ_{BB} y τ_{BB} que aproximen groseramente al cromatograma de DR.

Finalmente, se considera un criterio para la selección inicial de las dimensiones n y p de \mathbf{G} . Los cromatogramas medidos contienen m puntos distintos de cero en $[V_1-V_m]$. Como $m = p + n - 1$, muchas combinaciones de n y p satisfacen tal expresión. Se propone el siguiente procedimiento de dos pasos. En el *Paso I*, se adopta $\hat{n}_I = \hat{p}_I \approx m$; y a este efecto se agregan ceros en las colas del cromatograma original, de forma tal que sus m puntos originales se transforman en los puntos $\hat{m}_I = 2m - 1$. Entonces, se aplica el algoritmo de optimización, y se obtienen las estimaciones intermedias de $g(V)$ y $s_{k_2}^c(V)$, que llamaremos $\hat{g}_I(V)$ y $\hat{s}_{k_2,I}^c(V)$, respectivamente. El rango sobrestimado (\hat{p}_I) de $\hat{s}_{k_2,I}^c(V)$ genera oscilaciones espúreas en las colas de los cromatogramas corregidos. En el *Paso II*, estas oscilaciones son eliminadas reduciendo las dimensiones del problema en $\hat{n} < \hat{n}_I$ y $\hat{p} < \hat{p}_I$. Entonces, se aplica el algoritmo de optimización por segunda vez, para obtener las estimaciones finales $\hat{g}(V)$ y $\hat{s}_{k_2}^c(V)$.

Para evaluar la calidad de las funciones de E.I. estimadas, se define el siguiente error cuadrático medio (escalar):

$$e_g = \frac{(\hat{\mathbf{g}} - \mathbf{g})^T (\hat{\mathbf{g}} - \mathbf{g})}{\mathbf{g}^T \mathbf{g}} \quad (\text{III.9})$$

donde \mathbf{g} es la solución verdadera conocida *a priori*. Claramente, la Ec. (III.9) no puede aplicarse en un experimento real.

III.2.c. Ejemplos Simulados

Los ejemplos “sintéticos” o simulados son útiles para evaluar los procedimientos numéricos, porque las soluciones buscadas son *a priori* conocidas. Salvo las DMMs, se simularon las condiciones experimentales y función de E.I. determinadas por Busnel *et al.* (2001). Las simulaciones tuvieron en cuenta condiciones de temperatura ambiente, tetrahidrofurano (THF) como fase móvil, y una columna de lecho mixto Polymer Lab. (5 μm , 60 cm de longitud). La calibración de masa molar se asumió lineal [Fig. III.1.a)], y dada por (Busnel *et al.*, 2001):

$$\log M^c(V) = 10.562 - 0.4223 V \quad (\text{III.10})$$

La función de E.I. continua se representa por una EMG levemente no uniforme [ver Fig. III.1.a)], cuyos parámetros disminuyen ligeramente a lo largo del volumen del retención según (Busnel *et al.*, 2001):

$$\sigma_{\text{BB}}(V) = 0.165 - 0.002 V \quad (\text{III.11.a})$$

$$\tau_{\text{BB}}(V) = 0.160 - 0.0015 V \quad (\text{III.11.b})$$

Se simuló el análisis de 2 estándares angostos de PS con WCLD conocidas: una distribución de Poisson $w_{\text{P}}(i)$ de menor masa molar con $\bar{M}_{\text{w}} / \bar{M}_{\text{n}} = 1.010$; y una distribución normal-logarítmica $w_{\text{LN}}(i)$ de masa molar más alta con $\bar{M}_{\text{w}} / \bar{M}_{\text{n}} = 1.107$. Sus expresiones analíticas se encuentran en el Apéndice I y los parámetros empleados en la Tabla III.2. Estas distribuciones se muestran en la Fig. III.1.b) en un eje de masa molar logarítmico. Una WCLD de Poisson es la distribución más angosta posible que puede obtenerse a través de un proceso de polimerización aniónica. Es de notar que las masas molares de la distribución de Poisson están en el límite inferior de sensibilidad de los sensores LS o SV. Sin embargo, este problema no se considera aquí, ya que se asumen

sensores ideales perfectos. Se escogió la WCLD normal-logarítmica para emular las polidispersidades típicas de estándares con masas molares alrededor de 200000 g/mol. (Si se hubiera elegido una WCLD de Poisson con $\bar{M}_w \cong 200000$ g/mol, entonces su polidispersidad de alrededor de 1.0005 hubiera sido poco realista desde el punto de vista práctico).

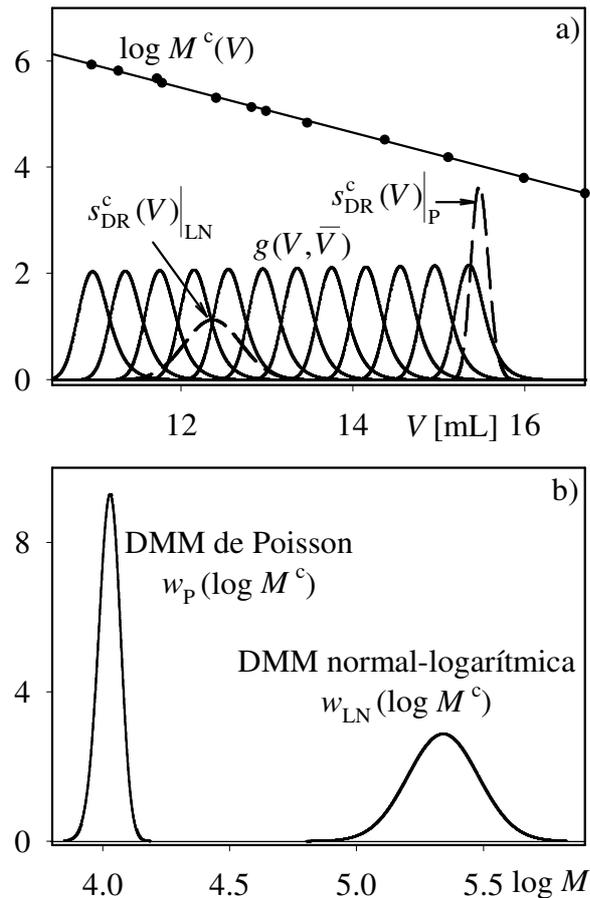


Figura III.1. Ejemplos simulados: datos crudos. (a) Calibración de masa molar, $\log M^c(V)$, función de E.I. no uniforme, $g(V, \bar{V})$, y cromatogramas corregidos de DR, $s_{DR}^c(V)|_{LN}$ y $s_{DR}^c(V)|_P$. (b) DMMs propuestas: distribución normal-logarítmica, $w_{LN}(\log M^c)$, y distribución de Poisson, $w_P(\log M^c)$.

Para cada WCLD simulada, se obtuvieron los cromatogramas de masa

verdaderos (o corregidos) a partir de las DMMs y la calibración lineal, resultando las curvas de trazos $s_{DR}^c(V)|_{LN}$ y $s_{DR}^c(V)|_P$ de la Fig. III.1.a). Todos los cromatogramas son discretos, con intervalos de volumen de retención regulares $\Delta V = 0.02$ mL. Los cromatogramas de LS verdaderos (o corregidos), $s_{LS}^c(V)|_{LN}$ y $s_{LS}^c(V)|_P$, se obtuvieron a partir de los cromatogramas de DR [Ec. (AII.7.a)] adoptando $K_{LS} = 0.02$. La Tabla III.2. muestra el número total de puntos (p) y los rangos de volumen de retención [$V_1^c - V_p^c$] de los cromatogramas corregidos.

Tabla III.2. Simulación de un análisis por SEC: Datos crudos ($\Delta V = 0.02$ mL).

	Normal-logarítmica	Poisson
<i>a) WCLD</i>		
$w(i)$	$(\bar{i} = 2100 \text{ y } \sigma_{LN}^2 = 0.32)$	$(\lambda = 100)$
\bar{M}_n (g/mol) ^(a)	207780	10519
\bar{M}_w (g/mol) ^(a)	230100	10623
\bar{M}_w / \bar{M}_n	1.107	1.010
<i>b) Cromatogramas Corregidos</i>		
p	122	41
$[V_1^c - V_p^c]$ (mL)	[11.22 – 13.64]	[15.10 – 15.90]
<i>c) Función de E.I.: número de puntos y valores límite de los parámetros</i>		
$n (= c+d+1)$	63	63
σ_{BB} (mL)	[0.1377 – 0.1425]	[0.1332 – 0.1348]
τ_{BB} (mL)	[0.1395 – 0.1431]	[0.1362 – 0.1374]
<i>d) Cromatogramas Medidos</i>		
$m = p + n - 1$	184	103
$[V_1 - V_m]$ (mL)	[10.70 – 14.36]	[14.58 – 16.62]

^(a) Masa molar del Estireno: $M_{St} = 104.15$ g/mol.

La Fig. III.2. presenta los cromatogramas corregidos de DR y de LS (en

líneas de trazos). También, la Fig. III.2. muestra la primera y última función de E.I. “efectiva”, colocadas en los primeros y últimos puntos distintos de cero de los cromatogramas corregidos. Cada función $g(V)$ individual exhibe $n = 63$ puntos no-nulos, con $c = 26$ puntos por delante, del punto correspondiente a la media y $d = 36$ puntos por detrás (Tabla III.2.). Es de notar que los volúmenes medios de las funciones $g(V)$ individuales no coinciden con sus máximos.

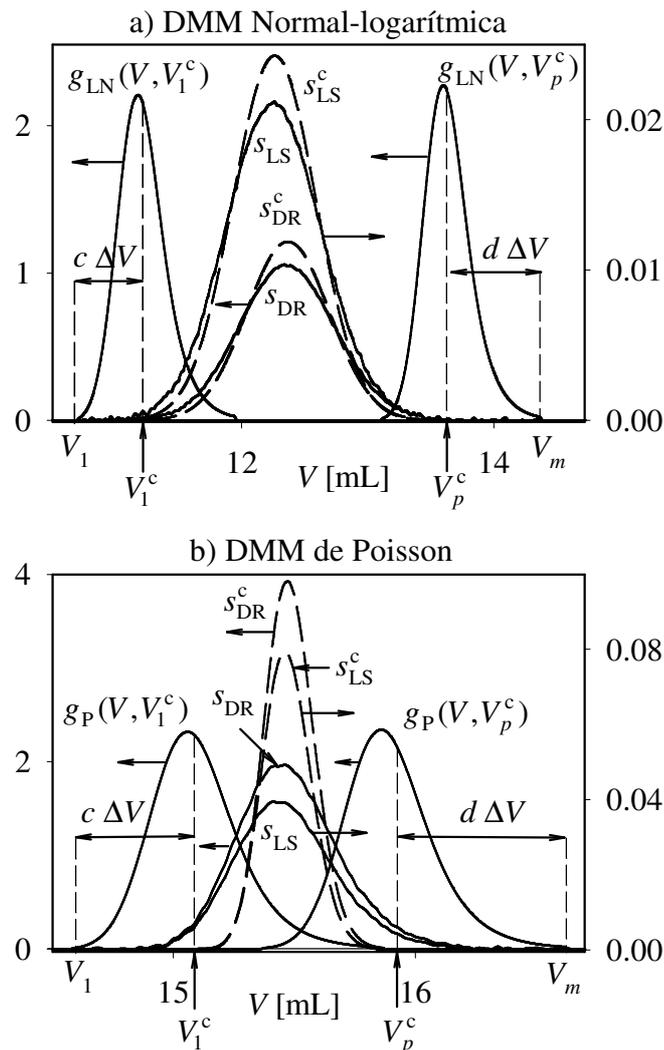


Figura III.2. Ejemplos simulados: datos crudos. (a) Distribución normal-logarítmica. (b) Distribución de Poisson. Funciones de E.I. límites [$g_{LN}(V, V_1^c)$, $g_{LN}(V, V_p^c)$, $g_P(V, V_1^c)$, $g_P(V, V_p^c)$], cromatogramas “medidos” [$s_{DR}(V)$, $s_{LS}(V)$], y cromatogramas corregidos [$s_{DR}^c(V)$, $s_{LS}^c(V)$].

Para cada una de las WCLD analizadas, se construyeron dos matrices \mathbf{G} (no-uniformes) con las Ecs (AIII.1, AI.2.b, y III.11), para cubrir estrictamente los rangos de volumen de retención. A cualquier volumen de retención V_j , la j -ésima columna de \mathbf{G} contiene las ordenadas de la función $g(V)$ particular con $\bar{V} = V_j$. Las columnas de las matrices \mathbf{G} no-uniformes se obtuvieron como sigue: i) a cada V_j , se calcularon los parámetros σ_{BB} y τ_{BB} , con las Ecs (III.11); ii) con $\bar{V} = V_j$, se calcularon las n alturas de cada función $g(V)$ individual con la Ec. (AI.2.b); iii) se colocaron ceros en todas las ordenadas de $g(V_i, \bar{V}_j)$ menores al 1% de su máximo; y iv) se normalizaron los elementos de las columnas, tal que su suma sea igual a 1. Para la distribución normal-logarítmica, se definió una matriz \mathbf{G} (184×122), que cubre el rango de volúmenes de retención 10.70–14.36 mL. Para la distribución de Poisson, se definió una matriz \mathbf{G} (103×41), que cubre el rango de volúmenes de retención 14.58–16.62 mL (Tabla III.2.).

Los cromatogramas libres de ruido se calcularon con las Ecs (AII.7), y luego se les adicionó un ruido Gaussiano con media cero para obtener los cromatogramas “medidos” con ruido, $s_{DR}(V)$ y $s_{LS}(V)$ de la Fig. III.2. En todos los casos, las varianzas del ruido fueron constantes e iguales al 0.25% del máximo de los cromatogramas. El número total de puntos m , y los rangos de volúmenes de retención $[V_1-V_m]$, para los cromatogramas medidos se muestran en la Tabla III.2. Es de notar que los cromatogramas medidos son ligeramente más anchos que cualquier función de E.I. individual.

A continuación, para cada uno de los 2 ejemplos simulados, se considera la estimación de la función de E.I. uniforme.

III.2.c.i) Estimación de la Función de E.I. Uniforme Arbitraria

Los datos básicos son los cromatogramas medidos y la calibración de masa molar. En primer lugar, se considera la aplicación del algoritmo propuesto [Ecs (III.6)],

para el caso de estimaciones de la función de E.I. de forma arbitraria. Para ambas WCLD, se adoptaron los siguientes parámetros: a) $r = 10$ para las operaciones de deconvolución; y b) $\beta = 500$ para el coeficiente de filtrado de la Ec. (III.6.b). Estos valores se obtuvieron tomando una solución de compromiso entre las estimaciones de las funciones de E.I. suaves con altos valores de $e_{s_{LS,DR}}$, y funciones de E.I. oscilatorias con bajos valores de $e_{s_{LS,DR}}$.

Las soluciones finales están en la Tabla III.3. y en la Fig. III.3. La Tabla III.3. muestra las dimensiones de los vectores y los intervalos de volumen de retención, intermedio y final. Para la WCLD normal-logarítmica, las estimaciones de la función de E.I. intermedia y final ($\hat{g}_{I,LN}(V)$ y $\hat{g}_{LN}(V)$, respectivamente) se muestran en la Fig. III.3.a). Para la WCLD de Poisson, las correspondientes estimaciones de la función de E.I. intermedia y final, se muestran en la Fig. III.3.d). Los cromatogramas corregidos correspondientes están en las Figs III.3.b, e). En ambos ejemplos, se observan oscilaciones espúreas en las estimaciones intermedias. Estas oscilaciones se eliminaron en el *Paso II*, al reducir las dimensiones de \hat{n}_I y \hat{p}_I (ver Tabla III.3.). En ambos ejemplos, las estimaciones finales de la función de E.I. son ligeramente oscilatorias y exhiben $\hat{n} = 95$ puntos no-nulos (algo superior al valor real $n = 63$). Sin embargo, las estimaciones finales son bastante aceptables, y la distribución normal-logarítmica presenta resultados ligeramente mejores. La función de E.I. verdadera es ligeramente no-uniforme en los rangos angostos de los cromatogramas y si bien las funciones de E.I. estimadas son uniformes, se aproximan bastante a la función de E.I. verdadera. Por esta razón, $\hat{g}_{LN}(V)$ es similar a las funciones de E.I. verdaderas inicial y final $g_{LN}(V, V_1^c)$ y $g_{LN}(V, V_p^c)$ (Fig. III.3.a); y en forma equivalente, $\hat{g}_P(V)$ está cerca de $g_P(V, V_1^c)$ y $g_P(V, V_p^c)$ (Fig. III.3.d).

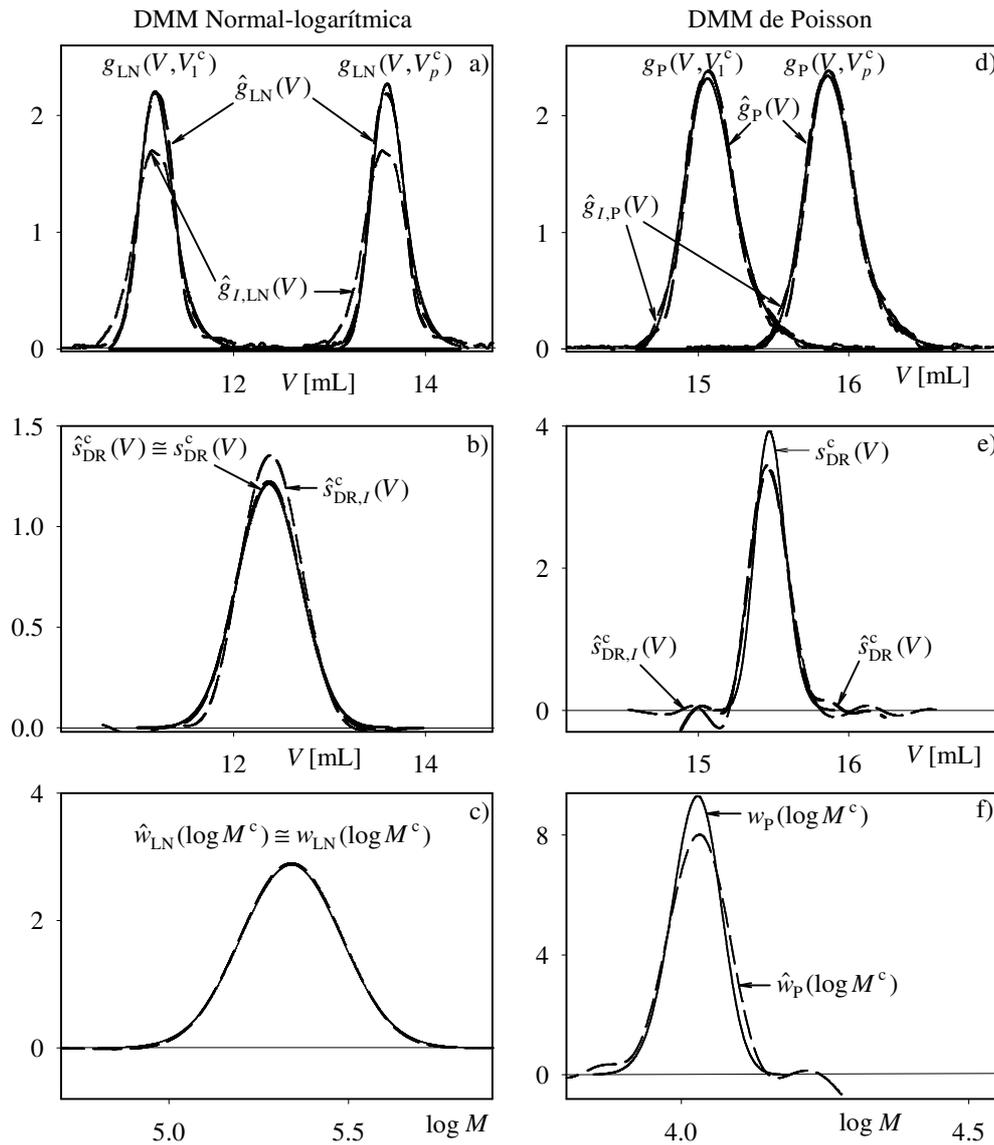


Figura III.3. Ejemplos simulados: estimaciones cuando se asumen funciones de E.I. arbitrarias. (a-c) DMM normal-logarítmica. (d-f) DMM de Poisson. (a,d) funciones de E.I. estimadas después del *Paso I* (curvas de trazos finos), y luego del *Paso II* (curvas de trazos gruesos). Las funciones de E.I. límite “verdaderas” se muestran en trazo continuo. (b,e) cromatogramas corregidos verdadero y estimado después de los *Pasos I* y *II*. (c,f) DMMs verdadera y estimada.

Tabla III.3. Ejemplos Simulados: ajustes intermedios y resultados finales.

	WCLD Normal- logarítmica ^(a)	WCLD de Poisson ^(b)
<i>a) Dimensiones y rangos de la función de E.I. y los cromatogramas medidos estimados</i>		
<i>Paso I:</i>		
$\hat{n}_I = \hat{p}_I = m$	184	103
$\hat{m}_I = 2m - 1$	367	205
$[V_1 - V_m]_I$ (mL)	[8.88-16.20]	[13.56-17.64]
<i>Paso II:</i>		
\hat{m} (= $\hat{n} + \hat{p} - 1$)	244 (= 95+150-1)	163 (= 95+69-1)
$[V_1 - V_m]$ (mL)	[10.10-14.96]	[13.98-17.22]
<i>b) Funciones de E.I. estimadas e índices de performance</i>		
<i>Función de E.I. arbitraria:</i>	$\hat{g}_{LN}(V)$ [Fig. III.3.a)]	$\hat{g}_P(V)$ [Fig. III.3.d)]
e_g ($\times 10^3$)	0.43	0.57
<i>Función de E.I. EMG:</i>	$\hat{g}_{LN}(V)$ [Fig. III.4.a)]	$\hat{g}_P(V)$ [Fig. III.4.b)]
$\hat{\sigma}_{BB}$ (mL)	0.143	0.137
$\hat{\tau}_{BB}$ (mL)	0.136	0.133
e_g ($\times 10^3$)	0.19	0.13
<i>c) Estimaciones de las medias de las DMMs</i>		
<i>Función de E.I. arbitraria:</i>		
\hat{M}_n (g/mol)	210120	10540
\hat{M}_w (g/mol)	230050	10610
\hat{M}_w / \hat{M}_n	1.095	1.007
<i>Función de E.I. EMG:</i>		
\hat{M}_n (g/mol)	209020	10510
\hat{M}_w (g/mol)	230990	10620
\hat{M}_w / \hat{M}_n	1.105	1.010

^(a) Ver Fig. III.3.a-c); ^(b) Ver Fig. III.3.d-f)

Finalmente, se considera la recuperación de las DMMs originales a partir de las funciones de E.I. uniformes estimadas, de los cromatogramas de concentración, y de la calibración de masa molar. El procedimiento fue el siguiente: (i) calcular el cromatograma

corregido de masa a través de las Ecs (III.1, 2), por deconvolución de los cromatogramas de masa medidos; y (ii) combinar los cromatogramas de masa corregidos y la calibración de masa molar para obtener las DMMs estimadas $\hat{w}_{LN}(\log M^c)$ y $\hat{w}_P(\log M^c)$. Los resultados se muestran en las Figs III.3.c,f). Para la DMM normal-logarítmica (más ancha), la estimación es bastante aceptable. Para la distribución de Poisson (más angosta), la DMM estimada es más oscilatoria, debido a la peor naturaleza de la operación de deconvolución. La Tabla III.3. muestra las masas molares medias y polidispersidades estimadas.

III.2.c.ii) Estimación de la Función de E.I. Uniforme Mediante una EMG

En este caso se esperan mejores resultados que en el punto anterior, porque:

a) la función de E.I. verdadera se definió originalmente como una EMG (ligeramente no-uniforme); y b) en cada ejemplo numérico, el algoritmo necesita estimar sólo 2 parámetros constantes: σ_{BB} y τ_{BB} (en lugar de $n = 95$ incógnitas). Para las estimaciones intermedias y finales, se adoptaron los mismos valores de los intervalos de volumen de retención, las dimensiones \hat{n} , \hat{p} , y \hat{m} , y el parámetro r , a los previamente descriptos para los casos de funciones de E.I. arbitrarias (sección superior de la Tabla III.3.).

Las funciones de E.I. estimadas se muestran en la Fig. III.4., y los resultados globales en la segunda sección de la Tabla III.3. Como se esperaba, los resultados son mejores que los anteriores, y los errores medios e_g son algo menores que para los casos de funciones de E.I. arbitrarias. Aunque no se muestra, las estimaciones intermedias de los cromatogramas de los *Pasos I* y *II* también resultaron versiones mejoradas del caso arbitrario. Comparado con los parámetros verdaderos de la EMG de la Tabla III. 2., los parámetros estimados de la EMG se encuentran por fuera de los límites superior o inferior de los valores verdaderos, resultando $\hat{\sigma}_{BB}$ levemente superior y $\hat{\tau}_{BB}$ levemente inferior.

También, los parámetros estimados σ_{BB} y τ_{BB} disminuyen levemente para masas molares decrecientes [$\hat{\sigma}_{BB}$ y $\hat{\tau}_{BB}$ son mayores para la distribución normal-logarítmica (mayor masa molar que para la distribución de Poisson (menor masa molar)]. La parte inferior de la Tabla III.3. muestra las masas molares medias y polidispersidades estimadas. En general, todas las estimaciones concuerdan con los valores verdaderos presentados en la Tabla III.2. Nuevamente, los promedios se estimaron ligeramente mejor con la función de E.I. supuesta como EMG. Esto es razonable, ya que las DMMs se estimaron a partir de las funciones de E.I. estimadas como EMG que resultaron mejores que las funciones de E.I. arbitrarias.

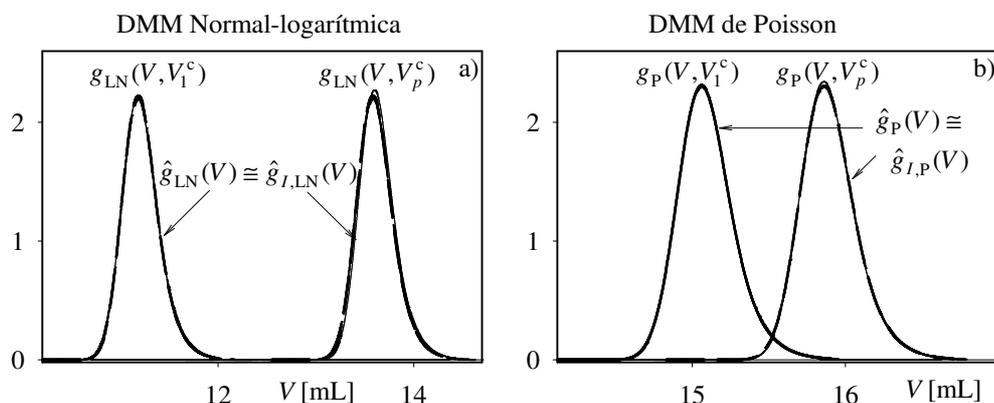


Figura III.4. Ejemplos simulados: estimaciones cuando se asumen funciones de E.I. representadas por EMG. (a) DMM normal-logarítmica. (b) DMM de Poisson. Funciones de E.I. estimadas después del *Paso I* (curvas de trazos finos), y después del *Paso II* (curvas de trazos gruesos). Las funciones de E.I. límite “verdaderas” se muestran en trazo continuo.

III.2.c.iii) Chequeos de Robustez del Método Propuesto

Los ejemplos presentados fueron simulados asumiendo distintas condiciones y combinaciones de detectores. Los resultados se resumen en la Tabla III.4. En el Caso I, se aumentaron las varianzas del ruido aditivo que contamina a los cromatogramas medidos desde 0.25% a 2.5% del máximo de los cromatogramas. A pesar de este cambio, las

funciones de E.I. estimadas sólo se deterioraron ligeramente, como puede verse en los valores resultantes de e_g y en los parámetros de las EMG estimadas.

En el Caso II, se introdujeron errores de $\pm 5\%$ en la pendiente de la calibración, $\log M^c(V)$. De nuevo, sólo se observaron desviaciones despreciables en las funciones de E.I. estimadas. Cuando a la $\log M^c(V)$ se la rota en el sentido de las agujas del reloj, las estimaciones de la función de E.I. y de las DMMs resultan más anchas que las reales; y lo contrario ocurre para rotaciones en el sentido contrario a las agujas del reloj.

En el Caso III, el detector de LS se cambió por un detector de SV ideal con la pendiente de MHS $\alpha = 0.712$ (correspondiente a PS en THF a 25 C) (Haney *et al.*, 1987). En este caso, variaciones de $\pm 5\%$ en el valor de α produjeron desviaciones despreciables en las funciones de E.I. estimadas. Mientras las variaciones positivas produjeron funciones de E.I. estimadas más anchas que las reales, lo contrario ocurrió para las variaciones negativas. Así, los errores en α son cualitativamente equivalentes a los errores en la pendiente de la calibración lineal.

En el Caso IV, se simularon errores en el IDV, observándose una sensibilidad muy alta. Así, al correr los cromatogramas de LS en sólo 0.02 mL (es decir, el intervalo de discretización adoptado), se produjeron errores inaceptablemente grandes (Tabla III.4.). Las funciones de E.I. estimadas fueron más angostas que la real cuando los cromatogramas de LS se cambiaron hacia volúmenes de retención más bajos; y mucho más anchas que la real cuando el corrimiento se realizó en la dirección opuesta.

Tabla III.4. Ejemplos simulados: Chequeos de robustez

Caso N°	WCLD Normal-logarítmica		WCLD de Poisson	
	Función de E.I.		Función de E.I.	
	Arbitraria	EMG	Arbitraria	EMG
<i>I) Varianzas del ruido de medición: 2.5% del máximo de los cromatogramas</i>				
$e_g (\times 10^3)$	6.2	0.87	2.8	1.1
$\hat{\sigma}_{BB}$ (mL)	-	0.140	-	0.143
$\hat{\tau}_{BB}$ (mL)	-	0.132	-	0.127
<i>II) Cambios del $\pm 5\%$ en la pendiente de la calibración de masa molar</i>				
$e_g (\times 10^3)^{(a)}$	6.5 / 5.6	4.2 / 7.5	1.5 / 0.68	0.32 / 0.15
$\hat{\sigma}_{BB}$ (mL) ^(a)	-	0.156 / 0.128	-	0.139 / 0.136
$\hat{\tau}_{BB}$ (mL) ^(a)	-	0.143 / 0.128	-	0.132 / 0.132
<i>III) Sensor SV con cambios en la pendiente α de MHS, del $\pm 5\%$</i>				
$e_g (\times 10^3)^{(a)}$	3.9 / 3.9	4.2 / 7.8	3.5 / 8.0	0.47 / 0.53
$\hat{\sigma}_{BB}$ (mL) ^(a)	-	0.156 / 0.133	-	0.140 / 0.138
$\hat{\tau}_{BB}$ (mL) ^(a)	-	0.143 / 0.121	-	0.131 / 0.128
<i>IV) Cambios en el IDV de ± 0.02 mL</i>				
$e_g (\times 10^3)^{(a)}$	117 / 62	190 / 43	365 / 71	422 / 49
$\hat{\sigma}_{BB}$ (mL) ^(a)	-	0.091 / 0.191	-	0.041 / 0.195
$\hat{\tau}_{BB}$ (mL) ^(a)	-	0.089 / 0.163	-	0.118 / 0.140

^(a) El primer valor corresponde a cambios positivos, y el segundo valor a cambios negativos.

Finalmente, se simularon WCLDs más anchas y más angostas. Una WCLD de Schulz-Flory (bastante más ancha) con $\bar{M}_n = 42800$ g/mol y $\bar{M}_w / \bar{M}_n \cong 2$, produjo errores altos en las funciones de E.I. estimadas, con $e_g = 34.2 \times 10^{-3}$ para funciones de E.I. arbitrarias, y con $e_g = 19.6 \times 10^{-3}$ para las EMG. La razón es que el E.I. afecta en forma despreciable a una DMM ancha, y por consiguiente puede recuperarse escasa información sobre la función de E.I. de los cromatogramas correspondientes. De forma similar, el

algoritmo no brindó buenos resultados para una WCLD de Poisson angosta con $\lambda = 500$ y $\overline{M}_w / \overline{M}_n \cong 1.002$. En este caso, las pequeñas diferencias entre los cromatogramas de DR y de LS fueron tapadas por el ruido de medición. Después de una serie de simulaciones que involucran WCLD normal-logarítmica y de Poisson con diferentes medias y ruidos, el procedimiento demostró ser eficaz para muestras con polidispersidades en el rango de 1.005–1.50.

III.3. Extensión del Método de Estimación de la Función de E.I. al caso de Triple Detección

La triple detección en SEC (algunas veces denominada SEC³) se refiere a la utilización de tres detectores en línea, LS + SV + DR. En esta metodología no se necesita, en principio, conocer ninguna calibración de masa molar, directa y/o universal, aunque sí se requiere la pendiente de MHS, α para el polímero analizado en las condiciones de trabajo (temperatura, solvente). A continuación, se extiende el método de estimación de la función de E.I. de la Sección III.2. al caso de triple detección, donde las hipótesis del modelo de medición son las mismas y los datos necesarios son las señales crudas de los sensores y la constante α de MHS.

La calibración directa, $M^c(V)$, puede estimarse a partir de la combinación de señales de dos sensores [Ec.(AII.5)]. Por ejemplo, con los sensores SV y DR, la forma matricial de $M^c(V)$ resulta:

$$(\mathbf{M}^c)^\alpha \propto [\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]}\mathbf{s}_{\text{DR}})]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]}\mathbf{s}_{\text{SV}}) \quad (\text{III.12})$$

donde $\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]}\mathbf{s}_{\text{DR}})$ y $\text{diag}[\mathbf{G}^{[-1]}\mathbf{s}_{\text{SV}}]$ representan matrices diagonales ($p \times p$) de los vectores correspondientes a los cromatogramas corregidos, $s_{\text{DR}}^c(V)$ y $s_{\text{SV}}^c(V)$, respectivamente [ver Ec. (III.1)]. La matriz diagonal \mathbf{M}^c contiene las ordenadas de la calibración de masas

molares. Luego el cromatograma de masa molar, $s_{LS}(V)$, puede estimarse a partir de la Ecs (III.3) y (III.12), como:

$$\hat{s}_{LS, [DR, SV]} = K_{LS} \mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{DR}) \right]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{SV}) \right\}^{1/\alpha} \mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{DR} \quad (\text{III.13})$$

donde $\hat{s}_{LS, [DR, SV]}$ representa al cromatograma de LS estimado a partir de las señales medidas de DR y SV. El vector normalizado de errores entre los cromatogramas de LS medido y estimado se obtiene como:

$$\mathbf{e}_{s_{LS, [DR, SV]}} = \frac{\mathbf{s}_{LS}}{\|\mathbf{s}_{LS}\|_1} - \frac{\mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{DR}) \right]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{SV}) \right\}^{1/\alpha} \mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{DR}}{\left\| \mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{DR}) \right]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{SV}) \right\}^{1/\alpha} \mathbf{G}^{-1} \mathbf{s}_{DR} \right\|_1} \quad (\text{III.14})$$

Finalmente, \mathbf{g} se obtiene a través del siguiente proceso de minimización, equivalente a las Ecs (III.6):

$$\min_{\mathbf{g}} (e_{s_{LS, [DR, SV]}}) = \min_{\mathbf{g}} \left(\mathbf{e}_{s_{LS, [DR, SV]}}^T \mathbf{e}_{s_{LS, [DR, SV]}} + \phi_g^2 \right) \quad (\text{III.15})$$

donde ϕ_g^2 es el mismo término de regularización que el de la Ec. (III.6.b).

En resumen, el procedimiento propuesto para estimar la función de E.I. está basado en estimar la calibración directa [Ec. (III.12)] y uno de los cromatogramas [$s_{LS}(V)$, Ec.(III.13)] a partir del conocimiento de los otros dos [$s_{DR}(V)$, $s_{SV}(V)$]. La implementación efectiva del método es a través de la solución de las Ecs (III.14) y (III.15). La Ec. (III.14) incluye implícitamente a la calibración \mathbf{M}^c de la Ec. (III.12).

Las Ecs (III.12) y (III.13) pueden generalizarse para cualquier trío de detectores genéricos $\{k_1, k_2, k_3\}$, como sigue:

$$\left[M^c(V) \right]^{(a_{k_3}-a_{k_2})} \propto \frac{s_{k_3}^c(V)}{s_{k_2}^c(V)} \quad (\text{III.16.a})$$

$$\left[M^c \right]^{(a_{k_3}-a_{k_2})} \propto \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_2}) \right]^1 \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_3}) \quad (\text{III.16.b})$$

$$\hat{\mathbf{s}}_{k_1, [k_2, k_3]} = \mathbf{K}_{k_1} \mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_2}) \right]^1 \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_3}) \right\}^{(a_{k_1}-a_{k_2})/(a_{k_3}-a_{k_2})} \mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_2}; \quad (\text{III.16.c})$$

($k_1, k_2, k_3 = \text{DR, LS, SV}$)

Luego, las Ecs (III.14, 15) para $\{k_1, k_2, k_3\}$ pueden generalizarse como:

$$\min_{\mathbf{g}} \left(e_{\mathbf{s}_{k_1, [k_2, k_3]}} \right) = \min_{\mathbf{g}} \left(\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k_1, [k_2, k_3]}}^T \mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k_1, [k_2, k_3]}} + \phi_g^2 \right); \quad (k_1, k_2, k_3 = \text{DR, LS, SV}) \quad (\text{III.17.a})$$

con:

$$\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k_1, [k_2, k_3]}} = \frac{\mathbf{s}_{k_1}}{\|\mathbf{s}_{k_1}\|_1} - \frac{\mathbf{G}_{k_1, [k_2, k_3]}^* \mathbf{s}_{k_2}}{\|\mathbf{G}_{k_1, [k_2, k_3]}^* \mathbf{s}_{k_2}\|_1}; \quad (k_1, k_2, k_3 = \text{DR, LS, SV}) \quad (\text{III.17.b})$$

donde:

$$\mathbf{G}_{k_1, [k_2, k_3]}^* = \mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_2}) \right]^1 \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_3}) \right\}^{(a_{k_1}-a_{k_2})/(a_{k_3}-a_{k_2})} \mathbf{G}^{[-1]}; \quad (\text{III.17.c})$$

($k_1, k_2, k_3 = \text{DR, LS, SV}$)

Para todas las posibles combinaciones de sensores DR, LS, y SV, la Tabla III.5. presenta las expresiones resultantes para $\mathbf{G}_{k_1, [k_2, k_3]}^*$ en las Ecs (III.17). Es de notar que los productos $\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_2}$ y $\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_3}$ en las Ecs (III.17.c) corresponden a las estimaciones de $\mathbf{s}_{k_2}^c$ y $\mathbf{s}_{k_3}^c$, respectivamente.

Si ahora se asume que $g(V)$ está representada por una EMG como se definió anteriormente, el problema de minimización de la Ec. (III.17.a) se reduce a la búsqueda de dos parámetros resultando una expresión equivalente a la Ec. (III.8), para el caso de triple

detección:

$$\min_{\{\sigma_{BB}, \tau_{BB}\}} \left(e_{\mathbf{s}_{k_1, [k_2, k_3]}} \right) = \min_{\{\sigma_{BB}, \tau_{BB}\}} \left(\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k_1, [k_2, k_3]}}^T \mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k_1, [k_2, k_3]}} \right) \quad (\text{III.18})$$

con $\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k_1, [k_2, k_3]}}$ dados por la Ec. (III.17.b).

Tabla III.5. Expresiones finales para $\mathbf{G}_{k_1, [k_2, k_3]}^*$ de la Ecs (III.17.b, c), cuando el cromatograma k_1 se estima a partir del cromatograma k_2, k_3 .

k_1	k_2	k_3	$\mathbf{G}_{k_1, [k_2, k_3]}^*$
DR	LS	SV	$\mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{LS}) \right]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{SV}) \right\}^{1/(1-\alpha)} \mathbf{G}^{[-1]}$
DR	SV	LS	$\mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{SV}) \right]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{LS}) \right\}^{\alpha/(1-\alpha)} \mathbf{G}^{[-1]}$
LS	DR	SV	$\mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{DR}) \right]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{SV}) \right\}^{1/\alpha} \mathbf{G}^{[-1]}$
LS	SV	DR	$\mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{SV}) \right]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{DR}) \right\}^{(\alpha-1)/\alpha} \mathbf{G}^{[-1]}$
SV	DR	LS	$\mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{DR}) \right]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{LS}) \right\}^{\alpha} \mathbf{G}^{[-1]}$
SV	LS	DR	$\mathbf{G} \left\{ \left[\text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{LS}) \right]^{-1} \text{diag}(\mathbf{G}^{[-1]} \mathbf{s}_{DR}) \right\}^{(1-\alpha)} \mathbf{G}^{[-1]}$

En los procedimientos asociados al tratamiento de datos de triple detección no se requiere conocer la calibración directa, como en el caso de la doble detección. Sin embargo, presentan como desventaja la necesidad de realizar dos inversiones numéricas para estimar las señales corregidas correspondientes a las dos señales medidas [Ec. (III.16.c)]. Alternativamente, si se conociera $M^c(V)$ determinada en forma independiente, podría reemplazarse en la Ec. (III.16.c). En tal caso, los resultados obtenidos podrían

utilizarse para verificar la solución resultante del método propuesto. Además, si se conociera $M^c(V)$, también podría utilizarse la Ec. (III.16.c) para estimar α . Estos procedimientos no fueron implementados aún, y se los plantea como potenciales trabajos futuros.

III.4. Corrección por E.I. en MD-SEC de Polímeros Simples, sin Conocimiento Explícito de la Función de E.I.

En esta sección se propone un método para corregir por E.I. un cromatograma medido sin conocer explícitamente la función de E.I., cuando se cuenta con detección DR + LS; o DR + SV. Los datos necesarios son los cromatogramas medidos, la calibración de masa molar y la constante α de MHS (en el caso de detección DR + SV).

Antes de describir el procedimiento de corrección, se realizan algunas definiciones. La matriz diagonal de un vector \mathbf{v} ($= [v(1), v(2), \dots, v(n)]^T$) se define según:

$$\text{diag}(\mathbf{v}) = \begin{bmatrix} v(1) & 0 & \dots & 0 \\ 0 & v(2) & \ddots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \ddots & 0 \\ 0 & 0 & \dots & v(n) \end{bmatrix} \quad (\text{III.19.a})$$

y la matriz de convolución de \mathbf{v} es:

$$\text{conv}(\mathbf{v}) = \begin{bmatrix} v(1) & 0 & 0 & \dots & 0 \\ v(2) & v(1) & 0 & \ddots & \vdots \\ \vdots & v(2) & v(1) & \ddots & \vdots \\ \vdots & \vdots & v(2) & \ddots & 0 \\ v(n) & \vdots & \vdots & \ddots & v(1) \\ 0 & v(n) & \vdots & \ddots & v(2) \\ \vdots & 0 & v(n) & \ddots & \vdots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & v(n) \end{bmatrix} \quad (\text{III.19.b})$$

donde el número de columnas puede elegirse arbitrariamente. El producto de convolución de dos vectores ($\mathbf{x} * \mathbf{y}$) resulta:

$$\mathbf{x} * \mathbf{y} = \text{conv}(\mathbf{x}) \mathbf{y} = \text{conv}(\mathbf{y}) \mathbf{x} = \mathbf{y} * \mathbf{x} \quad (\text{III.19.c})$$

donde el número de columnas de $\text{conv}(\mathbf{x})$ es igual a la dimensión de \mathbf{y} ; y el número de columnas de $\text{conv}(\mathbf{y})$ es igual a la dimensión de \mathbf{x} .

La Ec. (AII.7.b) puede reescribirse como:

$$\mathbf{s}_{\text{DR}} = \mathbf{g} * \mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}} = \text{conv}(\mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}}) \mathbf{g} \quad (\text{III.20.a})$$

De esta forma $\text{conv}(\mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}})$ resulta una matriz de dimensión $(m \times n)$, donde cada columna contiene los p elementos de $\mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}}$ desplazados un lugar hacia abajo con respecto a la columna precedente [Ec. (III.19.b)]. Luego el cromatograma para \mathbf{s}_{LS} , puede escribirse como:

$$\mathbf{s}_{\text{LS}} = \mathbf{g} * \mathbf{s}_{\text{LS}}^{\text{c}} = \mathbf{K}_{\text{LS}} \mathbf{g} * (\mathbf{M}^{\text{c}} \mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}}) = \mathbf{K}_{\text{LS}} \text{conv}(\mathbf{M}^{\text{c}} \mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}}) \mathbf{g} \quad (\text{III.20.b})$$

Similarmente, $\text{conv}(\mathbf{M}^{\text{c}} \mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}})$ también es una matriz de dimensión $(m \times n)$, donde cada columna contiene los p elementos de $\mathbf{s}_{\text{LS}}^{\text{c}} = \mathbf{M}^{\text{c}} \mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}}$ desplazados un lugar hacia abajo con respecto a la columna precedente [Ec. (III.19.b)].

A partir de la Ec. (III.20.a) puede estimarse \mathbf{g} por la inversión de la matriz $\text{conv}(\mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}})$, como sigue:

$$\hat{\mathbf{g}} = \{\text{conv}(\mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}})\}^{[-1]} \mathbf{s}_{\text{DR}} \quad (\text{III.21})$$

donde $\{\text{conv}(\mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}})\}^{[-1]}$ es una matriz de dimensión $(n \times m)$ que representa una pseudo-inversa regularizada de $\text{conv}(\mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}})$. Claramente, la Ec. (III.21) es una estimación ficticia de \mathbf{g} , por cuanto $\mathbf{s}_{\text{DR}}^{\text{c}}$ es un cromatograma desconocido.

A partir de las Ecs (III.20.b) y (III.21), una estimación del cromatograma de LS, $\hat{\mathbf{s}}_{\text{LS,DR}}$, calculado a partir del cromatograma de DR medido, resulta:

$$\hat{\mathbf{s}}_{\text{LS,DR}} = \mathbf{K}_{\text{LS}} \text{conv}(\mathbf{M}^c \mathbf{s}_{\text{DR}}^c) \{ \text{conv}(\mathbf{s}_{\text{DR}}^c) \}^{[-1]} \mathbf{s}_{\text{DR}} \quad (\text{III.22})$$

El vector normalizado de errores entre los cromatogramas de LS medido y estimado resulta:

$$\mathbf{e}_{\text{s}_{\text{LS,DR}}} = \frac{\mathbf{s}_{\text{LS}}}{\|\mathbf{s}_{\text{LS}}\|_1} - \frac{\text{conv}(\mathbf{M}^c \mathbf{s}_{\text{DR}}^c) \{ \text{conv}(\mathbf{s}_{\text{DR}}^c) \}^{[-1]} \mathbf{s}_{\text{DR}}}{\|\text{conv}(\mathbf{M}^c \mathbf{s}_{\text{DR}}^c) \{ \text{conv}(\mathbf{s}_{\text{DR}}^c) \}^{[-1]} \mathbf{s}_{\text{DR}}\|_1} \quad (\text{III.23})$$

La Ec. (III.23) representa m ecuaciones algebraicas con p ($< m$) incógnitas, que son las ordenadas de \mathbf{s}_{DR}^c . Finalmente, \mathbf{s}_{DR}^c se obtiene resolviendo el siguiente problema de minimización:

$$\min_{\{\mathbf{s}_{\text{DR}}^c\}} (e_{\text{s}_{\text{LS,DR}}}) = \min_{\{\mathbf{s}_{\text{DR}}^c\}} (\mathbf{e}_{\text{s}_{\text{LS,DR}}}^T \mathbf{e}_{\text{s}_{\text{LS,DR}}} + \phi_{\mathbf{s}_{\text{DR}}^c}^2) \quad (\text{III.24})$$

donde $\phi_{\mathbf{s}_{\text{DR}}^c}^2$ es un término de filtrado similar al de la Ec. (III.6.b) que se introduce para imponer alguna correlación entre puntos consecutivos de \mathbf{s}_{DR}^c y reducir sus oscilaciones.

En resumen, el procedimiento propuesto para corregir por E.I. está basado en resolver las Ecs (III.23) y (III.24). Estas expresiones pueden generalizarse para cualquier par de detectores genéricos $\{k_1, k_2\}$, como sigue:

$$\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k_1, k_2}} = \frac{\mathbf{s}_{k_1}}{\|\mathbf{s}_{k_1}\|_1} - \frac{\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c)^{(a_{k_1} - a_{k_2})} \mathbf{s}_{k_2}^c \right] \{ \text{conv}(\mathbf{s}_{k_2}^c) \}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_2}}{\|\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c)^{(a_{k_1} - a_{k_2})} \mathbf{s}_{k_2}^c \right] \{ \text{conv}(\mathbf{s}_{k_2}^c) \}^{[-1]} \mathbf{s}_{k_2}\|_1}; \quad (\text{III.25.a})$$

$$(k_1, k_2 = \text{DR, LS, SV})$$

y:

$$\min_{\mathbf{s}_{k_2}^c} (e_{\mathbf{s}_{k_1, k_2}}) = \min_{\mathbf{s}_{k_2}^c} (\mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k_1, k_2}}^T \mathbf{e}_{\mathbf{s}_{k_1, k_2}} + \phi_{\mathbf{s}_{k_2}^c}^2) \quad (\text{III.25.b})$$

con $\phi_{\mathbf{s}_{k_2}^c}^2$ como en la Ec. (III.6.b). Para todas las posibles combinaciones de sensores DR,

LS, y SV, la Tabla III.6. presenta las expresiones resultantes para $\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c)^{(a_{k_1} - a_{k_2})} \mathbf{s}_{k_2}^c \right] \left\{ \text{conv} (\mathbf{s}_{k_2}^c) \right\}^{-1}$ en la Ec. (III.25.a). Es de notar que para sensores SV, se requiere conocer además la pendiente α de MHS [ver Tabla III.6.]. Además, el producto $\left\{ \text{conv} (\mathbf{s}_{k_2}^c) \right\}^{-1} \mathbf{s}_{k_2}$ en la Ec. (III.25.a) es una estimación intermedia de \mathbf{g} , durante el proceso de optimización.

Las Ecs (III.25) se resuelven numéricamente con un procedimiento similar al utilizado para resolver las Ecs (III.5) y (III.6). A su vez, dichas ecuaciones pueden extenderse al caso en que se disponga de una calibración universal en lugar de la calibración directa. En tal caso, en la Ec. (III.25.a) se reemplaza \mathbf{M}^c por $(\mathbf{J}^c)^{1/(\alpha+1)}/K$, como se deriva de la Ec.(I.37).

Tabla III.6. Numerador del segundo término de la Ec. (III.25.a), cuando el cromatograma k_1 se estima a partir del cromatograma k_2 .

k_1	k_2	$\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c)^{(a_{k_1} - a_{k_2})} \mathbf{s}_{k_2}^c \right] \left\{ \text{conv} (\mathbf{s}_{k_2}^c) \right\}^{-1}$
LS	DR	$\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c) \mathbf{s}_{\text{DR}}^c \right] \left\{ \text{conv} (\mathbf{s}_{\text{DR}}^c) \right\}^{-1}$
SV	DR	$\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c)^\alpha \mathbf{s}_{\text{DR}}^c \right] \left\{ \text{conv} (\mathbf{s}_{\text{DR}}^c) \right\}^{-1}$
LS	SV	$\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c)^{(1-\alpha)} \mathbf{s}_{\text{SV}}^c \right] \left\{ \text{conv} (\mathbf{s}_{\text{SV}}^c) \right\}^{-1}$
DR	LS	$\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c)^{-1} \mathbf{s}_{\text{LS}}^c \right] \left\{ \text{conv} (\mathbf{s}_{\text{LS}}^c) \right\}^{-1}$
DR	SV	$\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c)^{-\alpha} \mathbf{s}_{\text{SV}}^c \right] \left\{ \text{conv} (\mathbf{s}_{\text{SV}}^c) \right\}^{-1}$
SV	LS	$\text{conv} \left[(\mathbf{M}^c)^{(\alpha-1)} \mathbf{s}_{\text{LS}}^c \right] \left\{ \text{conv} (\mathbf{s}_{\text{LS}}^c) \right\}^{-1}$

III.4.a. Ejemplos de Simulación

A continuación se presentan ejemplos simulados para detección DR + LS, y DR + SV. Los cromatogramas corregidos corresponden a una WCLD normal-logarítmica

igual a la simulada en el ejemplo de la sección III.2.c. [Tabla III.2.]. La calibración de masas molares, las constantes de los detectores, los rangos de volumen de los cromatogramas y las dimensiones de los vectores son los indicados en la Tabla III.2. Los cromatogramas medidos fueron simulados con las Ecs (III.20). Las ordenadas del vector \mathbf{g} se asumieron provenientes de una EMG uniforme, con $n = 63$, $\sigma = 0.13$ mL y $\tau = 0.14$ mL. Para resolver la Ec. (III.25.b), se requieren valores iniciales de las ordenadas del cromatograma corregido buscado (o equivalentemente sobre el vector $\mathbf{s}_{k_2}^c$ y la matriz $\text{conv}[\mathbf{s}_{k_2}^c]$). Se propone obtener un $\mathbf{s}_{k_2}^c$ inicial como sigue: (i) se define un eje discreto de V en el mismo rango de V del cromatograma s_{k_2} medido, pero con un intervalo ΔV más grande, resultando un número reducido de p puntos; (ii) se interpola el cromatograma de s_{k_2} en el nuevo eje V y se obtiene el $\mathbf{s}_{k_2}^c$ inicial. El criterio para la selección de las dimensiones p de $\mathbf{s}_{k_2}^c$, n y m de $\text{conv}[\mathbf{s}_{k_2}^c]$, fue similar al utilizado en la Sección III.2.c. para la WCLD normal-logarítmica [Tabla III.3.].

El siguiente error cuadrático medio (escalar) se utilizó para evaluar la calidad del cromatograma DR estimado:

$$e_{s_{DR}^c} = \frac{(\hat{\mathbf{s}}_{DR}^c - \mathbf{s}_{DR}^c)^T (\hat{\mathbf{s}}_{DR}^c - \mathbf{s}_{DR}^c)}{\mathbf{s}_{DR}^c{}^T \mathbf{s}_{DR}^c} \quad (\text{III.26})$$

donde \mathbf{s}_{DR}^c es la solución verdadera conocida *a priori*. Claramente, la Ec. (III.26) no puede aplicarse a un experimento real, donde \mathbf{s}_{DR}^c es desconocido.

Para la resolución de las Ecs (III.25), se adoptaron los siguientes parámetros:

a) $r = 95$ para las operaciones de deconvolución; y b) $\beta = 500$ y $\beta = 5000$, para el coeficiente de filtrado de la Ec. (III.25.b), en los ejemplos de detección DR + LS y DR + SV, respectivamente. Estos valores se obtuvieron tomando una solución de

compromiso entre las estimaciones de los s_{DR}^c suaves con altos valores de $e_{s_{k_1, k_2}}$, y s_{DR}^c oscilatorios con bajos valores de $e_{s_{LS, DR}}$. Finalmente, se eligió la mejor estimación de s_{DR}^c , como aquella que arroja un menor valor de $e_{s_{DR}^c}$ [Ec. (III.26)].

Ejemplo 1: SEC / (DR + LS)

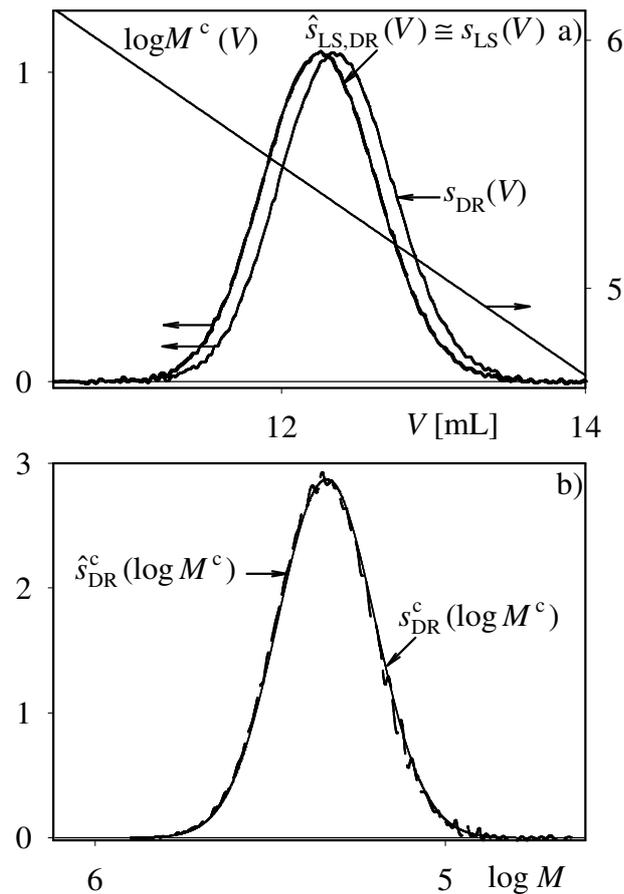


Figura III.5. Corrección directa por E.I. Ejemplo DR + LS. a) Calibración de masa molar, $\log M^c(V)$, cromatogramas medidos [$s_{DR}(V)$, $s_{LS}(V)$] y cromatograma de LS estimado, $\hat{s}_{LS,DR}(V)$. b) DMMs verdadera [$s_{DR}^c(\log M^c)$] y estimada [$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$].

Los cromatogramas libres de ruido fueron contaminados con ruido Gaussiano de media nula para obtener los cromatogramas “medidos” con ruido, $s_{DR}(V)$ y $s_{LS}(V)$ de la Fig. III.5.a). En todos los casos, la varianza del ruido fue constante e igual al 0.25% del

máximo de los cromatogramas.

En la Fig. III.5.a) se muestra también el cromatograma $\hat{s}_{LS,DR}(V)$, estimado con la Ec.(III.22) (en líneas de trazos gruesos) que resulta prácticamente superpuesto con el cromatograma medido original, $s_{LS}(V)$. En la Fig. III.5.b) se muestra la DMM estimada, $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$, calculada a partir del cromatograma de concentración estimado con la Ec. (III.24), y de la calibración de masa molar, $\log M^c(V)$. Las masas molares medias y las polidispersidades estimadas se muestran en la Tabla III.7.

Ejemplo 2: SEC / (DR + SV)

El cromatograma de viscosidad libre de ruido se calculó con una expresión similar a la Ec. (III.20.b), obtenida al reemplazar M^c por $(M^c)^\alpha$ y K_{LS} por $K_{SV} = 0.02$, resultando:

$$s_{SV} = \mathbf{g} * s_{SV}^c = K_{SV} \mathbf{g} * \left[(M^c)^\alpha s_{DR}^c \right] = K_{SV} \text{conv} \left[(M^c)^\alpha s_{DR}^c \right] \mathbf{g} \quad (\text{III.27})$$

Luego, se le adicionó un ruido Gaussiano (de media nula y la varianza del ruido fue constante e igual al 0.25% del máximo de los cromatogramas) obteniéndose el cromatograma “medido” con ruido, $s_{SV}(V)$, de la Fig. III.6.a). En la Fig. III.6.a) se muestra también el cromatograma $\hat{s}_{SV,DR}(V)$, estimado con una expresión equivalente a la Ec.(III.22), obtenida al reemplazar M^c por $(M^c)^\alpha$ y K_{LS} por K_{SV} . Este cromatograma resulta prácticamente superpuesto con el cromatograma medido original, $s_{SV}(V)$. En la Fig. III.6.b) se muestra la DMM estimada, $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$, calculada a partir del cromatograma de concentración estimado con la Ec. (III.25.b), y de la calibración de masa molar, $\log M^c(V)$. Las masas molares medias y las polidispersidades estimadas se muestran en la Tabla III.7.

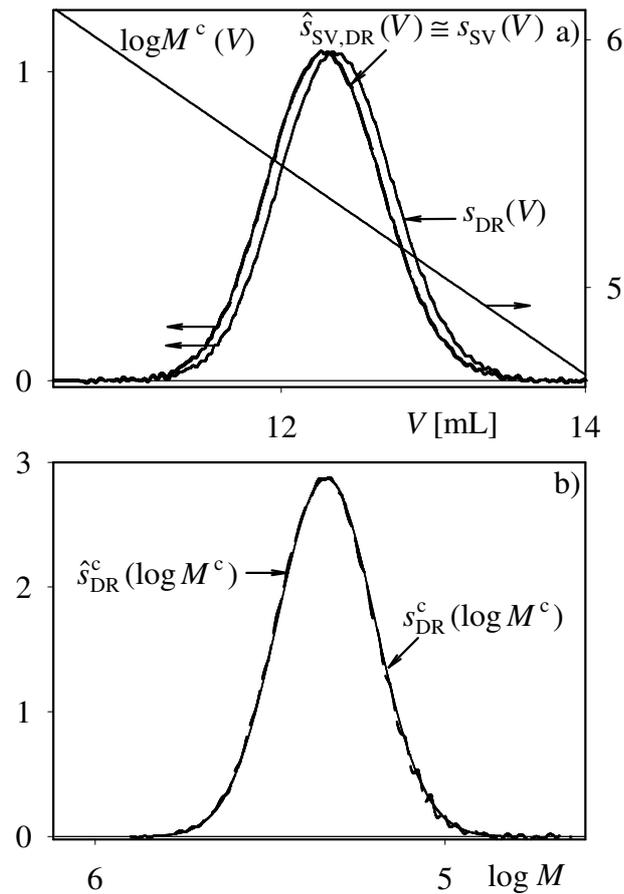


Figura III.6. Corrección directa por E.I. Ejemplo DR + SV. a) Calibración de masa molar, $\log M^c(V)$, cromatogramas medidos [$s_{DR}(V)$, $s_{SV}(V)$] y cromatograma de SV estimado, $\hat{s}_{SV,DR}(V)$. (b) DMMs verdadera [$s_{DR}^c(\log M^c)$] y estimada [$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$].

La Tabla III.7. muestra las masas molares medias y polidispersidades estimadas. En general, todas las estimaciones concuerdan con los valores verdaderos debido a la notable estimación lograda en el cromatograma DR corregido. El error $e_{s_{DR}^c}$ es menor en el caso DR + SV, debido a la mayor suavidad alcanzada en la estimación de \hat{s}_{DR}^c .

Las estimaciones de $s_{DR}^c(V)$ resultaron extremadamente buenas, lo que podría deberse a la compensación de los errores sistemáticos en las mediciones. La

selección de los parámetros β y r se realizó con el criterio de obtener un menor $e_{s_{DR}^c}$; que evidentemente no podría aplicarse a una medición real. Las buenas estimaciones de $s_{DR}^c(V)$ y el bajo $e_{s_{DR}^c}$ quizás se deben a la compensación entre soluciones altamente oscilatorias (elevado valor de r) con las oscilaciones provocadas por el ruido de medición.

Tabla III.7. Corrección directa por E.I. Masas molares medias de las DMMs real y estimada, y error cuadrático medio de estimación.

	DR + LS ^(a)	DR + SV ^(b)
<i>a) DMM real</i>		
\bar{M}_n (g/mol)	207780	207780
\bar{M}_w (g/mol)	230100	230100
\bar{M}_w / \bar{M}_n	1.107	1.107
<i>b) DMMs estimadas</i>		
\hat{M}_n (g/mol)	209180	208090
\hat{M}_w (g/mol)	231950	230300
\hat{M}_w / \hat{M}_n	1.109	1.107
$e_{s_{DR}^c} (\times 10^3)$	0.3942	0.1393

^(a) Ver Fig. III.5.; ^(b) Ver Fig. III.6.

Se evaluó la robustez del método ante errores de $\pm 5\%$ en la pendiente de $\log M^c(V)$. Cuando el error en la pendiente es por defecto, la DMM corregida estimada resulta más ancha que la real, y viceversa. También se investigó el efecto de errores en el IDV iguales a un intervalo de discretización ($\Delta V = \pm 0.02$ mL) observándose que $e_{s_{DR}^c}$ aumenta en forma significativa. Cuando el $s_{LS}(V)$ se ubica erróneamente hacia menores V ($\delta_{LS} < 0$), los errores observados resultaron más elevados que cuando el $s_{LS}(V)$ se desplaza hacia V mayores ($\delta_{LS} > 0$). Para $\delta_{LS} < 0$, el cromatograma corregido estimado resulta más

ancho que el real. Por último, el ruido de medición tiene un efecto moderado sobre el cromatograma corregido estimado. En la Tabla III.8. se resumen los errores comentados.

Tabla III.8. Corrección directa por E.I. Chequeos de robustez.

	DR + LS	DR + SV
<i>Cambios del $\pm 5\%$ en la pendiente de la calibración de masa molar</i>		
\hat{M}_n (g/mol) ^(a)	209660 / 208350	208230 / 207420
\hat{M}_w (g/mol) ^(a)	231280 / 232220	229530 / 231300
\hat{M}_w / \hat{M}_n ^(a)	1.103 / 1.115	1.102 / 1.115
$e_{s_{DR}^c}$ ($\times 10^3$) ^(a)	0.910 / 0.775	0.579 / 0.663
<i>Cambios en el IDV de ± 0.02 mL</i>		
\hat{M}_n (g/mol) ^(a)	213490 / 207910	205810 / 205940
\hat{M}_w (g/mol) ^(a)	232460 / 235080	224200 / 234980
\hat{M}_w / \hat{M}_n ^(a)	1.089 / 1.131	1.089 / 1.141
$e_{s_{DR}^c}$ ($\times 10^3$) ^(a)	9.756 / 6.383	5.151 / 10.929
<i>Varianzas del ruido de medición: 1 % del máximo de los cromatogramas</i>		
\hat{M}_n (g/mol)	208470	208020
\hat{M}_w (g/mol)	231230	230260
\hat{M}_w / \hat{M}_n	1.109	1.107
$e_{s_{DR}^c}$ ($\times 10^3$)	0.341	0.143
<i>Cambios en la pendiente α de MHS, del $\pm 5\%$</i>		
\hat{M}_n (g/mol) ^(a)	-	208420 / 207390
\hat{M}_w (g/mol) ^(a)	-	229840 / 231260
\hat{M}_w / \hat{M}_n ^(a)	-	1.103 / 1.115
$e_{s_{DR}^c}$ ($\times 10^3$) ^(a)	-	0.514 / 0.693

^(a) El primer valor corresponde a cambios positivos, y el segundo valor a cambios negativos.

Se efectuó un análisis de robustez similar al anterior, para el caso SV + DR, obteniéndose resultados cualitativamente similares, al variar la calibración de masas molares, el IDV y el ruido de medición. Además, se simularon errores del $\pm 5\%$ en la pendiente α de MHS. Para valores de α por defecto, la DMM corregida estimada resulta más ancha que la real, y viceversa. El efecto del error en α es similar al originado por errores en la pendiente de $\log M^c(V)$. En la Tabla III.8. se resumen los errores comentados.

III.5. Conclusiones

Se desarrolló un método teórico para estimar una función de E.I. uniforme (pero asimétrica), basado en el análisis de estándares angostos con sensores de masa molar y calibración de masa molar conocida. Las simulaciones involucraron una distribución de Poisson de masa molar relativamente baja, y una distribución normal-logarítmica de masa molar más alta. En ambos casos, se obtuvieron estimaciones de la función de E.I. bastante razonables. Dichas estimaciones resultaron mejores (y el algoritmo se resolvió más rápidamente) al adoptar funciones EMG. Además, los parámetros de las EMG estimadas mostraron una variación correcta con la masa molar; siendo posible estimar la función de E.I. no-uniforme global por interpolación de los parámetros de las EMG obtenidas.

El algoritmo numérico está libre de los errores en las ganancias de los detectores, y es robusto frente a las diferentes formas de WCLD, a los ruidos de alta frecuencia, a los errores en la pendiente de calibración, y a los errores en el parámetro de MHS, α (cuando se emplean sensores de SV). Sin embargo, el método es muy sensible a los errores en el IDV. No asumiendo ningún error en el IDV, se obtuvieron estimaciones de las funciones de E.I. muy razonables para estándares con polidispersidades en el rango 1.005–1.50. Para polidispersidades sumamente bajas, el procedimiento falla porque el cromatograma de masa molar casi coincide con el cromatograma de concentración, y

entonces la información contenida en ambos cromatogramas es la misma. Para polidispersidades altas, el procedimiento falla porque el E.I. tiene un efecto despreciable sobre los cromatogramas medidos.

En general, las calibraciones de masa molar se determinan a partir de los cromatogramas de concentración. Como se discutiera en el Capítulo II, los errores en la calibración de masa molar se deben en parte a la asignación incorrecta entre los volúmenes de retención medios y las masas molares medias. Quizás, podrían obtenerse estimaciones mejores de la calibración de masa molar si en lugar de utilizar los cromatogramas de masa medidos, se emplearan los cromatogramas corregidos por E.I., derivados de la aplicación del método propuesto en este Capítulo.

En triple detección, se incorpora un segundo sensor (independiente) de masa molar. Al disponerse de 3 sensores independientes, es posible –en principio– extender la aplicación del método de estimación al caso en que se desconoce la calibración de masa molar. Por otra parte, si dicha calibración se conociera, entonces podría utilizarse como una prueba de consistencia adicional entre los cromatogramas medidos, la calibración de masa molar, y las funciones de E.I. estimadas. Alternativamente, se podría aplicar un procedimiento iterativo similar al de Netopilík (1982), para estimar simultáneamente la función de E.I. uniforme y la calibración de masa molar.

Por último, se propuso un algoritmo teórico para corregir por E.I. sin la necesidad de conocer la función de E.I. El método se derivó a partir de relaciones matemáticas existentes entre las señales medidas y la calibración de masa molar. En tal sentido, es conceptualmente equivalente al método de estimación del E.I., pero involucra en un único problema la estimación de las ordenadas de $s_{DR}^c(V)$. Esta es una ventaja con respecto al método clásico, que requiere de dos pasos: 1) estimar la función de E.I.; y 2) resolver el problema inverso para obtener $\hat{s}_{DR}^c(V)$. Esta parece ser la mayor potencialidad

del método propuesto, que produce resultados de simulación notoriamente buenos bajo las hipótesis de cromatogramas ideales contaminados con ruidos aleatorios de media nula. La robustez del método debe ser estudiada con mayor profundidad, así como deben también establecerse algunos criterios de carácter práctico para el ajuste de los parámetros r y β asociados al caso de una medición real.

CAPÍTULO IV. Estimación de la Función de E.I.: Aplicaciones

en los Casos de SEC / (DR+LS)

y SEC / (DR+SV)

IV.1. Introducción

En SEC con detección de masa molar surge la incertidumbre en la determinación del IDV, que puede producir errores intolerablemente altos en las funciones de E.I. y en las DMMs estimadas. El IDV se define como el volumen muerto existente entre el detector másico (DR) y el detector de masa molar (LS o SV). En el método teórico desarrollado en el Capítulo III, para estimar la función de E.I. se asume un IDV exactamente conocido y compensado. El IDV origina un corrimiento en V de las señales de masa molar, y su corrección es particularmente importante cuando se realiza el tratamiento de datos de las mediciones. En el caso de sensores en serie (donde el DR se ubica como último detector), el IDV produce un corrimiento de la señal de masa molar hacia menores V . Cuando los sensores se ubican en paralelo, la señal de masa molar puede adelantarse o retrasarse respecto a la señal de DR. En el Capítulo II se estudiaron los efectos del IDV sobre las calibraciones *ad hoc* y sobre las funciones de E.I. estimadas.

La Ec. (I.54) asume que las macromoléculas que eluyen de las columnas de fraccionamiento alcanzan simultáneamente todos los detectores. En la práctica, el IDV introduce un retraso en las señales de la masa molar medidas, $s_{LS,m}(V)$ y $s_{SV,m}(V)$, que puede modelarse como:

$$s_{LS}(V) = s_{LS,m}(V - \delta_{LS}) \quad (\text{IV.1.a})$$

$$s_{SV}(V) = s_{SV,m}(V - \delta_{SV}) \quad (\text{IV.1.b})$$

donde δ_{LS} y δ_{SV} son los volúmenes que deben correrse las señales medidas de LS y SV

con respecto a la señal de DR, adoptada como referencia (es decir, $\delta_{DR} = 0$). Un valor $\delta_{LS} > 0$ (o $\delta_{SV} > 0$) indica que la señal medida se corrige desplazándola a mayores V 's. Se han propuesto varios métodos para determinar el IDV en detectores interconectados en serie. Por ejemplo, si una muestra idealmente monodispersa se inyecta en un sistema sin columnas, el IDV puede estimarse directamente a partir de la diferencia de V 's entre los máximos de los picos (He *et al.*, 1982); o a partir del máximo de la correlación cruzada entre las señales de ambos sensores (Billiani *et al.*, 1990).

Una estimación no sesgada de la calibración de masa molar, $M^c(V)$, puede calcularse introduciendo los cromatogramas corregidos en la Ec. (I.55); es decir:

$$\hat{M}^c(V) = K_{LS} \left[\frac{\hat{s}_{LS}^c(V)}{\hat{s}_{DR}^c(V)} \right] = K \left[\frac{\hat{s}_{SV}^c(V)}{\hat{s}_{DR}^c(V)} \right]^{1/\alpha} \quad (IV.2)$$

La DMM corregida por E.I., se obtiene de $\hat{s}_{DR}^c(V)$ y $\hat{M}^c(V)$. Un ejemplo simulado para SEC/(DR+LS) fue publicado por Vega y Meira (2001).

En una medición SEC, la distancia entre los máximos de los picos se incrementa con la polidispersidad de la muestra, el E.I., y el IDV (Balke, 1999). Un estándar idealmente monodisperso exhibiría picos de igual forma, y el desplazamiento entre picos dependerá del E.I. y del IDV, sugiriendo así la existencia de una correlación entre ambos parámetros. Para muestras polidispersas, el IDV real es menor que la distancia entre los máximos de los picos, por lo que el procedimiento comúnmente utilizado de alinear los picos, provee un IDV sobrestimado.

Sobre la base de las Ecs (I.54, IV.1, IV.2), varias publicaciones (Netopilík, 1994; 1997; 1998; 2001; Brun, 1998; Jackson, 1999; Brun *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 1993) han investigado los efectos combinados del E.I. y del IDV, sobre las calibraciones *ad hoc* y las DMMs estimadas. Por ejemplo, para la combinación particular de una DMM

normal-logarítmica, un E.I. Gaussiano, y una calibración de masa molar lineal, el aumento de la desviación estándar (σ) de la función de E.I. produce la disminución de la pendiente de la calibración *ad hoc*, mientras que un IDV en exceso provoca el mismo efecto; y ambas variables combinadas generan la rotación de la calibración *ad hoc* en sentido contrario a las agujas del reloj con respecto a $M^c(V)$ (Netopilík, 1994; 1997; 1998; 2001). Como ambos efectos están correlacionados, pueden compensarse entre sí, y entonces el E.I. puede corregirse a través de un reajuste del IDV (Brun, 1998; Jackson, 1999; Brun *et al.*, 2000). Para la detección DR + SV, y bajo las hipótesis de una calibración de masa molar lineal y un E.I. Gaussiano uniforme, se ha propuesto un método para determinar simultáneamente el IDV y la σ de la función de E.I. (Cheung *et al.*, 1993). Primero, se utilizó un set de estándares angostos para obtener una calibración de viscosidad intrínseca independiente, $[\eta]^c(V)$. Luego, se analizó una muestra ancha de polímero para estimar $[\hat{\eta}]^c(V)$ a partir de la relación de señales. El método encuentra los valores de σ y δ_{SV} que mejor ajustan $[\hat{\eta}]^c(V)$ con $[\eta]^c(V)$. Los resultados no fueron buenos debido a la asimetría de la función de E.I. en las altas masas molares y a los grandes errores de estimación a las bajas masas molares (Cheung *et al.*, 1993).

En el Capítulo III se consideró teóricamente el análisis de estándares angostos con detectores sensibles a la masa molar, cuando el IDV es despreciado. En este Capítulo, se extiende el método para estimar simultáneamente la función de E.I. uniforme (asimétrica) y el IDV, a partir de los cromatogramas de DR + LS (Sección IV.2) y DR + SV (Sección IV.3), obtenidos con estándares angostos de PS. Entonces, el método se prueba con mediciones experimentales obtenidas con: (i) un sensor de dispersión de luz en serie con el sensor DR; y (ii) un viscosímetro en línea que exhibe un arreglo en paralelo de los sensores DR y SV.

IV.2. Estimación Experimental del E.I. en SEC / DR + LS

Esta sección apunta a estimar la función de E.I. en un cromatógrafo SEC con dos detectores en serie: un DR y un LS. El método requiere los cromatogramas de DR y de LS de estándares angostos; y la calibración de masa molar. Básicamente, se propone el siguiente algoritmo para estimar simultáneamente δ_{LS} y $g(V)$: (i) suponer un IDV inicial, δ_{LS} , de forma que la calibración *ad hoc*, $\log M_w(V)$ [Ec. (I.38)], reproduzca la pendiente de la calibración de masa molar, $\log M^c(V)$; (ii) calcular el cromatograma de LS corregido por IDV, $s_{LS}(V)$ [Ec. (IV.1.a)]; (iii) estimar la función de E.I. uniforme, $g(V)$, en el rango del cromatograma medido a través de las Ecs (III.7); (iv) calcular los cromatogramas corregidos por E.I. [$\hat{s}_{LS}^c(V)$ y $\hat{s}_{DR}^c(V)$] por deconvolución de $s_{LS}(V)$ y $s_{DR}(V)$ [Ecs (III.1), (III.2)]; (v) estimar la calibración de masa molar, $\hat{M}^c(V)$ [Ec. (IV.2)], y comparar con la pendiente de $\log M^c(V)$, después de aplicar una regresión lineal en la región media de los cromatogramas; y (vi) recalculer los pasos (i – v) hasta reproducir los valores de la pendiente de $\log M^c(V)$, incrementando ligeramente el δ_{LS} si la pendiente de $\log \hat{M}^c(V)$ es mayor a la de $\log M^c(V)$, o disminuyendo ligeramente δ_{LS} en el caso contrario.

Según la Ec. (IV.2), se debe conocer K_{LS} para estimar $\hat{M}^c(V)$; sin embargo, no se lo requiere para estimar la pendiente de $\log \hat{M}^c(V)$, ya que dicho factor sólo afecta la magnitud de $\log \hat{M}^c(V)$. Finalmente, es de notar que pueden calcularse dos estimaciones de la DMM corregida por E.I., combinando: (a) $\hat{s}_{DR}^c(V)$ con $\log M^c(V)$, dando $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$; y (b) $\hat{s}_{DR}^c(V)$ con $\log \hat{M}^c(V)$, dando $\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$. También, se pueden obtener dos estimaciones de la DMM no corregida por E.I., combinando: (a) $s_{DR}(V)$ con $\log M^c(V)$, dando $s_{DR}(\log M^c)$; y (b) $s_{DR}(V)$ con $\log M_w(V)$, dando $s_{DR}(\log M_w)$. En

principio, se espera que $s_{DR}(\log M_w)$ sea más angosta que la DMM verdadera.

IV.2.a. Medición de Estándares Angostos de PS

Se utilizaron los cromatogramas de DR y LS provistos por el Prof. Taihyun Chang (Departamento de Química, POSTECH, Corea del Sur) que analizó por SEC tres estándares angostos de PS (uno obtenido en el laboratorio vía polimerización aniónica y dos comerciales), y sus respectivas fracciones aún más angostas, obtenidas por cromatografía de interacción por gradiente de temperatura (TGIC). Los datos de los estándares y de las fracciones se resumen en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Características de los estándares de PS utilizados. Detección DR + LS.

	Proveedor	$\bar{M}_p^{(a)}$ [g/mol]	\bar{M}_n [g/mol]	\bar{M}_w [g/mol]	\bar{M}_w / \bar{M}_n
<i>a) Estándar</i>					
PS16	Laboratorio	15700	15600 ^(b)	15900 ^(b)	1.019 ^(b)
PS31	Pressure Chemical	29600	29500	29800	1.010
PS200	Pressure Chemical	203500	202000	205000	1.015
<i>b) Fracción</i>					
PS16	Laboratorio		16100 ^(b)	16200 ^(b)	1.006 ^(b)

(a) Calculado como: $\bar{M}_p = \sqrt{\bar{M}_w \bar{M}_n}$; (b) Caracterizado por MALDI – MS.

Los cromatogramas $s_{DR}(V)$ y $s_{LS,m}(V)$ (a 90°) se indican en la Fig. IV.1., y se discretizaron con intervalos $\Delta V = 0.005$ mL. Los cromatogramas de LS, $s_{LS,m}(V)$, preceden a sus correspondientes cromatogramas de masa, $s_{DR}(V)$; y claramente, el IDV es positivo en todos los casos. La calibración de masa molar (lineal), obtenida con un set independiente de estándares de PS resultó: $\log M^c = 12.758 - 0.6232 V$ (Fig. IV.1.).

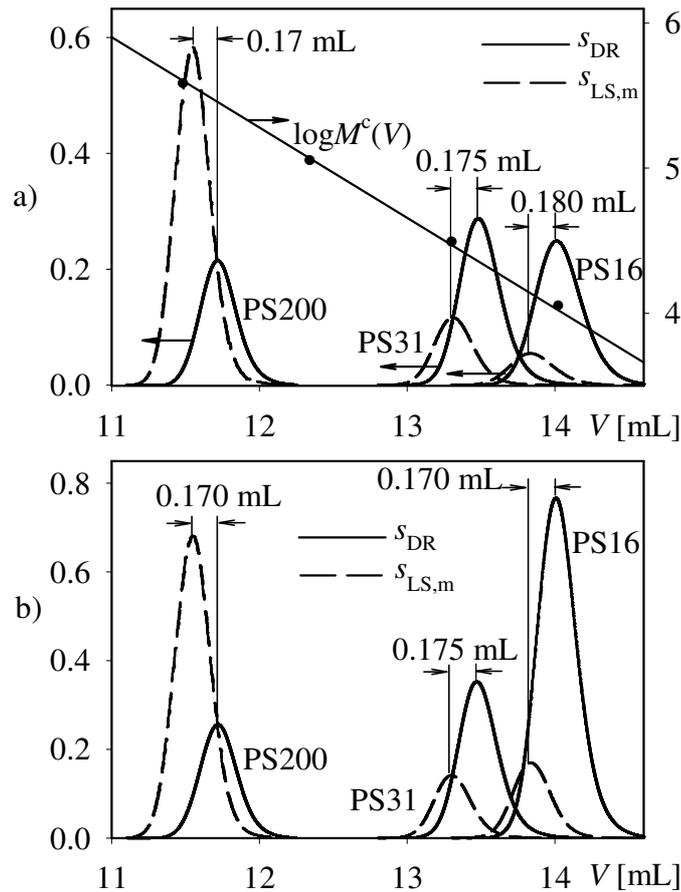


Figura IV.1. Cromatogramas medidos y calibración de masa molar, $\log M^c(V)$. a) Estándares base; b) Fracciones obtenidas por TGIC.

IV.2.b. Estimación de la Función de E.I.

Se considera la aplicación del algoritmo propuesto para estimar simultáneamente el IDV y los parámetros de la función de E.I. tipo EMG $\{\sigma, \tau\}$. El rango de V requerido en el paso (v) se seleccionó en base a los cromatogramas de DR, tomando los valores de las ordenadas superiores al 40% de sus máximos, para evitar las elevadas oscilaciones en ambas colas.

Se describirá el método aplicado para el estándar PS31, y se mostrarán las soluciones para los otros estándares. En la Fig. IV.2. se muestra el efecto que produce el IDV sobre las calibraciones *ad hoc* correspondientes al estándar PS31. Cuando no se corrige por IDV ($\delta_{LS} = 0$ mL), la pendiente de $\log M_w$ resulta considerablemente mayor

que la de $\log M^c$, mientras que por efecto del E.I., la pendiente de $\log M_w$ debería ser subestimada. La selección inicial del IDV se realiza tomando como límite superior el volumen correspondiente a la separación entre los picos de los cromatogramas de LS y el DR, mientras que como límite inferior se selecciona un valor de IDV tal que genere una $\log M_w$ cuya pendiente sea similar a la de $\log M^c$. Para ello, se seleccionaron tres valores: $\delta_1 = 0.175$ mL (IDV máximo), $\delta_2 = 0.170$ mL y $\delta_3 = 0.160$ mL. La pendiente de $\log M_w$ obtenida tomando δ_1 y δ_2 resulta subestimada, mientras que $\log M_w$ calculada con δ_3 es la que presenta una pendiente similar a $\log M^c$.

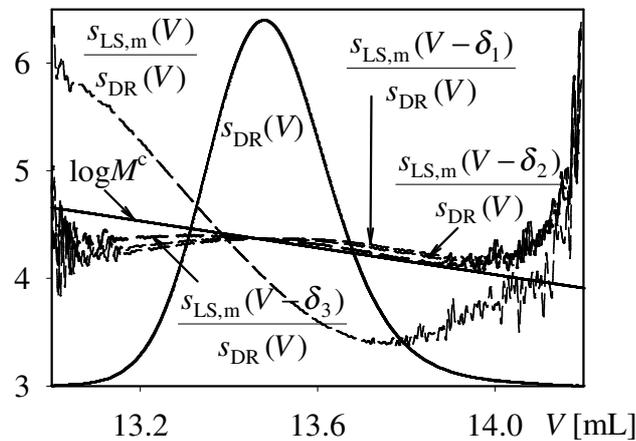


Figura IV.2. Efecto del IDV sobre la calibración *ad hoc*, $\log M_w$, para $\delta = 0$ mL, $\delta_1 = 0.175$ mL (IDV máximo), $\delta_2 = 0.170$ mL y $\delta_3 = 0.160$ mL.

Para estimar simultáneamente el IDV y los parámetros de la función de E.I. $\{\sigma, \tau\}$, se aplicó el algoritmo propuesto en la sección IV.2. El algoritmo se inicializó con $\delta_{LS} = 0.160$ mL, ya que este valor es el que provee una $\log M_w$ con pendiente similar a $\log M^c$. Los valores sucesivos de δ_{LS} en el paso (vi) se obtuvieron reduciendo continuamente el último valor en 0.005 mL. Después de varias iteraciones de los pasos (i-vi), $\delta_{LS} = 0.15$ mL dio la pendiente de $\log \hat{M}^c(V) \cong \log M^c(V)$ y los parámetros de la EMG resultaron: $\hat{\sigma} = 0.074$ mL y $\hat{\tau} = 0.033$ mL.

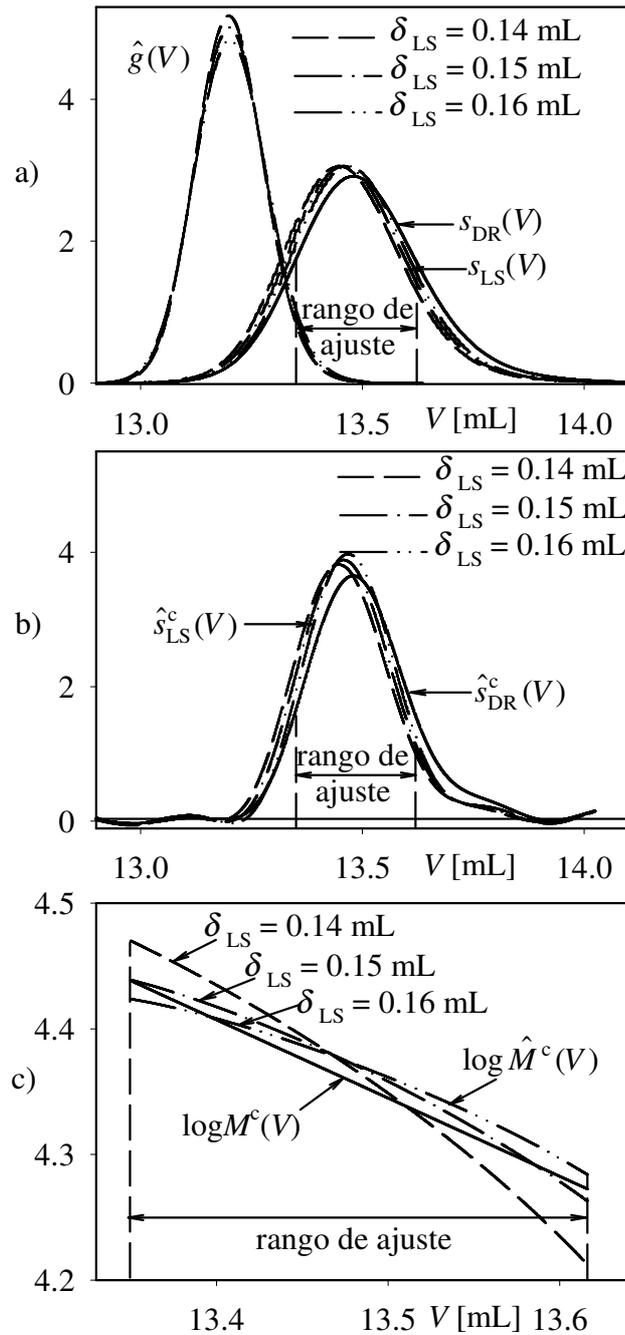


Figura IV.3. Estimación de $g(V)$ (EMG) para el estándar PS31. Resultados intermedios para 3 IDV's. a) EMG estimada, $\hat{g}(V)$, cromatogramas DR y LS corregidos por IDV, $s_{DR}(V)$ y $s_{LS}(V)$; b) Cromatogramas DR y LS corregidos por E.I., $\hat{s}_{DR}^c(V)$ y $\hat{s}_{LS}^c(V)$; c) Calibraciones de masas molares: verdadera, $\log M^c(V)$ y estimadas, $\log \hat{M}^c(V)$.

La Fig. IV.3.a) muestra los cromatogramas normalizados de DR y de LS del paso (ii), para $\delta_{LS} = 0.14, 0.15,$ y 0.16 mL, y las funciones de E.I. estimadas resultantes del

paso (iii). Los parámetros de las EMGs correspondientes difirieron en menos del 10%, resultando las $\hat{g}(V)$ de la Fig. IV.3.a). Los cromatogramas corregidos por E.I. se representan en la Fig. IV.3.b). La Figura IV.3.c) compara las calibraciones de masas molares, verdadera $\log M^c(V)$ y estimada $\log \hat{M}^c(V)$.

Para los seis estándares investigados la Tabla IV.2. presenta los resultados globales de los parámetros de E.I., los IDV, y las dimensiones n , p , y m , hallados por aplicación del algoritmo. El estándar PS200 y su fracción, exhiben idénticas funciones de E.I. estimadas, posiblemente debido a que el fraccionamiento por TGIC no fue eficiente.

Tabla IV.2. Estimación simultánea de la función de E.I. EMG y del IDV.

	$\hat{\sigma}$ [mL]	$\hat{\tau}$ [mL]	δ_{LS} [mL]	\hat{n}	\hat{p}	\hat{m}
<i>a) Estándar</i>						
PS16	0.074	0.034	0.15	150	232	381
PS31	0.074	0.033	0.15	150	232	381
PS200	0.099	0.050	0.15	150	182	331
<i>b) Fracción</i>						
PS16	0.076	0.036	0.15	150	232	381
PS31	0.071	0.033	0.15	150	232	381
PS200	0.099	0.050	0.15	150	182	331

A efectos de obtener una función de E.I. en todo el rango de medición, los parámetros $\hat{\sigma}$ y $\hat{\tau}$ de la Tabla IV.2. se ajustaron con un polinomio de orden 2, en función del V medio de los cromatogramas $s_{DR}(V)$, resultando las siguientes correlaciones:

$$\hat{\sigma}(V) = 0.0226 V^2 - 0.5698 V + 3.6539 \quad (\text{IV.3.a})$$

$$\hat{\tau}(V) = 0.0143 V^2 - 0.3621 V + 2.3087 \quad (\text{IV.3.b})$$

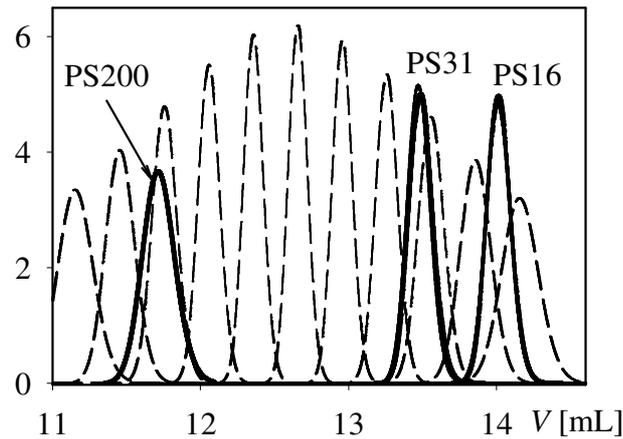


Figura IV.4. Funciones de E.I. (EMGs) estimadas para cada estándar (líneas llenas) y función de E.I. no uniforme extrapolada (líneas de trazos).

La Fig. IV.4. muestra las funciones de E.I. estimadas para cada estándar, junto a las funciones de E.I. extrapoladas a todo el rango V 's asumiendo las correlaciones (IV.3). Se observa que la función de E.I. estimada para el estándar PS200 es ligeramente más ancha y asimétrica que las correspondientes a PS16 y PS31. Las funciones de E.I. estimadas no-uniformes resultaron prácticamente simétricas para todo V , y levemente más anchas a V menores (mayor M), mientras que a V intermedios resultaron algo más angostas. Alternativamente, se propuso realizar un ajuste lineal de los parámetros $\hat{\sigma}$ y $\hat{\tau}$ de la Tabla IV.2., en función del V medio de los cromatogramas $s_{DR}(V)$, resultando las siguientes correlaciones:

$$\hat{\sigma}(V) = -0.0153 + 0.0075 V \quad (\text{IV.4.a})$$

$$\hat{\tau}(V) = -0.0233 + 0.0048 V \quad (\text{IV.4.b})$$

La Fig. IV.5. muestra las funciones de E.I. estimadas para cada estándar, y las funciones de E.I. extrapoladas a todo el rango de fraccionamiento asumiendo las correlaciones (IV.4). En este caso, las funciones de E.I. estimadas no-uniformes resultaron más asimétricas y menos anchas a V menores.

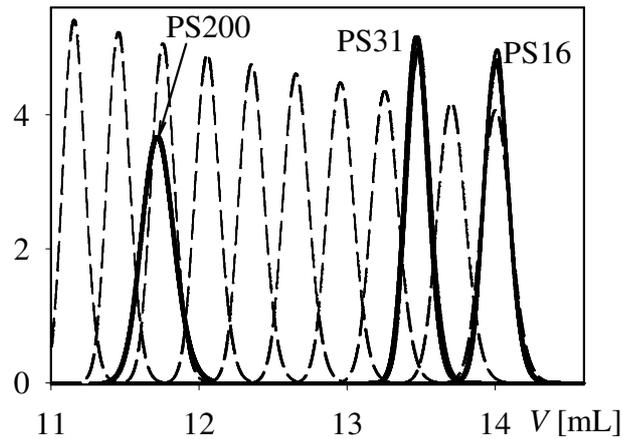


Figura IV.5. Funciones de E.I. estimadas para cada estándar, asumiendo funciones EMGs (líneas llenas, gruesas) y función de E.I. extrapolada a través de una correlación lineal para todo el rango de medición (líneas de trazos).

IV.2.c. Estimación de las DMMs de los Estándares de PS

A partir de la $\hat{g}(V)$ pueden obtenerse, como subproducto del método, las DMMs de los estándares corregidas por E.I. Para su cálculo, existen distintas alternativas: (i) utilizar la calibración directa $[\log M^c(V)]$ y el cromatograma másico $[s_{DR}(V)]$ resultando $s_{DR}(\log M^c)$; (ii) utilizar la calibración *ad hoc* corregida por IDV $[\log \hat{M}_w(V)]$ y el cromatograma $s_{DR}(V)$ resultando $s_{DR}(\log \hat{M}_w)$; (iii) estimar la DMM verdadera $[\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)]$ a partir del cromatograma corregido estimado $[\hat{s}_{DR}^c(V)]$ y empleando $\log M^c(V)$; y (iv) estimar la DMM verdadera combinando las estimaciones $\hat{s}_{DR}^c(V)$ y $\log \hat{M}^c(V)$, resultando $\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$. Las DMMs (i) y (ii) no son corregidas por E.I., por lo que se espera en principio, que $s_{DR}(\log M^c)$ y $s_{DR}(\log \hat{M}_w)$ sean más ancha y más angosta, respectivamente, que la DMM verdadera. Alternativamente, las DMMs (iii) y (iv) están corregidas por E.I. y se espera que sus masas molares medias sean similares.

La estimación final resultante $\hat{g}(V)$ para el estándar PS31 junto con los

cromatogramas de DR medido y corregido $\hat{s}_{DR}^c(V)$ se presentan en la Fig. IV.6.a). Las pequeñas oscilaciones espúreas en las colas del cromatograma de $\hat{s}_{DR}^c(V)$ no se muestran. La Fig. IV.6.b) compara la DMM calculada sin corrección por E.I., $s_{DR}(\log M^c)$, con la DMM corregida por E.I., $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$. Claramente, $s_{DR}(\log M^c)$ es más ancha que $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$, debido al efecto del E.I.

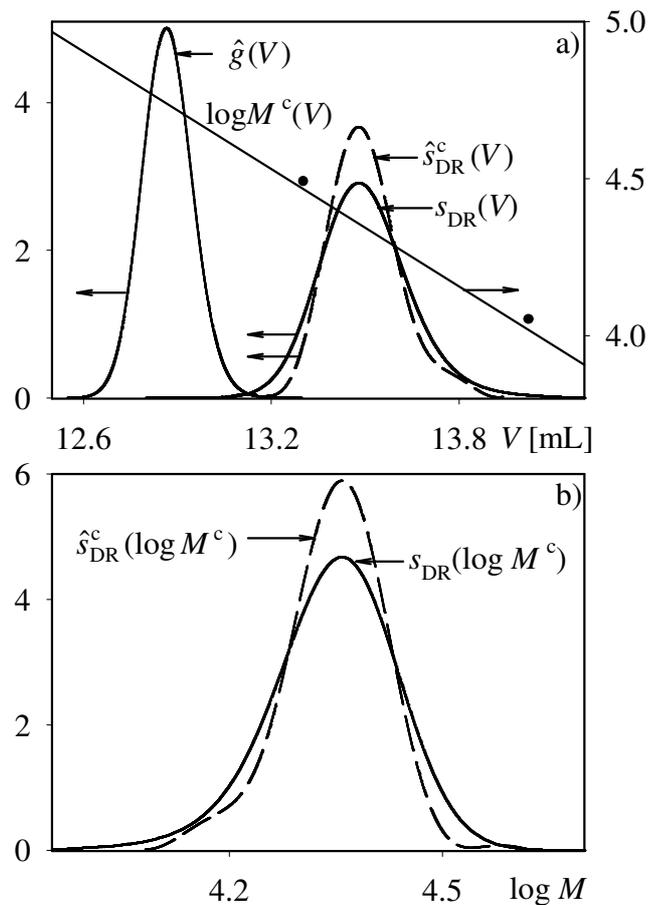


Figura IV.6. Estándar PS31. (a) E.I., $\hat{g}(V)$, calibración de masa molar, $\log M^c(V)$, y cromatogramas DR ensanchado y corregido por E.I., $s_{DR}(V)$ y $\hat{s}_{DR}^c(V)$. (b) DMMs ensanchada y corregida por E.I., $s_{DR}(\log M^c)$ y $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$.

La Tabla IV.3. presenta las masas molares medias para los estándares y sus fracciones, calculadas con $\delta_{LS} = 0.160$ mL. Las masas molares medias difieren de los

valores nominales (Tabla IV.1.), siendo menores para PS16 y PS31 y mayores para PS200. Estas diferencias pueden atribuirse a la incertidumbre que existe sobre la validez de $\log M^c(V)$, para el sistema cromatográfico en donde se analizaron las muestras. Todas las DMMs $\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$ son más angostas que las $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$, posiblemente debido a la amplificación de los errores en los δ_{LS} estimados, que pueden subestimar drásticamente la pendiente de $\log \hat{M}^c(V)$.

Tabla IV.3. Masas molares medias de los estándares PS16-PS200

	DMM	\bar{M}_n [g/mol]	\bar{M}_w [g/mol]	$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$	DMM	\bar{M}_n [g/mol]	\bar{M}_w [g/mol]	$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$
<i>a) Estándar</i>								
PS16	$s_{DR}(\log M^c)$	10000	10600	1.056	$s_{DR}(\log \hat{M}_w)$	10300	10500	1.017
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	10100	10500	1.041	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	10200	10500	1.031
PS31	$s_{DR}(\log M^c)$	21600	22600	1.045	$s_{DR}(\log \hat{M}_w)$	22300	22500	1.012
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	21900	22600	1.029	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	22000	22500	1.025
PS200	$s_{DR}(\log M^c)$	277000	286000	1.034	$s_{DR}(\log \hat{M}_w)$	282000	287000	1.009
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	285000	290000	1.016	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	285000	285000	1.019
<i>b) Fracciones</i>								
PS16	$s_{DR}(\log M^c)$	10200	10700	1.043	$s_{DR}(\log \hat{M}_w)$	10500	10600	1.006
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	10400	10600	1.026	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	10400	10600	1.018
PS31	$s_{DR}(\log M^c)$	22000	23000	1.043	$s_{DR}(\log \hat{M}_w)$	22600	22900	1.010
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	22300	22900	1.027	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	22300	22900	1.025
PS200	$s_{DR}(\log M^c)$	277000	287000	1.035	$s_{DR}(\log \hat{M}_w)$	283000	285000	1.009
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	284000	289000	1.017	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	284000	289000	1.017

IV.3. Estimación Experimental del E.I. en SEC / (DR+SV)

En esta sección, se estima la función de E.I. en un cromatógrafo SEC con detectores DR y SV en paralelo. Los datos requeridos son: (i) los cromatogramas DR y SV de estándares angostos; (ii) la calibración de masa molar; y (iii) el parámetro α de MHS. El método teórico descrito en el Capítulo III fue extendido para estimar simultáneamente la función de E.I. y el IDV. El algoritmo es similar al descrito en la sección IV.2., y consiste en: (i) suponer un IDV inicial, δ_{SV} , {por ejemplo, el δ_{SV} requerido para que la calibración *ad hoc* $\log M_{v,MHS}(V)$ [Ec. (I.39.a)] reproduzca la pendiente de $\log M^c(V)$ }; (ii) obtener el cromatograma corregido por IDV, $s_{SV}(V)$ [Ec. (IV.1.b)]; (iii) estimar la función de E.I. uniforme, $g(V)$, [Ecs (III.7)]; (iv) obtener los cromatogramas corregidos por E.I. [$\hat{s}_{SV}^c(V)$ y $\hat{s}_{DR}^c(V)$] por deconvolución de $s_{SV}(V)$ y $s_{DR}(V)$ [Ecs (III.1) y (III.2)]; (v) estimar $\hat{\alpha}$ de la pendiente de: $\log[\hat{s}_{SV}^c(V)/\hat{s}_{DR}^c(V)]$ vs. $\log M^c(V)$ [Ec. (IV.2)], después de aplicar una regresión lineal en la región media de los cromatogramas y comparar con el valor de α de literatura; y (vi) iterar desde los pasos (i – v) incrementando ligeramente el δ_{SV} si $\hat{\alpha} > \alpha$, o disminuyendo ligeramente δ_{SV} si $\hat{\alpha} < \alpha$, hasta que $\hat{\alpha} \cong \alpha$. Según la Ec. (IV.2), se requiere conocer K para estimar con precisión $[\eta]^c(V)$. Sin embargo, K sólo afecta la magnitud de $\log\{[\hat{\eta}]^c(V)\}$, pero no su pendiente $\hat{\alpha}$.

La aplicación SEC/(DR+SV) presenta la ventaja de conocer el valor α para estándares de PS en THF. Como contrapartida, tiene la desventaja de que los detectores se encuentran en paralelo, existiendo diferencias inevitables en los flujos a través de ambos detectores. La magnitud del IDV, δ_{SV} , puede depender de la masa molar del estándar analizado, debido a las contrapresiones más elevadas generadas por las masas molares más altas en el detector SV. Por estos motivos, la estimación de δ_{SV} es más compleja, y no se puede considerar un IDV único para todos los estándares como en el caso DR + LS. El

efecto del δ_{SV} en la pendiente del plot de MHS ($\log\{[\eta]^c\}$ vs. $\log M^c$) puede verse al estimar la viscosidad intrínseca a partir de la Ec. (IV.2). Cuando se representa $\log\{[\hat{\eta}]^c(V)\}$ vs. $\log \hat{M}^c(V)$, la pendiente del plot de MHS (idealmente lineal) debe coincidir con α ; mientras que si δ_{SV} se subestima, entonces la pendiente del plot de MHS se sobrestima, y viceversa. Finalmente, podrán calcularse dos estimaciones de la DMM corregida, $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$ y $\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$; y dos estimaciones de la DMM no corregida, $s_{DR}(\log M^c)$ y $s_{DR}(\log M_{v,MHS})$.

IV.3.a. Medición de Estándares Angostos de PS

Se utilizó un cromatógrafo Waters-Breeze con un juego completo de 6 columnas Styragel HR(1-6) (30 cm de longitud, $100-10^7$ g/mol), y un detector Viscotek Modelo 200, con una configuración en paralelo de los sensores de DR y de SV, ya comentado en el Capítulo I [sección I.1.b.iv)]. Se analizaron nueve estándares de PS (Tabla IV.4.). Se utilizó THF como fase móvil, a 1 mL/min y 25 °C. El volumen de inyección fue 0.2 mL, y la concentración nominal de los estándares 1.0 mg/mL. Se adoptaron los siguientes parámetros de MHS para PS en THF a 25 °C (Haney *et al.*, 1987): $K = 1.279 \times 10^{-4}$ dL/g, y $\alpha = 0.712$.

Los cromatogramas corregidos por línea de base y normalizados se representan por $s_{DR}(V)$ y $s_{SV,m}(V)$ en la Fig. IV.7. Tales cromatogramas son funciones discretas, con puntos a intervalos de volumen regulares $\Delta V = 0.03$ mL. Este intervalo relativamente grande fue seleccionado para tener un número moderado de puntos de los cromatogramas, permitiendo una mejora en la performance del algoritmo. La calibración de masa molar (lineal) resultó: $\log M^c = 13.0773 - 0.1913 V$, (Fig. IV.7.).

Tabla IV.4. Características de los estándares de PS utilizados. Detección DR + SV.

Estándar	Proveedor	\bar{M}_p	\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_w / \bar{M}_n
		[g/mol]	[g/mol]	[g/mol]	
PS1	Perkin Elmer	51200	50400	52100	---
PS2	Perkin Elmer	78600	75300	82100	---
PS3	Polyscience	118000 ^(a)	---	120000	1.03
PS4	Polyscience	226000 ^(a)	---	233000	1.06
PS5	Waters	240000	217600	---	---
PS6	Waters	340000	243000	---	---
PS7	Polyscience	589700 ^(a)	---	610000	1.07
PS8	Polyscience	858000 ^(a)	---	900000	1.10
PS9	Polyscience	1720000 ^(a)	---	1800000	1.10

(a) Calculado como: $\bar{M}_p = \sqrt{\bar{M}_w \bar{M}_n}$.

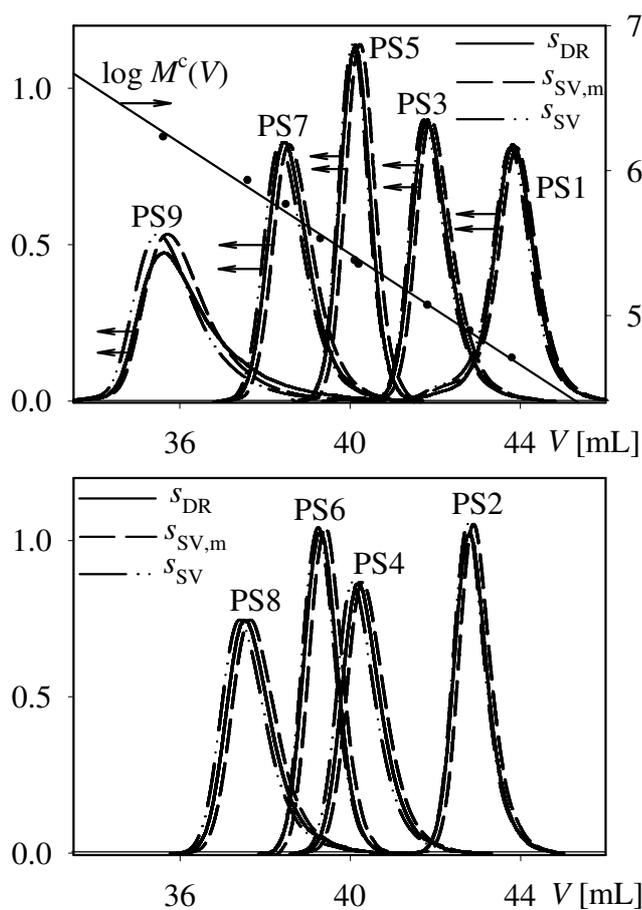


Figura IV.7. Detección DR + SV. Cromatogramas medidos (corregidos por línea de base y normalizados), y calibración de masa molar, $\log M^c(V)$.

En la Fig. IV.7., se observa que todos los $s_{DR}(V)$ preceden a sus correspondientes $s_{SV,m}(V)$; y las formas de los cromatogramas de masa y de masa molar de los estándares angostos son bastante similares entre sí, indicando una baja polidispersidad. Claramente, el IDV es negativo en todos los casos. Los cromatogramas de masa molar finales corregidos por IDV son representados por $s_{SV}(V)$ en la Fig. IV.7.

IV.3.b. Obtención de la Función de E.I.

Se considera la aplicación del algoritmo propuesto para estimar simultáneamente el IDV y los parámetros de la función de E.I. EMG $\{\sigma, \tau\}$. El rango de V de la región media del cromatograma que se requiere en el paso (v) se seleccionó con el mismo criterio utilizado para el caso de detección DR + LS. Se describirá el método aplicado para el estándar PS5, y se mostrarán las soluciones para todos los estándares. En la Fig. IV.8. se muestra el efecto que produce el IDV sobre las calibraciones *ad hoc* $\log M_{v,MHS}$, correspondientes al estándar PS5. Cuando no se corrige por IDV ($\delta_{SV} = 0$), $\log M_{v,MHS}$ exhibe un pendiente positiva, lo que es inadmisibles. Como se vio en el Capítulo II, la pendiente de $\log M_{v,MHS}$ debería ser subestimada por efecto del E.I., y el IDV se puede utilizar para compensar este error. La selección inicial del IDV se realiza tomando como límite superior un valor de IDV que genere una $\log M_{v,MHS}$ cuya pendiente sea similar a la de $\log M^c$; mientras que como límite inferior se selecciona el volumen correspondiente a la separación entre los picos de los cromatogramas de SV y de DR. Para ello, se seleccionaron tres valores: $\delta_1 = -0.14$ mL (IDV mínimo), $\delta_2 = -0.15$ mL (IDV máximo), y $\delta_3 = -0.16$ mL. La pendiente de $\log M_{v,MHS}$ obtenida con δ_1 resulta subestimada, mientras que con δ_3 resulta sobrestimada. Utilizando el IDV máximo δ_2 se obtiene una $\log M_{v,MHS}$ cuya pendiente es similar a $\log M^c$.

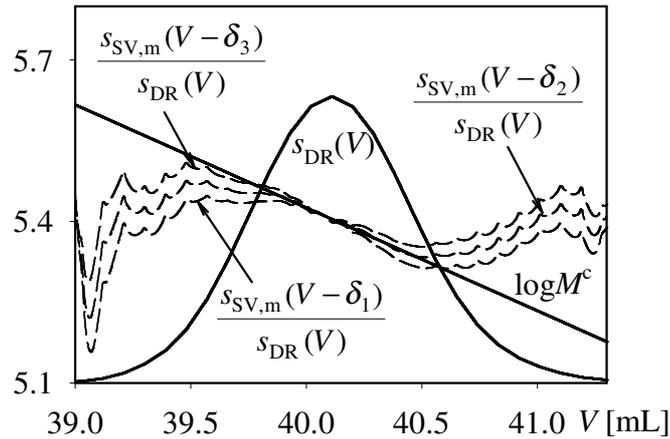


Figura IV.8. Efecto del IDV sobre $\log M_{v,MHS}$, para $\delta_1 = -0.14$ mL (IDV mínimo), $\delta_2 = -0.15$ mL (IDV máximo), y $\delta_3 = -0.16$ mL.

Para estimar simultáneamente el IDV y los parámetros de la función de E.I. $\{\sigma, \tau\}$, se aplicó el algoritmo descrito en la sección IV.3. El algoritmo se inicializó con $\delta_{SV} = -0.10$ mL, dando una primera estimación $\hat{\alpha} < 0$. Los valores sucesivos de δ_{SV} en el paso (vi) se obtuvieron reduciendo continuamente el último valor en 0.01 mL. Debido a que el intervalo de discretización de volumen fue $\Delta V = 0.03$ mL, entonces cada cromatograma $s_{SV}(V)$ se obtuvo interpolando el $s_{SV,m}(V)$ con 0.01 mL antes de aplicar la Ec. (IV.1.b), y luego se rediscretizó el cromatograma resultante con $\Delta V = 0.03$ mL.

Para $\delta_{SV} < -0.13$ mL, se alcanzó la convergencia en el paso (iii) con errores inaceptablemente altos en la Ec. (III.7.b). Los errores más bajos en $\hat{\alpha}$ se obtuvieron para valores de δ_{SV} en el rango $[-0.18, -0.13]$ mL; y en este caso las EMGs estimadas resultaron casi independientes de δ_{SV} . Después de varias iteraciones, $\delta_{SV} = -0.16$ mL dio la pendiente de MHS correcta $\hat{\alpha} \cong 0.712$; y los parámetros de la EMG resultaron: $\hat{\sigma} = 0.22$ mL y $\hat{\tau} = 0.16$ mL.

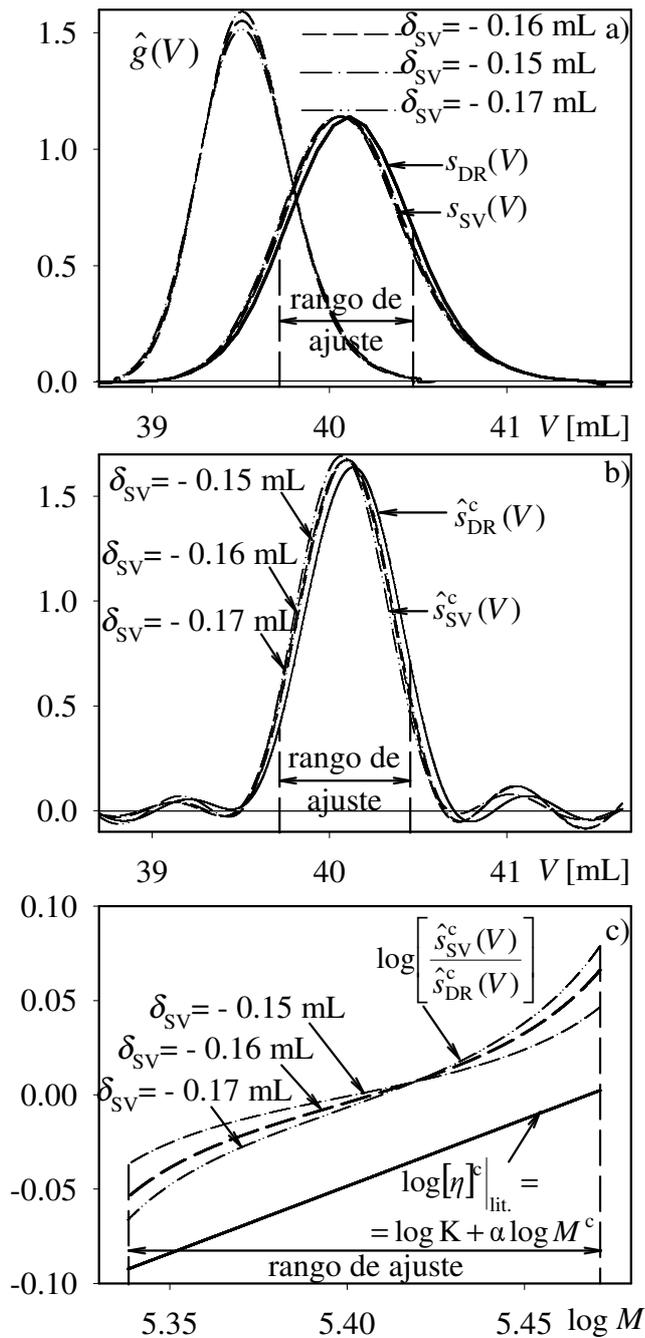


Figura IV.9. Estimación de $g(V)$ (EMG) para PS5 (resultados intermedios para 3 IDV's). a) EMG estimada, $\hat{g}(V)$, cromatogramas DR y SV corregidos por IDV, $s_{DR}(V)$ y $s_{SV}(V)$; b) Cromatogramas DR y SV corregidos por E.I., $\hat{s}_{DR}^c(V)$ y $\hat{s}_{SV}^c(V)$; c) Plot de MHS.

Para $\delta_{SV} = -0.15, -0.16, \text{ y } -0.17$ mL, la Fig. IV.9.a) muestra los cromatogramas normalizados de DR y de SV del paso (ii), y las funciones de E.I.

estimadas resultantes del paso (iii). Los parámetros de las EMGs correspondientes difirieron en menos del 10%, y se obtuvieron funciones de E.I. estimadas similares [representada por $\hat{g}(V)$ en la Fig. IV.9.a)]. Los cromatogramas corregidos por E.I. se representan en la Fig. IV.9.b). La Figura IV.9.c) compara el plot de MHS simulado con los parámetros de la literatura, $\log[\eta]_{\text{lit.}}^c(V)$, con el plot equivalente obtenido a partir de las señales corregidas estimadas, $\log[\hat{s}_{\text{SV}}^c(V)/\hat{s}_{\text{DR}}^c(V)]$. Se seleccionó el δ_{SV} ($= -0.16$ mL) final por comparación de la pendiente estimada con el valor α de literatura.

Para los nueve estándares investigados, la Fig. IV.10. ilustra los pares $\{\delta_{\text{SV}}, \hat{\alpha}\}$ obtenidos con las iteraciones sucesivas, hasta $\hat{\alpha} \cong 0.712$. Se observa una correlación muy lineal, que permite acelerar la convergencia del algoritmo iterativo como sigue: i) después de resolver algunas iteraciones (por ejemplo, 4), se determina la correlación lineal $\hat{\alpha}$ vs. δ_{SV} ; y ii) se calcula el δ_{SV} final a partir de la intersección de la correlación lineal con el valor verdadero α . Es de notar que todas las correlaciones lineales de la Fig. IV.10. exhiben pendientes negativas, pero con magnitudes e intersecciones diferentes. No se observa ninguna tendencia clara con la masa molar. La Tabla IV.5 resume los resultados globales de los parámetros de E.I., los IDV, y las dimensiones n , p , y m para los nueve estándares investigados. El IDV se informó con una precisión superior a 0.01 mL, porque sus valores se obtuvieron a través de la intersección comentada arriba.

El algoritmo fue también aplicado asumiendo $g(V)$'s de forma arbitraria (Capítulo III). La Fig. IV.11 compara las nuevas estimaciones con las EMGs anteriores. Se observa que: i) las estimaciones son suaves y similares a las obtenidas con EMGs; b) para los estándares PS2 – PS7, las EMGs son ligeramente más anchas, y lo contrario ocurre con PS1; y c) los estándares de masa molar más alta (PS8 y PS9) no pueden ajustarse adecuadamente con una EMG, como fuera observado por Busnel *et al.* (2001).

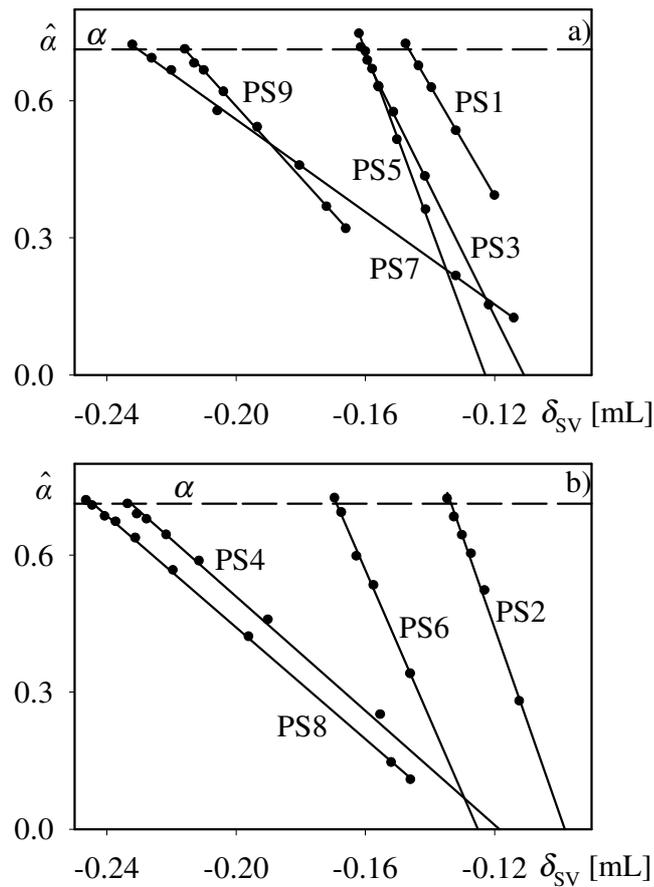


Figura IV.10. Pendientes de MHS estimadas, $\hat{\alpha}$ [paso (v) del algoritmo] (en puntos), y sus correspondientes regresiones lineales (en líneas llenas).

Tabla IV.5. Estimación simultánea de la función de E.I. EMG y del IDV.

Estándar	$\hat{\sigma}$ [mL]	$\hat{\tau}$ [mL]	δ_{sv} [mL]	\hat{n}	\hat{p}	\hat{m}
PS1	0.23	0.17	-0.146	100	131	230
PS2	0.24	0.19	-0.133	100	64	163
PS3	0.28	0.21	-0.161	100	110	209
PS4	0.28	0.17	-0.232	100	84	183
PS5	0.22	0.16	-0.160	100	31	130
PS6	0.27	0.15	-0.169	100	34	133
PS7	0.30	0.17	-0.216	120	64	183
PS8	0.30	0.18	-0.244	120	74	193
PS9	0.25	0.20	-0.230	100	194	293

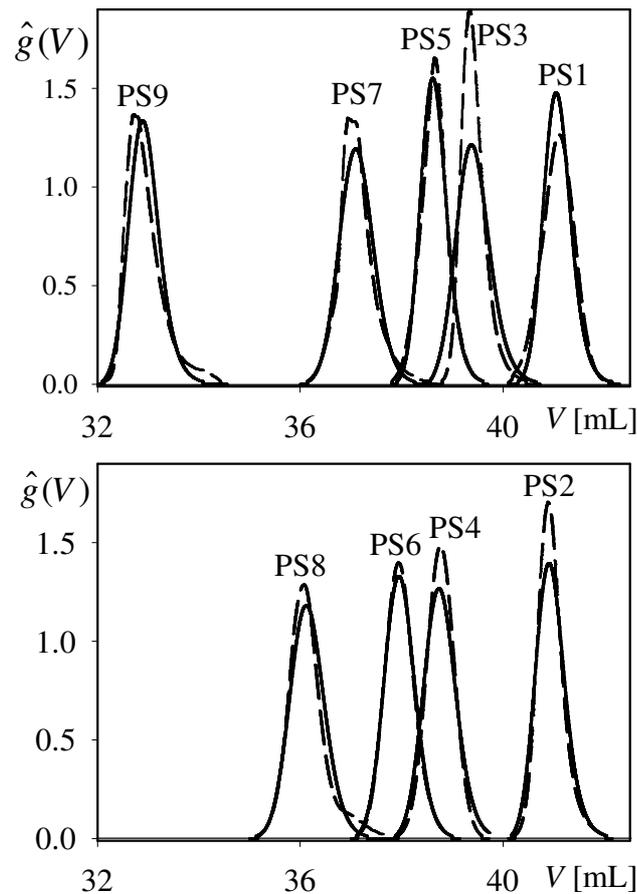


Figura IV.11. Funciones de E.I. finales estimadas para cada estándar, asumiendo funciones EMGs (líneas llenas) y arbitrarias (líneas de trazos).

IV.3.c. Estimación de las DMMs de los Estándares de PS

La estimación final resultante $\hat{g}(V)$ para el estándar PS5 junto con los cromatogramas de DR medido y corregido se presentan en la Fig. IV.12.a). Las pequeñas oscilaciones espúreas en las colas del cromatograma de $\hat{s}_{DR}^c(V)$ no se muestran. La Fig. IV.12.b) compara la DMM calculada sin corrección por E.I., $s_{DR}(\log M^c)$, con la DMM corregida por E.I., $s_{DR}^c(\log M^c)$, donde efectivamente $s_{DR}(\log M^c)$ resulta ensanchada por efecto del E.I. Las masas molares medias de las DMMs de todos los estándares se resumen en la Tabla IV.6. En todos los casos, las masas molares medias están cerca de los valores

nominales informados por los proveedores (Tabla IV.4.). Salvo el estándar PS1, todas las DMMs corregidas por E.I., $\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$, son más angostas que las dadas por $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$. También, para el estándar PS9, las polidispersidades obtenidas de $\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$ fueron ligeramente menores que los valores informados por los proveedores. Errores mayores y polidispersidades sobrestimadas se obtuvieron de $s_{DR}(\log M_{v,MHS})$, probablemente debido a la amplificación de errores en los δ_{SV} estimados, que pueden sobrestimar drásticamente la pendiente de $\log M_{v,MHS}(V)$.

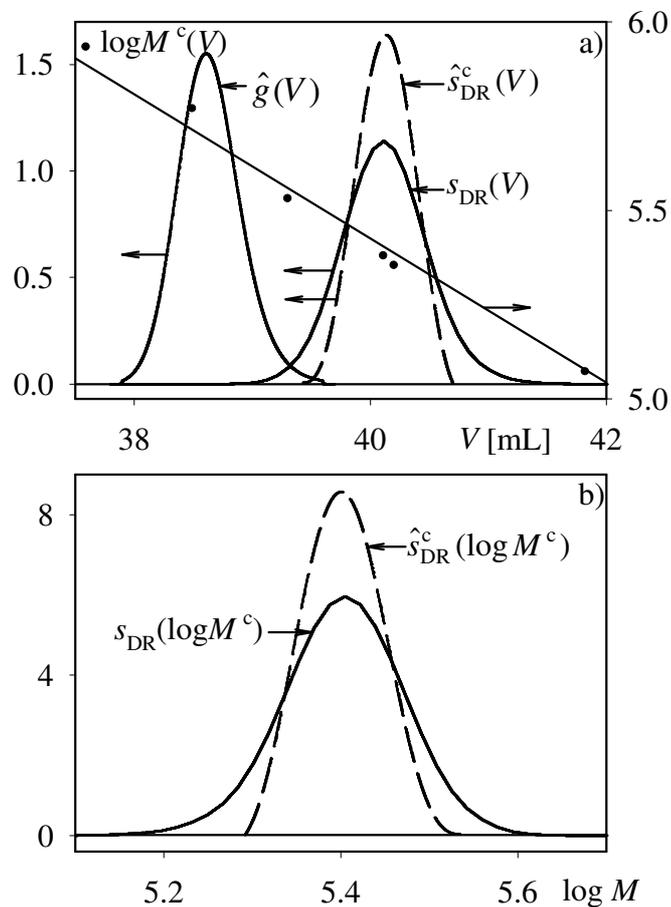


Figura IV.12. DMMs estimadas para el estándar PS5. (a) Función de E.I. final $\hat{g}(V)$, calibración de masa molar, $\log M^c(V)$, y cromatogramas de DR ensanchado y corregido por E.I., $s_{DR}(V)$ y $\hat{s}_{DR}^c(V)$. (b) DMMs ensanchada y corregida por E.I., $s_{DR}(\log M^c)$ y $\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$.

Tabla IV.6. Masas molares medias para los estándares PS1 – PS9.

	DMM	\bar{M}_n [g/mol]	\bar{M}_w [g/mol]	$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$	DMM	\bar{M}_n [g/mol]	\bar{M}_w [g/mol]	$\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$
PS1	$s_{DR}(\log M^c)$	47700	51200	1.07	$s_{DR}(\log \hat{M}_{v,MHS})$	48300	50400	1.045
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	48900	51600	1.05	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	48800	52100	1.07
PS2	$s_{DR}(\log M^c)$	73400	76200	1.04	$s_{DR}(\log \hat{M}_{v,MHS})$	75400	76300	1.013
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	75010	76440	1.02	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	76370	77630	1.02
PS3	$s_{DR}(\log M^c)$	109200	115500	1.06	$s_{DR}(\log \hat{M}_{v,MHS})$	108600	115500	1.06
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	113600	116000	1.02	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	114500	116500	1.02
PS4	$s_{DR}(\log M^c)$	221900	234800	1.06	$s_{DR}(\log \hat{M}_{v,MHS})$	223400	233100	1.04
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	226100	231800	1.03	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	245000	249700	1.02
PS5	$s_{DR}(\log M^c)$	249100	255500	1.03	$s_{DR}(\log \hat{M}_{v,MHS})$	251000	254000	1.04
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	252100	255100	1.01	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	253500	256000	1.01
PS6	$s_{DR}(\log M^c)$	354100	365100	1.03	$s_{DR}(\log \hat{M}_{v,MHS})$	359000	363000	1.013
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	365300	369400	1.01	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	374000	376800	1.01
PS7	$s_{DR}(\log M^c)$	470100	499300	1.06	$s_{DR}(\log \hat{M}_{v,MHS})$	476300	500700	1.05
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	520600	534700	1.03	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	547700	559000	1.02
PS8	$s_{DR}(\log M^c)$	692800	748800	1.08	$s_{DR}(\log \hat{M}_{v,MHS})$	701400	741800	1.06
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	769100	808900	1.05	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	814600	845200	1.04
PS9	$s_{DR}(\log M^c)$	1233000	1562000	1.27	$s_{DR}(\log \hat{M}_{v,MHS})$	1327000	1568000	1.18
	$\hat{s}_{DR}^c(\log M^c)$	1353000	1681000	1.24	$\hat{s}_{DR}^c(\log \hat{M}^c)$	1370000	1693000	1.24

IV.4. Conclusiones

El algoritmo teórico presentado en el Capítulo III fue extendido para calcular simultáneamente la función de E.I. y el IDV, en base a recuperar la pendiente de $\log M^c(V)$, en el caso DR+LS; y el exponente α de MHS, *a priori* conocido, en el caso DR+SV. Se analizaron por SEC/(DR+LS) tres estándares angostos de PS, y sus respectivas fracciones obtenidas por TGIC, con polidispersidades entre 1.010 y 1.019; y nueve estándares angostos de PS, con polidispersidades entre 1.03 y 1.10. En todos los casos, las funciones

de E.I. estimadas resultaron levemente asimétricas, con sus colas hacia altos V 's; excepto para los estándares de mayor masa molar (más cercano al límite de exclusión), donde la asimetría fue mayor, en concordancia con las observaciones de Busnel *et al.* (2001). En la zona central del rango de fraccionamiento, la tendencia de la función de E.I. es incierta.

El algoritmo resultó robusto frente a las incertidumbres en las ganancias de los sensores, en el parámetro K de MHS, y en la concentración de la muestra inyectada, porque tales errores no afectan ni las pendientes de la calibración $\log M^c(V)$ ni la del plot de MHS estimado. Las funciones de E.I. estimadas con formas arbitrarias, resultaron muy similares a las estimaciones logradas con EMGs. Cerca de la convergencia del algoritmo, las funciones de E.I. estimadas resultaron poco afectadas por pequeños errores en el IDV; en cambio, el algoritmo diverge para errores elevados en el IDV.

En el caso analizado de DR+LS, donde los detectores están conectados en serie, se puede asumir un valor de IDV único. Por el contrario, en el caso de DR+SV con los detectores en paralelo, la estimación del IDV resulta más compleja, ya que depende de las masas molares de la muestra analizada. La selección apropiada del IDV es crucial para estimar aceptablemente las DMMs. En el tratamiento de datos comúnmente realizado por los softwares comerciales, donde el IDV se corrige alineando los picos, la polidispersidad de las muestras angostas resulta subestimada. Ese valor del IDV sólo debería ser tomado como una cota máxima del IDV real; y en tal sentido sería útil para chequear los valores finales provistos por el algoritmo.

El problema de estimación de la función de E.I. no es sencillo, y no surgen tendencias claras en el comportamiento de dicha función en la zona central del rango de fraccionamiento. En cambio, la asimetría observada a bajos V 's (cercanos a la exclusión) parece confirmarse con los ejemplos analizados.

CAPÍTULO V. Estudio Teórico sobre los Errores Cometidos

en la Caracterización por SEC de Copolímeros

Lineales y de Homopolímeros Ramificados

V.1. Introducción

Las características más importantes relacionadas con la arquitectura molecular de un copolímero son: a) la naturaleza de las unidades repetitivas; b) la distribución de masas molares (DMM); c) la distribución de composición química (DCQ); d) la distribución de longitudes de secuencia; y e) la distribución de estereorregularidad (Meira *et al.*, 1989). En el caso de un homopolímero ramificado, interesan características tales como: a) la DMM; b) distribución de grados de ramificación (DGR); c) el número medio de ramas por molécula y su variación con la masa molar; d) la funcionalidad de los puntos de ramificación (tri- o tetrafuncionales); y e) la longitud (cortas o largas) y la conformación (estrella, peine, aleatorias) de las ramas (Meira, 1991). Estas características determinan diversas propiedades físicas y químicas del material, y por lo tanto sus propiedades de procesamiento (por ejemplo, los copolímeros con DCQ angostas son deseables desde el punto de vista de sus propiedades finales). Por tal motivo, interesa desarrollar técnicas especiales destinadas a caracterizar este tipo de compuestos. La caracterización molecular de copolímeros o de polímeros ramificados por SEC es difícil, ya que se pierde la relación uno a uno entre la masa molar (M) y el volumen hidrodinámico (V_h) observada en el caso de los homopolímeros lineales, debido a que a un mismo V_h eluyen moléculas con diferente masa molar, composición química (CQ) o número de ramas.

Desde el punto de vista del análisis por SEC, los copolímeros en bloque son más sencillos que los copolímeros estadísticos, debido a que algunas de sus propiedades

(como por ejemplo el incremento del índice de refracción específico, $\partial n/\partial c$, o el V_h) se pueden estimar simplemente promediando las propiedades de los homopolímeros correspondientes (Kilz, 2001). Para tratar de resolver el problema de caracterización de copolímeros, suele recurrirse a la cromatografía ortogonal, en donde se combinan dos formas de separación: la cromatografía líquida de adsorción (LAC) y SEC. En LAC, se separan las macromoléculas según su CQ; y en SEC, cada fracción de composición química uniforme se separa según su M , permitiendo en principio la estimación de la distribución conjunta de M-CQ (Berek, 2000; Kilz, 2001; Horst *et al.*, 2003).

Existen diversos problemas asociados a SEC de copolímeros (Meira *et al.*, 1989). En SEC ideal, la separación se produce de acuerdo a su V_h , por lo que en la celda del detector existirá una DMM y una DCQ instantáneas. Consecuentemente, la medición de cualquier sensor producirá una señal proporcional a algún promedio de la propiedad medida, convenientemente ponderado por las CQs y M s de las moléculas presentes en la celda de detección. Por otra parte, la presencia de mecanismos secundarios de fraccionamiento (como adsorción, partición e inclusión/exclusión iónica) originará un desplazamiento en el tiempo (o en el volumen) de retención. Otra incertidumbre se debe a la solvatación de las moléculas, que resulta agravada cuando dicha solvatación por unidad de volumen es diferente para cada comonomero. Estos mecanismos secundarios no serán considerados en el resto de este Capítulo.

Un copolímero puede ser tratado como un homopolímero desde el punto de vista de la determinación de la DMM por SEC, cuando: (1) la DCQ es muy angosta, o (2) la CQ promedio no cambia con el V_h (Bielsa *et al.*, 1992; Meira y Vega, 2004). En algunos casos particulares, existen métodos aproximados para determinar la DMM de un copolímero. Por ejemplo, la DMM de un copolímero dibloque SB (estireno-butadieno) puede estimarse a partir de los cromatogramas DR y UV. En tal caso, la masa instantánea

de copolímero se calcula con la Ec. (I.40); y la calibración de masas molares *ad hoc* (para el copolímero en análisis), se calcula a partir de alguno de los métodos comentados en el Capítulo I [Ecs (I.41) y (I.42)], que a su vez requieren de la fracción másica instantánea de PS en el copolímero, $p_S(V)$, derivada por combinación de las mismas señales medidas [Ec. (I.45)].

En los homopolímeros ramificados, la presencia de ramas cortas afecta las propiedades del polímero en estado sólido, mientras que las ramas largas introducen cambios en sus propiedades viscométricas (Meira, 1991). Las ramas largas reducen el V_h de las moléculas ramificadas con respecto al de sus homólogas lineales (de la misma naturaleza química y masa molar). En SEC, y bajo idénticas condiciones cromatográficas, una molécula ramificada eluye a un V mayor que su homóloga lineal, debido a que la primera presenta una estructura más compacta en solución. Como consecuencia, en la celda del detector existirán una DMM y una DGR instantáneas; y cualquier sensor proveerá una señal proporcional a un promedio de la propiedad medida. Como una ventaja frente al caso de los copolímeros, es más razonable asumir que $\partial n/\partial c$ no es afectado por el número de ramas, y entonces la señal del sensor DR será proporcional a la masa. Sin embargo, otras propiedades (por ejemplo, la viscosidad específica instantánea), dependerá de la DGR presente en la celda. Un homopolímero ramificado puede ser tratado como un homopolímero lineal desde el punto de vista de la determinación de su DMM, cuando: (1) la DMM y la DGR instantáneas son angostas, o (2) el número medio de ramas por molécula aumenta de forma monótona con la masa molar (Meira y Vega, 2004a).

En este Capítulo, se proponen modelos representativos del proceso de fraccionamiento SEC ideal de dos polímeros cromatográficamente complejos (un copolímero lineal di-bloque, y un homopolímero ramificado, con ramas trifuncionales largas); y se derivan expresiones para calcular los cromatogramas libres de E.I. provistos

por diversos sensores (DR, UV, LS, etc). El objetivo final, es cuantificar los errores que se cometen cuando se estiman la DMM, la DCQ y la DGR por métodos convencionales, cuando se utiliza SEC con doble detección o con detección de masa molar. Para ello, se desarrollan ejemplos sintéticos con distribuciones conocidas *a priori*, y se analizan los errores cometidos comparando los valores “reales” de esas distribuciones originales con los resultados que se obtendrían en la práctica, al aplicar los métodos clásicos.

V.2. Modelo de Fraccionamiento SEC de un Copolímero Dibloque

En esta sección, se estudia en forma teórica el fraccionamiento SEC de un copolímero dibloque; y se predicen los cromatogramas de índice de refracción [$s_{DR}(V)$], de absorción UV [$s_{UV}(V)$] y de dispersión de luz [$s_{LS}(V)$], cuando se supone conocida la distribución conjunta de masas molares y composiciones químicas. Se considera exclusivamente el fraccionamiento del copolímero en condiciones de SEC ideal, descartándose otras distorsiones producidas tanto por el E.I. como por mecanismos de fraccionamiento secundario.

V.2.a. Predicción de Variables asociadas al Fraccionamiento de las Moléculas del Copolímero Dibloque

Se asumen las siguientes hipótesis: a) validez del concepto de calibración universal; b) aditividad de los V_h de los bloques que componen el copolímero; y c) las constantes de MHS del copolímero se obtienen interpolando las constantes de los comonómeros en base a la composición química. La hipótesis a) es consistente con la propuesta de SEC ideal, y las hipótesis b) y c) son normalmente adoptadas en el caso de copolímeros dibloque (Kilz, 2001).

Se denominará “molécula (i,j)” a una molécula de copolímero SB que posea

'*i*' unidades repetitivas de S más '*j*' unidades repetitivas de B. Entonces, una molécula (*i,j*) tendrá una masa molar [$M_{SB}(i,j)$], y una fracción másica de S [$p_S(i,j)$], dadas por:

$$M_{SB}(i, j) = M_S(i) + M_B(j) = M_{S,0} i + M_{B,0} j \quad (\text{V.1.a})$$

$$p_S(i, j) = \frac{M_S(i)}{M_S(i) + M_B(j)} = \frac{M_{S,0} i}{M_{S,0} i + M_{B,0} j} \quad (\text{V.1.b})$$

donde $M_{S,0}$ (= 104.15 g/mol) y $M_{B,0}$ (= 54.09 g/mol) son las masas molares de los comonómeros S y B, respectivamente; y $M_S(i)$ y $M_B(j)$ son las masas molares de los bloques de S y B, respectivamente.

En base a la hipótesis b), el volumen hidrodinámico de la molécula de copolímero, $V_{h,SB}(i,j)$, se obtiene sumando los volúmenes hidrodinámicos aportados independientemente por cada bloque; es decir:

$$V_{h,SB}(i, j) = K_S M_S(i)^{[\alpha_S+1]} + K_B M_B(j)^{[\alpha_B+1]} = [\eta]_{SB}(i,j) M_{SB}(i,j) = J(V) \quad (\text{V.1.c})$$

donde K_S (= $1.279 \cdot 10^{-4}$ dL/g), K_B (= $2.560 \cdot 10^{-4}$ dL/g), α_S (= 0.712) y α_B (= 0.740) son las constantes de MHS de los homopolímeros de S y de B, respectivamente; y $[\eta]_{SB}(i,j)$ es la viscosidad intrínseca de la molécula de copolímero. [La igualdad final de la Ec. (V.1.c) resulta de la hipótesis a), donde $J(V)$ es la calibración universal, en general no lineal].

Combinando las Ecs (V.1.a) y (V.1.c), resulta:

$$[\eta]_{SB}(i, j) = \frac{K_S M_S(i)^{[\alpha_S+1]}}{M_S(i) + M_B(j)} + \frac{K_B M_B(j)^{[\alpha_B+1]}}{M_S(i) + M_B(j)} \quad (\text{V.1.d})$$

Combinando las Ecs (V.1.b) y (V.1.c), resulta:

$$\begin{aligned} [\eta]_{SB}(i, j) &= p_S(i, j) K_S M_S(i)^{\alpha_S} + [1 - p_S(i, j)] K_B M_B(j)^{\alpha_B} \\ &= p_S(i, j) [\eta]_S(i) + [1 - p_S(i, j)] [\eta]_B(j) \end{aligned} \quad (\text{V.1.e})$$

donde $[\eta]_S(i)$, $[\eta]_B(j)$ son las viscosidades intrínsecas correspondientes a cada bloque. La

Ec. (V.1.e) indica que $[\eta]_{SB}(i,j)$ resulta de la suma de las viscosidades intrínsecas de cada bloque ponderadas con sus respectivas fracciones másicas.

Cuando la calibración universal $J(V)$ es conocida, las Ecs (V.1.a) y (V.1.c) permiten calcular el volumen V_{SB} al que eluye cualquier molécula (i, j) . Por ejemplo, en el caso particular de una calibración universal lineal, $\log J(V) = A - B V$, resulta:

$$V_{SB}(i, j) = \frac{A}{B} - \frac{1}{B} \log \left[K_S M_S(i)^{(\alpha_S+1)} + K_B M_B(j)^{(\alpha_B+1)} \right] \quad (\text{V.1.f})$$

Las Ecs (V.1.a-f) son funciones (bivariantes) representativas de propiedades asociadas a una molécula (i,j) aislada; y en tal sentido, son independientes de la DMM y/o de la DCQ del copolímero analizado. Así, la masa molar [Ec. (V.1.a)] y la fracción másica de S [Ec. (V.1.b)], dependen exclusivamente de los comonómeros intervinientes; el volumen hidrodinámico [Ec. (V.1.c)] y la viscosidad intrínseca [Ecs (V.1.d,e)], dependen del comportamiento de la molécula en solución (a través de las constantes de MHS); y el volumen de retención al que finalmente eluye la molécula [Ec. (V.1.f)], depende también del sistema cromatográfico, caracterizado por la calibración universal, $J(V)$.

A efectos de visualizar gráficamente estas expresiones, se seleccionó un rango arbitrario de longitudes de cadena de bloque (i,j) , resultando un rango de masas molares $M_{SB} < 900000$ g/mol. En la Fig. V.1. se representan las funciones (bivariantes) $p_S(M_S, M_B)$ y $V_{h,SB}(M_S, M_B)$, calculadas con las Ecs (V.1.a-c). La función p_S [Fig. (V.1.a)] exhibe un esperado aumento con M_S (a M_B fijo); y una moderada disminución con M_B (a M_S fijo). La función $V_{h,SB}$ [Fig. (V.1.b)] predice una razonable monotonía creciente con las masas molares de cada bloque; pero no así con la masa molar del copolímero, como se analizará más adelante. Ambas funciones exhiben una mayor sensibilidad con respecto a M_S (que con respecto a M_B), debido a su masa molar más elevada ($M_S \approx 2 M_B$). Claramente, estas tendencias observadas podrían revertirse para otros polímeros.

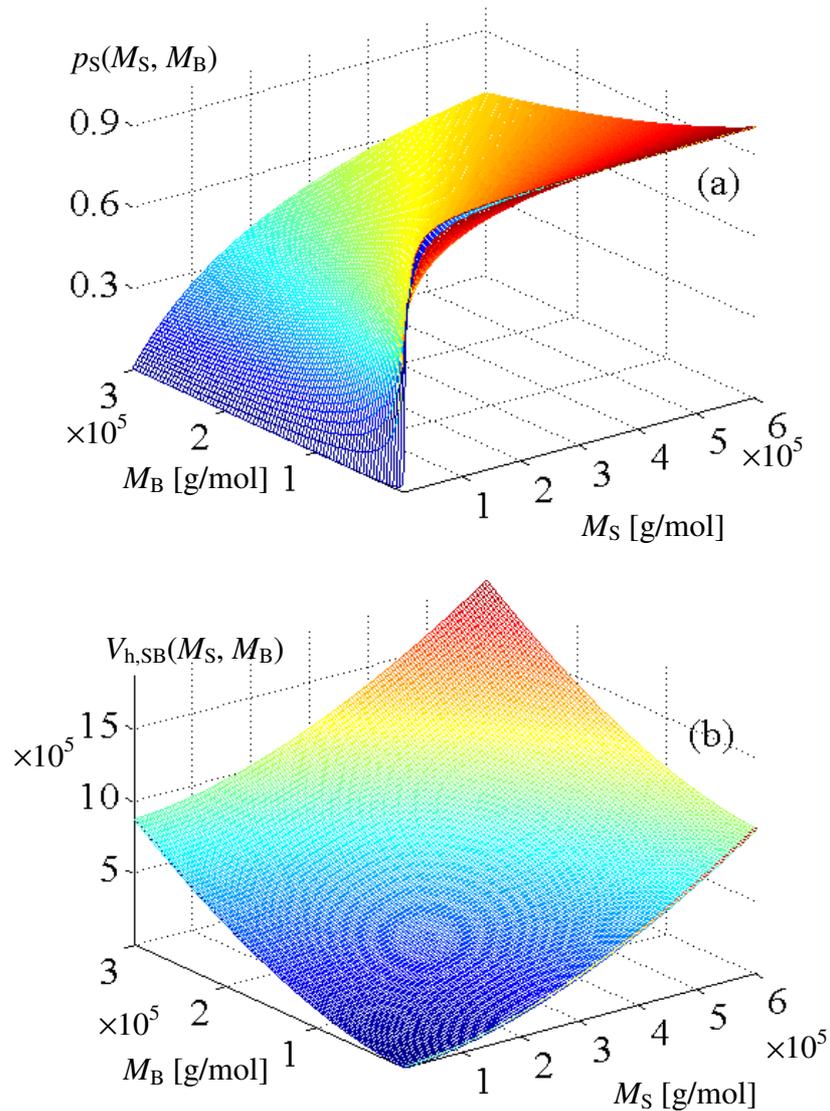


Figura V.1. Fracción másica de S (a) y volumen hidrodinámico (b) de las moléculas (i,j) de un copolímero dibloque SB.

En la Fig. V.2.a) se representa la función (bivariable) $[\eta]_{SB}(M_S, M_B)$, calculada con las Ecs (V.1.a,d,e). A bajas masas molares, la función $[\eta]_{SB}$ exhibe un comportamiento algo inesperado *a priori*, dado que evidencia una leve disminución al incrementarse las unidades de S ligadas al copolímero (en base a la ecuación de MHS, la $[\eta]$ de un homopolímero siempre aumenta con M). Este comportamiento depende de los parámetros de MHS asociados a cada bloque del copolímero, y por lo tanto podría variar considerablemente para moléculas formadas por otros comonómeros. Para una mejor

comprensión, en la Fig. V.2.b) se muestran algunas “curvas de nivel” de $[\eta]_{SB}(M_S, M_B)$. La recta horizontal correspondiente a $M_B = 150000$ g/mol permite visualizar que $[\eta]_{SB}$ disminuye desde 1.72 dL/g (a M_S bajos) hasta aproximadamente 1.28 dL/g (a $M_S \cong 325000$ g/mol), para después aumentar monótonamente a M_S más elevados. Las dos rectas (paralelas) representan moléculas de copolímero de masa molar constante ($M_{SB} = 330000$ g/mol, y $M_{SB} = 535000$ g/mol). La intersección de cada recta con las distintas curvas de nivel indican la existencia de moléculas de copolímero de igual masa molar y diferente viscosidad intrínseca, que por lo tanto eluirán a diferentes volúmenes de retención.

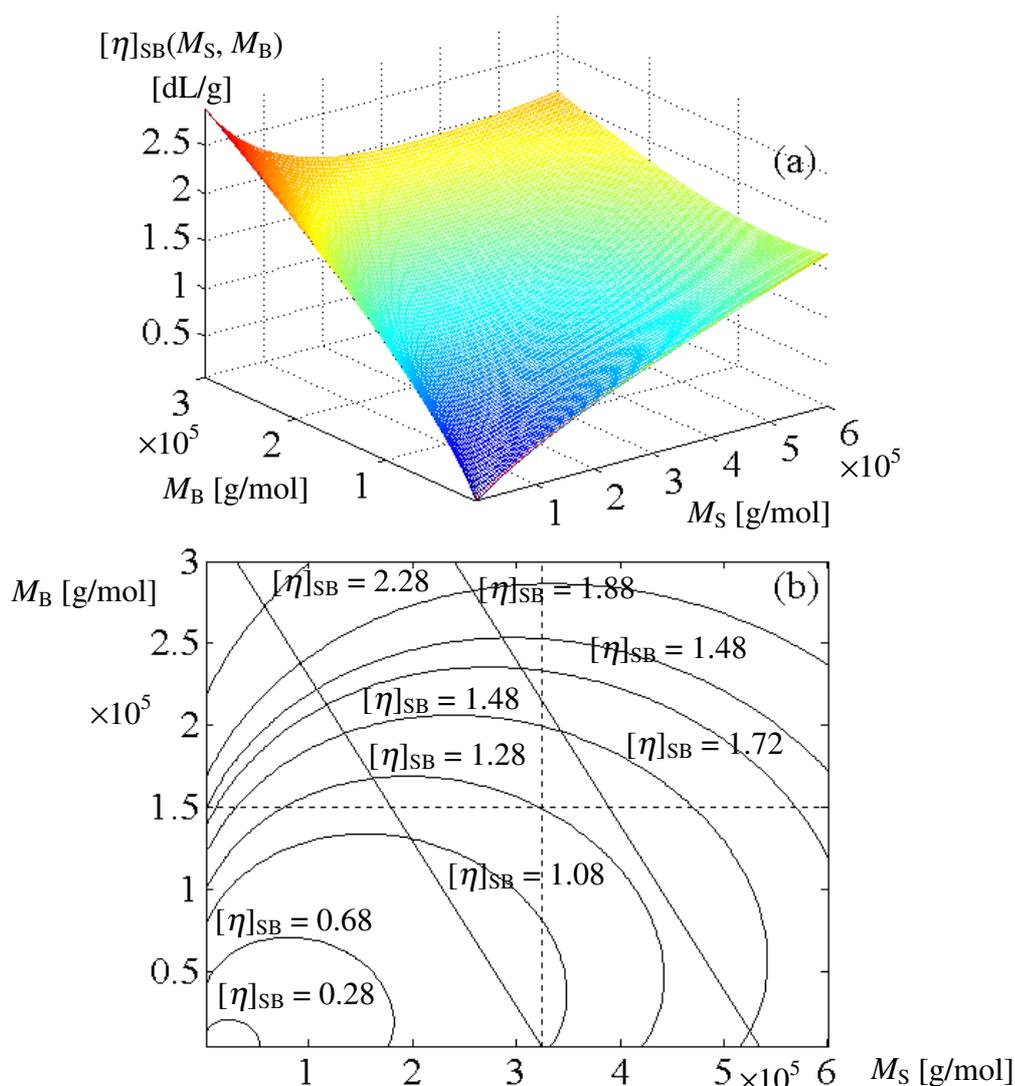


Figura V.2. (a) Viscosidad intrínseca del copolímero $\{[\eta]_{SB}(i,j)\}$; (b) Curvas de nivel para $[\eta]_{SB}(i,j)$.

La Fig. V.3.a) representa el volumen $V_{SB}(i,j)$ [Ec. (V.1.f)] al que eluye cada molécula (i,j) de copolímero (los ejes M_B y M_S se seleccionaron en sentido decreciente para permitir una mejor visualización del gráfico). Esta función vincula longitudes de cadena (o equivalentemente masas molares) con volúmenes de retención, y en tal sentido constituye una “superficie de calibración de masas molares”. Como era de esperar, los valores más elevados de $V_{SB}(i,j)$ corresponden a las moléculas más pequeñas (de menor $V_{h,SB}$), que invierten mayor tiempo en su tránsito por las columnas.

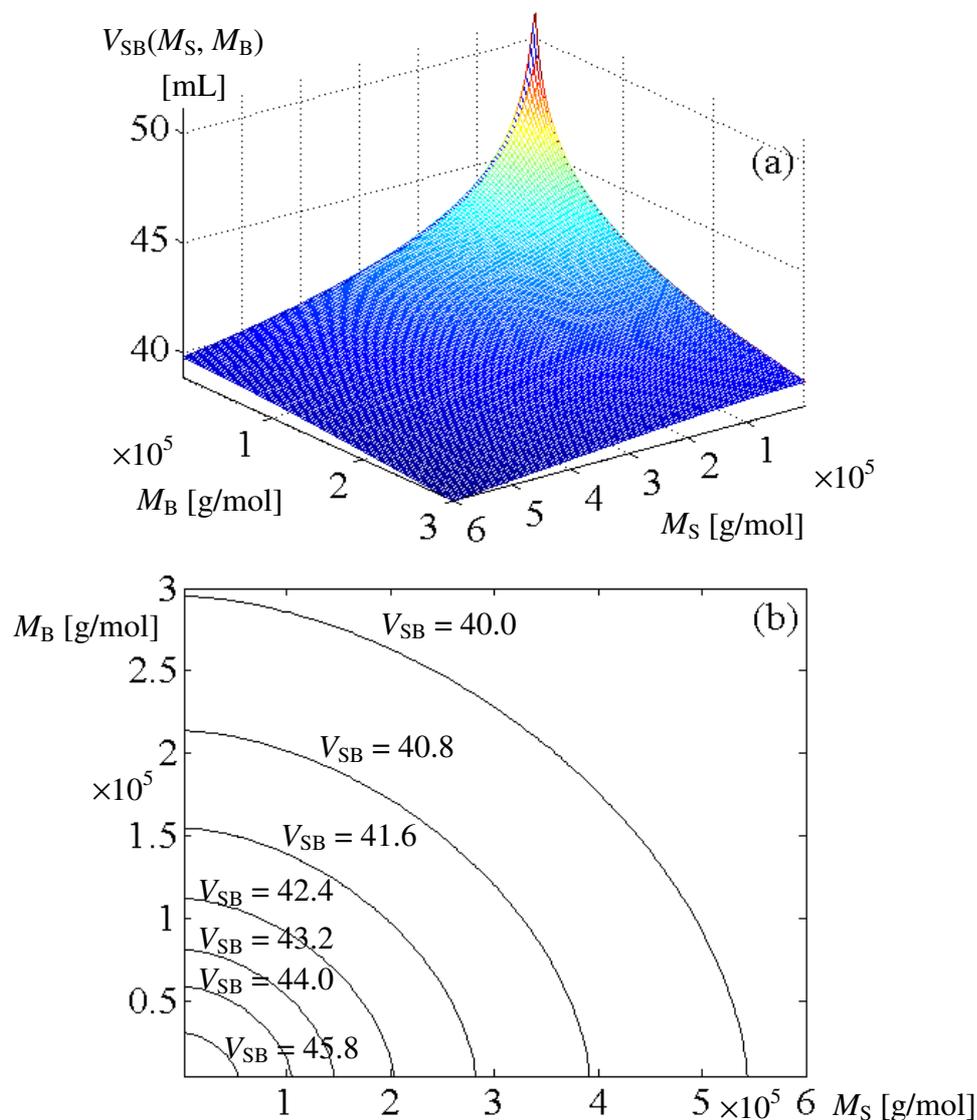


Figura V.3. (a) Volumen de retención del copolímero [$V_{SB}(i,j)$]; (b) Curvas de nivel para $V_{SB}(i,j)$.

Como se preveía, $V_{SB}(i,j)$ resulta una función no-biyectiva; es decir, a un V_{SB} fijo, existe una diversidad de pares $\{M_S(i), M_B(j)\}$ [representados como curvas de nivel en la Fig. V.3.b)] que satisfacen la Ec. (V.1.f). Cada una de estas curvas representa la presencia de moléculas (i,j) de distintas masas molares eluyendo a un V_{SB} fijo, y por lo tanto justifican la existencia (a ese V_{SB}) de una DMM instantánea. Además, esos mismos pares $\{M_S(i), M_B(j)\}$ se corresponden con diferentes valores de $p_S(i,j)$ [como lo predicen la Ec. (V.1.b) y la Fig. V.1.a)]. Entonces, cada punto de una curva de nivel está también asociado con una fracción másica diferente, justificando la existencia adicional de una DCQ instantánea al V_{SB} correspondiente. La determinación precisa de esas DMM y DCQ instantáneas será posible sólo cuando se conozca la masa asociada a cada molécula (i,j) .

Para el cálculo de los cromatogramas del copolímero dibloque (presentado en una sección posterior de este capítulo), resultan de particular interés diversas curvas de nivel. Dichas curvas permiten definir “dominios” de moléculas (i,j) que satisfacen determinada condición. Por ejemplo, la curva de nivel “41.6 mL” de la Fig. V.3.b) permite evaluar el conjunto de moléculas (i,j) que eluyen a 41.6 mL [o dominio $D_{41.6}(i,j)$], y que se calcula igualando la Ec. (V.1.f) al valor 41.6 mL. A continuación se definen más rigurosamente algunos dominios:

$$D_V(i, j) = \{(i, j) : V_{SB}(i, j) = V\} \quad (\text{V.2.a})$$

$$D_M(i, j) = \{(i, j) : M_{SB}(i, j) = M\} \quad (\text{V.2.b})$$

$$D_p(i, j) = \{(i, j) : p_S(i, j) = p\} \quad (\text{V.2.c})$$

donde el dominio $D_V(i,j)$ representa el conjunto de pares (i,j) cuyas correspondientes moléculas eluyen a $V_{SB} = V$; el dominio $D_M(i,j)$ representa el conjunto de pares (i,j) cuyas correspondientes moléculas tienen una masa molar $M_{SB} = M$; y el dominio $D_p(i,j)$ representa el conjunto de pares (i,j) cuyas correspondientes moléculas tienen una fracción

másica de S $p_S = p$. El dominio D_V se calcula igualando la Ec. (V.1.f) al valor constante V . El dominio D_M se calcula igualando la Ec. (V.1.a) al valor constante M . El dominio D_p se calcula igualando la Ec. (V.1.b) al valor constante p . En particular, las curvas de nivel de la Fig. V.2.b) están asociadas a diferentes dominios D_V ; y las rectas paralelas de 330000 g/mol y 535000 g/mol de la Fig. V.2., corresponden a dos dominios D_M .

V.2.b. Cálculo de los Cromatogramas (Libres de E.I.) de un Copolímero

Dibloque de SB

Para calcular (simular) cualquier cromatograma de un copolímero, debe asumirse conocida la distribución conjunta (en masa) de masas molares y composición química [representada por $W_c(M_{SB}, p_S)$]; o alternativamente, la distribución bivariable (en masa) de masas molares [representada por $W_{SB}(M_S, M_B)$]. A su vez, cualquiera de estas dos distribuciones puede derivarse a partir de la otra, mediante el cambio de las abscisas, calculado con las Ecs (V.1.a,b), más una transformación adecuada de las ordenadas, similar a la descrita en el Capítulo I. En base a estas consideraciones, se trabajará a continuación con $W_{SB}(M_S, M_B)$; o, equivalentemente, con la distribución bivariable de masa molar, $W_{SB}(i, j)$, que describe la masa correspondiente a todas las moléculas de copolímero formadas por ' i ' unidades repetitivas de S más ' j ' unidades repetitivas de B. La DCQ es una distribución univariable [representada por $w_p(p_S)$], que representa la masa w_p correspondiente a todas las moléculas de copolímero que poseen una fracción másica p_S .

El procedimiento para calcular los cromatogramas involucra dos pasos secuenciales, consistentes en calcular: (i) las DMM y DCQ instantáneas presentes en la celda; y (ii) la señal que proveerá un dado sensor (DR, UV, LS), en presencia de las distribuciones mencionadas. El paso (i) resulta de combinar la DMM bivariable $W_{SB}(i, j)$ con el fraccionamiento sufrido por las moléculas (i, j) , según lo calculado en el punto

V.2.a). La señal final asociada al paso (ii) depende de las características del sensor. A continuación se describen en detalle cada uno de estos pasos.

V.2.b.i) Cálculo de las Distribuciones Instantáneas

La DMM bivariable instantánea, $W_V(i,j)$, representa la masa de aquellas moléculas (i,j) que eluyen a cada volumen de retención V ; y se calcula como:

$$W_V(i,j) = W_{SB}(i,j) \Big|_{D_V(i,j)} \quad (\text{V.3})$$

El segundo miembro de la Ec. (5.3) debe entenderse como la suma de las masas de la DMM bivariable $W_{SB}(i,j)$ restringida a la línea de contorno definida por el dominio $D_V(i,j)$. De la misma forma, la función bivariable $M_V(i,j)$ representa las masas molares de aquellas moléculas (i,j) que eluyen a V ; y se calcula como:

$$M_V(i,j) = M_{SB}(i,j) \Big|_{D_V(i,j)} \quad (\text{V.4})$$

También, la función bivariable $p_V(i,j)$ representa la fracción másica de S en aquellas moléculas (i,j) que eluyen a V ; y se calcula como:

$$p_V(i,j) = p_S(i,j) \Big|_{D_V(i,j)} \quad (\text{V.5})$$

La DMM univariable instantánea, $w_V(M)$, representa la masa de las diversas moléculas de copolímero con masa molar M que eluyen a V ; y se calcula sumando las masas de todas las moléculas de la distribución instantánea $W_V(i,j)$, que además pertenezcan al dominio D_M . Esta suma se representa por la siguiente expresión:

$$w_V(M) = \sum_{D_M} W_V(i,j) \quad (\text{V.6})$$

En forma similar, la DCQ univariable instantánea, $w_V(p)$, representa la masa de las diversas moléculas de copolímero con fracción másica p_S que eluyen a V ; y se

calcula sumando las masas de todas las moléculas de la distribución instantánea $W_V(i,j)$, que además pertenezcan al dominio D_p ; es decir:

$$w_V(p) = \sum_{D_p} W_V(i, j) \quad (\text{V.7})$$

La masa de copolímero instantánea, $w(V)$, la fracción másica media de S instantánea, $p_S(V)$, y la masa molar media (en peso) instantánea, $M_w(V)$, se calculan como:

$$w(V) = \sum_{D_V} W_V(i, j) \quad (\text{V.8.a})$$

$$p_S(V) = \frac{\sum_{D_V} [p_V(i, j) W_V(i, j)]}{w(V)} \quad (\text{V.8.b})$$

$$M_w(V) = \frac{\sum_{D_V} [M_V(i, j) W_V(i, j)]}{w(V)} \quad (\text{V.8.c})$$

Finalmente, la DMM univariable global, $w(M)$, y la DCQ univariable global, $w(p)$, pueden calcularse a partir de las distribuciones instantáneas, según:

$$w(M) = \sum_V w_V(M) \quad (\text{V.9.a})$$

$$w(p) = \sum_V w_V(p) \quad (\text{V.9.b})$$

Estas distribuciones deben coincidir con los valores calculados directamente a partir de la DMM bivariable original, $W_{SB}(i,j)$, según:

$$w(M) = \sum_{D_M} W_{SB}(i, j) \quad (\text{V.10.a})$$

$$w(p) = \sum_{D_p} W_{SB}(i, j) \quad (\text{V.10.b})$$

V.2.b.ii) Cálculo de los Cromatogramas

Debido a la variedad de masas molares y composiciones químicas existentes en la celda de detección a cada V , cualquier sensor sólo podrá medir algún valor medio o global de las distribuciones instantáneas. Por ejemplo, un DR, un LS y un UV generarán los cromatogramas $s_{DR}(V)$, $s_{UV}(V)$ y $s_{LS}(V)$, dados por las Ecs (I.24), (I.27) y (I.29):

$$s_{DR}(V) = \{K_{DR,S} p_S(V) + K_{DR,B} [1 - p_S(V)]\} w(V) \quad (V.11.a)$$

$$s_{UV}(V) = K_{UV,S} p_S(V) w(V) \quad (V.11.b)$$

$$s_{LS}(V) = K_{LS} M_w(V) w(V) \quad (V.11.c)$$

En la Ec. (V.11.b), se despreció la absorbancia UV del PB. Las Ecs (V.11) también pueden escribirse en función de las distribuciones instantáneas, reemplazando $w(V)$, $p_S(V)$ y $M_w(V)$, por sus expresiones en las Ecs. (V.8), según:

$$s_{DR}(V) = K_{DR,S} \sum_{D_V} [p_V(i, j) W_V(i, j)] + K_{DR,B} \left[\sum_{D_V} W_V(i, j) - \sum_{D_V} [p_V(i, j) W_V(i, j)] \right] \quad (V.12.a)$$

$$s_{UV}(V) = K_{UV} \sum_{D_V} [p_V(i, j) W_V(i, j)] \quad (V.12.c)$$

$$s_{LS}(V) = K_{LS} \sum_{D_V} [M_V(i, j) W_V(i, j)] \quad (V.12.b)$$

V.2.c. Ejemplo de Simulación

Para construir la DMM bivariable del copolímero, se procedió de la siguiente manera: 1) se generó una DMM (angosta) de Poisson ($\lambda = 100$, Apéndice I) para el bloque PB; 2) se generó una DMM (ancha) de Schulz-Flory ($a = 0.05$, Apéndice I), para el bloque PS; y 3) se formaron las moléculas de copolímero SB de manera tal que toda molécula de

PS tenga la misma probabilidad de unirse con cualquiera de las moléculas de PB. En la Figura V.4. se muestran las DMMs univariadas de los bloques PS y PB [$w_S(M_S)$, $w_B(M_B)$], y la DMM bivariable del copolímero [$W_{SB}(i,j)$]. En la Tabla V.1. se indican las masas molares medias y las polidispersidades de $w_S(M_S)$, $w_B(M_B)$ y $W_{SB}(i,j)$. La fracción másica global de S en $W_{SB}(i,j)$ resultó: $p_S = 0.28$.

Tabla V.1. Valores medios y polidispersidades de las DMMs de los bloques PS y PB, y de la distribución bivariable

	\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_w/\bar{M}_n
Bloque PS	2076	4008	1.93
Bloque PB	5046	5460	1.01
$W_{SB}(i,j)$	7480	8060	1.08

A efectos de simular el fraccionamiento SEC y los cromatogramas DR y UV, se adoptaron la calibración universal: $\log J(V) = 18.09 - 0.3041 V$, y las siguientes constantes para los sensores: $K_{DR,S} = 272300$, $K_{DR,B} = 223500$, $K_{UV,S} = 25800$, y $K_{LS} = 0.2$.

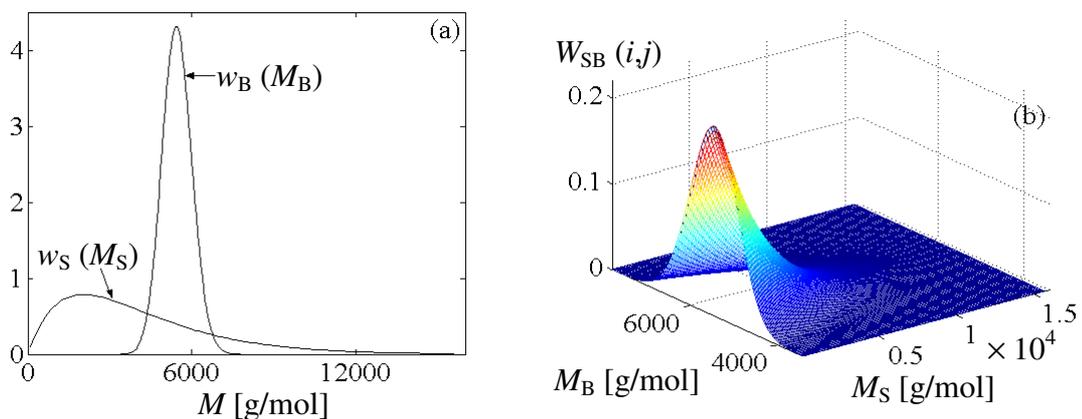


Figura V.4. a) DMMs univariadas de los homopolímeros PS y PB [$w_S(M_S)$, $w_B(M_B)$]; b) DMM bivariables del copolímero, $W_{SB}(i,j)$.

En la Fig. V.5. se muestran cuatro DMMs bivariables instantáneas, $W_V(i,j)$ [Ec.(V.3)], para los 2 V extremos (donde las DMM son angostas), y 2 V intermedios (donde las DMM son más anchas). El aspecto ruidoso observado en algunas DMMs se debe a las aproximaciones numéricas por discretización. La base de cada DMM (su intersección con el plano M_S - M_B de ordenadas nulas), representa el dominio D_V correspondiente (o curvas de nivel de la Fig. V.3.).

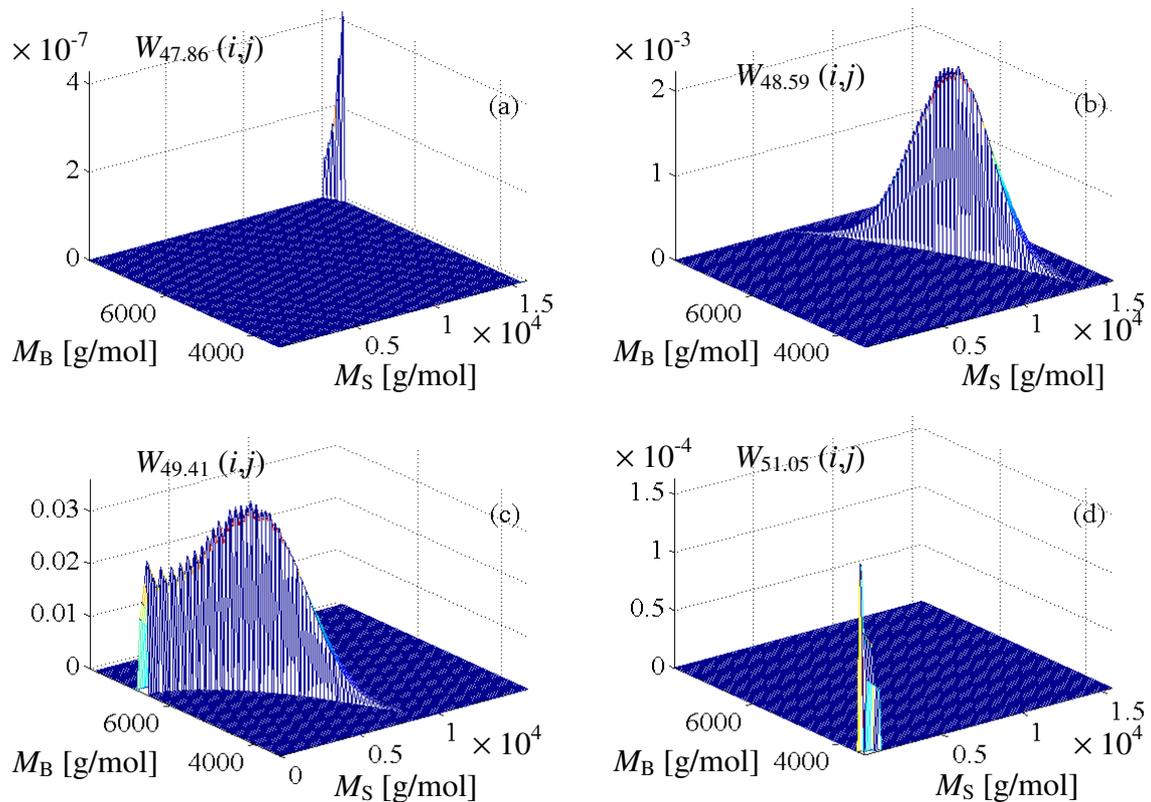


Figura V.5. DMM bivariables instantáneas $W_V(i,j)$, para 4 V diferentes: (a) $V = 47.86$ mL; (b) $V = 48.59$ mL; (c) $V = 29.41$ mL; (d) $V = 51.05$ mL.

En la Fig. V.6.a) se muestran las DMMs univariables instantáneas [$w_V(M)$, Ec. (V.6)] y la DMM global [$w(M)$, Ec. (V.9.a)]. En la Fig. V.6.b) se muestran las DCQs univariables instantáneas [$w_V(p)$, Ec. (V.7)] y la DCQ global [$w(p_s)$, Ec. (V.9.b)]. Ambas distribuciones globales fueron chequeadas con las Ecs. (V.10). En las distribuciones de la Fig. V.6. se observa que la mayor masa eluye a $V \cong 49.82$ mL. En general, las DCQs

instantáneas son muy anchas, verificándose entonces un fraccionamiento prácticamente nulo por composición química.

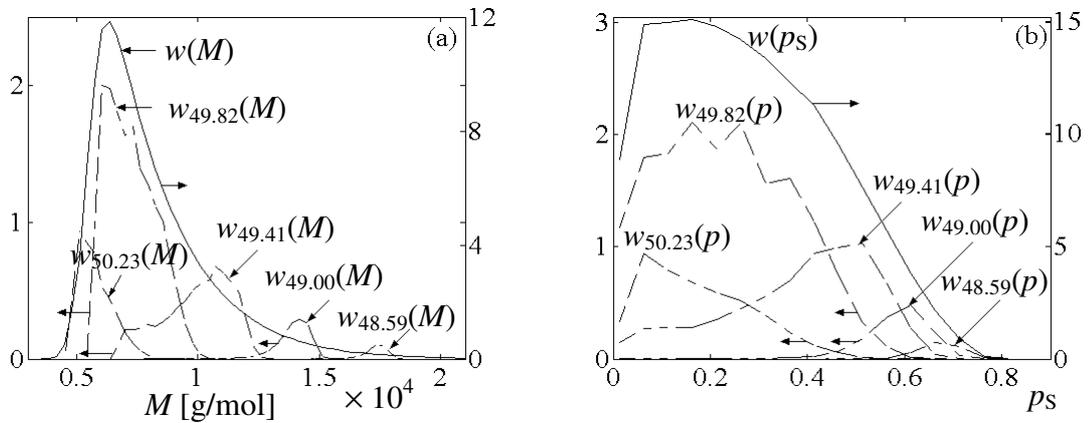


Figura V.6. Distribuciones del copolímero SB: (a) DMMs univariables instantáneas y global; (b) DCQs univariables instantáneas y global.

En la Fig. V.7.a) se representan los cromatogramas $s_{DR}(V)$, $s_{LS}(V)$ y $s_{UV}(V)$, simulados con las Ecs (V.12). Tanto $s_{LS}(V)$ como $s_{UV}(V)$ resultan levemente desplazados hacia menores V 's con respecto a $s_{DR}(V)$. Además, se representa la masa de copolímero instantánea $w(V)$ [Ec. (V.8.a)] que resulta intermedia entre los cromatogramas $s_{DR}(V)$ y $s_{UV}(V)$, debido a que los últimos son funciones de $w(V)$ pesadas por $p_S(V)$ [Ecs (V.11)]. En la Fig. V.7.b) se muestran las calibraciones de masas molares $\log M_S(V)$ y $\log M_B(V)$, correspondientes a los homopolímeros [Ec. (I.37)] $\log M_S(V) = (\alpha_S + 1)^{-1} [\log J(V) - \log K_S]$ y $\log M_B(V) = (\alpha_B + 1)^{-1} [\log J(V) - \log K_B]$; y las siguientes calibraciones alternativas del copolímero: (i) la “exacta”, $\log M_w(V)$, calculada con la Ec. (V.8.c); y (ii) las “aproximadas” (calculadas por los métodos convencionales), $\log M_1(V)$ [Ec. (I.41), (Runyon *et al.*, 1969)], y $\log M_2(V)$ [Ec. (I.42), (Chang, 1971)]. Como se esperaba, la calibración de (i) se superpone totalmente con su estimación a partir de los cromatogramas DR y LS [Ec. (I.38)].

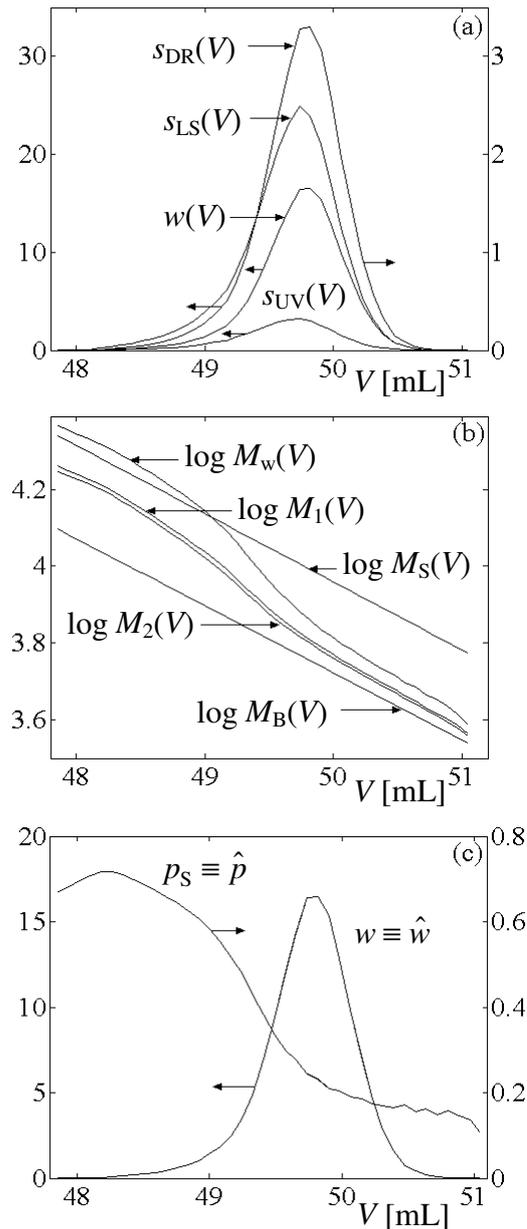


Figura V.7. a) Cromatogramas medidos; b) calibraciones de PS y PB [$\log M_S(V)$, $\log M_B(V)$] y del copolímero [$\log M_w(V)$, $\log M_1(V)$ y $\log M_2(V)$]; c) masa instantánea [$w(V)$], y fracción másica de S instantánea [$p_S(V)$].

Todas las calibraciones del copolímero son no lineales. Las calibraciones $\log M_1(V)$ y $\log M_2(V)$ son muy similares entre sí, y se encuentran incluidas dentro del rango de M 's impuestos por las calibraciones de los homopolímeros. La calibración $\log M_w(V)$ es apreciablemente diferente a $\log M_1(V)$ [o $\log M_2(V)$]; y para $V < 49.1$ mL predice masas molares superiores a las del PS. Este comportamiento singular se debe a la

elevada variedad de moléculas diferentes presentes a un mismo V ; y particularmente a la existencia de DCQs instantáneas muy anchas. Si las DCQs instantáneas fuesen angostas, $\log M_w(V)$ caería dentro de las calibraciones de los homopolímeros. Esta hipótesis subyace en los planteos convencionales de Runyon *et al.* (1969) y Chang (1971), y origina entonces masas molares medias estimadas inferiores a las reales.

En la Fig. V.7.c) se muestran la masa instantánea de copolímero [$w(V)$, Ec. (V.8.a)] y la fracción másica instantánea de S [$p_S(V)$, Ec. (V.8.b)]. Como se esperaba, ambas funciones se superponen perfectamente con sus estimaciones a partir de los cromatogramas DR y UV [Ec. (I.40) y Ec. (I.45)].

V.2.d. Análisis de los Errores Cometidos en la DMM y en la DCQ Estimadas

En este punto se analizan los errores que se cometerían al estimar la DMM univariable, $w(M)$, y la DCQ, $w(p_S)$, del copolímero dibloque SB, a partir de las señales medidas. Las distribuciones “verdaderas” se calculan con las Ecs. (V.10), dado que por tratarse de un ejemplo simulado se conoce la distribución bivariable $W(i,j)$.

La DCQ estimada del copolímero SB, $\hat{w}(p_S)$, se obtiene combinando $w(V)$ con $p_S(V)$ calculadas a partir de las señales de DR y UV [Ecs (V.11.a,b)]. Cuando se dispone además de la señal de LS, es posible estimar la DMM, $\hat{w}(M_w)$, combinando $w(V)$ con $M_w(V)$ [Ecs (V.11)]. Si en lugar de la señal de LS sólo se dispone de las calibraciones directas de ambos homopolímeros, $M_S(V)$ y $M_B(V)$, entonces pueden calcularse dos DMMs aproximadas (con los métodos clásicos), $\hat{w}(M_1)$ y $\hat{w}(M_2)$, combinando $w(V)$ con $M_1(V)$ y con $M_2(V)$, obtenidos a partir de las expresiones (I.41, I.42), respectivamente.

Las distribuciones verdaderas y estimadas se representan en la Fig. V.8.; y los valores medios se resumen en la Tabla V.2. Las fracciones másicas medias en número

($p_{S,n}$) y en peso ($p_{S,w}$), se calcularon a través de las siguientes expresiones discretas:

$$\bar{p}_{S,n} = \frac{\sum_k p_S(k) w(k) / M(k)}{\sum_k w(k) / M(k)} \quad (\text{V.13.a})$$

$$\bar{p}_{S,w} = \frac{\sum_k p_S(k) w(k)}{\sum_k w(k)} \quad (\text{V.13.b})$$

donde “ k ” (1, 2, ...) representa el índice de la discretización de los ejes M y p_S de la DCQ.

En todos los casos analizados, el \bar{M}_w y la polidispersión (\bar{M}_w / \bar{M}_n) resultaron inferiores a los valores verdaderos. La DMM $\hat{w}(M_w)$ es la más próxima a la distribución real, aunque levemente más angosta. Las masas molares medias de las DMMs aproximadas [$\hat{w}(M_1)$, $\hat{w}(M_2)$], resultaron claramente subestimadas.

La DCQ estimada difiere notablemente de la DCQ real. Este resultado es razonable debido a que las DCQs instantáneas son extremadamente anchas (ver Fig. V.6.b). Si bien el valor estimado de $\bar{p}_{S,w}$ es similar al real, el valor estimado de $\bar{p}_{S,n}$ es sensiblemente menor al real; y en consecuencia la relación $\bar{p}_{S,w} / \bar{p}_{S,n}$ resultó subestimada.

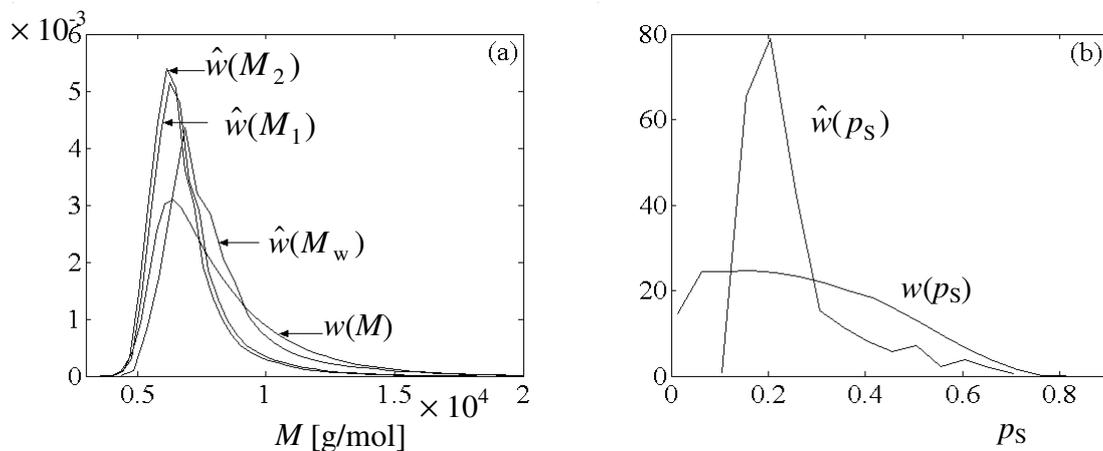


Figura V.8. Comparación entre distintas distribuciones reales y estimadas del copolímero dibloque SB. a) DMMs; b) DCQs.

Tabla V.2. Valores medios de las DMMs y DCQs reales y estimadas.

DMM	\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_w / \bar{M}_n
$w(M)$	7481	8057	1.08
$\hat{w}(M_w)$	7570	7993	1.06
$\hat{w}(M_1)$	6728	6982	1.04
$\hat{w}(M_2)$	6576	6814	1.04
DCQ	$\bar{P}_{S,n}$	$\bar{P}_{S,w}$	$\bar{P}_{S,w} / \bar{P}_{S,n}$
$w(p_S)$	0.11	0.28	2.62
$\hat{w}(p_S)$	0.22	0.25	1.15

V.3. SEC de Homopolímeros Ramificados

En esta sección, se estudia en forma teórica el fraccionamiento SEC de un homopolímero ramificado; y se predicen los cromatogramas DR y SV [$s_{DR}(V)$ y $s_{SV}(V)$], cuando se supone conocida la distribución conjunta en masa, $W(M,r)$, de masas molares M y grados de ramificación r . Como en la sección anterior, se considera exclusivamente el fraccionamiento en condiciones de SEC ideal.

V.3.a. Predicción de Variables asociadas al Fraccionamiento de las Moléculas del Homopolímero Ramificado

Se asumen las siguientes hipótesis: a) validez del concepto de calibración universal; b) existencia solamente de ramas (tri- o tetrafuncionales) largas; y c) validez de las ecuaciones de Zimm-Stockmayer (1949) para describir el volumen de las moléculas en solución. Bajo estas hipótesis, el fraccionamiento SEC de un homopolímero ramificado se modelará en términos de los V_h que exhiben las moléculas ramificadas en solución [Ecs (I.14–I.19)].

Se denominará “molécula (M,r) ” a una molécula de homopolímero que posea

masa molar M y r ramas. A partir de las Ecs (I.12, I.18, I.19), la viscosidad intrínseca de la molécula (M,r) , $[\eta](M,r)$, es:

$$[\eta](M,r) = g^{\varepsilon}(r) K M^{\alpha} = g^{\varepsilon}(r) K M^{\alpha} \quad (\text{V.14.a})$$

donde K y α son las constantes de MHS de la molécula lineal, $\{M,0\}$. Entonces, el volumen hidrodinámico de la molécula (M,r) resulta:

$$V_h(M,r) = g^{\varepsilon}(r) V_h(M,0) = g^{\varepsilon}(r) K M^{\alpha+1} = J(V) \quad (\text{V.14.b})$$

Dado que $g^{\varepsilon} < 1$, entonces una molécula ramificada $\{M,r\}$ en solución presentará V_h y $[\eta]$ inferiores a los de su lineal homóloga $\{M,0\}$.

Cuando la calibración universal $J(V)$ es conocida, la Ec. (V.14.b) permite calcular el volumen V al que eluye cualquier molécula (M,r) . En el caso de una calibración universal lineal, $\log J(V) = A - B V$, resulta:

$$V(M,r) = \frac{A - \log \{ g^{\varepsilon}(r) K M^{\alpha+1} \}}{B} \quad (\text{V.14.c})$$

Las Ecs (V.14) son funciones (bivariantes) representativas de propiedades asociadas a una molécula (M,r) aislada; y en tal sentido, son independientes de la DMM y/o de la DGR del homopolímero ramificado analizado. La viscosidad intrínseca [Ec. (V.14.a)] y el volumen hidrodinámico [Ec. (V.14.b)] dependen del comportamiento de la molécula en solución (a través de las constantes de MHS) y del exponente empírico ε ; y el volumen de retención al que finalmente eluye la molécula [Ecs (V.14.c)], depende también del sistema cromatográfico, caracterizado por la calibración universal, $J(V)$.

A efectos de visualizar gráficamente el comportamiento de las Ecs (V.14), se simuló el fraccionamiento SEC de un homopolímero ramificado de poliacetato de vinilo (PVAc) en THF, a 25 °C. Los parámetros utilizados fueron: $K_{\text{VAc}} = 1.60 \times 10^{-4}$ dL/g,

$\alpha_{VAc} = 0.7$, y $\varepsilon = 1.2$ (Park y Graessley, 1977). La calibración universal seleccionada fue: $\log J(V) = 13.6 - 0.290 V$. En la Fig. V.9. se representan las funciones bivariables $[\eta](M,r)$ y $V(M,r)$. La función $[\eta](M,r)$ [Fig. V.9.a)] exhibe un comportamiento bastante monótono, con un aumento para valores crecientes de M y decrecientes de r . Los incrementos de $[\eta]$ con M son algo más pronunciados cuando las moléculas son poco ramificadas (r pequeños). Para valores constantes de M , $[\eta]$ disminuye con r debido a la contracción volumétrica.

La Fig.V.9.b) representa la “superficie de calibración” del polímero complejo analizado. Se observa una apreciable variación de V con M , principalmente para M pequeños, donde la resolución cromatográfica es más elevada. Sin embargo, la variación de V con r es muy baja, indicando una pobre capacidad de SEC para fraccionar por ramas. A un dado V constante, existirá una diversidad de moléculas $\{M,r\}$ en las celdas de detección [que pueden calcularse como las curvas de nivel de la superficie $V(M,r)$]; es decir, coexisten moléculas ramificadas con otras menos ramificadas (o lineales) de menor M , desarrollándose así una DMM y una DGR instantáneas.

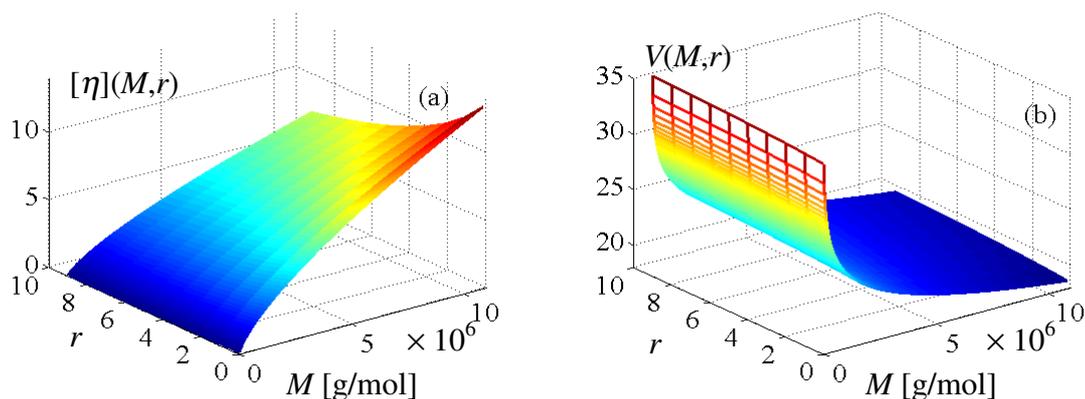


Figura V.9. Homopolímero ramificado de PVAc. Viscosidad intrínseca (a) y volumen de retención (b) de las moléculas $\{M,r\}$.

Las funciones de la Fig. V.9. podrían analizarse también a través de las

correspondientes curvas de nivel, como se hizo en las Figs V.2. y V.3. para el copolímero dibloque. Alternativamente, puede efectuarse una representación de estas superficies paramétrica con el número de ramas r . A tales efectos, las formas logarítmicas de las Ecs (V.14.a,c) resultan:

$$\log\{[\eta](M, r)\} = \varepsilon \log[g(r)] + \log K + \alpha \log M \quad (\text{V.15.a})$$

$$V(M, r) = \frac{1}{B} \{A - [\varepsilon \log g(r) + \log K + (\alpha + 1) \log M]\} \quad (\text{V.15.b})$$

A cada r fijo, ambas expresiones exhiben una dependencia lineal con $\log M$. Las Ecs. (V.15) se representan gráficamente en la Fig. V.10., para $r = 0, 1, \dots, 9$. La Fig. V.10.a) indica que moléculas de igual masa molar tienen una viscosidad intrínseca menor cuando son más ramificadas. La Fig. V.10.b) puede ser interpretada como curvas de calibración independientes, asociadas a cada número de ramas. Una vez más se observa la escasa resolución de SEC para fraccionar por ramas. Cualquier horizontal a un V constante intersecta a las rectas en puntos de diferente M y de diferente r ; sugiriendo entonces la existencia de DMMs y DGRs instantáneas.

Se estudió la sensibilidad de $[\eta](M, r)$ y $V(M, r)$ con K , α y ε . Valores menores de K y α y mayores de ε , producen la disminución de $[\eta](M, r)$ y el aumento de $V(M, r)$ para iguales (M, r) ; siendo mucho más notorio el efecto de las constantes de MHS. El comportamiento inverso se observa para K y α mayores y ε menores. Además la magnitud de los desplazamientos de $[\eta](M, r)$ y $V(M, r)$ con la variación de ε es mayor cuando r aumenta para un mismo M .

Para moléculas con puntos de ramificación tetrafuncionales, se observó que $[\eta](M, r)$ disminuye y $V(M, r)$ aumenta respecto de las mismas variables para moléculas con ramas trifuncionales [a iguales (M, r)]; lo que resulta lógico ya que en el primer caso

las moléculas son más compactas, presentando un menor V_h y por lo tanto una menor viscosidad y un mayor V de retención en las columnas. Finalmente, se puede decir que K y α bajos y ε elevados producen un efecto similar al de contracción volumétrica observado en las moléculas con ramas tetrafuncionales respecto de las trifuncionales.

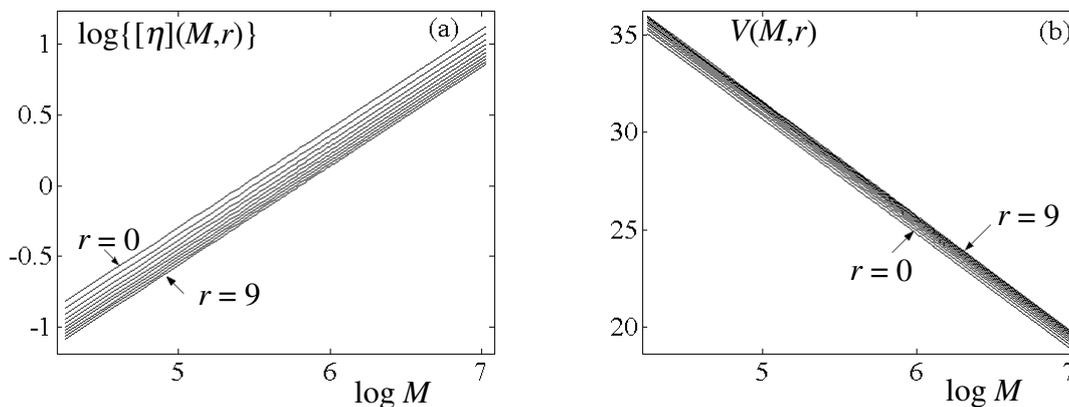


Figura V.10. Homopolímero ramificado de PVAc. Viscosidad intrínseca (a) y volumen de retención (b) de las moléculas $\{M,r\}$. Curvas paramétricas de r .

V.3.b. Cálculo de los Cromatogramas (Libres de E.I.) de un Homopolímero Ramificado de PVAc

A efectos de simular los cromatogramas de un homopolímero ramificado, se debe asumir conocida la distribución conjunta $W(M,r)$. El procedimiento para calcular los cromatogramas involucra dos pasos secuenciales, consistentes en calcular: (i) las DMM y DGR instantáneas presentes en la celda; y (ii) la señal que proveerá un dado sensor (DR, SV), en presencia de las distribuciones mencionadas. El paso (i) resulta de combinar la distribución conjunta $W(M,r)$ con el fraccionamiento sufrido por las moléculas (M,r) , según lo calculado en el punto V.3.a). La señal final asociada al paso (ii) depende de las características del sensor. A continuación se describen en detalle cada uno de estos pasos.

V.3.b.i) Cálculo de las Distribuciones Instantáneas

La distribución instantánea $W_V(M,r)$ describe la masa de aquellas moléculas $\{M,r\}$ que eluyen a V , y se calcula como:

$$W_V(M,r) = W(M,r) \Big|_{D_V(M,r)} \quad (\text{V.16})$$

donde $D_V(M,r)$ representa el dominio de moléculas (M,r) que eluyen a V [curva de nivel de $V(M,r)$]; es decir:

$$D_V(M,r) = \{(M,r) : V(M,r) = V\} \quad (\text{V.17})$$

De la misma manera, la función bivariable $[\eta]_V(M,r)$ representa las viscosidades intrínsecas de aquellas moléculas que eluyen a V ; y se calcula como:

$$[\eta]_V(M,r) = [\eta](M,r) \Big|_{D_V(M,r)} \quad (\text{V.18})$$

Alternativamente, pueden definirse distribuciones bivariantes a M fijo o a r fijo, como sigue:

$$W_M(r,V) = W(M,r) \Big|_{D_M(r,V)} \quad (\text{V.19.a})$$

$$W_r(M,V) = W(M,r) \Big|_{D_r(M,V)} \quad (\text{V.19.b})$$

con:

$$D_M(r,V) = \{(r,V) : M(r,V) = M\} \quad (\text{V.20.a})$$

$$D_r(M,V) = \{(M,V) : r(M,V) = r\} \quad (\text{V.20.b})$$

Todos estos dominios se derivan de $V(M,r)$ [Fig. V.9.b)]. Por ejemplo, $D_r(M,V)$ son las rectas de la Fig. V.10.b).

A partir de $W_V(M,r)$ pueden calcularse la DMM y la DGR univariantes instantáneas $[w_V(M)$ y $w_V(r)$, respectivamente], como sigue:

$$w_V(M) = \sum_r W_V(M, r) \quad (\text{V.21.a})$$

$$w_V(r) = \sum_M W_V(M, r) \quad (\text{V.21.b})$$

La masa de homopolímero instantánea, $w(V)$, y la viscosidad intrínseca media en peso instantánea, $[\eta]_w(V)$, se calculan como:

$$w(V) = \sum_{M,r} W_V(M, r) \quad (\text{V.22.a})$$

$$[\eta]_w(V) = \frac{\sum_{M,r} W_V(M, r) [\eta]_V(M, r)}{w(V)} \quad (\text{V.22.b})$$

Finalmente, la DMM univariable global, $w(M)$, y la DGR univariable global, $w(r)$, se calculan a partir de las distribuciones instantáneas como:

$$w(M) = \sum_V w_V(M) = \sum_{r,V} W_V(M, r) \quad (\text{V.23.a})$$

$$w(r) = \sum_V w_V(r) = \sum_{M,V} W_V(M, r) \quad (\text{V.23.b})$$

Estas distribuciones deben coincidir con los valores calculados directamente a partir de la distribución original $W(M, r)$, según:

$$w(M) = \sum_r W(M, r) \quad (\text{V.24.a})$$

$$w(r) = \sum_M W(M, r) \quad (\text{V.24.b})$$

Los mismos desarrollos pueden aplicarse a las distribuciones bivariadas definidas por las Ecs (V.19, 20). Por ejemplo, los “cromatogramas” de las moléculas con número de ramas r fijos, $w_r(V)$, y con masa molar M fija, $w_M(V)$, son:

$$w_r(V) = \sum_M W_r(M, V) \quad (\text{V.25.a})$$

$$w_M(V) = \sum_r W_M(r, V) \quad (\text{V.25.b})$$

V.3.b.ii) Cálculo de los Cromatogramas

Debido a la existencia de una DMM y una DGR instantáneas, los detectores DR y SV medirán un valor medio de esas distribuciones. Los cromatogramas $s_{\text{DR}}(V)$ y $s_{\text{SV}}(V)$ resultan [Ecs (I.23), (I.32) y (I.33)]:

$$s_{\text{DR}}(V) = K_{\text{DR}} w(V) \quad (\text{V.26.a})$$

$$s_{\text{SV}}(V) = K_{\text{SV}} [\eta]_w(V) w(V) \quad (\text{V.26.b})$$

Estas ecuaciones deben combinarse con los cálculos de $w(V)$ y $[\eta]_w(V)$ de las Ecs. (V.22).

V.3.c. Ejemplo de Simulación

Se simuló el fraccionamiento SEC de poliacetato de vinilo (PVAc) en THF a 25 C, con los siguientes parámetros: $K = 1.60 \times 10^{-4}$ dL/g, $\alpha = 0.7$ (Brandrup e Immergut, 1989), $\varepsilon = 1.2$ (Park y Graessley, 1977). La distribución conjunta $W(M, r)$ del homopolímero ramificado es la suma de distribuciones independientes, cada una con diferente número de ramas y masa. Para cada número de ramas $r = [0, 1, \dots, 9]$, se generó una WCLD de Schulz-Flory, $w_r(M)$ [Apéndice I], con el parámetro (a_r) y las masas (m_r) decrecientes con r (Grcev *et al.*, 2004) [TablaV.3.]. Las masas molares medias correspondientes a $w_r(M)$ se calcularon como:

$$\overline{M}_n(r) = \frac{\sum_M W(M,r)}{\sum_M W(M,r)/M}; \quad \overline{M}_w(r) = \frac{\sum_M W(M,r)M}{\sum_M W(M,r)} \quad (\text{V.27})$$

En la Fig. V.11. se muestran las DMM, $w_r(M)$, y la distribución conjunta, $W(M,r)$, obtenida combinando las $w_r(M)$.

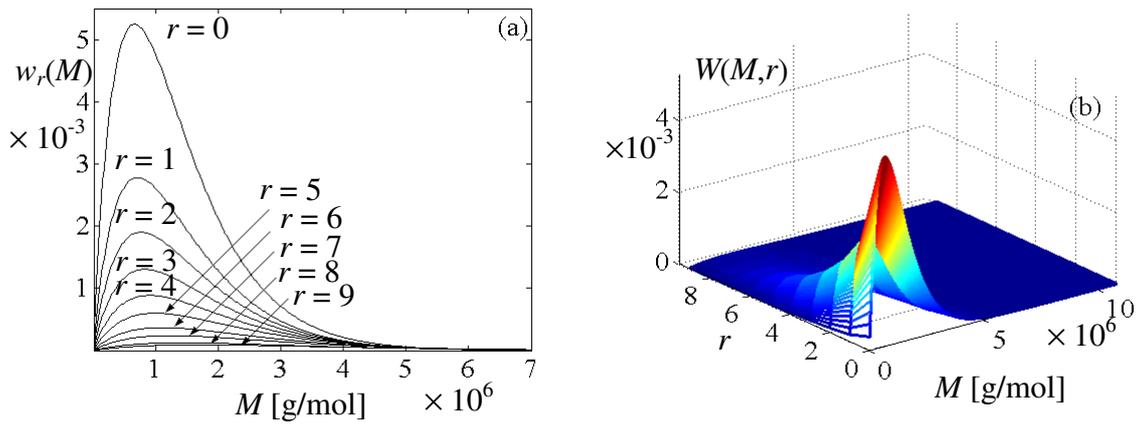


Figura V.11. a) DMMs individuales (por rama), $w_r(M)$; b) Distribución conjunta de masas molares y grados de ramificación, $W(M,r)$.

Tabla V.3. Características de las DMM Schulz-Flory correspondientes a cada r .

r	a_r	m_r	$\overline{M}_n(r)$	$\overline{M}_w(r)$	$\overline{M}_w(r)/\overline{M}_n(r)$
0	1.5×10^{-6}	0.5282	676000	1333000	1.973
1	1.4×10^{-6}	0.3000	723000	1429000	1.975
2	1.3×10^{-6}	0.2208	778000	1538000	1.977
3	1.2×10^{-6}	0.1672	842000	1666000	1.978
4	1.1×10^{-6}	0.1217	918000	1817000	1.979
5	1.0×10^{-6}	0.0906	1009000	1998000	1.980
6	0.9×10^{-6}	0.0619	1120000	2216000	1.980
7	0.8×10^{-6}	0.0453	1257000	2484000	1.976
8	0.7×10^{-6}	0.0267	1432000	2815000	1.966
9	0.6×10^{-6}	0.0226	1659000	3225000	1.944

A efectos de simular el fraccionamiento SEC y los cromatogramas DR y SV,

se adoptaron la calibración universal: $\log J(V) = A - B = 13.6 - 0.290 V$, y la siguiente ganancia constante para el DR: $K_{DR} = 4$. En las Figs V.12.a) se representan 4 distribuciones instantáneas, $W_V(M,r)$ [Ec. (V.16)], para $V = 21, 23.5, 26$ y 28.5 mL (asociadas cada una a un intervalo de discretización $\Delta V = 0.5$ mL), junto con la DMM global univariable, $w(M)$ [Ec. (V.23.a)]. A cada V , se indican las DMM correspondientes a cada rama (las curvas de mayor masa corresponden a moléculas menos ramificadas). A un mismo V existen moléculas con distinto número de ramas, originando las DGRs instantáneas, $w_V(r)$ [Ec. (V.21.b)]. En la Fig. V.12.b) se representan las DMMs instantáneas, $w_V(M)$ [Ec.(V.21.a)]. El aspecto ruidoso observado en algunas DMMs se debe a las aproximaciones numéricas de la discretización. Se observa que las polidispersiones disminuyen con el incremento de V [a mayor V eluyen las moléculas con menor masa molar y menor número de ramas].

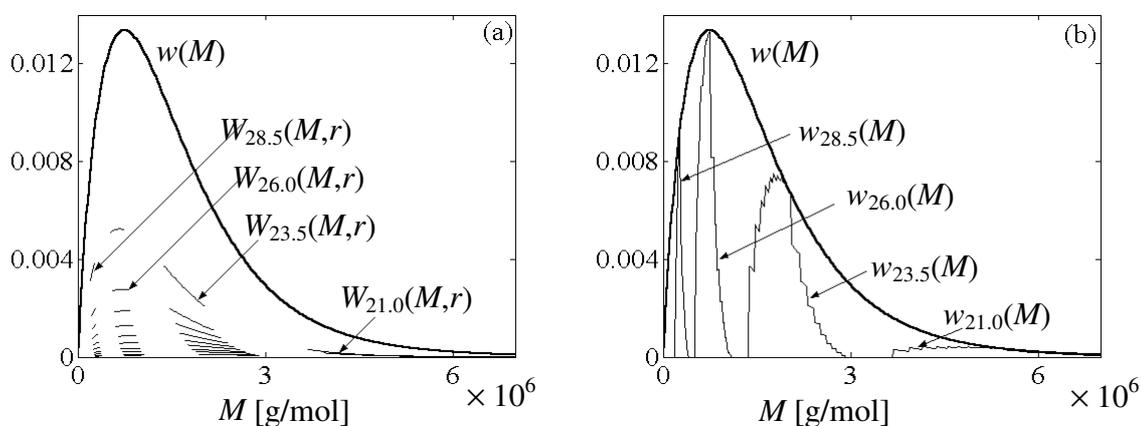


Figura V.12. a) Distribuciones instantáneas, $W_V(M,r)$, y DMM global, $w(M)$; b) DMM instantáneas, $w_V(M)$, y DMM global, $w(M)$.

En las Figs. V.13.a-d) se muestran las DGRs univariables instantáneas discretas, $w_V(r)$ [Ec. (V.21.b)], sólo para los mismos 4 V previamente considerados. En la Fig V.13.e), se representa la DGR discreta global, $w(r)$ [Ec. (V.23.b)], obtenida por suma de todas las DGRs instantáneas. En la Fig. V.13.f) se muestran las masas instantáneas de

las moléculas con número de ramas r fijos, $w_r(V)$ [Ec. (V.25.a)]. A un V fijo, están presentes moléculas con distinto número de ramas, verificándose que el fraccionamiento por ramas es prácticamente nulo.

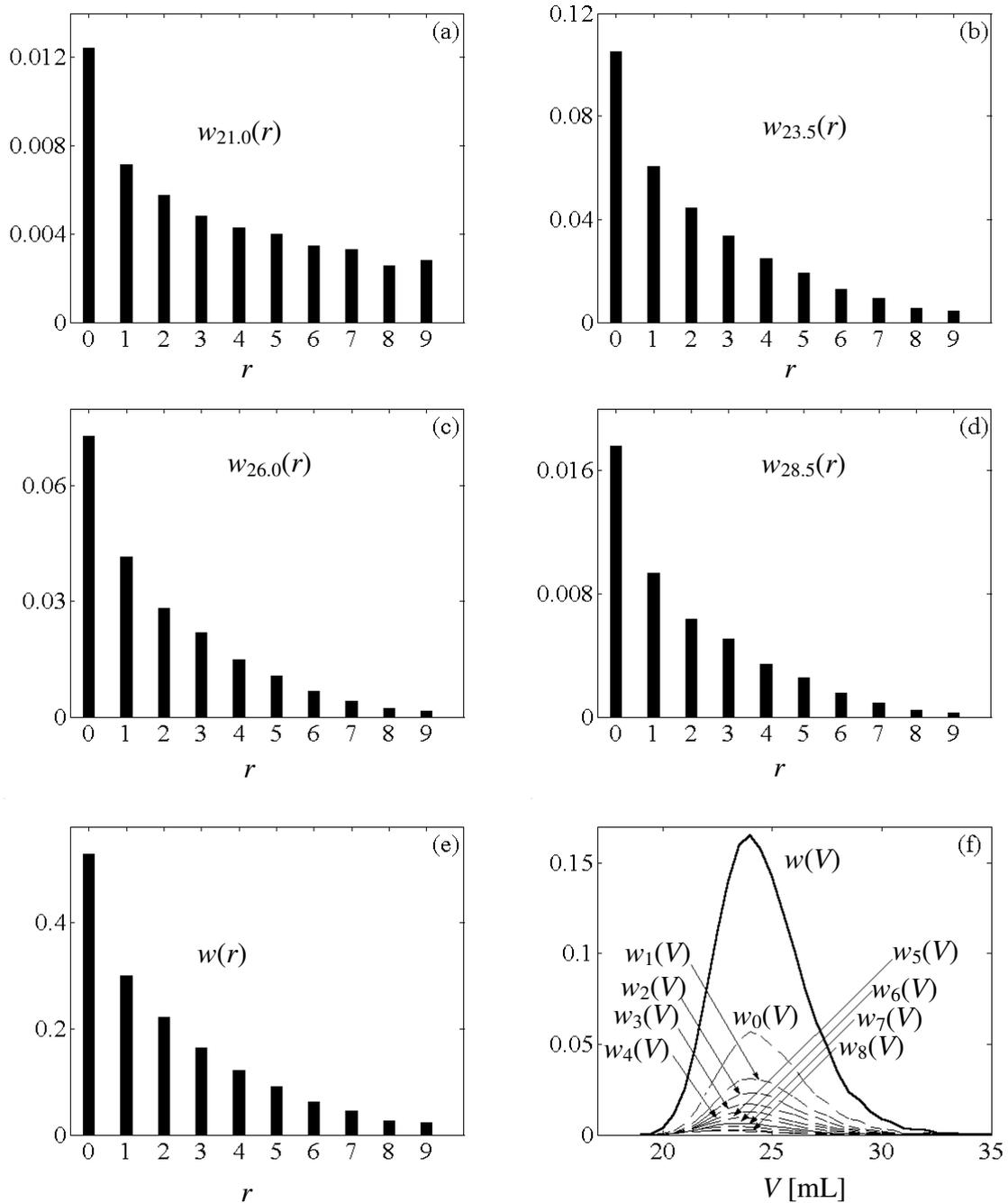


Figura V.13. a-d) DGRs discretas instantáneas, $w_V(r)$, para 4 V 's arbitrarios; e) DGR global, $w(r)$; f) masas instantáneas de las moléculas con número de ramas r fijos, $w_r(V)$, y global, $w(V)$.

En la Fig. V.14.a) se muestran los cromatogramas $s_{DR}(V)$ y $s_{SV}(V)$ simulados con las Ecs (V.26), y la calibración universal $\log J(V)$ asumida. El comatograma $s_{SV}(V)$ resulta levemente desplazado hacia menores V 's con respecto a $s_{DR}(V)$. En la Fig. V.14.b) se representa (en líneas de trazos) la calibración “*ad hoc*” de masas molares $\log M_{v,J}(V)$ para el homopolímero ramificado, calculada combinando $\log J(V)$ con las señales $s_{DR}(V)$ y $s_{SV}(V)$ [Ec. (I.39.b)]. Esta calibración presenta algunas oscilaciones en sus extremos (debido probablemente a problemas de discretización), que serían potenciadas en las colas de los cromatogramas por la presencia de ruidos de medición. En la práctica, deben eliminarse dichas oscilaciones, y por la tendencia observada en la curva calculada, se seleccionó un ajuste lineal en el rango $V = [21 - 32]$ mL (indicado por las líneas de puntos verticales), luego extrapolado a todo el rango de medición.

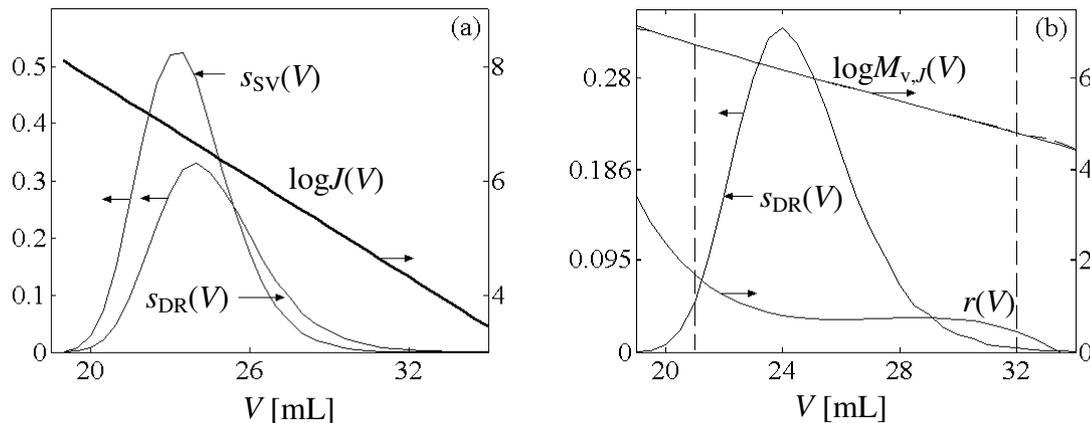


Figura V.14. a) Cromatogramas medidos [$s_{DR}(V)$, $s_{SV}(V)$] y calibración universal $\log J(V)$; b) Cromatograma DR [$s_{DR}(V)$] y calibraciones *ad hoc* de masa molar [$\log M_{v,J}(V)$] y de ramas [$r(V)$].

Por otra parte, también se calculó la “calibración” *ad hoc* de ramas, $r(V)$ [Fig. V.14.b)], a partir del siguiente procedimiento: 1) se calculó la viscosidad intrínseca a partir de la Ec. (I.33); 2) se calculó $g(V)$ combinando las Ecs. (I.18) y (I.19); y 3) se calculó $r(V)$ combinando $g(V)$ con $\log M_{v,J}(V)$ y con la expresión de Zimm y Stockmayer [Ec. (I.16)], asumiendo que $r \equiv b_n$. Esta calibración resulta prácticamente plana en la zona central del

cromatograma, y sólo predice valores inferiores a 4 ramas (muy por debajo de las 9 ramas existentes en la distribución verdadera); consecuentemente, la técnica SEC subestimaré el número de ramas.

V.3.d. Análisis de los Errores Cometidos en la DMM y en la DGR Estimadas

Se analizan los errores que se cometerían al estimar la DMM univariable, $w(M)$, y la DGR, $w(r)$, del polímero ramificado, a partir de las señales medidas. Las distribuciones “verdaderas” se calculan con las Ecs (V.24), dado que por tratarse de un ejemplo simulado se conoce la distribución conjunta, $W(M,r)$.

La DMM estimada por SEC, $\hat{w}(M_v)$, se obtiene combinando $w(V)$ [o $s_{DR}(V)$] con $M_v(V)$. La DGR estimada por SEC, $\hat{w}(r)$, se obtiene combinando $w(V)$ [o $s_{DR}(V)$] con $r(V)$. Por otra parte, si en lugar de la señal SV se dispusiera de la calibración universal y las constantes de MHS, podría estimarse la DMM $\hat{w}(M)$ combinando $w(V)$ con $M(V)$ obtenida a partir de la Ec. (I.37). Las distribuciones verdaderas y estimadas se representan en la Fig. V.15.; y los valores medios se resumen en la Tabla V.4. Los números de ramas medios en número, \bar{r}_n , y en peso, \bar{r}_w , se calcularon a través de las siguientes expresiones:

$$\bar{r}_n = \frac{\sum r(M)\hat{w}(M)/M}{\sum \hat{w}(M)/M} \quad (\text{V.28.a})$$

$$\bar{r}_w = \frac{\sum r(M)\hat{w}(M)}{\sum \hat{w}(M)} \quad (\text{V.28.b})$$

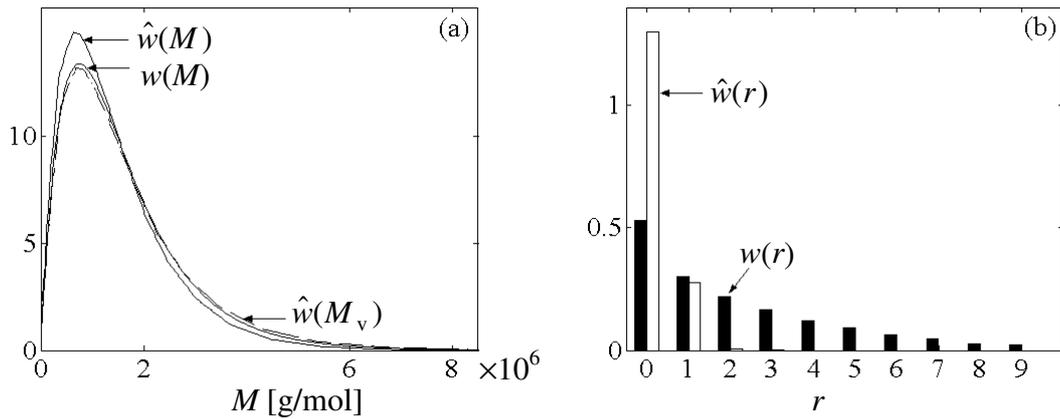


Figura V.15. a) DMMs verdadera, $w(M)$, y estimada por SEC / DR, $\hat{w}(M)$, y por SEC / (DR + SV), $\hat{w}(M_v)$; b) DGRs verdadera, $w(r)$, y estimada por SEC / (DR + SV), $\hat{w}(r)$.

Tabla V.4. Valores medios de las DMMs y DGRs reales y estimadas.

DMM	\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_w / \bar{M}_n
$w(M)$	783000	1609000	2.06
$\hat{w}(M)$	718000	1430000	1.99
$\hat{w}(M_v)$	778000	1674000	2.15
DGR	\bar{r}_n	\bar{r}_w	\bar{r}_w / \bar{r}_n
$w(r)$	1.683	2.073	1.232
$\hat{w}(r)$	0.726	0.877	1.209

Las DMMs estimadas resultaron en general aceptables. En SEC / (DR + SV), el \bar{M}_w y la polidispersión (\bar{M}_w / \bar{M}_n) resultaron levemente sobrestimados, pero la DMM estimada, $\hat{w}(M_v)$, es la más próxima a la distribución real. Las masas molares medias y la polidispersión de la DMM estimada por SEC / DR, $\hat{w}(M)$, resultaron levemente subestimadas. En cambio, la DGR estimada por SEC / (DR + SV) difiere notablemente de la DGR real, con números medios de ramas claramente subestimados, aunque la relación \bar{r}_w / \bar{r}_n no difiere considerablemente de la real. El resultado es razonable debido a la

incapacidad de la técnica para detectar número de ramas elevados, como lo prueba la “calibración” $r(V)$ de la Fig. V.14.b).

V.4. Conclusiones

Se desarrollaron modelos matemáticos para describir el fraccionamiento SEC ideal de algunos polímeros cromatográficamente complejos. Estos modelos podrían ser utilizados para ayudar a interpretar los complicados procesos de fraccionamiento en SEC, que conducen a la existencia de distribuciones instantáneas en las celdas de detección. Por ejemplo, en este Capítulo, esos modelos permitieron evaluar los errores que se cometen cuando se pretende determinar la DMM y la DCQ de un copolímero (lineal) dibloque; y la DMM y la DGR de un homopolímero ramificado, utilizando los procedimientos de la práctica SEC habitual.

Los dos modelos de fraccionamiento propuestos son muy similares en su desarrollo, aunque se presentó con un mayor detalle en el caso del copolímero dibloque. A su vez, dicho modelo podría haberse planteado en términos de la distribución conjunta $W_{SB}(M, p_S)$ en lugar de la distribución (equivalente) bivariable $W_{SB}(i, j)$. En este planteo alternativo, los desarrollos se tornarían totalmente equivalentes a los vistos para el caso del homopolímero ramificado.

Las características de “mezcla” originadas por la naturaleza compleja de los polímeros es –en principio– asemejable a la mezcla debida al E.I. En tal sentido, un objetivo posterior sería tratar de utilizar estos modelos en su forma “inversa”, para poder inferir propiedades de polímeros cromatográficamente complejos. Esta alternativa no parece obvia, particularmente si se dispone de pocas señales medidas.

En el análisis de copolímeros dibloque SB por SEC / (DR + UV), las masas molares calculadas con los métodos clásicos de interpolación con la composición química

(Runyon et al., 1969; Chang, 1971), resultan subestimadas. La razón fundamental es la existencia de distribuciones instantáneas muy anchas originadas en la escasa capacidad de fraccionamiento por masa molar y especialmente por composición química, y que inhabilitan la interpolación de las masas molares de cada homopolímero con una única fracción másica media. Las estimaciones más exactas de la DMM se logran cuando se agrega un tercer sensor LS; sin embargo, este sensor no contribuye a mejorar la DCQ estimada. Los apartamientos observados en las masas molares medias y en la DMM podrían aún ser mayores, dependiendo del tipo de polímero y de la relación polímero-solvente (constantes de MHS), dado que influirían directamente sobre los V_h de las macromoléculas en solución.

En el análisis de homopolímeros ramificados por SEC/DR, las masas molares calculadas con los métodos clásicos de utilización de la calibración universal y constantes de MHS, resultan subestimadas. Este efecto se debe a la existencia de distribuciones instantáneas muy anchas originadas en la escasa capacidad de fraccionamiento por ramas. Una estimación más exacta de la DMM se logra cuando se utiliza el sensor SV. La estimación de la DGR sólo es posible cuando se utilizan ambos sensores (DR + SV); sin embargo, los números de ramas resultan claramente subestimados. Los errores observados se deben a la naturaleza compleja (efecto mezcla) del homopolímero ramificado, que impide lograr un fraccionamiento adecuado por número de ramas. Al igual que en el caso de copolímeros, los apartamientos observados en las masas molares medias y en la DMM podrían aún ser mayores, dependiendo del tipo de polímero (coeficiente ϵ y presencia de ramas tetrafuncionales) y de la interacción polímero-solvente (constantes de MHS), ya que influirían directamente sobre los V_h de las macromoléculas en solución.

CAPÍTULO VI. SEC de Fase Acuosa: Análisis de Algunos Polielectrolitos y Biopolímeros

VI.1. Introducción

La DMM de los polímeros solubles en agua afecta algunas propiedades físicas, tales como la viscosidad de las soluciones, la resistencia a la tracción, al agua y a los solventes, la fuerza adhesiva y el poder dispersante (Nagy, 1995, 1999; Wu, 1995, 1999). La estimación de la DMM de un polímero hidrosoluble por SEC, incluye dos desafíos importantes: (i) asegurar el mecanismo de exclusión por tamaños, y (ii) disponer de la calibración de masas molares adecuada.

Para analizar poli(ácido acrílico) [PAA] por SEC, se recomiendan buffers de fosfatos como fase móvil (FM), con el agregado de sales de nitrato de sodio (para controlar la fuerza iónica), y columnas con rellenos a base de polimetacrilato hidroxilado (Bender, 1999; Myers, 2002). Myers (2002) caracterizó muestras de PAA utilizando FMs de fosfatos a dos pH distintos: 4.5 y 7.0. A pH = 7.0, las masas molares medias por SEC / DR (determinadas en base a una calibración con dextrans) resultaron un 80% mayores que los valores obtenidos a pH = 4.5, debido a los cambios de conformación de las moléculas. Las masas molares medias determinadas por SEC / MALLS resultaron menos influenciadas por el cambio de pH, determinándose además que el $\partial n / \partial c$ en la FM a pH = 7.0 es mayor al valor correspondiente a pH = 4.5. La $[\eta]$ y las constantes de MHS determinadas por SEC / MALLS sugieren una expansión del PAA a mayor pH, explicado por un incremento de la densidad de carga superficial sobre las moléculas. La variación de $\log M_w$ vs. V resultó lineal y decreciente a pH = 7.0, mientras que a pH = 4.5, $\log M_w$ aumentó con V . En definitiva, a pH = 7.0 se acepta el fraccionamiento por exclusión pura, mientras que a pH = 4.5 algunas moléculas de mayor M parecen ser retenidas en las

columnas por la interacción electrostática.

El análisis de quitosanos por SEC / LS sugiere que se trata de polímeros lineales, de conformación random coil (Ortega, 2000), típicamente con masas molares inferiores a 5×10^5 g/mol (Brugnerotto *et al.*, 2001). Los coeficientes de MHS pueden determinarse por viscometría (Ottøy *et al.*, 1996; Brugnerotto *et al.*, 2001), pero su uso debe ser cuidadoso debido a que la presencia de cargas superficiales en las moléculas de quitosanos en solventes ácidos le confieren la capacidad de formar agregados. Brugnerotto *et al.* (2001) caracterizaron quitosanos de igual masa molar y diferente grado de deacetilación (DD) por SEC / LALLS, utilizando como FM un buffer de acetato de sodio [CH₃COOH / CH₃COONa] de pH = 4.5, y columnas con un relleno catiónico. Se encontró que el DD no influye sobre $\partial n / \partial c$ ni sobre V_h , pero afecta levemente a las constantes de MHS (K disminuye y α aumenta, a medida que el DD disminuye). Ottøy *et al.* (1996) analizaron dos muestras de quitosanos con distintos DD por SEC / LALLS, utilizando como FM un buffer de acetato de amonio [CH₃COOH / CH₃COONH₄] de pH = 4.5 y columnas con un relleno hidrofílico a base de poli(hidroximetacrilato). Las curvas $[\eta]M$ vs. V exhibieron distintas pendientes y ordenadas; y la muestra con mayor DD (mayor densidad de cargas) se desplazó hacia V mayores, debido a la interacción iónica con la fase estacionaria.

La concentración de las soluciones de quitosanos influye sobre la formación de agregados, originándose señales de LS bimodales para concentraciones superiores a 1 mg/mL. Comparando muestras con M y concentraciones similares, se observó que los agregados detectados por LS fueron mayores para los quitosanos con menor DD; es decir, la asociación de las moléculas de quitosano aumenta con el contenido de grupos acetilo (< DD), debido a interacciones hidrofóbicas. Además el porcentaje de estos agregados es mayor a medida que se incrementa la masa molar de las muestras (Ottøy *et al.*, 1996).

Recientemente, se han analizado por SEC / DR muestras de quitosanos obtenidos por radiación gamma (R- γ), utilizando como FM un buffer de CH₃COOH/CH₃COONa y columnas con un relleno a base de poli(hidroximetacrilato); y se observó que las masas molares de los quitosanos disminuyen con la dosis de R- γ (Choi *et al.*, 2002; Wasikiewicz *et al.*, 2005).

La caracterización de almidones por SEC involucra idealmente estimar la DMM de las fracciones de amilopectina y de amilosa, y la DGR de la amilopectina. La SEC presenta varias limitaciones: (1) es incapaz de separar las fracciones; (2) las moléculas de amilopectina exceden el rango de fraccionamiento de las columnas y pueden degradarse; y (3) no se dispone de estándares de calibración específicos. Los trabajos de investigación ponen énfasis en la preparación de la muestra y en las técnicas de aislamiento de las fracciones. La calibración SEC/DR suele efectuarse con amilopectina desramificada con pululanasa, con estándares de dextransos, o con pululanos (que tienen un comportamiento similar en un sistema acuoso al almidón desramificado) (Blennow, 2001; Mizukami, 1999, Ramesh, 1999). Alternativamente, se ha utilizado SEC / (DR + LS) para estimar las DMMs (Jackson *et al.*, 1988, 1989, 1990; Bradbury y Bello, 1993; Klucinec y Thompson, 1998; Suortti *et al.*, 1991, 1998; Nagy, 1999; Striegel *et al.*, 1995, 1996; Van Dijk *et al.*, 1976), y los niveles de ramificación (Yoo y Jane, 2002; You y Lim, 2000; Yu y Rollings, 1987, 1988; Huber y Praznik, 1996; Striegel y Timpa, 1995, 1996).

Algunos dextransos han sido caracterizados por SEC empleando columnas con soportes de sílice (Chmelík *et al.*, 1997), de divinilbenceno entrecruzado con glucosa (Merienne *et al.*, 2000), y de poli(hidroximetacrilato) (Volet y Lesec, 1994), y distintos detectores (DR, LS, fluorescencia). La aplicación clínica de los dextransos depende de sus masas molares, según se especifica en las Farmacopeas de Gran Bretaña y de EE.UU.; y la técnica de caracterización recomendada es SEC/DR. Los principales inconvenientes para

caracterizar dextranos son la falta de estándares monodispersos, y la necesidad de hallar condiciones de baja interacción polímero / solvente / fase estacionaria, que aseguren el fraccionamiento por tamaños (los dextranos forman puentes de hidrógeno con la FM o con la fase estacionaria, originando fraccionamientos secundarios).

En este Capítulo se presenta la caracterización por SEC de algunos polímeros solubles en agua. Esta tarea es totalmente novedosa para el *Grupo de Polímeros* donde se desarrolló esta tesis, ya que por primera vez se trabajará en SEC de fase acuosa. Inicialmente, se evalúan las características de fraccionamiento de las columnas (número de platos teóricos); y se ataca el problema de la calibración del sistema acuoso con diferentes estándares cromatográficos, tratando de verificar las condiciones de fraccionamiento por exclusión pura. Finalmente, se caracterizan polímeros solubles en agua tanto de origen sintético (PAA) como natural (polisacáridos: quitosanos, almidones y dextranos).

VI.2. Sistema Cromatográfico en Fase Acuosa

Se utilizó un cromatógrafo líquido Waters–Breeze, compuesto por una bomba isocrática (modelo 1515), un inyector manual Rheodyne y un DR Waters 2414, modelo 410, a una temperatura de 30 °C. El caudal de trabajo fue de 0.8 mL/min. Se utilizaron 5 columnas UltraHydrogel (UH), Waters (7.8 mm × 300 mm), con tamaños de poro de [120, 250, 500, 1000, 2000] Å y límites de fraccionamiento: [5×10^3 , 8×10^4 , 4×10^5 , 1×10^6 , 7×10^6] g/mol, respectivamente.

Las columnas contienen un relleno de polimetacrilato altamente hidroxilado, recomendado para analizar polímeros solubles en agua (tales como polisacáridos y polielectrolitos), con FMs acuosas; y a veces hasta con un 50% de solventes orgánicos, compatibles con este tipo de fase estacionaria. La interacción de analitos polares con la fase estacionaria es bastante débil, debido a las funciones hidrofílicas polihidroxi sobre la

superficie del relleno. Probablemente, sobre la superficie, existan pequeñas cantidades de grupos acídicos, que pueden ser suprimidos por el agregado de sales a la FM. La compatibilidad de la matriz con ácidos y bases es bastante buena. Las columnas UH se pueden emplear con FMs de pH 2 a 12 por largos períodos de tiempo. Tanto las interacciones iónicas polímero / relleno, como las interacciones entre las moléculas de polímero se pueden suprimir aumentando la fuerza iónica del medio. Generalmente, las soluciones acuosas de nitrato de sodio (NaNO_3) 0.1 mol/L resultan un buen solvente para muchos polímeros. Las interacciones hidrofóbicas se pueden reducir agregando pequeñas cantidades de solventes orgánicos (típicamente, un 20% de acetonitrilo) [Neue, 1999].

VI.2.a. Evaluación de las Columnas de Fraccionamiento. Cálculo del Número de Platos Teóricos

En cada columna se inyectaron (por duplicado) 20 μL de etilenglicol diluido [0.0025 mL/mL de FM (agua deionizada)], a temperatura ambiente. Los platos teóricos, N , se calcularon con una de las posibles variantes de la Ec. (I.21), sugerida por el fabricante de las columnas (Waters), como sigue:

$$N = 5.54 \left(\frac{V_p}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (\text{VI.1})$$

donde V_p es el volumen de retención del pico, y $W_{1/2}$ es el ancho del pico medido a la mitad de las alturas de las ordenadas de cada cromatograma DR.

Los cromatogramas DR (corregidos por línea de base y normalizados) se muestran en la Fig. VI.1. El intervalo de discretización fue $\Delta V = 0.01$ mL. Los valores de N calculado con la Ec. (VI.1) se indican en la Tabla VI.1. Las columnas UH 120 a 1000 muestran un número de platos teóricos aceptable ($N > 10000$; Quatrocchi *et al.*, 1992). La columna UH 2000 tiene menor resolución, debido al mayor tamaño de poro de las

partículas del relleno, como se explicó en el Capítulo I.

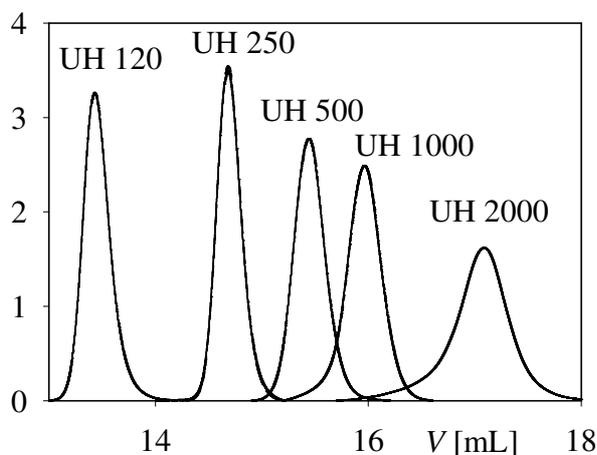


Figura VI.1. Cromatogramas de DR para etilenglicol ($M = 62.07$ g/mol).

Tabla VI.1. Número de platos teóricos (N) para las columnas UltraHydrogel.

Columna	N
UH 120	12800
UH 250	17700
UH 500	11400
UH 1000	10300
UH 2000	5300

Los cromatogramas obtenidos con las columnas UH 120 – 500 son bastante angostos y simétricos, debido quizás a su menor tamaño de poro. En contraste, los cromatogramas correspondientes a las columnas UH 1000 – 2000, son más anchos y asimétricos. Estas observaciones concuerdan con lo sugerido por algunos autores cuando indican que: (i) tanto la amplitud como la asimetría de los picos se incrementan con el aumento del diámetro de poro de la fase estacionaria (Busnel *et al.*, 2001; Schnöll-Bitai, 2005); y (ii) las moléculas con igual M permanecen más tiempo en las columnas de mayor tamaño de poro, produciéndose una mayor dispersión axial y por lo tanto un ensanchamiento de los picos (Dondi *et al.*, 2002).

VI.2.b. Calibraciones con Estándares de Pululanos y Dextranos

En esta sección se obtienen las calibraciones con estándares de pululanos y dextranos, en distintas FMs. Estos polisacáridos son biopolímeros neutros, ya que no presentan cargas superficiales en su estructura. Los pululanos son homopolímeros lineales de maltotriosa unidas por enlaces α -(1→6) glucosídicos; mientras que los dextranos son homopolímeros ramificados de glucosa unidas por enlaces α -(1→6), y las ramas son formadas por la presencia de enlaces α -(1→2), α -(1→3), α -(1→4).

Tabla VI.2. SEC/DR de estándares de Pululanos en las tres FMs.

Estándar	M_p [g/mol]	M_w [g/mol]	M_w/M_n [-]	V_p [mL]		
				FM1	FM2	FM3 *
P1	5650	5900	1.09	46.0536	46.4664	44.2232
						44.2136
P2	11200	11800	1.10	44.2136	44.5464	42.5008
						42.6264
P3	22000	22800	1.07	42.0936	42.6536	40.7008
						40.7072
P4	45900	47300	1.06	39.4264	39.8536	38.1448
						38.0112
P5	105800	112000	1.12	36.7336	37.2000	35.2936
						35.2776
P6	173500	212000	1.13	34.3976	34.7600	33.0232
						32.9048
P7	380000	404000	1.13	32.5280	32.7336	31.2064
						31.2080
P8	710500	788000	1.23	30.8000	30.8136	29.6272
						29.4776

* Se efectuaron inyecciones por duplicado de cada estándar.

Las características moleculares de los estándares de pululanos (Shodex Standard P-82, Lote N° 30901, Showa Denko) y dextranos (Polymer Standards Service –

USA, Inc.) se indican en las Tablas VI.2. y VI.3., respectivamente. Se ensayaron tres FMs: (i) FM1: agua + azida sódica (NaN_3), 0.05 % p/v; (ii) FM2: agua + sulfato de sodio (Na_2SO_4), 50 mM; (iii) FM3: buffer $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$, 50 mM, pH = 4.50; con las condiciones de medición descritas al inicio de la sección VI.2. Los estándares fueron pesados y disueltos en las FMs (concentración aproximada 1 mg/mL). Las soluciones fueron filtradas con un filtro de 0.45 μm de diámetro de poro previo a su inyección. En todos los casos, el volumen inyectado fue de 200 μL . Las constantes de MHS de los estándares en las distintas FMs se indican en la Tabla VI.4.

Tabla VI.3. SEC/DR de estándares de Dextranos en la FM1.

Estándar	M_p [g/mol]	M_w [g/mol]	M_n [g/mol]	M_w/M_n [-]	V_p [mL]
D1	4400	5200	3300	1.60	46.7310
D2	9900	11600	8100	1.43	44.8112
D3	21400	23800	18300	1.30	41.7817
D4	43500	48600	35600	1.36	39.7157
D5	124000	148000	100000	1.47	36.4622
D6	196000	273000	164000	1.66	34.7703
D7	277000	410000	236000	1.73	33.9027
D8	401000	668000	333000	2.01	33.0100

Tabla VI.4. Constantes de MHS de Pululanos y Dextranos.

Estándar	α [-]	K [dL/g]	FM	Referencia
<i>Pululanos</i>	0.67 ± 0.01	$(1.91 \pm 0.02) \times 10^{-4}$	H_2O , 25 °C (\approx FM1)	Kato <i>et al.</i> (1982)
	0.665	2.01×10^{-4}	FM2	Showa Denko
<i>Dextranos</i>	0.50	9.78×10^{-4}	H_2O , 25 °C (\approx FM1)	Showa Denko
	0.50	9.0×10^{-4}	FM2	

Los cromatogramas DR corregidos por línea de base de los pululanos en las distintas FMs y de los dextranos en la FM1, se muestran en las Figs VI.2. y VI.3. Los

cromatogramas de los pululanos en la FM2, se encuentran desplazados a un V levemente superior con respecto a la FM1. En cambio, en la FM3, los estándares eluyen a un V claramente inferior con respecto a las FM1 y FM2. Este efecto puede deberse a la naturaleza ácida de la FM3, que induce cierta cantidad de cargas superficiales sobre la fase estacionaria y las cadenas de pululanos, provocando una competencia entre el mecanismo de exclusión pura y la exclusión por interacción electrostática. La repulsión podría reducirse agregando Na_2SO_4 a la FM, para disminuir las interacciones electrostáticas. Un detalle importante al realizar mediciones con dextranos es el tiempo de preparación de las soluciones. Se observó que pasado un día de preparadas las muestras, el V de retención de los cromatogramas disminuye, probablemente debido a la capacidad de formar dímeros. Estas observaciones también fueron realizadas por Merienne *et al.* (2000) quienes analizaron por SEC soluciones de dextranos en dimetilsulfóxido (DMSO).

Las calibraciones directas, $\log M_p(V) = a - b V$, se obtuvieron combinando M_p con V_p (Tablas VI.2 y VI.3), y ajustando un polinomio de orden 1 (Figs VI.3 y VI.4, y Tabla VI.5). Las calibraciones universales, $\log J_p(V) = A - B V$, se obtuvieron combinando M_p , las constantes de MHS (Tabla VI.4), y V_p en las FM1 y FM2 (Tablas VI.2 y VI.3), según la Ec. (I.37); y ajustando un polinomio de orden 1 [Fig. VI.5.a) y Tabla VI.5]. Debido a la moderada diferencia existente entre las distintas $\log J_p(V)$, se efectuó una regresión lineal de todos los puntos experimentales, observándose que se ubican razonablemente cerca de la recta, independientemente de la FM empleada (Fig. VI.5.b). Los puntos asociados a los pululanos en la FM3 no se incluyeron, por no disponerse de las correspondientes constantes de MHS.

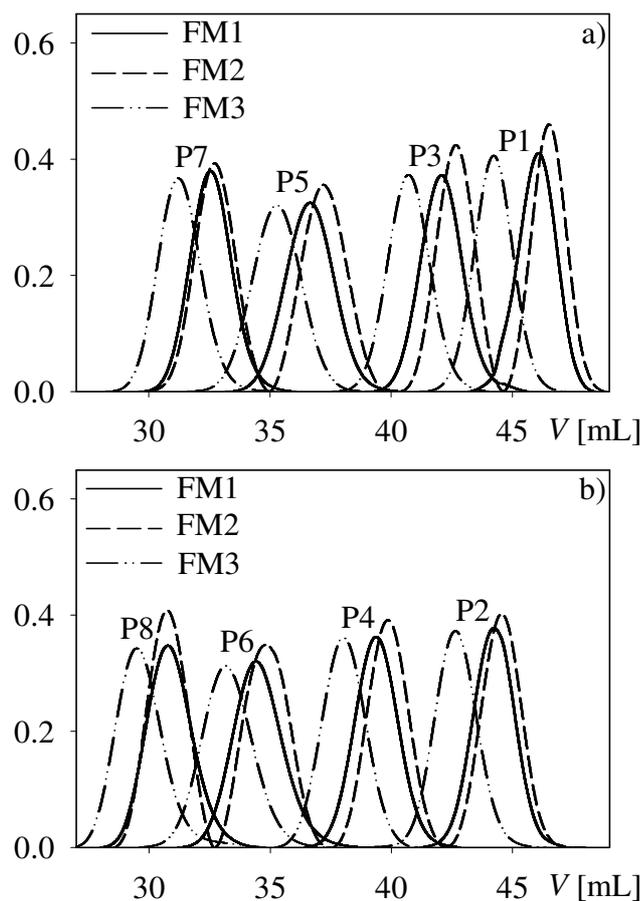


Figura VI.2. Cromatogramas DR de estándares de Pululanos en las tres FMs.

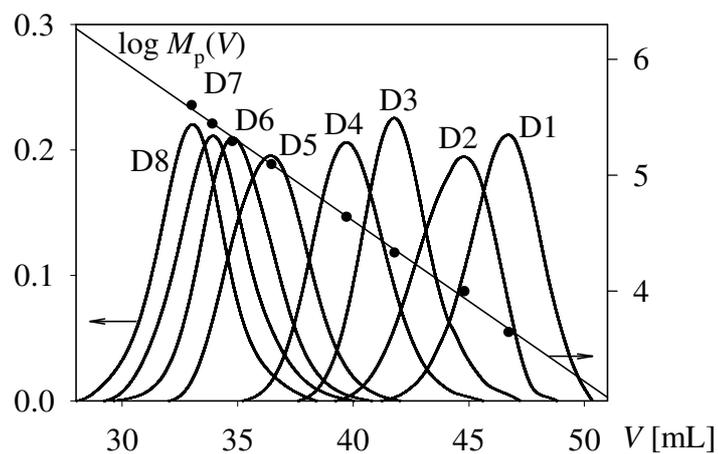


Figura VI.3. Cromatogramas DR de estándares de Dextranos, y calibración directa, $\log M_p(V)$, en la FM1.

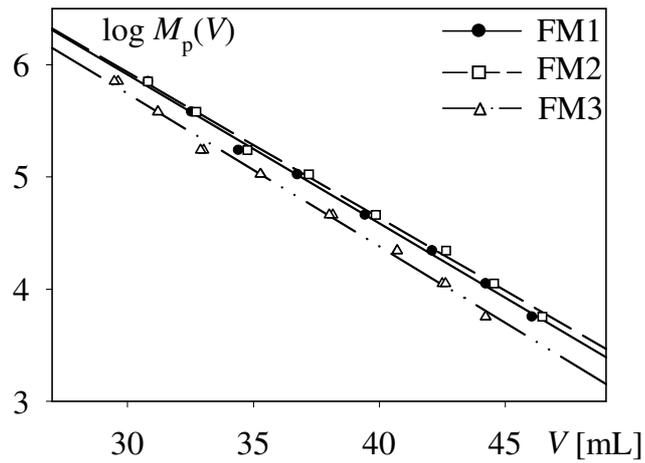


Figura VI.4. Calibraciones directas de estándares de Pululanos en las tres FMs.

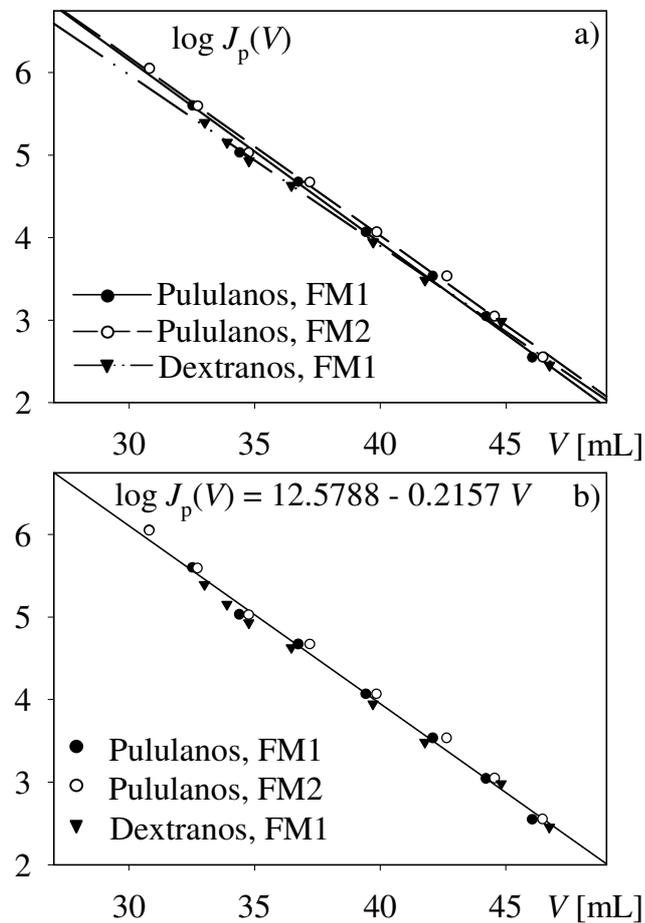


Figura VI.5. Calibraciones universales: a) individuales, para Pululanos y Dextranos en las FM1 y FM2; b) única para todos los estándares.

Tabla VI.5. Coeficientes de las calibraciones lineales directas [$\log M_p(V)$], y universales [$\log J_p(V)$], para estándares de Pululanos y Dextranos.

Estándar	FM	$\log M_p(V) = a - bV$		$\log J_p(V) = A - BV$	
		a	b	A	B
<i>Pululanos</i>	FM1	9.8890	0.1326	12.7957	0.2215
	FM2	9.8333	0.1300	12.6757	0.2164
	FM3	9.8318	0.1363	-	-
<i>Dextranos</i>	FM1	10.1346	0.1383	12.1922	0.2074

Las curvas de calibración directa de los pululanos en las FM1 y FM2 son cercanas (Fig. VI.4). En cambio, $\log M_p(V)$ en la FM3 se encuentra claramente desplazada hacia menores V . Las $\log M_p(V)$ en FM1 y FM2 se encuentran desplazadas entre 0.18 mL y 0.50 mL, mientras que las desviaciones correspondientes a $\log M_p(V)$ en la FM3 son superiores a 1.25 mL. En definitiva, las FM1 y FM2, serán consideradas adecuadas para SEC de almidones y dextranos, dado sus similares características de interacción polímero / solvente / fase estacionaria con respecto a los pululanos. En cambio, la FM3 se utilizará para analizar quitosanos, para la cual se han reportado condiciones de fraccionamiento por exclusión pura (Choi *et al.*, 2002).

VI.3. SEC de Polímeros Hidrosolubles

A continuación se analizarán muestras de cuatro polímeros hidrosolubles. En primer lugar, el PAA: un homopolímero lineal que presenta cargas negativas en solución (polielectrolito), y del cual no se dispone de estándares cromatográficos. En segundo lugar, algunos quitosanos: polisacáridos que en solución acuosa se comportan como policationes por la presencia de grupos amino en sus cadenas; y que debido a su solubilidad sólo en medio ácido, serán caracterizados utilizando la FM3. Por último, dos polisacáridos neutros: almidones y dextranos. La dificultad de los almidones reside en la

separación y análisis de sus fracciones: la amilosa (prácticamente lineal) y la amilopectina (altamente ramificada). Los dextranos son homopolímeros ramificados, pero para ellos se dispone de estándares cromatográficos.

VI.3.a. Análisis de Polielectrolitos Aniónicos: Estimación de la DMM de PAA Comercial por SEC/DR

Se analizaron por SEC/DR dos muestras comerciales de PAA (M1 y M2) provistas por una empresa nacional productora de polímeros especiales para la industria. Los análisis se efectuaron bajo las condiciones descritas en la Sección VI.2, utilizando una nueva FM (FM4): un buffer de fosfatos $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 50mM, pH = 7.00 + NaNO_3 50 mM (30 °C). En esta FM4 se aseguran condiciones de exclusión pura para el PAA con las columnas utilizadas, y las constantes de MHS son: $\alpha_{\text{PAA}} = 0.590$, y $K_{\text{PAA}} = 2.30 \times 10^{-3}$ dL/g (Myers, 2002). Como no se dispone de estándares de PAA, se exploró la posibilidad de utilizar la “calibración universal” del sistema cromatográfico en la FM2: $\log J_p(V) = A - B V_p = 12.6757 - 0.2164 V$ (Tabla VI.5). A tales efectos, debe verificarse que el PAA se fraccione según SEC ideal en la FM2.

Ambas muestras fueron fácilmente disueltas en FM2 y FM4 (a temperatura ambiente), y filtradas con un filtro de 0.45 μm . Las concentraciones aproximadas fueron de 2 mg/mL. Los cromatogramas DR en FM4 (medidos por duplicado, corregidos por línea de base y normalizados) se muestran en la Fig. VI.6, observándose una buena repetitividad de las mediciones. En la Fig. VI.7 se muestran los cromatogramas DR en la FM4 (líneas llenas) y en la FM2 (líneas de trazos), observándose sólo pequeños desplazamientos (inferiores a 0.37 mL) en M1 a V elevados. Estos desplazamientos son menores a los observados en las calibraciones directas de pululanos entre las FM1 y FM2 (Fig. VI.4). La aceptable reproducibilidad de los cromatogramas en ambas FMs permite aceptar que en la FM2, el PAA se fracciona por exclusión pura. Entonces, las masas

molares del PAA se calculan en base a la Ec. (I.37.):

$$\log M_{\text{PAA}} = [A - \log(K_{\text{PAA}}) - B V] / (\alpha_{\text{PAA}} + 1) \quad (\text{VI.2})$$

Las DMMs se indican en la Fig. VI.8; y las masas molares medias y la polidispersidad se resumen en la Tabla VI.6. Ambas muestras exhiben una forma similar. En la FM2, las masas molares medias resultan levemente inferiores (7%), debido al pequeño desplazamiento hacia V mayores observado en los cromatogramas (Fig. VI.7).

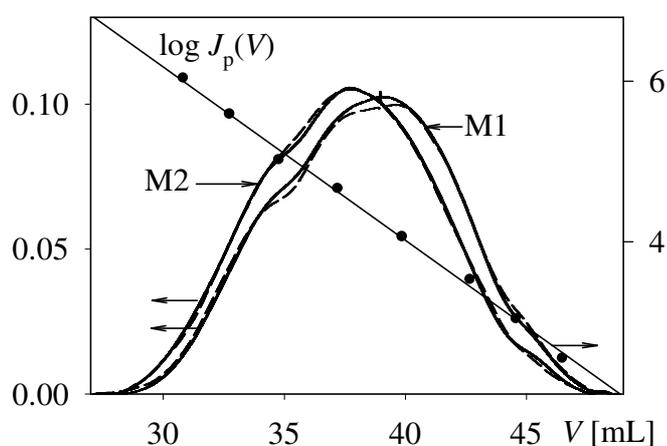


Figura VI.6. Cromatogramas DR de PAA en la FM4, y calibración universal obtenida en la FM2.

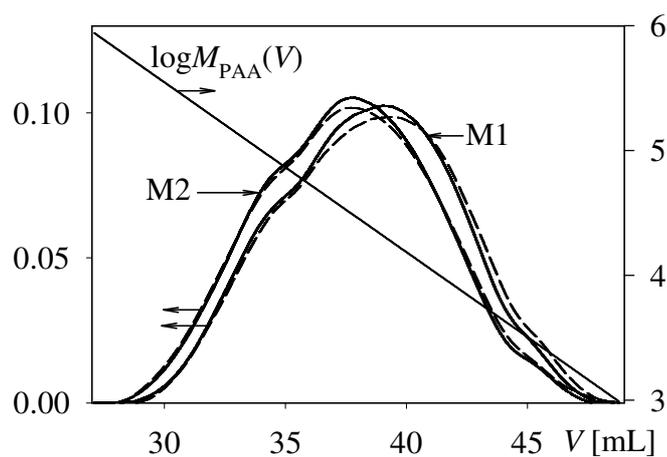


Figura VI.7. Cromatogramas DR de PAA en la FM4 (línea llena) y en la FM2 (línea de trazos).

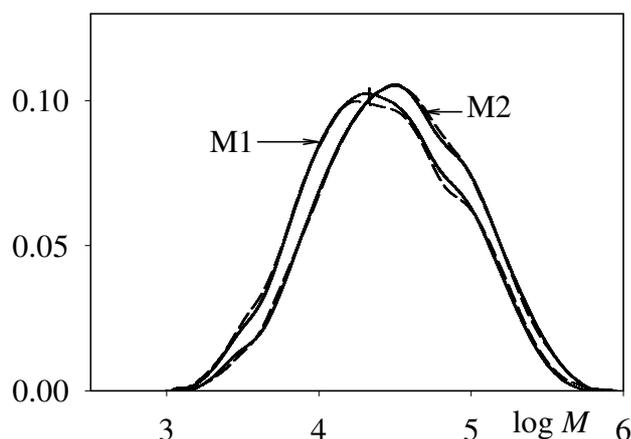


Figura VI.8. DMMs estimadas para las dos muestras de PAA: M1 y M2. En líneas de trazos se indican las DMMs correspondientes a las repeticiones.

Tabla VI.6. Masas molares medias de las muestras de PAA.

Muestra	Fase móvil	Repetición	M_n	M_w	M_w / M_n
M1	FM4	1	14400	47200	3.27
		2	14100	48900	3.48
M2	FM4	1	18100	58400	3.22
		2	18200	58300	3.20
M1	FM2	1	13200	45100	3.42
M2	FM2	1	17000	58800	3.46

VI.3.b. Análisis de Biopolímeros Catiónicos: Estimación de la DMM de Quitosanos Irradiados por SEC / DR y SEC / (DR + LS)

Los quitosanos fueron obtenidos en el Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas de Quitina (LIBAQ, Departamento de Química, Univ. Nacional del Sur), a partir de quitina extraída de residuos de la industria camaronera del puerto de Ingeniero White (Bahía Blanca, Argentina). La deacetilación de la quitina se efectuó empleando NaOH al 45%, a diferentes temperaturas y tiempos de reacción, obteniéndose tres grupos de quitosanos (A, B, C) indicados en la Tabla VI.7. A pesar de las diferentes condiciones de reacción, los grados de deacetilación resultaron similares (cerca del 80%).

Tabla VI.7. Características de la obtención de los tres grupos de Quitosanos.

Condiciones de reacción	Quitosano		
	A	B	C
Temperatura	135 °C	90 °C	35 °C
Tiempo	60 min	90 min	72 hs
Grado de deacetilación	83 %	80 %	82 %

Cada muestra fue irradiada con la finalidad de obtener quitosanos de menor masa molar. La irradiación se efectuó con rayos gamma (R- γ) de ^{60}Co , en el Centro Atómico de Ezeiza, con un amplio rango de dosis de radiación (entre 7 y 200 kGy), en estado sólido, en aire y a temperatura ambiente. La unidad de dosis de radiación, expresada como energía absorbida por unidad de masa irradiada, es el Gray (Gy): 1 Gy = 1 Joule/Kg. La velocidad de dosis de radiación fue de 10 kGy/h. Finalmente, en cada grupo de quitosanos se dispone tanto de las muestras sin irradiar como de las irradiadas (oligoquitosanos) con distintas dosis de R- γ , como se indica en la Tabla VI.8.

El grado de deacetilación se determinó con un espectrofotómetro Shimadzu 1063, utilizando el método de la primera y segunda derivada del espectro UV de patrones de N-acetilglucosamina y del quitosano (Tan *et al.*, 1998). La evaluación de posibles cambios en la estructura química de los quitosanos inducidos por la R- γ (por ej. oxidación), se realizó por FTIR de films (Peniche-Convras *et al.*, 1992; Wasikiewicz *et al.*, 2005), empleando un equipo Nicolet 520 (Depto. de Química, Univ. Nacional del Sur). Los espectros FTIR de los tres grupos de polímeros irradiados y sin irradiar, presentaron las mismas bandas características del quitosano: 3445 cm^{-1} (grupo -OH), 1622 cm^{-1} (grupo -NH₂) y 1154 cm^{-1} (puente C-O-C), con distinta intensidad de acuerdo a la dosis aplicada. La ausencia de otras bandas indica la inexistencia de cambios estructurales de importancia. Tampoco hubo variación en el grado de deacetilación entre materiales irradiados y sin irradiar.

Tabla VI.8. Dosis de R- γ y masas molares medias (por SEC / DR) de los quitosanos.

Quitosano	R- γ [kGy]	\overline{M}_n [g/mol]	\overline{M}_w [g/mol]	$\overline{M}_w / \overline{M}_n$ [-]
<i>Grupo A</i>				
Q1	0	65600	320000	4.88
Q2	40	34600 35900	118000 123000	3.40 3.42
Q3	100	28100 26500	90000 86200	3.20 3.25
Q4	200	20400 19700	61700 63000	3.03 3.20
<i>Grupo B</i>				
HEE	0	173000	587000	3.39
E7	7	209000 205000	454000 436000	2.17 2.12
E10	10	169900 162000	375000 356000	2.21 2.20
E45	45	69900 77990	179000 178000	2.55 2.28
E60	60	46100 49500	124000 129000	2.68 2.62
E90	90	32600 33300	91300 90700	2.80 2.73
E100	100	25800 25500	72600 73100	2.81 2.86
<i>Grupo C</i>				
HO	0	359000	766000	2.13
O7	7	218000 211000	455000 473000	2.09 2.24
O15	15	122000 130000	287000 302000	2.36 2.33
O30	30	99800 90400	215000 241000	2.15 2.66
O45	45	68100 63900	168000 155000	2.46 2.42
O60	60	46700 49900	118000 119000	2.52 2.38
O90	90	33300 34400	88000 88500	2.64 2.57
O100	100	27300 26700	69900 69600	2.56 2.61

VI.3.b.i) Estimación de la DMM de Quitosanos por SEC / DR. Efecto de la R- γ sobre las Masas Molares Medias del Quitosano Irradiado

Todas las muestras de quitosanos se analizaron por SEC / DR, bajo las condiciones descritas en la sección VI.2. y utilizando la FM3. Se utiliza esta FM porque los quitosanos sólo son solubles en medio ácido; y con las columnas empleadas se logran condiciones de fraccionamiento por tamaño (Brugnerotto *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002). Las muestras se disolvieron en ácido acético glacial, y se trataron en baño María durante 30 min; luego, se las llevó a volumen con la FM3, hasta una concentración aproximada de 1 mg/mL. Las soluciones fueron filtradas con un filtro de 0.45 μm previo a su inyección.

Los cromatogramas DR (corregidos por línea de base y normalizados) se muestran en la Fig. VI.9. Las masas molares medias se estimaron combinando los cromatogramas DR con la calibración directa de pululanos en la FM3 (Tabla VI.5), y se indican en la Tabla VI.8. (Como no se dispone de estándares de quitosanos, se utilizó la calibración de los pululanos por tratarse también de polisacáridos lineales.) El quitosano Q1 presenta mayor polidispersión y menor masa molar inicial con respecto a las otras dos muestras (HEE y HO), debido a su obtención bajo condiciones más severas de temperatura (135 C), dando lugar a una posible degradación. Con menor temperatura y mayor tiempo de reacción, los quitosanos originales exhiben mayor masa molar y menor polidispersión, como ya fuera reportado por Agullo (2004).

Las muestras irradiadas se analizaron por duplicado. Se observa la reducción de las masas molares con el aumento de la dosis de R- γ , confirmando la escisión de las cadenas por efecto de la radiación ionizante (Choi *et al.*, 2002). En la Fig. VI.10 se grafican las masas molares medias (el promedio de los valores en las muestras analizadas por duplicado); observándose su disminución con la dosis de R- γ . Dicha disminución es más pronunciada para dosis menores a 60 kGy, en concordancia con lo reportado por otros

autores (Wasikiewicz *et al.*, 2005).

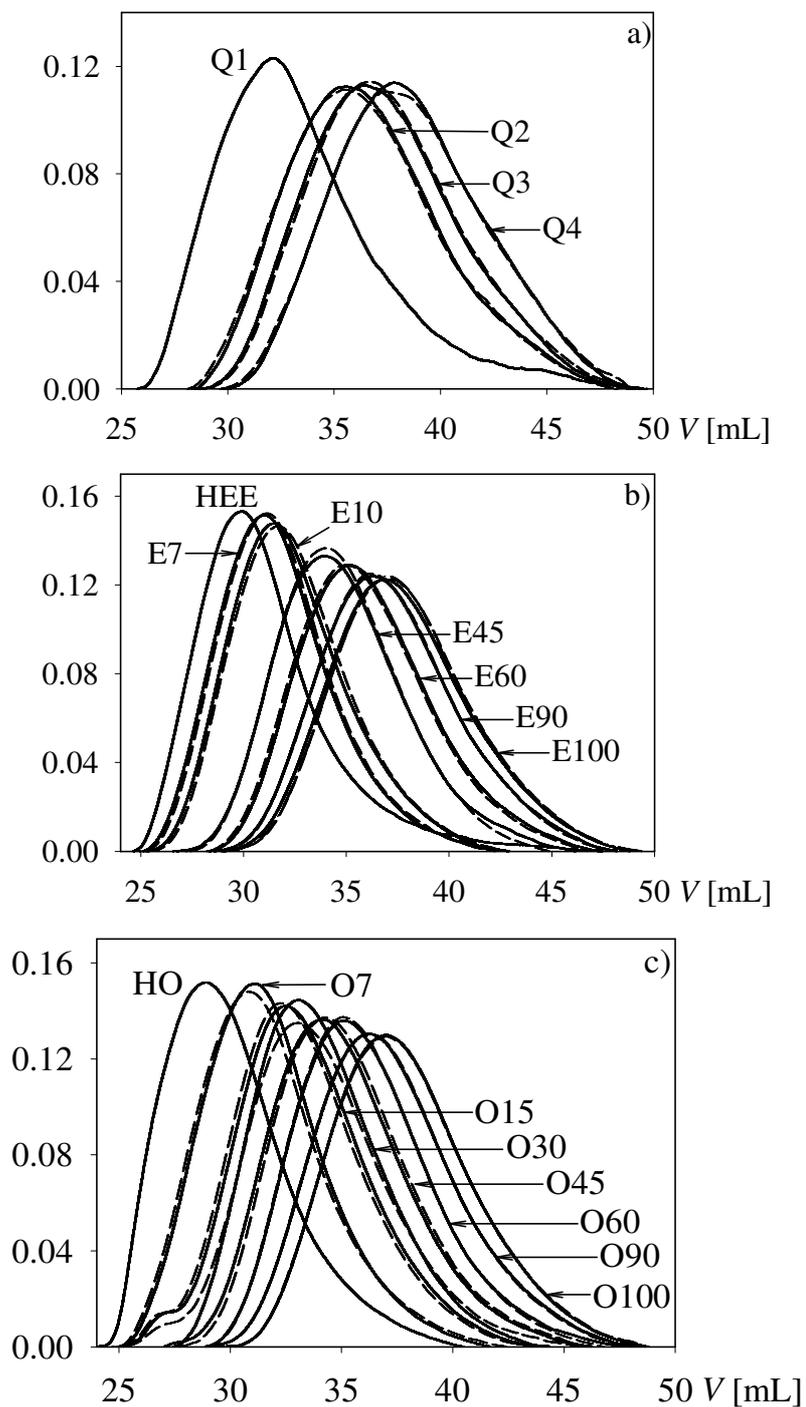


Figura VI.9. Cromatogramas DR de quitosanos en la FM3: a) Grupo A; b) Grupo B; c) Grupo C. (Las líneas de trazos indican repeticiones).

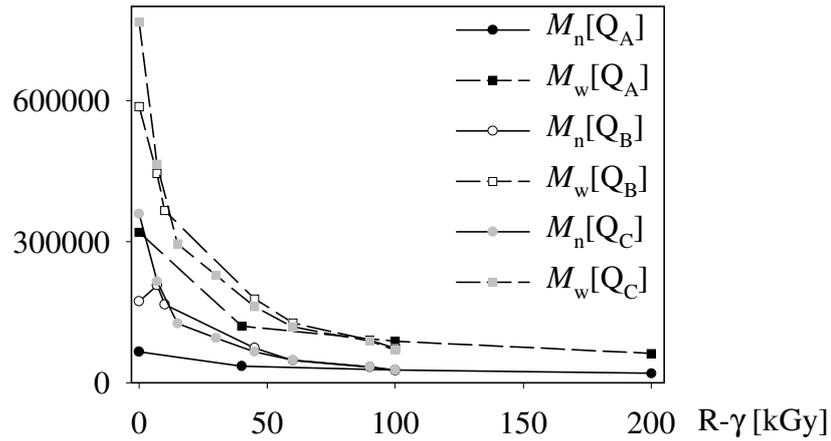


Figura VI.10. SEC/DR de quitosanos. Efecto de la dosis de R- γ sobre las masas molares medias.

El proceso de degradación por efecto de la R- γ se puede describir por los cambios en las masas molares, mediante la ecuación de Charlesby–Pinner (IAEA, 2002):

$$\frac{1}{\bar{M}_n} - \frac{1}{\bar{M}_{n,0}} = 1.04 \times 10^{-7} D G_s \quad (\text{VI.3})$$

donde $\bar{M}_{n,0}$ es la masa molar media en número de la muestra sin irradiar; D es la dosis de radiación; y G_s es la radiosensibilidad del quitosano, expresada como el número de escisiones inducidas por cada 100 eV de energía radiante. Esta correlación se representa en la Fig. VI.11.

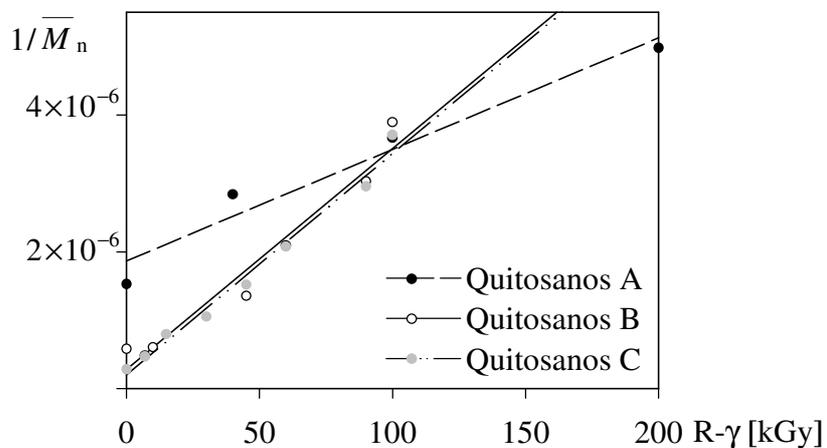


Figura VI.11. Correlación de Charlesby–Pinner con la dosis de R- γ [Ec. (VI.3)].

Las regresiones indicadas en la Fig. VI.11 permitieron estimar $G_s \cong 1.6$, para el quitosano A; y $G_s \cong 3.1$, para los quitosanos B y C. El quitosano A presentó una menor eficiencia en la formación de oligoquitosanos por R- γ , debido posiblemente a la degradación en el procedimiento de deacetilación de la quitina. Los valores de G_s encontrados para los quitosanos B y C resultaron similares a los reportados por otros autores [$G_s = 3.5$, Wasikiewicz *et al.* (2005); y $G_s = 3.4$, Ulanski *et al.* (2000)].

VI.3.b.ii) Análisis de Quitosanos por SEC / (DR + LS)

Se utilizó una configuración serie de detectores DR + LS, con un detector LS (DAWN DSP, Wyatt Technology Corp.) que permite medir la luz dispersada a 18 ángulos. A efectos de determinar tanto el IDV como la constante $K'_{w,P} = K_{DR}/K_{LS}$ asociada a la Ec. (I.30), se utilizó un estándar angosto de pululanos (P4, Tabla VI.2) en la FM1, con una concentración aproximada de 1.5 mg/mL. El IDV se estimó con el criterio comentado en el Capítulo IV, ajustando la pendiente de $\log M_p(V)$ obtenida con estándares de pululanos en la FM1 (Tabla VI.5), con el cociente de las señales medidas, $\log[s_{LS}(V)/s_{DR}(V)]$. El IDV resultó de 0.19 mL. La ganancia correspondiente a los pululanos, $K'_{w,P}$, se obtuvo a partir de la Ec. (I.30), reproduciendo la masa molar del estándar en el rango de V 's de mayor relación señal-a-ruido. La ganancia correspondiente a los quitosanos, $K'_{w,Q}$, se obtuvo utilizando la relación con los $\partial n/\partial c$, derivada a partir de las Ecs (I.23, I.28.c, I.29, I.30):

$$K'_{w,Q} = K'_{w,P} \frac{(\partial n/\partial c)_P}{(\partial n/\partial c)_Q} \quad (\text{VI.4})$$

donde $(\partial n/\partial c)_P$ ($= 0.146$ mL/g) corresponde a los pululanos (Beer *et al.*, 1999); y $(\partial n/\partial c)_Q$ ($= 0.190$ mL/g) corresponde a los quitosanos (Brugnerotto *et al.*, 2001). En definitiva, la Ec. (I.30) para estimar las masas molares instantáneas de los quitosanos, resultó:

$$M_w(V) = 7.18 \times 10^5 \frac{s_{LS}(V)}{s_{DR}(V)} \quad (\text{VI.5})$$

Todos los quitosanos se analizaron bajo las condiciones descritas en la sección VI.2, y utilizando la fase móvil FM3. Las condiciones de preparación e inyección de las muestras fueron descritas en la sección VI.3.b.i). Los cromatogramas (corregidos por línea de base y por IDV) se representan en la Fig. VI.12, observándose un V medio que aumenta con la dosis de R- γ . Las ordenadas de los cromatogramas LS decrecen con la dosis de R- γ , debido a la reducción de la masa molar. Varios cromatogramas LS resultaron bimodales, detectándose picos angostos a bajos V 's, donde la señal de DR es en general baja, indicando la probable presencia de pequeños agregados de elevada masa molar. La formación de agregados por interacciones hidrofóbicas entre las moléculas suele atribuirse a una excesiva concentración de las soluciones utilizadas (Ottøy *et al.*, 1996).

Se calculó el \overline{M}_w de cada quitosano en base a la integración de la señal de LS [Ec. (I.33)], evitándose así los errores introducidos por el cociente de señales. Los resultados se indican en la Tabla VI.9. En general, los \overline{M}_w 's de las muestras con cromatogramas LS unimodales, resultaron levemente inferiores a los valores predichos por SEC/DR (Tabla VI.8), excepto para los \overline{M}_w 's más elevados de los quitosanos C; mientras que los \overline{M}_w 's de las muestras con cromatogramas LS bimodales [indicados con una (B) en la Tabla VI.9], resultaron claramente superiores. En definitiva, si bien las masas molares medias determinadas por SEC / DR pueden estar algo sobreestimadas, el efecto no se aprecia en el caso de los cromatogramas bimodales por la insensibilidad del DR a la pequeña masa exhibida por el agregado.

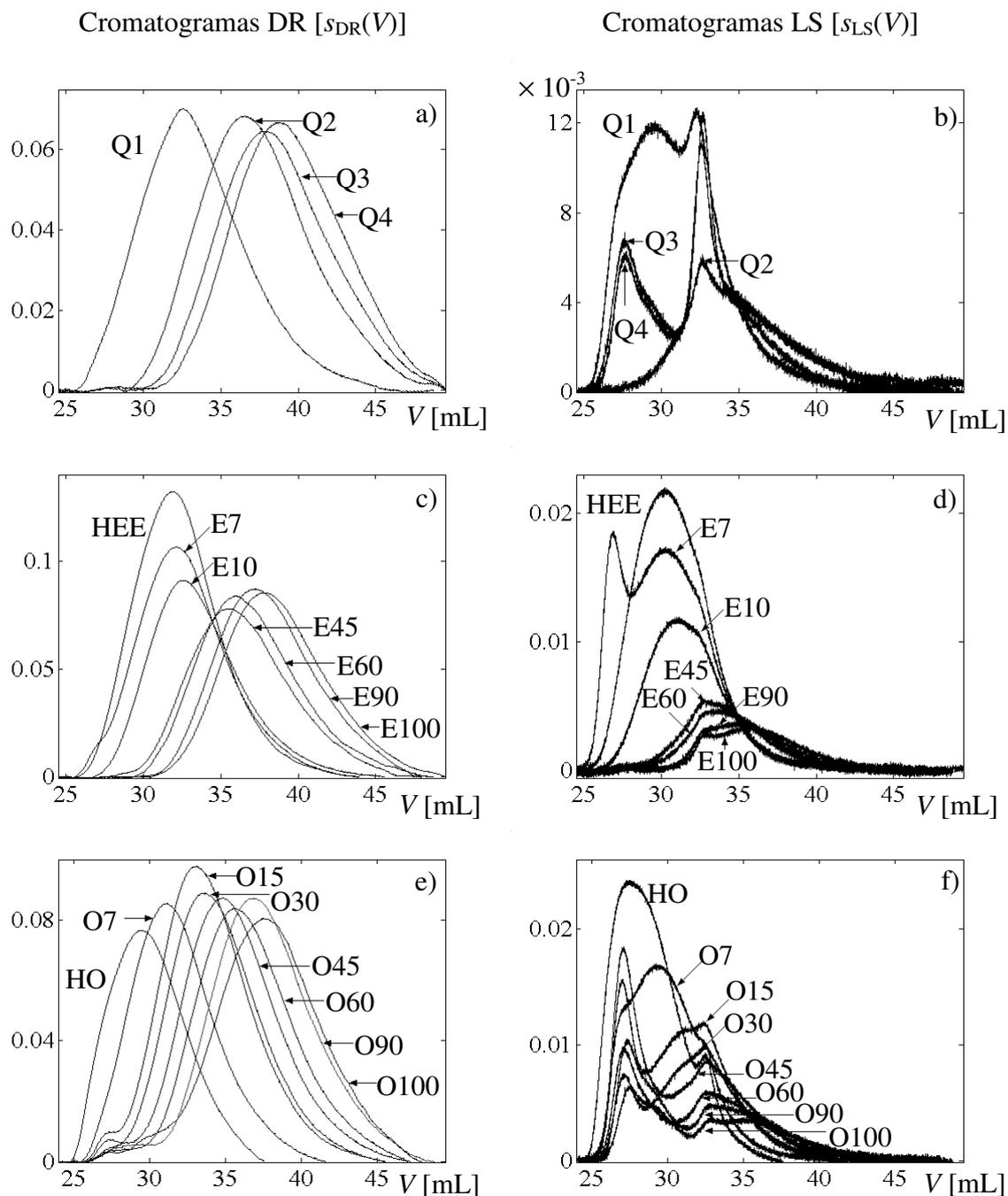


Figura VI.12. Cromatogramas DR y LS de los quitosanos: a), b) Grupo A; c), d) Grupo B; e), f) Grupo C.

A continuación, se presenta el procesamiento de los cromatogramas en base al cociente de señales de la Ec. (VI.5). En la Fig. VI.13 se muestra como ejemplo el tratamiento de datos en la muestra HEE. Debido a las notorias oscilaciones exhibidas por $\log M_w(V)$ en los extremos de los cromatogramas, se adoptó el criterio de ajustar $\log M_w(V)$

con una recta en el rango de V 's indicado por las líneas de trazos verticales. De esta forma, se reduce notoriamente el efecto de las fracciones de alta masa molar correspondientes a los agregados. La DMM, $s_{DR}(\log M_w)$, se obtiene combinando $s_{DR}(V)$ con la calibración lineal ajustada [Fig. VI.13.b)]. En la misma figura, se representa también la DMM $s_{DR}(\log M_{PUL})$ obtenida combinando el cromatograma DR de HEE [sección VI.3.b.i)] con la calibración directa de pululanos en la FM3 (Tabla VI.5). La DMM obtenida por SEC / (DR + LS) resulta más angosta y con menores valores de \overline{M}_w .

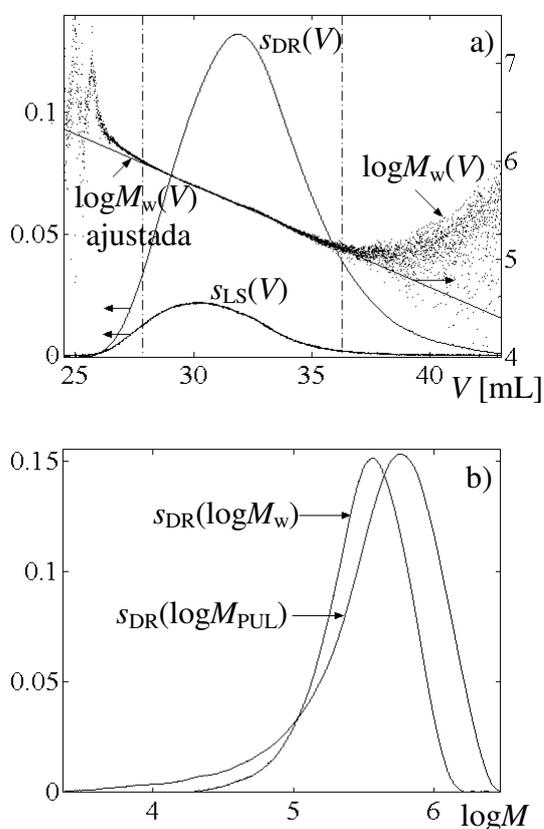


Figura VI.13. Estimación de la DMM del quitosano HEE por SEC / (DR + LS):
 a) Cromatogramas DR y LS, y calibraciones *ad hoc*; b) DMM estimada, comparada con la obtenida por SEC/DR (base pululanos).

En la Tabla VI.9 se resumen las masas molares medias y podispersidades de todos los quitosanos. En general, los \overline{M}_n resultan mayores y los \overline{M}_w menores a los

obtenidos por SEC/DR utilizando la calibración directa de pululanos (Tabla VI.8). A pesar de estas diferencias, se mantiene la misma tendencia observada anteriormente, donde las masas molares medias decrecen con la dosis de R- γ [Fig. VI.14].

Tabla VI.9. Masas molares medias de quitosanos por SEC / (DR + LS).

Quitosano	Ec. (I.33)	SEC / (DR + LS)		
	\overline{M}_w [g/mol]	\overline{M}_n [g/mol]	\overline{M}_w [g/mol]	$\overline{M}_w/\overline{M}_n$ [-]
<i>Grupo A</i>				
Q1 (B)	348000	170000	309000	1.82
Q2	110000	33200	97000	2.92
Q3 (B)	136000	33800	58200	1.72
Q4 (B)	126000	25100	45100	1.79
<i>Grupo B</i>				
HEE	401000	248000	391000	1.57
E7 (B)	451000	212000	368000	1.74
E10	300000	158000	281000	1.78
E45	120000	58300	122000	2.09
E60	105000	51000	100000	1.96
E90	76600	34600	72800	2.10
E100	65500	33200	56000	1.69
<i>Grupo C</i>				
HO	813000	568000	769000	1.36
O7	510000	319000	457000	1.43
O15 (B)	346000	139000	259000	1.87
O30 (B)	266000	110000	221000	2.01
O45 (B)	285000	79300	163000	2.05
O60 (B)	211000	59500	125000	2.11
O90 (B)	170000	44900	91000	2.03
O100 (B)	129000	44400	74100	1.67

(B): El cromatograma LS exhibe una bimodalidad

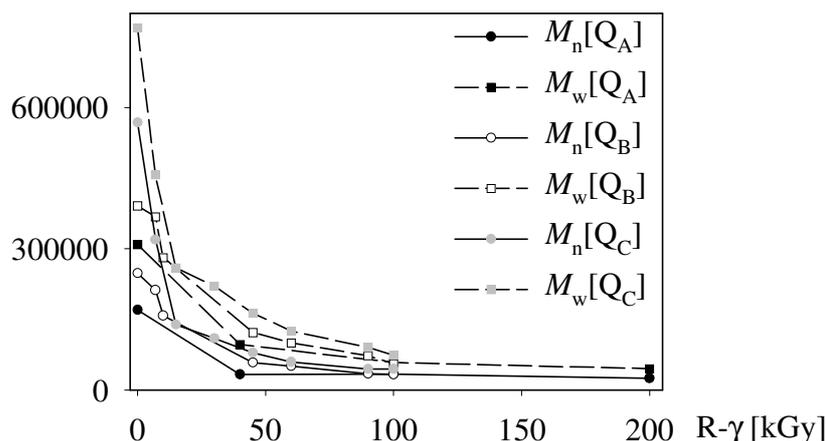


Figura VI.14. SEC / (DR + LS) de quitosanos. Efecto de la dosis de R- γ sobre las masas molares medias.

VI.3.c. Análisis de Biopolímeros Neutros: Dextranos y Almidones

VI.3.c.i) DMM de una Muestra de Dextrano Comercial por SEC / DR

Se analizó una muestra comercial de dextrano (Dextran, MW = 60000 – 90000. Grado Clínico. Lote N°: 4717A. Cat. N°: 101513. ICN Biomedicals Inc.) por SEC con detección DR, bajo las mismas condiciones descritas en la Sección VI.2., y utilizando la fase móvil FM1. La muestra de dextrano se preparó por pesada y disolución en la FM1 (concentración aproximada, 1mg/mL), fue filtrada con un filtro de 0.45 μm de diámetro de poro previo a su inyección, y el volumen inyectado fue de 200 μL .

A partir del cromatograma $s_{\text{DR}}(V)$ [Fig. VI.15.a)] y de la calibración directa de dextranos [Sección VI.2.b), Tabla VI.5], se estimó la DMM que se muestra en la Fig. VI.15.b) y sus masas molares medias se resumen en la Tabla VI.10. En la misma tabla, se muestran las masas molares medias estimadas cuando se utilizan: (i) la calibración directa de pululanos en la FM1 (Tabla VI.5.), (ii) las calibraciones universales individuales de pululanos y de dextranos en la FM1 (Tabla VI.5.), y (iii) la calibración universal única para todos los estándares [Fig. VI.5.b)]. En (ii) y (iii), las masas molares se obtuvieron por

combinación de $\log J_p(V)$ con las constantes de MHS de dextrans en la FM1 (Tabla VI.4). En todos los casos, las masa molares medias estimadas se ubican dentro del rango informado por el fabricante. Como se mencionó en la sección VI.2.b), la calibración de pululanos (lineales) produce valores de \bar{M}_n y \bar{M}_w menores a los calculados con la calibración de dextrans, debido a la contracción volumétrica de los dextrans por sus ramas. Con la calibración universal de dextrans se obtuvieron valores medios iguales a los de la calibración directa. Las calibraciones universales que consideran a los estándares de pululanos proveen valores de \bar{M}_n y \bar{M}_w algo mayores a los calculados con la calibración directa, debido también al efecto de las ramas.

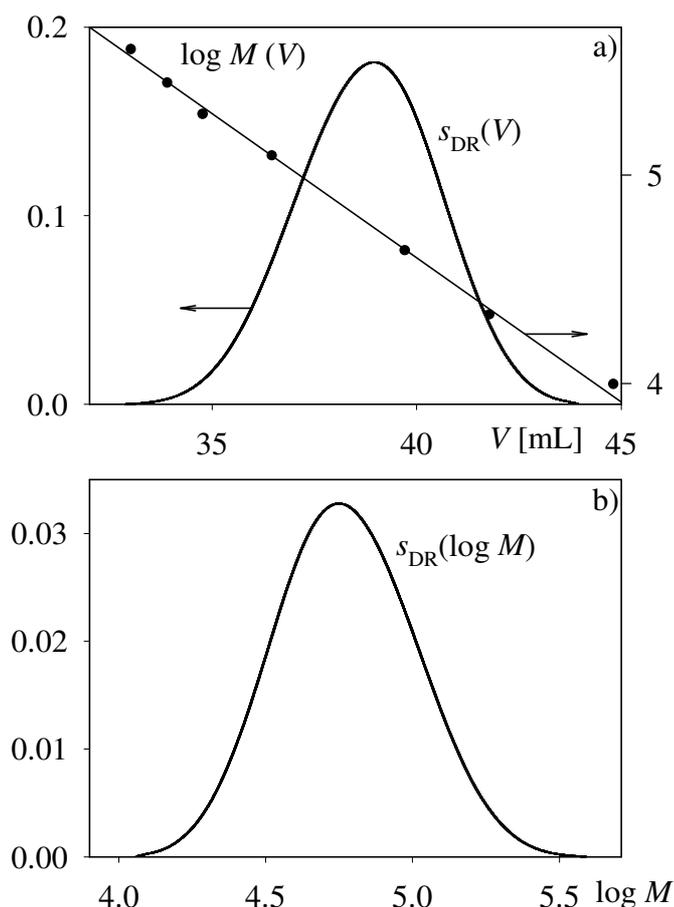


Figura VI.15. Análisis de una muestra comercial de Dextrano. a) Cromatograma másico corregido por línea de base, y calibración directa obtenida con estándares de dextrans; b) DMM estimada, $s_{DR}(\log M)$.

Tabla VI.10. Masas molares medias de dextranos por SEC / DR.

Calibración	Estándares	\bar{M}_n	\bar{M}_w	\bar{M}_w / \bar{M}_n
$\log M_p(V)$	Dextranos	51100	68500	1.34
	Pululanos	48900	63900	1.31
$\log J_p(V)$	Dextranos	51000	68300	1.34
	Pululanos	54500	76000	1.39
	Dextranos y Pululanos	62300	85500	1.38

VI.3.c.ii) Muestras de Almidón de Mandioca. Descripción de la Técnica de Extracción y Separación de Amilosa y Amilopectina

En esta sección se analiza una muestra de almidón de mandioca provista por el grupo de investigación del área de Cereales y Oleaginosos del Instituto de Tecnología de Alimentos (ITA, UNL). Se desea caracterizar al almidón y a las fracciones individuales de amilosa y amilopectina. Para ello, se dispersa el almidón en agua y se lo somete a distintas temperaturas hasta lograr una disolución adecuada. Luego, cada muestra correspondiente a una temperatura distinta es tratada con n-butanol. El agregado de n-butanol a los sobrenadantes acuosos de las muestras de almidón produce un precipitado, debido a la capacidad de la amilosa de formar un complejo insoluble en solución acuosa a temperatura ambiente. De esta manera es factible separar las fracciones de amilosa (precipitado) y amilopectina (solución). Luego, el complejo amilosa-butanol puede ser redisoluelto aumentando la temperatura, y logrando la disolución de la amilosa. Así, se podrán obtener cromatogramas del almidón tratado a distintas temperaturas (previo al fraccionamiento con n-butanol), de las fracciones de amilosa (por redisolución del precipitado), y de la amilopectina (remanente en la solución).

El procedimiento utilizado fue el siguiente (Banks y Greenwood, 1975):

a) Se dispersó aproximadamente 1 g de muestra en 100 mL de agua.

b) Se tomaron alícuotas de 10 mL de la dispersión anterior, y se sometieron durante 30 min. a las siguientes temperaturas en baño María con agitación continua: 70, 75, 80, 90, y 95 °C.

c) Cada alícuota fue centrifugada a 3400 rpm (2000 unidades de aceleración gravitatoria), durante 30 min. a temperatura ambiente. Se recogieron los sobrenadantes para su posterior procesamiento.

d) Los sobrenadantes del punto c) se trataron con n-butanol durante 30 min. con agitación continua. Se obtuvieron soluciones acuosas opalescentes que se centrifugaron a 3400 rpm, durante 30 min. a temperatura ambiente. Resultaron dos fracciones, sobrenadante y precipitado (redisuelto en agua a 60 °C), que se conservaron para su posterior análisis.

Tanto los sobrenadantes del punto c) como los precipitados redisueltos del punto d) deben inyectarse inmediatamente, ya que la amilosa retrodegrada en solución acuosa, formando precipitados insolubles con el transcurso del tiempo.

VI.3.c.iii) Análisis de Amilosa y Amilopectina por SEC / DR

Las muestras obtenidas según el procedimiento anterior se analizaron con el mismo equipamiento de la Sección VI.2, en la FM1. El caudal de trabajo fue de 0.8 mL/min y el volumen de muestra inyectado fue de 200 µL. Las muestras obtenidas en las etapas c) y d) de la técnica de extracción fueron filtradas con filtro de 0.45 µm previo a su inyección en el sistema cromatográfico.

Los sobrenadantes filtrados de la etapa c) de la técnica de extracción, se inyectaron obteniéndose los cromatogramas DR de la Fig. VI.16. A bajos volúmenes de retención, la resolución cromatográfica para las muestras tratadas a 90 y 95 °C podría ser baja, y cercana a la zona no lineal de fraccionamiento próxima a la exclusión. Las formas

de los cromatogramas cambian con la temperatura (T) debido al diferente contenido de amilopectina. Los cromatogramas de las muestras tratadas a mayor T se desplazan hacia menores V, debido a la presencia de mayor cantidad de amilopectina. Para $T < 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se observa un único pico ancho en el rango de [27 – 40] mL que podría corresponder a las fracciones de amilosa, ya que a estas T la amilopectina permanece todavía concentrada dentro de los gránulos de almidón (Banks y Greenwood, 1975). Para $T > 75\text{ }^{\circ}\text{C}$, la amilopectina es liberada de los gránulos de almidón, pasando a la solución y aumentando su viscosidad. Los sobrepicos más angostos observados a $V \approx 27\text{ mL}$, podrían corresponder a fracciones de amilopectina. Las muestras tratadas a 70 y 75 °C se inyectaron por duplicado, observándose una buena repetitividad de los cromatogramas (Fig. VI.16), mientras que el resto de las muestras se inyectó una única vez debido a que por la elevada viscosidad de las soluciones, se recuperó muy poca cantidad de solución luego del filtrado.

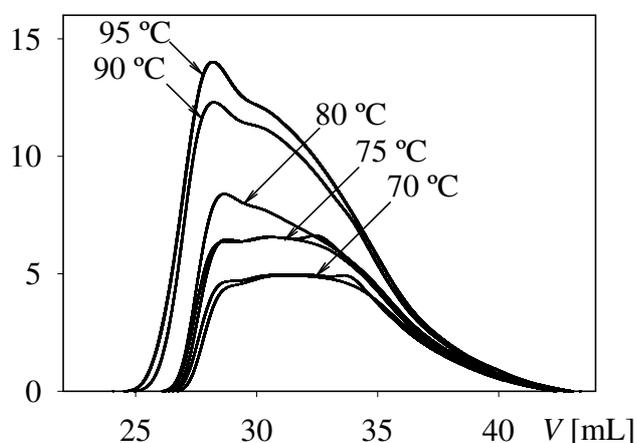


Figura VI.16. Cromatogramas DR de las muestras de almidón, correspondientes a los sobrenadantes [etapa c) de la técnica de extracción].

El área de los cromatogramas aumenta con T dado que en tales condiciones se extrae mayor cantidad de masa (tanto de amilosa como de amilopectina). Para corroborar esa tendencia, se midió (por duplicado) la concentración de amilosa en los sobrenadantes sin filtrar, con una técnica colorimétrica por espectrofotometría UV-Vis

(Knutson, 1986). En la Fig. VI.17 se grafican la absorbancia (círculos y líneas llenas) y el área de los cromatogramas (círculos vacíos y líneas de trazos), en función de la T. La absorbancia aumenta con la T de tratamiento (hasta 80 °C), y luego permanece aproximadamente constante indicando que la mayor masa de amilosa se libera a $T > 80$ °C).

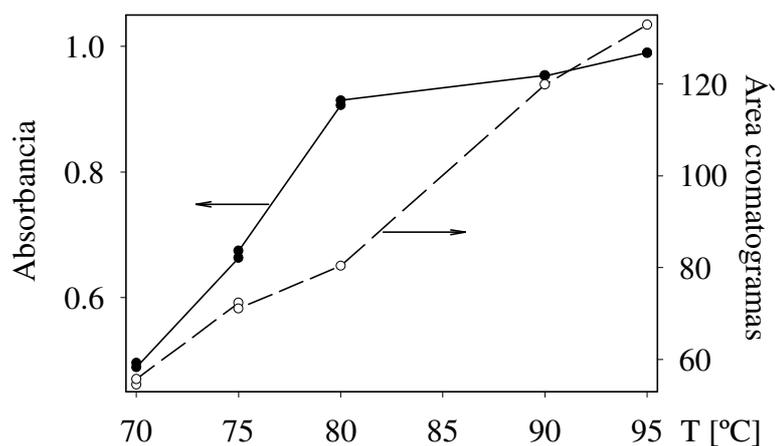


Figura VI.17. Absorbancia y área de los cromatogramas DR correspondientes a los sobrenadantes [etapa c) de la técnica de extracción].

Se inyectaron también los sobrenadantes y precipitados obtenidos después del tratamiento con n-butanol [etapa d) de la técnica de extracción]. Los cromatogramas DR resultantes se muestran en las Figs VI.18 y VI.19, respectivamente. Idealmente, la Fig. VI.18 debería representar los cromatogramas de la amilopectina; mientras que la Fig. VI.19 correspondería a los cromatogramas de la amilosa. Sin embargo, dado que la separación no es perfecta, ambos conjuntos de cromatogramas estarán en alguna medida contaminados por la fracción complementaria.

Los sobrenadantes de las muestras tratadas a $T < 80$ °C, originan dos picos solapados [Fig. VI.18]: uno más ancho, debido a un exceso de amilosa no complejada con n-butanol; y otro más angosto, correspondiente a la amilopectina. Este último pico angosto no llega a observarse en los cromatogramas de la Fig. VI.16, debido probablemente a que la mayor concentración de amilosa produce el enmascaramiento del pico de amilopectina.

A iguales T, los cromatogramas de la Fig. VI.18 exhiben áreas inferiores a las de los cromatogramas de la Fig. VI.16, indicando que el efecto complejante del n-butanol disminuye la cantidad de amilosa en solución. De todas maneras, el proceso de separación no fue totalmente eficiente, o bien la cantidad de alcohol adicionada no fue la suficiente para complejar toda la amilosa presente.

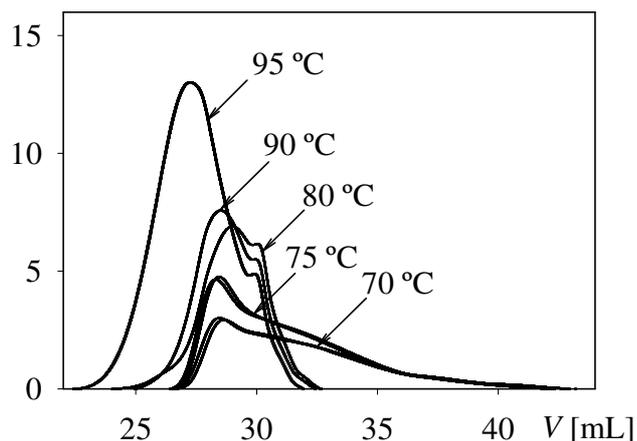


Figura VI.18. Cromatogramas DR de los sobrenadantes de la muestra de almidón tratada con n-butanol [etapa d) de la técnica de extracción].

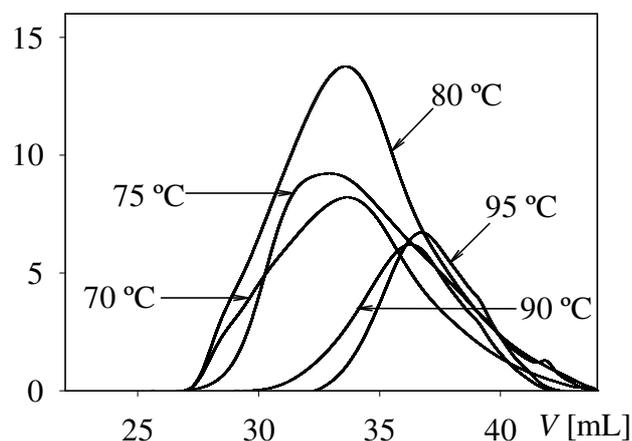


Figura VI.19. Cromatogramas DR de los precipitados de la muestra de almidón tratada con n-butanol [etapa d) de la técnica de extracción].

En las muestras correspondientes a $T > 80$ °C también se obtienen cromatogramas con dos picos solapados, pero en este caso el pico principal es el atribuido

a la amilopectina, mientras que un pico mucho menor se observa en el rango de V 's atribuido a la amilosa. Además, el área de los picos aumenta con T , debido a la mayor disolución de la amilopectina. Los cromatogramas se desplazan hacia menores V 's a medida que aumenta T , revelando una mayor masa molar de las especies extraídas (probablemente con mayor número de ramificaciones).

Los cromatogramas de la Fig. VI.19 corresponden a los complejos de amilosa–butanol redisueltos. Para $70 < T < 80$ °C, los cromatogramas se ubican en un mismo rango de V 's, y su área aumenta con T , indicando mayor masa de amilosa extraída. Sin embargo, esta tendencia se pierde en los cromatogramas de las muestras tratadas a 90 y 95 °C, que presentan menores áreas y están desplazados a menores V 's. Este efecto puede atribuirse a dos fenómenos que ocurren a elevadas T : 1) la retención de muestra en el filtro previo a la inyección cromatográfica, como consecuencia del incremento de la viscosidad de la solución debido a la mayor concentración de amilosa extraída; y 2) la tendencia de la amilopectina en solución a formar redes que retienen la amilosa impidiendo su precipitado. A efectos de corroborar esta presunción, se midieron las absorbancias de los precipitados redisueltos y sin filtrar, observándose que la absorbancia aumenta para las muestras tratadas entre 70 y 80 °C, y luego permanece aproximadamente constante para el resto de las T 's. En la Fig. VI.20 se muestran la absorbancia (círculos y líneas llenas) de los precipitados redisueltos [etapa d) de la técnica] sin filtrar, y el área de los cromatogramas (círculos vacíos y líneas de trazos) de los precipitados redisueltos filtrados, en función de la T . Se observa que mientras la absorbancia aumenta (indicando mayor concentración de amilosa); el área de los cromatogramas disminuye para aquellas muestras tratadas a $T > 80$ °C. En consecuencia, los cromatogramas correspondientes a las muestras tratadas a 90 y 95 °C no son representativos de la totalidad de amilosa presente.

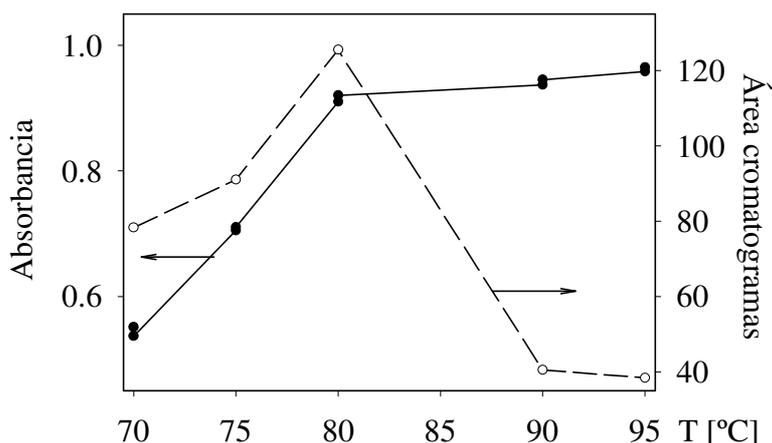


Figura VI.20. Absorbancia y área de los cromatogramas DR correspondientes a los precipitados redisolvidos [etapa d) de la técnica de extracción].

Tabla VI.11. Masas molares medias de amilopectina y amilosa.

Muestra	T [°C]	Base Pululanos			Base Dextranos		
		\bar{M}_n [g/mol]	\bar{M}_w [g/mol]	\bar{M}_w/\bar{M}_n [-]	\bar{M}_n [g/mol]	\bar{M}_w [g/mol]	\bar{M}_w/\bar{M}_n [-]
Amilopectina	70	302000	708000	2.34	335000	844000	2.52
	75	375000	805000	2.15	419000	964000	2.30
	80	1000000	1200000	1.17	1200000	1420000	1.18
	90	1100000	1260000	1.15	1320000	1530000	1.16
	95	1600000	1990000	1.24	1950000	2460000	1.27
Amilosa	70	156000	370000	2.38	168000	432000	2.57
	75	129000	305000	2.35	139000	352000	2.53
	80	149000	353000	2.38	160000	410000	2.56

Se determinaron las masas molares medias de la amilopectina (a todas las T's), y de la amilosa (a T = 70, 75 y 80 °C), utilizando las calibraciones directas de pululanos y de dextranos (Tabla VI.5), aunque estrictamente ninguna de esas calibraciones es correcta. Se las adoptó sólo a fines comparativos, y con la idea cualitativa de evaluar: 1) la amilopectina, con la calibración de dextranos (moléculas ramificadas); y 2) la amilosa, con la calibración de pululanos (moléculas lineales). Los valores obtenidos se resumen en la Tabla VI.11. Como era de esperar, las masas molares medias de la fracción

correspondiente a la amilopectina son sensiblemente mayores a las de amilosa, y aumentan con la T de tratamiento de la muestra. En cambio, las masas molares de la amilosa no muestran ninguna tendencia definida. Las masas molares estimadas para la amilosa se encuentran en rangos reportados por otros autores (por ejemplo, 10^5 – 10^6 g/mol, Roger *et al.*, 1996, Suortti *et al.*, 1998); mientras que las masas molares estimadas para la amilopectina resultaron apreciablemente menores (hasta 10^8 g/mol, Roger *et al.*, 1999). Indudablemente, valores más exactos deberán obtenerse utilizando sensores que permitan determinar la masa molar en forma absoluta (particularmente, LS).

VI.4. Conclusiones

Se comenzaron los primeros trabajos de investigación en el área de SEC en fase acuosa en el Grupo de Polímeros del INTEC. Se logró poner en funcionamiento el sistema cromatográfico, determinar su performance, explorar diferentes fases móviles y su compatibilidad con los rellenos de las columnas, evaluar algunas técnicas de preparación y separación de muestras, y analizar algunos polímeros hidrosolubles de características muy diversas (aniónicos, catiónicos y neutros). En tal sentido, si bien las tareas desarrolladas y comentadas en este Capítulo no conforman una labor científica profunda, constituyen un primer paso necesario para la explotación futura de la técnica en forma más intensiva.

Uno de los mayores desafíos en SEC de fase acuosa es determinar las condiciones operativas para lograr un fraccionamiento molecular por exclusión pura. En el caso de los polímeros neutros analizados (pululanos, dextranos y almidones), las condiciones se verifican con las FM1 y FM2. En cambio, con la FM3 se observó un efecto de repulsión iónica revelado por una notable reducción de los volúmenes de retención. Sin embargo, con las columnas utilizadas, esta FM3 permite condiciones de exclusión en el análisis de quitosanos (biopolímero catiónico). En el caso del PAA (polímero sintético aniónico), la condición de fraccionamiento por exclusión en la FM2 se determinó por

comparación con los cromatogramas obtenidos en la FM4, donde normalmente se acepta el fraccionamiento ideal. El concepto de calibración universal es equivalente al fraccionamiento ideal por tamaños, y por lo tanto es una herramienta aconsejable para su verificación. En tal sentido, será de utilidad contar con mediciones independientes de la viscosidad intrínseca y las constantes de MHS del polímero en las FMs utilizadas.

La segunda limitación importante en SEC de fase acuosa es la estimación de las masas molares absolutas, dado que normalmente no se dispone de los estándares cromatográficos específicos, y en muchos casos las moléculas son altamente ramificadas o de masas molares muy elevadas. En general, deberían utilizarse sensores de masa molar absoluta (por ejemplo, para analizar la amilopectina). Sin embargo, en algunos casos particulares puede bastar con un DR clásico, como se vio en el análisis del PAA, donde las masas molares pudieron determinarse en forma confiable gracias a la linealidad de sus moléculas, a la validez de la calibración universal, y al conocimiento de las constantes de MHS en las FMs utilizadas.

La principal dificultad en el análisis de quitosanos residió en la determinación de sus masas molares absolutas. En una primera aproximación, se utilizó la calibración directa de pululanos en la FM3, asumiendo un comportamiento similar en solución de las moléculas involucradas. Alternativamente –y por primera vez– se utilizó el detector de dispersión de luz multiángulo. Con este detector, los resultados fueron cualitativamente semejantes en cuanto a las tendencias observadas por las muestras irradiadas. Por ejemplo, se pudo verificar la disminución de las masas molares y de la polidispersión con dosis de radiación crecientes, y se logró estimar la eficiencia de formación de oligoquitosanos por acción de la R- γ . Dos limitaciones importantes impidieron obtener resultados más confiables. En primer lugar, la presencia de cromatogramas bimodales, posiblemente debido a agregados moleculares en las muestras

preparadas. En segundo lugar, las mediciones LS resultaron excesivamente ruidosas, fundamentalmente porque al momento de la medición no se disponía de un filtro específico para el fluido carrier recomendado por fabricante del detector para mediciones en fase acuosa.

Por último, se implementó una técnica de separación de las fracciones de amilosa y amilopectina para analizar muestras de almidón de mandioca, y los resultados se evaluaron por SEC/DR. La separación no resultó totalmente eficiente, en el sentido que subsistieron contaminaciones de las fracciones de amilosa con amilopectina, y viceversa. Probablemente, se podría optimizar la separación ensayando otras cantidades de alcohol agregado, o adicionando concanavalina-A para formar un complejo insoluble con la amilopectina, y lograr que la amilosa permanezca en solución.

Las masas molares medias de amilosa y amilopectina se estimaron en base a pululanos y dextransos, y las tendencias resultaron razonables. Las masas molares de las fracciones de amilopectina resultaron notablemente inferiores a las reportadas para almidones de otras fuentes botánicas. Sin embargo, no se cuenta con información bibliográfica acerca de las masas molares de almidón de mandioca. Los resultados deberán confirmarse optimizando la técnica de extracción, y utilizando detección de masa molar para determinar las DMMs en forma absoluta. En tal caso, la suma convenientemente ponderada de las DMMs de las fracciones debería reproducir la DMM obtenida para el almidón sin separar.

CAPÍTULO VII. Conclusiones y Sugerencias para Trabajos Futuros

Actualmente, SEC es una de las técnicas analíticas más utilizadas para la caracterización macromolecular de polímeros. Idealmente, la técnica es muy precisa para estimar la DMM de un homopolímero lineal; y potencialmente apta para estimar la DCQ de un copolímero y la DGR de polímeros ramificados. Los desarrollos más recientes, se han visto potenciados por la aparición comercial de los sensores de masa molar, que –en principio– permitirían determinar masas molares instantáneas en forma absoluta. Sin embargo, en cualquier aplicación, siguen perdurando diversos errores, que tornan a las estimaciones inciertas y/o erróneas.

En esta tesis, se ponen de manifiesto varias fuentes de error relacionadas con la técnica MD-SEC, fundamentalmente en aspectos asociados a las calibraciones, al ensanchamiento instrumental (E.I.), y a la caracterización de polímeros complejos. En general, la metodología utilizada combinó desarrollos teóricos, simulaciones numéricas y aplicaciones experimentales.

Las calibraciones tradicionales de SEC son: 1) la calibración “directa” que correlaciona masas molares, M , con volúmenes de retención, V ; y 2) la calibración “universal”, que correlaciona tamaños de las moléculas en solución, $[\eta] M$, con V . Ambas calibraciones sufren incertidumbres tan elevadas que, aun en el caso más simple de los homopolímeros lineales, impiden una estimación exacta de las propiedades moleculares. En el análisis por SEC / DR, el principal problema reside en la incertidumbre de las masas molares de los estándares utilizados para calibrar. Quizás, podrían obtenerse estimaciones mejores de la calibración de masa molar si en lugar de utilizar los cromatogramas de masa medidos, se emplearan los cromatogramas corregidos por E.I.

En SEC con detección de masa molar, la calibración *ad hoc* aportada por los detectores, incluye otro conjunto diferente de errores; entre ellos, los principales son: 1) el IDV; 2) la concentración de la muestra inyectada (o la calibración de los detectores); 3) la mala relación señal-a-ruido en las colas de los cromatogramas; y 4) el E.I. Estas fuentes de error afectan en forma distinta a la DMM estimada. Por ejemplo, el IDV modifica fundamentalmente la polidispersión; mientras que la concentración tiene un efecto directo sobre las masas molares medias. Con relación a 3), las calibraciones *ad hoc* deben ser extrapoladas (con algún criterio) hacia las colas de los cromatogramas. Algunos softwares comerciales directamente descartan esas colas, lo que origina DMMs con polidispersiones subestimadas.

El E.I. es importante en el análisis de polímeros muy angostos (o con componentes de masa molar que produzcan picos angostos en los cromatogramas), típicamente con polidispersiones inferiores a 1.10. En muestras angostas, el E.I. y el IDV originan errores muy similares, provocando básicamente la “rotación” de las calibraciones, y consecuentemente la estimación errónea de la polidispersidad. La elevada correlación entre estos factores, permite en algunos casos utilizar al IDV para corregir por E.I. Sin embargo, esta operación es estrictamente válida sólo en el caso de cromatogramas Gaussianos.

La corrección por E.I. es un problema extensamente estudiado en la literatura. Existen dos enfoques generales para explicar los fenómenos de dispersión en las columnas: 1) el enfoque global o “fenomenológico” de Tung (1966); y 2) los modelos matemáticos detallados. El enfoque 1) es más general, en el sentido que también permite englobar otros fenómenos de dispersión extra-columnas. Los modelos matemáticos, en cambio, sólo se centran en el fraccionamiento intra-columna, e incluyen un número de parámetros físico-químicos de difícil determinación. Con relación a 1), la dificultad reside

en estimar la función de E.I., y en tal sentido esta tesis propone un avance novedoso. El algoritmo de estimación de funciones arbitrarias desarrollado es muy general, y compensa la falencia usual de estimar funciones Gaussianas. Además, su simplificación al caso de estimar una EMG es también útil, dado su simplicidad y robustez, sumado al hecho que la mayor parte de las funciones asimétricas angostas pueden ser razonablemente ajustadas con este tipo de distribuciones. La limitación se encuentra posiblemente en la zona próxima a la exclusión total, donde el E.I. parece tornarse excesivamente asimétrico. En esos extremos, quizá el algoritmo de funciones arbitrarias pueda ser más promisorio.

La no uniformidad de la función de E.I. es un interrogante aun hoy en día, encontrándose en la literatura propuestas diversas (y a veces contrapuestas). El ancho de la función de E.I. suele reportarse tanto constante (uniforme) como con tendencias monótonas crecientes, decrecientes, o pasando por un mínimo en la parte central del rango de fraccionamiento. Dilucidar este problema no parece una tarea obvia, y posiblemente la solución dependa del sistema cromatográfico disponible. La multiplicidad de mediciones de estándares, la reproducibilidad de masas molares medias independientemente determinadas (por ejemplo, por MALDI), y el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento de datos, son las herramientas adecuadas para el avance de las investigaciones en esta línea. Equipamientos comerciales actuales incorporan tres detectores (un sensor másico y dos sensores de masa molar); y permitirían efectuar pruebas de consistencia entre los cromatogramas medidos, la calibración de masa molar conocida y las funciones de E.I. estimadas.

La estimación de la función de E.I. no es un objetivo final de interés práctico, sino tan sólo un paso intermedio en busca de la solución deseada: la DMM corregida por E.I. (o verdadera). En el enfoque clásico, conocido el E.I., el paso siguiente consiste en corregir los cromatogramas medidos a través de procedimientos de inversión numérica,

que normalmente introducen soluciones oscilatorias espurias. Ante esta situación, parece más razonable encarar metodologías de procesamiento de datos que eviten la estimación intermedia de la función de E.I., y que en su lugar directamente corrijan la DMM estimada. Este enfoque ha sido planteado y probado numéricamente en el Capítulo III, y debería a continuación ser verificado experimentalmente.

La metodología utilizada para el planteo y derivación de los modelos matemáticos que describen el fraccionamiento SEC ideal de polímeros complejos es novedosa. La principal hipótesis reside en la validez del concepto de calibración universal, y por tal motivo estos modelos sólo requieren información sobre las constantes de MHS de las especies intervinientes. En los casos particulares analizados, se pusieron en evidencia falencias de la técnica SEC para determinar la DCQ de un copolímero dibloque SB, y la DGR de un homopolímero ramificado de PVAc. Estos modelos, sin embargo, pueden ser utilizados para el análisis de otros polímeros, y los niveles de errores de estimación podrían modificarse notablemente según las constantes físico-químicas correspondientes, ya sea mejorando o empeorando la capacidad de la técnica. La extensión de estos modelos a casos aun más complejos (como copolímeros estadísticos, copolímeros lineales con tres o más bloques, terpolímeros de injerto, etc.), parece viable.

El análisis de polímeros por SEC en fase acuosa constituyó también un desafío novedoso. Los avances logrados son aún incipientes, pero se ha ganado una importante experiencia inicial en el manejo de la técnica. La caracterización de polímeros hidrosolubles reúne varias de las desventajas y complicaciones de la técnica SEC. En efecto, se conjugan dificultades tales como: i) la complejidad de preparación de las muestras previo a su inyección, ii) la búsqueda de condiciones adecuadas para asegurar la exclusión por tamaños, compensando mecanismos de fraccionamiento secundario inducidos por las moléculas cargadas (polielectrolitos), iii) la necesidad de explorar fases

móviles alternativas, iv) la imposibilidad de contar con estándares cromatográficos, v) las características de polímero complejo (ramificado o mezclas), vi) las altas masas molares posiblemente no fraccionables o degradables, etc.

En definitiva, el análisis de polímeros hidrosolubles es bastante “artesanal”, y las soluciones resultan *ad hoc* para cada problema tratado. Los ejemplos considerados fueron variados, en el sentido que se analizaron polímeros tanto lineales como ramificados, puros y compuestos, aniónicos, catiónicos y neutros. En efecto, dextranos y almidones son neutros; pero el almidón está compuesto por fracciones diferentes (la amilosa, lineal; y la amilopectina, ramificada); mientras que el dextrano es un homopolímero ramificado. El PAA es un polímero sintético, hidrosoluble y lineal, de características aniónicas; y el quitosano es un biopolímero catiónico lineal. Sólo en el caso de los dextranos se cuenta con estándares cromatográficos. Los estándares de pululanos (neutros) son usualmente utilizados para reportar masas molares medias, por tratarse de polímeros angostos y lineales. La determinación de masas molares absolutas confiables por SEC / DR sólo es posible en casos muy especiales (como lo fue en el caso del PAA). Por tal motivo, la tendencia actual en el área de caracterización de biopolímeros, es la utilización de sensores de masa molar, y en especial de sensores de dispersión de luz.

Sugerencias para Trabajos Futuros

Se listan a continuación algunas tareas de interés que quedaron pendientes y/o que surgen como extensión natural de los desarrollos presentados en esta tesis.

1.- Ensanchamiento instrumental.

1.a) Las dificultades para estimar la función de E.I. residen en el escaso contenido de información de las señales medidas sobre el proceso de fraccionamiento. En esta línea, se podría avanzar en la estimación del E.I. a través del uso de sistemas de triple detección (Capítulo III). El agregado de nuevas señales independientes permiten incrementar la

información disponible sobre la dispersión.

1.b) Se debería continuar explorando las técnicas directas de corrección de los cromatogramas medidos sin conocimiento explícito del E.I. (Capítulo III). Los formalismos actuales más avanzados presentan a la técnica bajo el nombre de “deconvolución a ciegas”, para referirse a la estimación de la señal de entrada (cromatograma corregido) a partir de las salidas (cromatogramas medidos), sin conocer la dinámica del sistema (función de E.I.).

1.c) En los últimos años, están perfeccionándose los modelos detallados de fraccionamiento en las columnas (en particular, la teoría estocástica). Estos modelos podrían ayudar a interpretar el proceso de fraccionamiento, y a describir formas más adecuadas para la función de E.I. El ajuste paramétrico de estos modelos con diferentes estándares conocidos permitiría en principio caracterizar a las columnas; y la DMM corregida de una muestra incógnita podría obtenerse por “inversión” del modelo e información sobre las mediciones.

2.- Análisis de polímeros complejos

2.a) El análisis por SEC de polímeros bloque SBS, o de terpolímeros de injerto, es de interés tecnológico. La extensión de los modelos desarrollados en el Capítulo V a cualquiera de estos dos casos parece posible. La utilidad de estos modelos reside en su capacidad para cuantificar errores cometidos en las distribuciones estimadas. Pero también son potencialmente útiles para combinarlos con modelos matemáticos representativos de la síntesis de los polímeros, y lograr caracterizaciones moleculares más confiables.

2.b) Se piensa explorar la posibilidad de utilizar los modelos de fraccionamiento en su forma “inversa”, para poder inferir propiedades de polímeros cromatográficamente complejos. Es decir, a partir de las mediciones y del modelo de fraccionamiento, se pretende determinar características moleculares del polímero analizado. Esta alternativa

sería particularmente viable en la medida que se disponga de un número apreciable de mediciones independientes.

3.- Análisis de polímeros hidrosolubles

Se planea en lo inmediato perfeccionar la caracterización molecular de los almidones. En tal sentido debe inicialmente optimizarse la técnica de extracción de amilosa / amilopectina descrita en el Capítulo VI. Además, se deben implementar las mediciones por SEC / LS, a efectos de determinar masas molares absolutas, gráficos conformacionales, etc. Las incertidumbres sobre el fraccionamiento de las altas masas molares de la amilopectina, podrían eliminarse a partir de mediciones fuera de línea de la masa molar media en peso, a través de la denominada operatoria batch del detector LS, donde las muestras se analizan sin ser previamente fraccionadas.

APÉNDICE I. Descripción de las Diferentes Distribuciones **Utilizadas en esta Tesis**

En este Apéndice se resumen las principales distribuciones utilizadas en esta tesis.

I.1. Distribuciones de Longitud de Cadena y de Masas Molares Típicas

Las distribuciones de longitud de cadena en peso (WCLD) de un polímero describen la masa correspondiente a cada longitud de cadena, i . Las WCLDs utilizadas en esta tesis son:

$$(i) \text{ WCLD de Poisson} \quad w_{\text{P}}(i) = \frac{i}{\lambda + 1} \frac{e^{-\lambda} \lambda^{i-1}}{(i-1)!} \quad (\text{AI.1.a})$$

$$(ii) \text{ WCLD normal-logarítmica} \quad w_{\text{LN}}(i) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_{\text{LN}} i} \exp\left[-\frac{[\ln(i/\bar{i})]^2}{2\sigma_{\text{LN}}^2}\right] \quad (\text{AI.1.b})$$

$$(iii) \text{ WCLD de Schulz-Flory} \quad w_{\text{SF}}(i) = a^2 i (1-a)^{i-1} \quad (\text{AI.1.c})$$

La distribución de Poisson tiene como único parámetro λ , que permite evaluar directamente tanto la media en número ($\lambda+1$), como la media en peso ($\lambda+2$). La distribución normal-logarítmica posee dos parámetros: la desviación estándar (σ_{LN}^2) y la media (\bar{i}). Por último, la distribución de Schulz-Flory posee un único parámetro (a).

Las WCLDs se transforman en DMMs en eje M lineal cambiando las abscisas, i , de la WCLD por $M_0 i$, donde M_0 es la masa molar de la unidad repetitiva. Las DMMs en eje $\log M$ se obtienen con la metodología descrita en el Capítulo I [sección:

I.1.a.ii)].

En la Fig. AI.1 se muestra un ejemplo de cada una de las DMMs presentadas, para el siguiente conjunto de parámetros: $M_0 = 104.15$ g/mol (masa molar del estireno), $\lambda = 100$, $\sigma_{LN}^2 = 0.32$, $\bar{i} = 2100$, y $a = 2.5 \times 10^{-3}$; respectivamente. Las escalas de ordenadas fueron arbitrarias. Las DMMs son asimétricas, a excepción de $w_{LN}(\log M)$ que resulta Gaussiana. La DMM de Poisson es más angosta (típicamente, obtenida por síntesis aniónica); mientras que la DMM de Schulz-Flory exhibe una polidispersidad próxima a 2 (típicamente, obtenida vía polimerización por radicales libres).

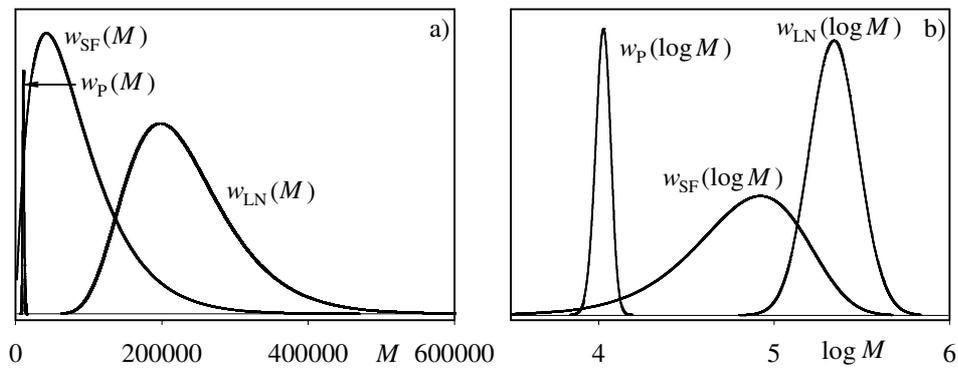


Figura AI.1. Distribuciones de masas molares: a) en eje M , y b) en eje $\log M$.

I.2. Distribuciones representativas de la Función de E.I.

El E.I. se suele representar con una función continua y asimétrica, $g(V)$; por ejemplo, una distribución Gaussiana modificada exponencialmente (EMG). Una EMG de primer orden se define por el producto de convolución entre una función Gaussiana y una función exponencial decreciente (Felingner, 1988):

$$g(V) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma \tau} \exp\left(-\frac{(V - \bar{V})^2}{2\sigma^2}\right) * \exp\left(-\frac{V}{\tau}\right) \quad (\text{AI.2.a})$$

donde el símbolo ‘*’ indica ‘producto de convolución’, normalmente definido como:

$[f_1(V) * f_2(V) = \int_0^\infty f_1(V - \bar{V}) f_2(\bar{V}) d\bar{V}]$; \bar{V} y σ representan el volumen medio y la desviación estándar de una función Gaussiana, respectivamente; y τ es la constante de decaimiento exponencial. En la Ec. (AI.2.a), $g(V)$ está normalizada en el sentido que $\int_0^\infty g(V) dV = 1$. También, el volumen medio de $g(V)$ resulta: $\bar{V} = \int_0^\infty V g(V) dV = \bar{V} + \tau$. Si se asume $\bar{V} = 0$, entonces $\bar{V} = -\tau$; y en este caso, la Ec. (AI.2.a) se reduce a la siguiente expresión de dos parámetros:

$$g(V) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma \tau} \exp\left(-\frac{(V + \tau)^2}{2\sigma^2}\right) * \exp\left(-\frac{V}{\tau}\right) \quad (\text{AI.2.b})$$

En el caso particular de asumir una función de E.I. simétrica, generalmente se representa a $g(V)$ con una función Gaussiana $g_G(V)$, definida como (Felsing, 1998):

$$g_G(V) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_G} \exp\left(-\frac{(V - \bar{V}_G)^2}{2\sigma_G^2}\right) \quad (\text{AI.3.a})$$

donde \bar{V}_G y σ_G son la media y la desviación estándar de la función Gaussiana, respectivamente. Si se adopta $\bar{V}_G = 0$, la Ec. (AI.3.a), se reduce a:

$$g_G(V) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma_G} \exp\left(-\frac{V^2}{2\sigma_G^2}\right) \quad (\text{AI.3.b})$$

La función Gaussiana es un caso límite de una EMG cuando $\tau \rightarrow 0$.

En la Fig. AI.2. se representan algunas EMG con distintos grados de asimetría (τ/σ), pero todas de medias nulas. A mayor asimetría, la altura de los picos disminuye y el máximo se desplaza a menores V .

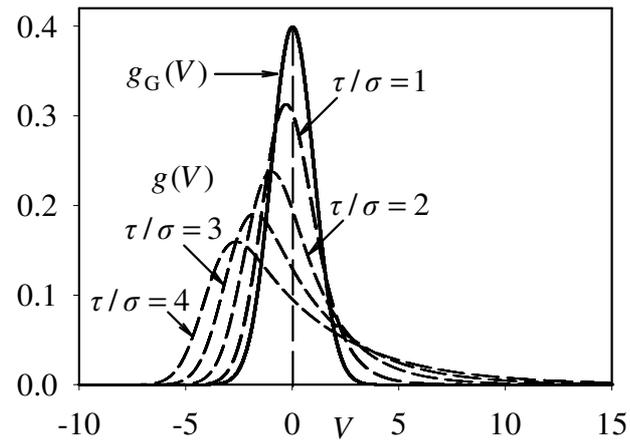


Figura AI.2. Funciones de E.I. típicas. EMG de diferentes asimetrías y de medias nulas.

APÉNDICE II. Simulación de los Cromatogramas y de las Calibraciones Ad Hoc de un Homopolímero Lineal

En este Apéndice, se presenta el procedimiento utilizado en esta tesis para simular los cromatogramas másicos y de masa molar de un homopolímero lineal, a partir del conocimiento de su DMM, $w(\log M)$, y de la calibración de masas molares, $M^c(V)$. El cromatograma másico corregido (o verdadero), $s_{DR}^c(V)$, que se obtendría en ausencia de E.I. se calcula como [Ec. (I.4)]:

$$s_{DR}^c(V) = K_{DR} w[M^c(V)] M^c(V) \quad (\text{AII.1})$$

donde K_{DR} es la ganancia constante del sensor DR. En $M^c(V)$, se introduce el supraíndice ‘c’ para resaltar la asunción de que una calibración de masa molar obtenida con estándares angostos no es afectada por E.I. Debido al E.I., en la celda del sensor DR, existe una DMM instantánea y el cromatograma de DR “medido”, $s_{DR}(V)$, se considera como una versión ensanchada (o filtrada) de $s_{DR}^c(V)$ modelada como (Tung, 1966):

$$s_{DR}(V) = \int_0^\infty g(V, \bar{V}) s_{DR}^c(\bar{V}) d\bar{V} \quad (\text{AII.2})$$

donde $g(V, \bar{V})$ es la función de E.I. (en general, no uniforme); y \bar{V} representa un volumen de retención medio. A cada \bar{V} , se define una función $g(V)$ individual diferente. Para funciones $g(V)$ simétricas, \bar{V} se asigna inequívocamente en el máximo (o moda). Para funciones $g(V)$ asimétricas, \bar{V} puede asignarse a la moda, la media, o cualquier otra medida de tendencia central. Esta ambigüedad sobre las funciones de E.I. asimétricas es un problema aún no resuelto en el tratamiento de datos en SEC. Para funciones de E.I. uniformes (o constantes con el volumen de retención), la Ec. (AII.2) se reduce a una simple integral de convolución.

Cuando se analizan homopolímeros lineales con sensores perfectos o ideales, entonces la siguiente expresión relaciona el cromatograma másico $s_{DR}^c(V)$ corregido por E.I. con cualquier cromatograma de masa molar corregido por E.I. $s_k^c(V)$ ($k = LS, SV, OS$) (Netopilík, 1982; Hamielec, 1984; Meira y Vega, 2005):

$$s_k^c(V) = K_k [M^c(V)]^{a_k} s_{DR}^c(V), \quad (a_{DR} = 0; a_{LS} = 1; a_{SV} = \alpha; a_{OS} = -1) \quad (\text{AII.3})$$

donde K_k es la ganancia del detector k ; y α es el exponente de MHS para una dada combinación de polímero-solvente-temperatura. En ausencia de E.I., la DMM instantánea resulta estrictamente monodispersa, y con cualquier sensor de masa molar se obtendría la calibración de masa molar $M^c(V)$ (Baumgarten *et al.*, 2002). Con la Ec. (AII.3) se obtiene una calibración de masa molar $M^c(V)$ independiente de la DMM, que en principio debería ser idéntica a la que se obtendría a partir de estándares uniformes en un cromatógrafo real con E.I.

Al despreciar los ensanchamientos extras producidos fuera de las columnas de fraccionamiento (en el inyector, celdas de los detectores, y capilar interdetector), entonces cualquier cromatograma k genérico se distorsiona por la misma función de E.I., como sigue (Netopilík, 1982; Hamielec, 1984):

$$s_k(V) = \int_0^\infty g(V, \bar{V}) s_k^c(\bar{V}) d\bar{V}, \quad (k = DR, LS, SV, OS) \quad (\text{AII.4})$$

donde $s_k(V)$ es el cromatograma medido.

Cálculo de las Calibraciones Ad Hoc

A partir de la relación de señales medidas, se pueden obtener las masas molares medias instantáneas en peso, viscosidad y número [$M_w(V)$, $M_v(V)$ y $M_n(V)$] (Baumgarten *et al.*, 2002; Jackson y Barth, 1995, 2004; Lehmann *et al.*, 1996):

$$M_w(V) = K_w \frac{s_{LS}(V)}{s_{DR}(V)}; \quad M_v(V) = K_v \left[\frac{s_{SV}(V)}{s_{DR}(V)} \right]^{1/\alpha}; \quad M_n(V) = K_n \frac{s_{DR}(V)}{s_{OS}(V)}; \quad (\text{AII.5.a})$$

$$[M_w(V) \geq M_v(V) \geq M_n(V)]$$

con $K_w = K_{DR} / K_{LS}$, $K_v = K_{DR} / K$, $K_n = K_{DR} / K_{OS}$.

A diferencia de $M^c(V)$ de la Ec. (AII.3), $M_w(V)$, $M_v(V)$ y $M_n(V)$ dependen de la DMM; y por tal motivo se las denomina calibraciones *ad hoc* de masa molar. En el caso de emplear la combinación DR + SV, se puede obtener una calibración $\log M_v(V)$ alternativa combinando la calibración universal $\log J(V)$ con la relación de señales de ambos sensores, de la siguiente forma:

$$\log M_v(V) = \log J(V) - \log \left(K_{DR} \frac{s_{SV}(V)}{s_{DR}(V)} \right) \quad (\text{AII.5.b})$$

Para diferenciar ambas calibraciones, llamaremos $M_{v,MHS}(V)$ a la calibración de la Ec. (AII.5.a) y $\log M_{v,J}(V)$ a la calibración de la Ec. (AII.5.b).

Los cromatogramas de masa molar calculados asumen la hipótesis de IDV nulo. Sin embargo el IDV no puede despreciarse e introduce un retardo en las señales de masa molar medidas, $s_{LS,m}(V)$ y $s_{SV,m}(V)$, que se puede modelar como:

$$s_{LS,m}(V) = s_{LS}(V + \delta_{LS}) \quad (\text{AII.6.a})$$

$$s_{SV,m}(V) = s_{SV}(V + \delta_{SV}) \quad (\text{AII.6.b})$$

donde $\delta_{LS} (> 0)$ y $\delta_{SV} (> 0)$ representan los IDV entre el detector de masa molar y el DR, que se adopta como referencia (es decir, $\delta_{DR} = 0$).

Finalmente, los cromatogramas calculados con las Ecs (AII.4 y AII.6) se encuentran libres de ruido; y para simular una situación mas realista se les suele adicionar un ruido aleatorio Gaussiano de media nula y varianza constante.

En la práctica, la simulación de los cromatogramas, las calibraciones, y otros cálculos derivados, se implementa computacionalmente. Para ello, se requiere utilizar versiones discretas de las expresiones anteriores. Las Ecs (AII.3) y (AII.4) en forma discreta resultan:

$$\mathbf{s}_k^c = \mathbf{K}_k [\mathbf{M}^c]^{a_k} \mathbf{s}_{\text{DR}}^c ; \quad (k = \text{LS, SV, OS}) \quad (\text{AII.7.a})$$

$$\mathbf{s}_k = \mathbf{G} \mathbf{s}_k^c ; \quad (k = \text{DR, LS, SV, OS}) \quad (\text{AII.7.b})$$

donde \mathbf{s}_k es un vector columna ($m \times 1$) que contiene las ordenadas de $s_k(V)$ en el rango $[V_1 - V_m]$; \mathbf{s}_k^c es un vector columna ($p \times 1$) que contiene las ordenadas de $s_k^c(V)$ en el rango más angosto $[V_1^c - V_p^c]$; \mathbf{M}^c es una matriz diagonal ($p \times p$) que contiene las ordenadas de $M^c(V)$ en el rango $[V_1^c - V_p^c]$; y \mathbf{G} es una matriz rectangular ($m \times p$) que representa a $g(V, \bar{V})$, con V en $[V_1 - V_m]$, y \bar{V} en $[V_1^c - V_p^c]$. El intervalo de muestreo ΔV se selecciona teniendo en cuenta que un ΔV pequeño produce cromatogramas corregidos con alta resolución, y ΔV mayores mejoran las inversiones numéricas de \mathbf{G} . Los valores típicos de ΔV se encuentran en el rango de 0.01–0.03 mL. Los detalles de construcción de la matriz \mathbf{G} se presentan en el Apéndice III.

APÉNDICE III. Construcción de la Matriz de E.I. no Uniforme

En este Apéndice, se considera la construcción de la matriz de E.I. no uniforme, \mathbf{G} , a partir de una expresión analítica (conocida y continua) de la función de E.I. $g(V, \bar{V})$. A cada volumen de retención discreto, deben calcularse las alturas de todas las funciones individuales $g(V)$ con volúmenes de retención medios en el rango $[V_1^c - V_p^c]$. La mayoría de las funciones analíticas (por ejemplo, una distribución Gaussiana) nunca tiende estrictamente a cero, y esto produciría matrices \mathbf{G} “completas”, con la mayoría de sus elementos cercanos a cero. Esto aumenta la correlación entre las columnas de \mathbf{G} ; y por consiguiente aumenta la naturaleza mal-condicionada de su inversión numérica. Para mejorar la inversión numérica de \mathbf{G} , se propone colocar ceros en todas las componentes más pequeños de \mathbf{G} (por ejemplo, todas aquellas menores al 1% del máximo). Además, se fija el número total de puntos no nulos de cada función $g(V)$ individual como $n (= c + d + 1)$, donde c y d son los números de puntos distintos de cero antes y después de \bar{V} , respectivamente.

La \mathbf{G} de dimensiones mínimas, contiene p columnas que cubren estrictamente el rango del cromatograma corregido $[V_1^c - V_p^c]$, y m filas que cubren estrictamente el rango del cromatograma medido $[V_1 - V_m]$. Para cromatogramas medidos que contienen m puntos, los cromatogramas corregidos tendrán $p = m - c - d$ puntos, y la matriz \mathbf{G} de tamaño mínimo es:

$$\mathbf{G} = \begin{bmatrix} g(V_1, V_1^c) & \cdots & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & 0 & & \vdots \\ g(V_{c+1}, V_1^c) & & g(V_j, V_j^c) & & \\ \vdots & \ddots & \vdots & \ddots & 0 \\ g(V_{c+1+d}, V_1^c) & & g(V_{c+j}, V_j^c) & & g(V_p, V_p^c) \\ 0 & \ddots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \vdots & & g(V_{c+j+d}, V_j^c) & & g(V_{c+p}, V_p^c) \\ & & 0 & \ddots & \vdots \\ 0 & \cdots & 0 & \cdots & g(V_m, V_p^c) \end{bmatrix}; \quad (m > p) \quad (\text{AIII.1})$$

En la Ec. (AIII.1), cualquier j -ésima columna genérica contiene las n alturas distintas de cero de $g(V, \bar{V})$, a $\bar{V} = V_j^c$.

En un amplio rango de volúmenes de retención, la función de E.I. y su correspondiente matriz \mathbf{G} son no-uniformes. En contraste, en el estrecho rango de un estándar de calibración, la función de E.I. es uniforme y representada por $\mathbf{g} = [g_1, g_2, \dots, g_n]^T$, donde el exponente ‘T’ indica la operación de transposición. La matriz \mathbf{G} correspondiente también es uniforme, y queda totalmente especificada sólo por los n elementos distintos de cero de cualquier función $g(V)$. Además, dos columnas consecutivas j y $j+1$ cualesquiera de \mathbf{G} son idénticas, salvo por el hecho que la $(j+1)$ -ésima columna contiene todos sus elementos distintos de cero corridos una posición hacia abajo, con respecto a la j -ésima.

Nomenclatura

A: Constante asociada con la difusión eddy [Ec. (I.50)].

a : Parámetro de una WCLD de Schulz-Flory.

A_2 : Segundo coeficiente del virial.

A_i : Área del cromatograma.

$A(V, \lambda)$: Absorbancia.

B: Constante asociada con la difusión longitudinal [Ec. (I.50)].

$b_n(M)$: Número medio en número, de ramas por molécula.

$b_w(M)$: Número medio en peso, de ramas por molécula.

C: Constante asociada con la transferencia de masa [Ec. (I.50)].

$c(V)$: Cromatograma de concentración másica continuo.

c : Número de puntos de la función de E.I. antes de \bar{V} .

c_i : Concentración de los diferentes grupos que absorben.

C_j : Concentración de soluto en el equilibrio en la fase móvil, en cada plato j .

C_M : Factor que depende del diámetro de las partículas y del coeficiente de difusión del soluto extrapartícula [Ec. (I.51)].

C_{SM} : Factor que depende del diámetro de las partículas y del coeficiente de difusión del soluto en la fase móvil estancada [Ec. (I.51)].

d : Número de puntos de la función de E.I. después de \bar{V} .

D_a : Coeficiente de dispersión axial.

dM : Incrementos de masa molar.

dV : Incrementos de volumen de retención.

dw^0/dM vs. M : DMM diferencial continua en masa en un eje lineal de M .

$dw/d\log M$ vs. $\log M$: DMM diferencial continua en eje M logarítmico.

$[dw/d\log M]_j$ vs. $\log M_j$: DMM discreta con un eje M logarítmico.

$D_V(i,j)$: Dominio que representa el conjunto de pares (i,j) cuyas correspondientes moléculas eluyen a $V_{SB} = V$.

$D_M(i,j)$: Dominio que representa el conjunto de pares (i,j) cuyas correspondientes moléculas tienen una masa molar $M_{SB} = M$.

$D_p(i,j)$: Dominio que representa el conjunto de pares (i,j) cuyas correspondientes moléculas tienen una fracción másica de S $p_S = p$.

$D_V(M,r)$: Dominio que representa a las moléculas (M,r) que eluyen a V .

$D_M(r,V)$: Dominio que representa a las moléculas (r,V) con masa molar M .

$D_r(M,V)$: Dominio que representa a las moléculas (M,V) con número de ramas r .

$\partial n/\partial c$: Incremento específico del índice de refracción con la concentración.

Δn : Variación del índice de refracción.

ΔP_0 : Caída de presión causada por un solvente.

ΔP : Diferencia de presión.

ΔR_θ : Exceso de Rayleigh.

ΔV : Intervalos de volumen de retención.

Δw_i : Amplitud media del pico (medida en los puntos de inflexión).

e_g : Error cuadrático medio (escalar), en la estimación de \mathbf{g} .

$\tilde{\mathbf{e}}_{s_k,DR}$: Vector de error de estimación del cromatograma de masa molar,

calculado a partir del cromatograma de DR medido.

$\mathbf{e}_{s_{k,DR}}$: Vector de error de estimación normalizado del cromatograma de masa molar, calculado a partir del cromatograma de DR medido.

$e_{s_{k,DR}}$: Funcional escalar asociado con el error cuadrático medio de $\mathbf{e}_{s_{k,DR}}$.

F_v : Caudal de la fase móvil.

g : Parámetro de ramificación.

g' : Segundo parámetro de ramificación.

$g(V, \bar{V})$: Función de E.I. no uniforme y asimétrica.

$g(V)$: Función de E.I. simétrica.

\mathbf{g} : Vector que contiene las ordenadas de $g(V)$.

\mathbf{G} : matriz rectangular ($m \times p$) que representa a $g(V, \bar{V})$ con V en $[V_1 - V_m]$, y \bar{V} en $[V_1^c - V_p^c]$.

$\mathbf{G}^{[-1]}$: Matriz ($p \times m$) que representa una pseudo-inversa regularizada de \mathbf{G} .

G_s : Radiosensibilidad del quitosano.

H : Altura del plato teórico.

\bar{i} : Media de la WCLD normal-logarítmica.

I_0 : Intensidad de la luz transmitida a través de las celdas que contienen el solvente puro.

I_i : Intensidad de la luz transmitida a través de las celdas que contienen la solución de polímero.

K : Constante de MHS.

$K_{DR,A}$: Constante de calibración del sensor DR respecto de A.

$K_{DR,B}$: Constante de calibración del sensor DR respecto de B.

K_{DR} : Ganancia del sensor DR.

K_{LS} : Constante óptica del sensor LS.

K_{SEC} : Coeficiente de distribución o partición SEC del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

$K_{UV,A}$: Constante de calibración del sensor UV respecto de A.

$K_{UV,B}$: Constante de calibración del sensor UV respecto de B.

K_v : Logaritmo del cociente de la ganancia del sensor DR y LS y el exponente α de MHS, [= $\alpha^{-1} \log(K_{DR} / K)$].

K_w : Logaritmo del cociente de las ganancias de los sensores DR y LS, [= $\log(K_{DR} / K_{LS})$].

ℓ : Longitud de la celda.

ℓ_c : Longitud de un capilar.

L: Longitud de la columna.

$\log J_{nom}(V)$: Calibración universal que relaciona el M_{nom} de estándares de PS con el V_p del cromatograma $s_{DR}(V)$.

$\log J_{nom1}(V)$ y $\log J_{nom2}(V)$: Calibración universal que relaciona el M_{nom} de estándares de PS con el V_p del cromatograma $s_{DR}(V)$, corregida por concentración.

$\log M_p(V_m)$: Calibración directa que relaciona el M_p de estándares de PS con el V_m del cromatograma $s_{DR}(V)$.

$\log M_p(V_p)$: Calibración directa que relaciona el M_p de estándares de PS con el V_p del cromatograma $s_{DR}(V)$.

$\log \bar{M}_n(V_m)$: Calibración directa que relaciona el \bar{M}_n de estándares de PS con el V_m del cromatograma $s_{DR}(V)$.

$\log \bar{M}_v(V_m)$: Calibración directa que relaciona el \bar{M}_v de estándares de PS con el V_m del cromatograma $s_{DR}(V)$.

$\log \bar{M}_n(V_p)$: Calibración directa que relaciona el \bar{M}_n de estándares de PS con el V_p del cromatograma $s_{DR}(V)$.

$\log \bar{M}_v(V_p)$: Calibración directa que relaciona el \bar{M}_v de estándares de PS con el V_p del cromatograma $s_{DR}(V)$.

$\log[\eta](V)$ vs. V : Calibración de viscosidad intrínseca instantánea.

$\log\{\eta_{sp}(V) / c(V)\}$: Cociente de señales de los cromatogramas DR y SV.

$\log J = \log([\eta] M)$ vs. V : Calibración universal en eje logarítmico.

$\log J_{MHS}(V)$: Calibración universal en base a la Ec. (I.37), con las constantes de MHS de PS.

$\log \hat{M}_{lin.}(V)$: Calibración de masa molar estimada linealizada.

$\log M(V)$: Calibración de masa molar en eje logarítmico.

$\log M_{AB}(V)$: Calibración de masa molar para el copolímero.

$\log M_{PA}(V)$ y $\log M_{PB}(V)$: Calibraciones de masa molar individuales de homopolímeros estándares (PA y PB).

$\log M_{v,J}(V)$: Calibración *ad hoc* en detección DR + SV empleando la calibración universal.

$\log M_{v,MHS}(V)$: Calibración *ad hoc* en detección DR + SV empleando las constantes de MHS.

$\log M_w(V)$: Calibración *ad hoc* en detección DR + LS.

$\log \hat{M}^c(V)$: Calibración de masa molar estimada.

$\log \hat{M}_w(V)$: Calibración *ad hoc*, $\log M_w$ corregida por IDV.

$\log \hat{M}_{v,MHS}(V)$: Calibración *ad hoc*, $\log M_{v,MHS}$ corregida por IDV.

$M(V)$: Calibración de masa molar.

M : Masa molar.

m : Número de puntos de los cromatogramas medidos.

M_b : Masa molar de un polímero ramificado.

M^c : Calibración de masa molar no afectada por E.I.

M^c : Matriz diagonal que contiene las ordenadas de la calibración de masa molar, M^c .

m_i : Masa inyectada.

M_l : Masa molar de un polímero lineal.

\bar{M}_n : Masa molar media en número.

$M_n(V)$: Masa molar media en número instantánea.

M_{nom} : Masa molar nominal.

M_p : Masa molar de pico.

\bar{M}_v : Masa molar media en viscosidad.

$M_v(V)$: Masa molar media instantánea basada en viscosidad.

\bar{M}_w : Masa molar media en peso.

$M_w(V)$: Masa molar media en peso instantánea.

$M_w^*(V)$: Masa molar instantánea aparente.

\bar{M}_z : Masa molar media z.

$M_{SB}(i,j)$: Masa molar del copolímero SB.

$M_{S,0}$ y $M_{B,0}$: Masas molares de los comonómeros S y B.

$M_S(i)$ y $M_B(j)$: Masas molares de los bloques de S y B.

$M_V(i,j)$: Función bivariable que representa las masas molares de aquellas moléculas (i,j) que eluyen a V .

$m_{pi,C1}$ y $m_{pi,C2}$: Curvas lineales de calibración másica.

N : Número de platos teóricos.

n : Número de puntos de la función de E.I.

n_0 : Índice de refracción del solvente.

N_{Av} : Número de Avogadro.

$P(\theta)$: Función de dispersión, que describe la variación angular de la intensidad de luz dispersada.

p : Número de puntos de los cromatogramas corregidos.

$p_A(V)$: Fracción másica instantánea de A.

$p_S(V)$: Fracción másica instantánea de PS en el copolímero.

P_T : Caída total de presión sobre el sensor SV.

$p_V(i,j)$: Función bivariable que representa la fracción másica de S en aquellas moléculas (i,j) que eluyen a V .

$p_{S,n}$ y $p_{S,w}$: Fracciones másicas medias en número y en peso.

$p_S(i,j)$: Fracción másica de S en el copolímero SB.

q : Caudal.

q_j : Concentración de soluto en el equilibrio en la fase estacionaria, en cada plato j .

r : Número de terminos “efectivos” en el método de descomposición en valores singulares Ec. (I.60).

r_c : Radio de un capilar.

$r(V)$: Calibración *ad hoc* de ramas.

\bar{r}_n y \bar{r}_w : Números de ramas medios en número y en peso.

R_{col} : Resolución de la columna.

R_g^2 : Radio de giro medio cuadrático.

$R_{g,b}^2$: Radio de giro medio cuadrático de una molécula ramificada.

$R_{g,\ell}^2$: Radio de giro medio cuadrático de una molécula de polímero lineal.

$R_{g,z}^2$: Radio de giro z-medio cuadrático.

$s_{DR}(V)$: Cromatograma de DR corregido por línea de base.

$s_{LS}(V)$: Cromatograma LS corregido por línea de base.

$s_{SV}(V)$: Cromatograma de viscosidad SV corregido por línea de base.

$s_{UV}(V)$: Cromatograma UV corregido por línea de base.

$s_{DR}^c(V)$: Cromatograma “verdadero”, “corregido” o “no ensanchado” obtenido con un sensor DR.

$s_{LS}^c(V)$: Cromatograma “verdadero”, “corregido” o “no ensanchado” obtenido con un sensor LS.

$s_{OS}^c(V)$: Cromatograma “verdadero”, “corregido” o “no ensanchado” obtenido con un sensor OS.

$s_{SV}^c(V)$: Cromatograma “verdadero”, “corregido” o “no ensanchado” obtenido con un sensor SV.

$s_{LS,m}(V)$: Cromatograma LS afectado por IDV.

$s_{SV,m}(V)$: Cromatograma de viscosidad SV corregido por línea de base.

$s_{DR}(\log M)$: DMM obtenida por combinación de $s_{DR}(V)$ con $\log M(V)$.

$s_{DR}(\log M_w)$: DMM obtenida por combinación de $s_{DR}(V)$ con $\log M_w(V)$.

$s_{DR}(\log M_{v,MHS})$: DMM obtenida por combinación de $s_{DR}(V)$ con $\log M_{v,MHS}(V)$.

$s_{DR}(\log M_{v,j})$: DMM obtenida por combinación de $s_{DR}(V)$ con $\log M_{v,j}(V)$.

$s_k(V)$: Cromatograma genérico ensanchado ($k = DR, LS, SV, OS$).

$s_k^c(V)$: Cromatograma genérico corregido ($k = DR, LS, SV, OS$).

\mathbf{s}_k : Vector columna ($m \times 1$) que contiene las ordenadas de $s_k(V)$.

\mathbf{s}_k^c : Vector columna ($p \times 1$) que contiene las ordenadas de $s_k^c(V)$.

$\hat{\mathbf{s}}_{DR}^c$: Estimación de \mathbf{s}_{DR}^c .

$\hat{\mathbf{s}}_k^c$: Estimación de \mathbf{s}_k^c .

$\hat{\mathbf{s}}_{k,DR}$: Estimación del cromatograma de masa molar, calculado a partir del cromatograma de DR medido.

T: Temperatura.

u : Velocidad lineal de la fase móvil.

\mathbf{u}_j : Autovector de $\mathbf{G}\mathbf{G}^T$.

V : Volumen de retención.

V_e : Volumen de exclusión total.

V_h : Volumen hidrodinámico de la molécula de polímero.

V_i : Volumen de permeación total.

V_i : Volumen inyectado.

\bar{V}_i : Volumen de retención medio.

\mathbf{v}_j : Autovector $\mathbf{G}^T \mathbf{G}$.

v_m : Volumen de fase móvil en cada plato teórico.

V_m : Volumen de retención correspondiente a la mediana del cromatograma.

V_m : Volumen total de la fase móvil en la columna

V_p : Volumen de poro.

V_p : Volumen de retención correspondiente al pico del cromatograma.

v_s : Volumen de fase estacionaria en cada plato teórico.

V_s : Volumen total de la fase estacionaria.

\bar{V} : Variable de integración que representa un volumen de retención medio.

$[V_1 - V_m]$: Eje de V de los cromatogramas medidos.

$[V_1^c - V_p^c]$: Eje de V de los cromatogramas corregidos.

$V_{SB}(i,j)$: Volumen al que eluye cada molécula (i,j) de copolímero.

$V_{h,SB}(i,j)$: Volumen hidrodinámico de la molécula de copolímero.

$V_h(M,r)$: Volumen hidrodinámico de la molécula de homopolímero ramificado.

$w(b)$, con $b = b_n, b_w$: DGR en un homopolímero ramificado.

$w(\log M)$: DMM obtenida a partir de la masa y de $\log M(V)$.

$w(\log M_J)$: DMM obtenida a partir de la masa y de $\log J(V)$.

$w(\log M_{v,MHS})$: DMM obtenida a partir de la masa y de $\log M_{v,MHS}$.

$w(\log M_{v,J})$: DMM obtenida a partir de la masa y de $\log M_{v,J}$.

$w(\log M_w)$: DMM obtenida a partir de la masa y de $\log M_w$.

W : Masa total de muestra.

$w_{AB}(p_A)$: DCQ en un copolímero dibloque AB.

$w_{LN}(i)$: WCLD normal-logarítmica.

$w_{LN}(\log M)$: DMM normal-logarítmica.

$w_P(i)$: WCLD de Poisson.

$w_P(\log M)$: DMM de Poisson.

$w_{SF}(i)$: DMM de Schulz-Flory.

$w_{SF}(\log M)$: DMM de Schulz-Flory.

$w_p(p_S)$: DCQ univariable.

$w_V(M)$: DMM univariable instantánea.

$w_V(p)$: DCQ univariable instantánea.

$w(V)$: Masa de copolímero instantánea.

$w(M)$: DMM univariable global.

$w(p)$: DCQ univariable global.

$\hat{w}(p_S)$: DCQ estimada del copolímero SB.

$\hat{w}(M_w)$: DMM estimada combinando $w(V)$ con $M_w(V)$.

$w_V(r)$: DGR univariable instantánea.

$w(r)$: DGR univariable global.

$w_r(V)$ y $w_M(V)$: "Cromatogramas" de las moléculas con número de ramas r fijos y con masa molar M fija.

$W_c(M_{SB}, p_S)$: Distribución conjunta (en masa) de masas molares y composición química.

$W_{SB}(M_S, M_B)$: Distribución bivariable (en masa) de masas molares.

$W_V(i, j)$: DMM bivariable instantánea.

$W(M, r)$: Distribución conjunta (en masa) de masas molares M y grados de ramificación r .

$W_M(r, V)$ y $W_r(M, V)$: Distribuciones bivariables a M fijo o a r fijo.

z : Coordenada de longitud de la columna.

Símbolos Griegos

α : Constante de MHS.

α' : Parámetro de interacción que tiene en cuenta las desviaciones con respecto a la condición θ .

β : es un factor de peso en ϕ_g^2 .

$\delta_i(\lambda)$: Absortividad molar de los diferentes grupos que absorben.

δ_{LS} : IDV entre los sensores DR y LS.

δ_{SV} : IDV entre los sensores DR y SV.

ε : Parámetro empírico, que relaciona g y g' [Ec. (I.19)].

ε_r : Porosidad del relleno de las columnas.

ϕ_g^2 : Función de filtrado escalar.

Φ : Parámetro de la ecuación de Flory–Fox.

Φ_0 : Constante de la ecuación de Flory–Fox [Ec. (I.13.b)] para $M > 10^4$ g/mol

η : Viscosidad absoluta de una solución polimérica.

η_0 : Viscosidad absoluta del solvente puro.

η_{sp} : Viscosidad específica de una solución polimérica.

$\eta_{sp}(V)$: Viscosidad específica instantánea.

$[\eta]$: Viscosidad intrínseca de una solución polimérica.

$[\overline{\eta}]$: Viscosidad intrínseca media global.

$[\eta]_b$: Viscosidad intrínseca de un polímero ramificado.

$[\eta]_\ell$: Viscosidad intrínseca de un polímero lineal.

$[\eta](M,r)$: Viscosidad intrínseca de la molécula (M,r) .

$[\eta](V)$: Viscosidad intrínseca instantánea.

$[\eta]_{SB}(i,j)$: Viscosidad intrínseca de la molécula de copolímero.

$[\eta]_V(M,r)$: Viscosidades intrínsecas de aquellas moléculas que eluyen a V .

$[\eta]_w(V)$: Viscosidad intrínseca media en peso instantánea.

λ : Parámetro de la WCLD de Poisson.

λ_0 : Longitud de onda.

λ_k : k -ésimo momento de la DMM discreta $w_j(M_j)$.

θ : Ángulos de detección del sensor LS.

θ : Condición theta (termodinámicamente ideal).

σ_{BB} : Desviación estándar de una función de E.I. tipo EMG.

$\sigma_{BB}(V)$: Variación con V de la desviación estándar de una función de E.I. tipo EMG, no uniforme.

σ_{cap}^2 : Varianza de los capilares.

σ_{col}^2 : Varianza de la columna.

σ_{con}^2 : Varianza de las conexiones.

σ_{det}^2 : Varianza de la celda del detector.

σ_g : Desviación estándar de una función de E.I. uniforme y Gaussiana.

σ_g^2 : Varianza de una función de E.I. uniforme y Gaussiana.

σ_{iny}^2 : Varianza del proceso de inyección [volumen de muestra].

σ_j : Valores singulares de \mathbf{G} (o raíz cuadrada de los autovalores de $\mathbf{G}^T\mathbf{G}$).

σ_{LN}^2 : Desviación estándar de la WCLD normal-logarítmica.

σ_p^2 : Varianza total del pico cromatográfico.

τ : Constante de decaimiento exponencial de una distribución EMG.

τ_{BB} : Decaimiento exponencial de una función de E.I. tipo EMG.

$\tau_{\text{BB}}(V)$: Variación con V del decaimiento exponencial de una función de E.I.

tipo EMG, no uniforme.

Supraíndices

‘c’: Corregido.

‘T’: Transpuesta de una matriz.

Símbolos especiales

*: Producto de convolución.

“^”: Valor estimado.

$\|\bullet\|_1$: Norma-1 estándar de un vector.

diag (\mathbf{v}): Matriz diagonal de un vector.

conv (\mathbf{v}): Matriz de convolución de un vector \mathbf{v} .

Referencias

- Agullo, E. Informe Final CYTED IV.14 "Obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos". Ed.: Ana Pastor de Abram, Perú (2004).
- Aiba, S. Studies on Chitosan: 1. Determination of the Degree of N-acetylation of Chitosan by Ultraviolet Spectrophotometry and Gel Permeation Chromatography. *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, 8, 173-176.
- Aiba, S. Preparation of N-acetylchitooligosaccharides by Hydrolysis of Chitosan with Chitinase followed by N-acetylation. *Carbohydr. Res.* **1994**, 265(2), 323-328.
- Alba, D.; Meira G. Inverse Optimal Filtering Method for the Instrumental Spreading Correction in SEC. *J. Liq. Chromatogr.* **1984**, 7, 2833-2862.
- Alba, D.; Meira, G. Calibration of Instrumental Spreading in SEC by a Novel Recycle Technique. *J. Liq. Chromatogr.* **1986**, 9, 1141-1157.
- Balke, S.T. Orthogonal Chromatography and Related Advances in Liquid Chromatography. En *Detection and Data Analysis in Size Exclusion Chromatography*; Provder, T., Ed.; ACS Symp. Ser.: Washington, 1987; Vol. 352, 59-77.
- Balke, S.; Mourey, T.; Harrison, C. Number-Average Molecular Weight by Size Exclusion Chromatography. *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, 51, 2087-2102.
- Balke, S.; Mourey, T.; Schunk, T. Size Exclusion Chromatography: Practical Methods for Quantitative Results. *Polym. React. Eng.* **1999**, 7(3), 429-452.
- Banks, W.; Greenwood, C. *Starch and Its Components*; University Press: Edinburgh, 1975.
- Baumgarten, J.; Busnel, J.; Meira, G. Band Broadening in Size Exclusion

Chromatography of Polymers. State of the Art and Some Novel Solutions. J. Liq. Chromatogr. R. T. **2002**, 25(13-15), 1967-2001.

Baxter, A.; Dillon, M.; Taylor, K.; Roberts, G. Improved Method for IR Determination of the Degree of N-acetylation of Chitosan. Int. J. Biol. Macromol. **1992**, 14, 166-169.

Belenkii, B.; Vilenchik, L. *Modern Liquid Chromatography of Macromolecules*; Journal of Chromatography Library; Elsevier: Amsterdam, 1983; Vol. 25.

Beer, M.; Wood, P.; Weisz, J. A Simple and Rapid Method for Evaluation of Mark-Houwink-Sakurada Constants Of Linear Random Coil Polysaccharides Using Molecular Weight And Intrinsic Viscosity Determined By High Performance Size Exclusion Chromatography: Application To Guar Galactomannan. Carbohyd. Polym. **1999**, 39, 377-380.

Belenkii, B.; Vilenchik, L. *Modern Liquid Chromatography of Macromolecules*; Journal of Chromatography Library; Elsevier: Amsterdam, 1983; Vol. 25.

Bender, M.; Saucy, D. Column Selection and Related Issues for Acrylic Acid and Acrylate Ester Polymers. En *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*; Wu, Ch. Ed.; Academic Press: San Diego, California, 1999; 539-558.

Berek, D. Coupled Liquid Chromatography Techniques for the Separation of Complex Polymers. Prog. Polym. Sci. **2000**, 25, 873-908.

Berek, D.; Marcinka, K. Gel Chromatography. In *Separation Methods*; Deyl, Z., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 1984; 271.

Bielsa, R.O.; Meira, G.R. Linear Copolymer Analysis with Dual-Detection Size Exclusion Chromatography: Correction for Instrumental Broadening. J. Appl. Pol. Sci. **1992**, 46, 835-845.

Billiani, J.; Rois, G.; Lederer, K. A New Procedure for Simultaneous Calibration of Separation and Axial Dispersion in CLE. *Chromatographia*. **1988**, *26*, 372-376.

Billiani, J.; Amtmann, I.; Mayr, T.; Lederer, K. Calibration of Separation and Instrumental Peak Broadening in CLE Coupled with Light Scattering of Simple Polymers. *J. Liq. Chromatog.* **1990**, *13*(15), 2973-2986.

Bradbury, A.; Bello, A. Determination of Molecular Size Distribution of Starch and Debranched Starch by a Single Procedure Using High- Performance Size- Exclusion Chromatography. *Cereal Chem.* **1993**, *70*(5), 543-547.

Brandrup, J.; Immergut, E.H.; Eds. *Polymer Handbook*, 3rd. Edition; John Wiley & Sons, Ltd.: New York, 1989.

Brugnerotto, J.; Desbrieres, J.; R, G.; Rinaudo M. Characterization of Chitosan by Steric Exclusion Chromatography. *Polymer*. **2001**, *42*, 9921-9927.

Brun, Y. Data Reduction in Multidetector Size Exclusion Chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1998**, *21*(13), 1979-2015.

Brun, Y. The Mechanism of Copolymer Retention in Interactive Polymer Chromatography. I. Critical Point of Adsorption for Statistical Copolymers. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **1999a**, *22*(20), 3027-3065.

Brun, Y. The Mechanism of Copolymer Retention in Interactive Polymer Chromatography. II. Gradient Separation. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **1999b**, *22*(20), 3067-3090.

Brun, Y.; Gorenstein, M.; Hay, N. New Approach to Model Fitting in Multi-Detector GPC. *J. Liq. Chrom. R. T.* **2000**, *23*(17), 2615-2639.

Buchholz, F.L. Polyacrylamides and Poly(Acrylic Acids)". En *Ullmann's Encyclopedia of*

Industrial Chemistry. Fifth Edition; VCH: Weinheim, Alemania, 1992; Vol. A21, 143-155.

Burchard, W. Solution Properties of Branched Macromolecules. *Adv. Polym. Sci.* **1999**, *143*, 113-194.

Busnel, J.P.; Foucault, F.; Denis, L.; Lee, W.; Chang, T. Investigation and Interpretation of Band Broadening in Size Exclusion Chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2001**, *930*, 61-71.

Busnel, J.P. Band Broadening in Size-Exclusion Chromatography. En *Encyclopedia of Chromatography*; Cazes, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2001; 79-83.

Campos, A.; García, R.; Porcar, I.; Soria, V. Solution Properties of Polyelectrolytes. XI. Adsorption Effects in Aqueous Size-Exclusion Chromatography of Polyanions. *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, *17*(14-15), 3261-3283.

Cassassa, E.F. Comments on Exclusion of Polymer Chains from Small Pores and Its Relation to Gel Permeation Chromatography. *Macromolecules.* **1976**, *9*(1), 182-185.

Colonna, P.; Biton, V.; Mercier, C. Interactions of Concanavalin A with α -D-glucans. *Carbohydr. Res.* **1985**, *137*, 151-166.

Curotto, E.; Aros, F. Quantitative Determination of Chitosan and the Percentage of Free Amino Groups. *Anal. Biochem.* **1993**, *211*, 240-241.

Chang, F. Molecular Weight Analysis of Block Copolymer by Gel Permeation Chromatography. *J. Chromatogr.* **1971**, *55*, 67-71.

Cheung, P.; Lew, R.; Balke, S.T.; Mourey, T.H. CLE-Viscometer Detector Systems. II. Resolution Correction and Determination of Interdetector Volume. *J. Appl. Pol. Sci.* **1993**, *47*, 1701-1706.

- Chmelík, J.; Chmelíková, J.; Novotny, M. Characterization of Dextrans by Size-Exclusion Chromatography on Unmodified Silica Gel Columns, with Light-Scattering Detection, and Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A.* **1997**, *790*(1-2), 93-100.
- Choi, W.; Ahn, K.; Lee, D.; Byun, M.; Park, H. Preparation of chitosan oligomers by irradiation. *Polym. Degrad. Stab.* **2002**, *78*, 533-538.
- Chuang, J.; Sydor, R. High Performance Size Exclusion Chromatography of Starch with Dimethyl Sulfoxide as the Mobile Phase. *J. Appl. Poly. Sci.* **1987**, *34*, 1739-1748.
- Dawkins, J. Inorganic Packings for GPC. En *Chromatography of Synthetic and Biological Polymers. Columns Packings, GPC, GF and Gradient Elution*; Epton, R., Ed.; The Chemical Society Macromolecular Group; Ellis Horwood LTD.: Chichester, 1978, Vol. 1, 30-56.
- Dawkins, J. Calibration of Separation Systems En *Steric Exclusion Liquid Chromatography of Polymers*; J. Janca, Ed.; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1984; Vol. 25, 53-116.
- Degoulet, C.; Nicolai, T.; Durand, D.; Busnel, J.P. Characterization of Polydisperse Solutions of Branched Poly(methyl methacrylate) Using Size Exclusion Chromatography with On-Line Multiangle Light Scattering and Viscosity Detection. *Macromol.* **1995**, *28*, 6819-6824.
- Domard, A.; Rinaudo, U. Preparation and Characterisation of Fully Deacetylated Chitosan. *Int. J. Biol. Macromol.* **1983**, *5*, 49-52.
- Domard, A. Determination of N-acetyl Content in Chitosan Samples by CD Measurements. *Int. J. Biol. Macromol.* **1987**, *9*, 333-336.
- Dondi, F.; Cavazzini, A.; Remelli, M.; Felinger, A.; Martin, M. Stochastic Theory of Size

Exclusion Chromatography by the Characteristic Function Approach. *J. Chromatogr.A.* **2002**, *943*, 185-207.

Estenoz, D.A.; Vega, J.R.; Oliva, H.M.; Meira; G.R. Analysis of a Styrene-Butadiene Graft Copolymer by Size Exclusion Chromatography. I. Computer Simulation Study for Estimating the Biases Induced by Branching Under Ideal Fractionation and Detection. *Int. J. Polym. Anal. and Charact.* **2001**, *6*, 315-338.

Estenoz, D.A.; Vega, J.R.; Oliva, H.M.; Meira; G.R. Grafting Efficiency in High-Impact Polystyrene by SEC combined with Theoretical Predictions from a Polymerization-SEC Model. *J. Liq. Chrom. R. T.* **2002**, *25*(18), 2781-2793.

Felinger, A. *Data Analysis and Signal Processing in Chromatography*. Data Handling in Science and Technology. Elsevier: Amsterdam, 1998; Vol. 21.

Flory, P; Fox, T. Treatment of Intrinsic Viscosities. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 1904-1908.

Fredriksson, H.; Silverio, J.; Andersson, R.; Eliasson, A.-C.; Åman P. The Influence of Amylose and Amylopectin Characteristics on Gelatinization and Retrogradation Properties of Different Starches. *Carbohydr. Polym.* **1998**, *35*, 119-134.

Games, D.; Hewlins, M.; Westwood, S.; Morgan. J. Extra-Column Band Spreading in High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Using a Moving Belt Interface. Numerical Evaluation of System Variance. *Chromatogr.* **1982**, *250*, 62-67.

Gérard, C.; Barron, C.; Colonna, P.; Planchot, V. Amylose determination in genetically modified starches. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *44*, 19-27.

Giddings, J. C.; Eyring, H. A. A Molecular Dynamic Theory of Chromatography. *J. Phys. Chem.* **1955**, *59*, 416-421.

Goldwasser, J.; Rudin, A. Analysis of Block and Statistical Copolymers by Gel-Permeation Chromatography – Estimation of Mark – Houwink Constants. *J. Liq. Chromatogr.* **1983**, *6*(13), 2433-2463.

Grcev, S.; Schoenmakers, P.; Iedema, P. Determination of Molecular Weight and Size Distribution and Branching Characteristics of PVAc by means of Size Exclusion Chromatography/Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC/MALLS). *Polymer.* **2004**, *45*, 39-48.

Grubisic, Z.; Rempp, P.; Benoit, H. A Universal Calibration for Gel Permeation Chromatography. *J. Polym. Sci. B: Polym. Letters.* **1967**, *5*(9), 753-759.

Grznárová, G.; Polakovič, M.; Ačai, P.; Görner, T. Extra-column Dispersion of Macromolecular Solutes in Aqueous-phase Size-exclusion Chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2004**, *1040*, 33-43.

Gugliotta, L.; Vega, J.; Meira, G. Instrumental Broadening Correction in Size Exclusion Chromatography. Comparison of Several Deconvolution Techniques. *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*, 1671-1708.

Hamielec, A.; Ouano, A. Generalized Universal Molecular Weight Calibration Parameter in GPC. *J. Liq. Chromatogr.* **1978**, *1*, 111-120.

Hamielec, A.E. Size Exclusion Chromatography (SEC) of Complex Polymers. Methods of Correction for Imperfect Resolution. *J. Liq. Chromatogr.* **1980**, *3*(3), 381-392.

Hamielec, A.E.; Ederer, H.J.; Ebert, K.H. Size Exclusion Chromatography of Complex Polymers. Generalized Analytical Corrections for Imperfect Resolution. *J. Liq. Chromatogr.* **1981**, *4*, 1697-1707.

Hamielec, A.E. Correction for Axial Dispersion. In *Steric Exclusion Liquid Chromatography of Polymers*; Janca, J.; Ed.; Chromatographic Science; Marcel Dekker,

Inc.: New York, 1984; Vol. 25, 117-160.

Han, J; Lim, S. Structural Changes of Corn Starches by Heating and Stirring in DMSO measured by SEC-MALLS-RI System. *Carbohydr. Polym.* **2004**, *55*, 265-272.

Haney, M. The Differential Viscometer. I. A New Approach to the Measurement of Specific Viscosities of Polymer Solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* **1985a**, *30*, 3023-3036.

Haney, M. The Differential Viscometer. II. On-Line Viscosity Detector for Size-Exclusion Chromatography. *J. Appl. Polym. Sci.* **1985b**, *30*, 3037-3049.

Haney, M.; Armonas, J.; Rosen, L. Detection and Data Analysis in Size Exclusion Chromatography; Provder, T. Ed.; ACS Symp. Ser.: Washington, 1987; Vol. 352, 119-132.

He, Z.; Zhang, X.; Cheng, R. Simultaneous Calibration of Molecular Weight Separation and Column Dispersion of GPC by Coupling with LALLS. *J. Liq. Chromatogr.* **1982**, *5*(7), 1209-1222.

Hiral, A.; Odani, H.; Nakajima, A. Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan by ^1H NMR Spectroscopy. *Polym. Bull.* **1991**, *26*, 87-94.

Horst, A.; Schoenmakers, P. Comprehensive Two – Dimensional Liquid Chromatography of Polymers. *J. Chromatogr. A.* **2003**, *1000*, 693-709.

Huber, A.; Praznik, W. Molecular Characteristics of Glucans: High- Amylose Cornstarch. En *Strategies in Size Exclusion Chromatography*; Potschka & Dubin Eds.; American Chemical Society: Washington, 1996; Serie 635, 351-378.

Hupe, K.; Jonker, R.; Rozing, G. Determination of Band-Spreading in High-Performance Liquid Chromatographic Instruments. *J. Chromatogr.* **1984**, *285*, 253-265.

IAEA (International Atomic Energy Agency) “Radiation synthesis and modification of

polymers for bio-medical applications”. *TECDOC-1324*, 5-47 (2002).

Ilyina, A.; Tikhonov, V.; Albulov, A.; Varlamov, V. Enzymic Preparation of Acid-free-water-soluble Chitosan. *Process Biochem.* **2000**, *35*, 563-568.

Ishige, T.; Lee, S.I.; Hamielec, A.E. Solution of Tung's Axial Dispersion Equation by Numerical Techniques. *J. Appl. Polym. Sci.* **1971**, *15*, 1607-1622.

Jackson, C.; Yau, W.W. Computer Simulation Study of Size Exclusion Chromatography with Simultaneous Viscometry and Light Scattering Measurements. *J. Chromatogr.* **1993**, *645*, 209-217.

Jackson, C.; Barth, H. Molecular Weight- Sensitive Detectors for Size Exclusion Chromatography. En *Handbook of Size Exclusion Chromatography*; Wu, Ch., Ed.; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; Vol. 69, 103-145.

Jackson, C. Evaluation of the “Effective Volume Shift” Method for Axial Dispersion Corrections in Multi-Detector Size Exclusion Chromatography. *Polymer.* **1999**, *40*, 3735-3742.

Jackson, C.; Barth, H. Molecular Weight- Sensitive Detectors for Size Exclusion Chromatography. En *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques* (2nd. Edition); Wu, Ch., Ed.; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2004; Vol. 91, 99-138.

Jackson, D.; Choto- Owen, C.; Waniska, R.; Rooney, L. Characterization of Starch Cooked in Alkali by Aqueous High- Performance Size- Exclusion Chromatography. *Cereal Chem.* **1988**, *65*(6), 493-496.

Jackson, D.; Waniska, R.; Rooney, L. Differential Solubility of Corn and Sorghum Starches as Characterized by High- Performance Size- Exclusion Chromatography. *Cereal*

Chem. **1989**, *66*, 228-232.

Jackson, C.; Nilson, L.M.; Wyatt, P.J. Characterization of Biopolymers using a Multi-angle Light Scattering Detector with Size Exclusion Chromatography. *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp.* **1990**, *45*, 191.

Janča, J. Principles of Steric Exclusion Liquid Chromatography. En *Steric Exclusion Liquid Chromatography of Polymers*; J. Janca, Ed.; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1984; Vol. 25, 1-51.

Jeon, Y.; Kim, S. Production of Chitooligosaccharides Using an Ultrafiltration Membrane Reactor and their Antibacterial Activity. *Carbohyd. Polym.* **2000**, *41*, 133-141.

Kato, T.; Okamoto, T.; Tokuya, T.; Takahashi, A. Solution Properties and Chain Flexibility of Pullulan in Aqueous Solution. *Biopolymers.* 1982, *21*(8), 1623-1633.

Kilz, P. Design, Properties, and Testing of Polymer Standards Service Size Exclusion Chromatography (SEC) Columns and Optimization of SEC Separations. En *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*; Wu, Ch., Ed.; Academic Press: San Diego, California, 1999; 267-303.

Kilz, P. Copolymer Analysis by LC Methods, Including Two – Dimensional Chromatography. En *Encyclopedia of Chromatography*; Cazes, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2001; 195-200.

Klucinec, J.; Thompson, D. Amylopectin Nature and Amylose-to-Amylopectin Ratio as Influences on the Behavior of Gels of Dispersed Starch. *Cereal Chem.* **1998**, *75*(6), 887-896.

Knutson, C. A. A Simplified Colorimetric Procedure for Determination of Amylose in Maize Starches. *Cereal Chem.* **1986**, *63*, 89-92.

Knutson, C.A. Evaluation of Variations in Amylose–Iodine Absorbance Spectra. *Carbohyd. Polym.* **1999**, *42*, 65-72.

Kuo, C.; Provder, T.; Koehler, M. Evaluation and Application of a Commercial Single Capillary Viscometer System for the Characterization of Molecular Weight Distribution and Polymer Chain Branching. *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*(16), 3177-3199.

Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreqi, A.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Buschmann, M.; Gupta, A. A Validated ^1H NMR Method for the Determination of the Degree of Deacetylation of Chitosan. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2003**, *32*, 1149-1158.

Lawrey, B. Size Exclusion Chromatography of Polyvinyl Acetate. En *Handbook of Size Exclusion Chromatography*; Wu, Ch., Ed.; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; Vol. 69, 303-309.

Lederer, K.; Imirich-Schwarz, G.; Dinky, M. Simultaneous Calibration of Separation and Axial Dispersion in Size Exclusion Chromatography Coupled with Light Scattering. *J. Appl. Polym. Sci.* **1986**, *32*, 4751-4760.

Lee, H.; Ree, M.; Chang, T. Characterization of Binary Polymer Mixtures by Size Exclusion Chromatography with Multiple Detection. *Polymer.* **1995**, *36*(11), 2215-2218.

Lehmann, U.; Köhler, W.; Albrecht, W. SEC Absolute Molar Mass Detection by Online Membrane Osmometry. *Macromolecules.* **1996**, *29*, 3212-3215.

Lesec, J.; Lecacheux, D.; Marot, G. Continuous Viscometric Detection in Size Exclusion Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, *11*(12), 2571-2591.

Lesec, J., Volet, G. Data Treatment in Aqueous GPC with On-Line Viscometer and Light Scattering Detectors. *J. Liq. Chromatogr.* **1990**, *13*(5), 831-849.

Lesec, J. Flow Fluctuations in GPC-Viscometry. *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, *17*(5), 1011-

1028.

Lesec, J. Viscosimetric Detection in GPC-SEC. En *Encyclopedia of Chromatography*; Cazes, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2001, 872-875.

Letot, L.; Lesec, J.; Quivoron, C. Performance Evaluation of Continuous Viscometer. *J. Liq. Chromatogr.* **1980**, 3(3), 427-438.

Levenspiel, O.; Smith, W. Notes on the Diffusion-type Model for the Longitudinal Mixing of Fluids in Flow. *Chem. Eng. Sci.* **1957**, 6(4-5), 227-235.

Lew, R.; Cheung, P.; Balke, S.; Mourey, T. SEC-Viscometer Detector Systems. I. Calibration and Determination of Mark-Houwink Constants. *J. Appl. Polym. Sci.* **1993**, 47, 1685-1700.

Lin, F. Size Exclusion Chromatography of Acrylamide Homopolymer and Copolymers. En *Handbook of Size Exclusion Chromatography*; Wu, Ch. Ed.; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; Vol. 69, 249-277.

MacGregor, E. A. Greenwood C. T. *Polymers in Nature*. John Wiley & Sons Ltd. 1980.

Malawer, E. Introduction to Size Exclusion Chromatography. En *Handbook of Size Exclusion Chromatography*; Wu, C., Ed; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; Vol. 69, 1-24.

Martin, A.J.P.; Synge, L.M. A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases. *Biochem. J.* **1941**, 35, 1358-1368.

Matheson, N. K. A Comparison of the Structures of the Fractions of Normal and High-Amylose Pea-Seed Starches Prepared by Precipitation with Concanavalin A. *Carbohydr. Res.* **1990**, 199, 195-205.

Meehan, E. Semirigid Polymer Gels for Size Exclusion Chromatography. En *Handbook of*

Size Exclusion Chromatography; Wu, Ch., Ed., Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; Vol. 69, 25-46.

Meehan, E. Size Exclusion Chromatography Columns from Polymer Laboratories. En *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*; Wu, Ch., Ed.; Academic Press: San Diego, California, 1999; 349-366.

Meira, G., García-Rubio, L. Corrections for Instrumental and Secondary Broadening in the Chromatographic Analysis of Linear Copolymers. *J. Liq. Chromatogr.* **1989**, *12*(6), 997-1021.

Meira, G.R. Data Reduction in Size Exclusion Chromatography of Polymers. En *Modern Methods of Polymer Characterization*; Barth, H.; Mays, J., Eds.; J. Wiley & Sons, Inc.: New York, 1991; 67-101.

Meira, G.; Vega, J. Axial Dispersion Correction Methods in GPC/SEC. En *Encyclopedia of Chromatography*; Cazes, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2001; 71-76.

Meira, G.; Vega, J. Characterization of Copolymers by Size Exclusion Chromatography. En *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques* (2nd. Edition); Wu, C., Ed; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2004; Vol. 91, 139-156.

Meira, G.; Vega, J. Band Broadening Correction Methods in GPC-SEC. En *Encyclopedia of Chromatography* (2nd. Edition); Cazes, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2005; 149-159.

Meira, G.; Vega, J.; Yossen, M. Gel Permeation and Size Exclusion Chromatography. En *Ewing's Analytical Instrumentation Handbook* (3rd. Edition); Cazes, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2004; 825-867.

Mendel, J. Least-squares Estimation: Singular-value Decomposition. En *Lessons in*

Estimation Theory for Signal Processing, Communications, and Control; Prentice Hall: New Jersey, 1995; 44-57.

Merienne, S., Busnel, J.; Fricoteux, J.; Prudhomme, J. Size- Exclusion Chromatography of Dextrans in DMSO as Eluent. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2000**, *23*(11), 1745-1756.

Mima, S.; Miya, M.; Iwamoto, R.; Yoshikawa, S. Highly Deacetylated Chitosan and its Properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **1983**, *28*, 1909-1917.

Miyoshi, H.; Shimahara, K.; Watanabe, K.; Onodera, K. Characterisation of Some Fungal Chitosans, *Biosci. Biotech. Bioch.* **1992**, *56*, 1901-1905.

Mori, S. High-Speed Gel Permeation Chromatography. A Study of Operational Variables. *J. Appl. Polym. Sci.* **1977**, *21*, 1921-1932.

Mori, S. Effect of Experimental Conditions. En *Steric Exclusion Liquid Chromatography of Polymers*; Janca, J., Ed.; Chromatographic Science; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1984; Vol. 25, 161-211.

Mori, S. Column Efficiency. En *Aqueous Size-Exclusion Chromatography*; Dubin, P., Ed.; Journal of Chromatography Library; Elsevier: Amsterdam, 1988; Vol. 40, 171-190.

Mori, S. GPC-SEC: Effect of Experimental Conditions. En *Encyclopedia of Chromatography*; Cazes, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2001; 378-380.

Mourey, T.H.; Coll, H. Size- Exclusion Chromatography with Two-Angle Laser Light-Scattering (SEC-TALLS) of High Molecular Weight and Branched Polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **1995**, *56*, 65-72.

Mourey, T.H.; Balke, S.T. Detecting Local Polydispersity with Multidetector SEC from Reconstructed DRI Chromatograms. *J. Appl. Polym. Sci.* **1998**, *70*(4), 831-835.

Muzzarelli, R.; Rochetti, R. Determination of the Degree of Acetylation of Chitosan by

- First Derivative Ultraviolet Spectrophotometry. *Carbohydr. Polym.* **1985**, *5*, 461-472.
- Myers, Ron. Analysis of Polyelectrolytes by GPC-MALS. www.iscpubs.com/articles/al/a0202mye.pdf.
- Nagy, D. Aqueous Size Exclusion Chromatography of Polyvinyl Alcohol. En *Handbook of Size Exclusion Chromatography*; Wu, Ch. Ed.; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; Vol. 69, 279-301.
- Nagy, D. Applications and Uses of Columns for Aqueous Size Exclusion Chromatography of Water-Soluble Polymer. En *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*; Wu, Ch. Ed., Academic Press: San Diego, California, 1999; 559-581.
- Nanjo, F.; Katsumi, R.; Sakai, K. Enzymatic Method for Determination of the Deacetylation of Chitosan. *Anal. Biochem.* **1991**, *193*, 164-167.
- Netopilík, M. Correction for Axial Dispersion in Gel Permeation Chromatography with a Detector of Molecular Masses. *Polymer Bull.* **1982**, *7*, 575-582.
- Netopilík, M. Model Analysis of the Determination of the Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada Parameters and Molecular Weight Distribution by Means of Size Exclusion Chromatography with Dual Detection. *Polymer.* **1994**, *35*(22), 4799-4803.
- Netopilík, M. Combined Effect of Interdetector Volume and Peak Spreading in Size Exclusion Chromatography with Dual Detection. *Polymer.* **1997**, *38*, 127-130.
- Netopilík, M. Effect of Local Polydispersity in Size Exclusion Chromatography with Dual Detection. *J. Chromatogr. A.* **1998a**, *793*, 21-30.
- Netopilík, M. Effect of Interdetector Peak Broadening and Volume in Size Exclusion Chromatography with Dual Viscometric-Concentration Detection. *J. Chromatogr. A.* **1998b**, *809*, 1-11.

Netopilík, M.; Persson, B.; Porsch, B.; Nilsson, S.; Sundelöf, L. Flow Irregularities due to Polymer Elution in Size Exclusion Chromatography and its Effect on Viscometric Detection. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2000**, *5*, 339-357.

Netopilík, M. Influence of Peak Broadening and Interdetector Volume Error on Size Exclusion Chromatography Analysis with Dual Viscometric-Concentration Detection Using the Universal Calibration Method. *J. Chromatogr. A.* **2001**, *915*, 15-24.

Netopilík, M. Relations between the Separation Coefficient, Longitudinal Displacement and Peak Broadening in Size Exclusion Chromatography of Macromolecules. *J. Chromatogr. A.* **2002**, *978*, 109-117.

Neue, U. Waters Columns for Size Exclusion Chromatography. En *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*; Wu, Ch., Ed.; Academic Press: San Diego, California, 1999; 325-348.

Nishimura, K.; Nishimura, S.; Nishi, N.; Saiki, I.; Tokura, S.; Azuma, I. Immunological Activity of Chitin and its Derivatives. *Vaccine.* **1984**, *2*, 93-99.

Nishimura, K.; Nishimura, S.; Nishi, N.; Numata, F.; Tone, Y.; Tokura, S.; Azuma, I. Adjuvant Activity of Chitin Derivatives in Mice and Guinea-pigs. *Vaccine.* **1985**, *3*, 379-384.

Ortega, G. Analysis of Chitosan by Size- Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering Detection. *Actas del SLAP 2000 y I SOLAQ*, 463 (2000).

Ottøy, M.; Vårum, K.; Christensen, B.; Anthonsen, M.; Smidsrød, O. Preparative and Analytical Size-exclusion Chromatography of Chitosans. *Carbohydr. Polym.* **1996**, *31*, 253-261.

Pantaleone, D.; Yalpani, M.; Scollar, M. Unusual Susceptibility of Chitosan to Enzymic Hydrolysis. *Carbohydr. Res.* **1992**, *237*, 325-332.

Park, W.; Graessley, W. On-Line Viscometry Combined with Gel Permeation Chromatography. II. Application to Branched Polymers. *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* **1977**, *15*, 85-95.

Pasti, L.; Dondi, F.; van Hulst, M.; Schoenmakers, P.; Martin, M.; Felinger, A. Experimental Validation of the Stochastic Theory of Size-Exclusion Chromatography: Retention on Single and Coupled Columns. *Chromatographia Supplement.* **2003**, *57*, S171-S186.

Peniche-Convias, C.; Arguelles-Monal, W.; San Roman, J. A Kinetic Study of the Thermal Degradation of Chitosan and a Mercaptan Derivative of Chitosan. *Polym. Degrad. Stabil.* **1992**, *39*, 21-28.

Peters, M. Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan, *J. Mat. Sci.-Pure Appl. Chem.* **1995**, *A32*, 629-640.

Podzimek, S. The Use of GPC Coupled with a Multiangle Laser Light Scattering Photometer for the Characterization of Polymers. On the determination of Molecular Weight, Size and Branching. *J. Appl. Polym. Sci.* **1994**, *54*, 91-103.

Potschka, M. Mechanism of Size-Exclusion Chromatography. I. Role of Convection and Obstructed Diffusion in Size-Exclusion Chromatography. *J. Chromatogr.* **1993**, *648*, 41-69.

Procházka, O.; Kratochvíl, P. Analysis of the Accuracy of Determination of Molar Mass Distribution by the GPC with the On-Line Light Scattering Detector. *J. Appl. Polym. Sci.* **1986**, *31*, 919-928.

Prougenes, P.; Berek, D.; Meira G. Size Exclusion Chromatography of Polymers with Molar Mass Detection. Computer Simulation Study on Instrumental Broadening Biases and Proposed Correction Method. *Polymer.* **1998**, *40*, 117-124.

Provder, T. Ed. *Size Exclusion Chromatography. Methodology and Characterization of Polymers and Related Material*; ACS Symposium Series 245; American Chemical Society: Washington, 1984.

Provder, T. Ed. *Detection and Data Analysis in Size Exclusion Chromatography*; ACS Symposium Series 352; American Chemical Society: Washington, 1987.

Provder, T.; Kuo, C. Assessing the Validity of the Universal Calibration Concept in THF and DMAC for a Variety of Polymers and Columns Supports. *Polym. React. Eng.* **1999**, 7(4), 465-484.

Prüß, A.; Kempter, C.; Gysler, J.; Jira, T. Extracolumn Band Broadening in Capillary Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2003**, 1016, 129-141.

Quivoron, C. Use for Polymer Analysis. In *Steric Exclusion Liquid Chromatography of Polymers*; J. Janca, Ed.; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1984; Vol. 25, 213-280.

Radke, W.; Simon, P.; Müller, A. Estimation of Number-Average Molecular Weights of Copolymers by Gel Permeation Chromatography - Light Scattering. *Macromolecules.* **1996**, 29, 4926-4930.

Radosta, S.; Haberer, M.; Vorwerg, W. Molecular Characteristics of Amylose and Starch in Dimethyl-Sulfoxide. *Biomacromolecules.* **2001**, 2, 970-978.

Rathke, T.; Hudson, S. Determination of the Degree of N-deacetylation in Chitin and Chitosan as well as their Monomer Sugar Ratios by Near Infrared Spectroscopy. *J. Polym. Sci.* **1993**, 31, 749-753.

Ravi Kumar, M. A Review of Chitin and Chitosan Applications. *React. Funct. Polym.* **2000**, 46, 1-27.

- Roger, P.; Bello-Perez, L.; Colonna, P. Contribution of Amylose and Amylopectin to the Light Scattering Behaviour of Starches in Aqueous Solution. *Polymer*. **1999**, *40*, 6897–6909.
- Roger, P.; Tran, V.; Leseq, J.; Colonna, P. Isolation and Characterisation of Single Chain Amylose. *J. Cereal Sci.* **1996**, *24*, 247–262.
- Runyon, J.; Barnes, D.; Rudd, J.; Tung, L. Multiple Detectors for Molecular Weight and Composition Analysis of Copolymers by Gel Permeation Chromatography. *J. Appl. Polym. Sci.* **1969**, *13*, 2359-2369.
- Sakai, K.; Uchiyama, T.; Matakira, Y.; Nanjo, F. Immobilization of Chitinolytic Enzymes and Continuous Production of N-acetylglucosamine with the Immobilized Enzymes. *J. Ferment. Bioeng.* **1991**, *72*, 168-172.
- Sannan, T.; Kurita, K.; Ogura, K.; Iwakura, Y. Studies on Chitin: 7. IR Spectroscopy Determination of Degree of Deacetylation. *Polymer*. **1978**, *19*, 458-459.
- Sashiwa, H.; Fujishima, S.; Yamano, N.; Kawasaki, N.; Nakayama, A. Production of N-Acetyl-D-glucosamine from β -Chitin by Enzymatic Hydrolysis. *Chem. Lett.* **2001**, *30*(4), 308-309.
- Schnöll-Bitai, I. The Direct Determination of Axial Dispersion in Size Exclusion Chromatography Based on Poissonian Chain Length Distributions. *Chromatographia*. **2003**, *58*(2/6), 375-380.
- Schnöll-Bitai, I. Direct Determination of Band Broadening in Size Exclusion Chromatography. *J. Chromatogr. A*. **2005**, *1084*, 160-166.
- Scott, R. Extra-column Dispersion. En *Encyclopedia of Chromatography*; Cazes, J., Ed.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2001; 318-319.

Snyder, L.; Kirkland, J.; Glajch, J.; Krull, I.; Szulc, M. *Practical HPLC Method Development*. J. Wiley & Sons, Inc.: New York, 1997.

Striegel, A.; Timpa, J. Molecular Characterization of Polysaccharides Dissolved in Me₂NAc-LiCl by Gel-Permeation Chromatography. *Carbohydr. Res.* **1995**, *267*, 271-290.

Striegel, A.; Timpa, J. Size Exclusion Chromatography of Polysaccharides in Dimethylacetamide-Lithium Chloride. En *Strategies in Size Exclusion Chromatography*; Potechka & Dubin Eds. American Chemical Society: Washington, 1996; Serie 635, 351-378.

Striegel, A. Longitudinal Diffusion in Size-Exclusion Chromatography: A Stop-Flow Size-Exclusion Chromatography Study. *J. Chromatogr. A.* **2001**, *932*, 21-31.

Suortti, T.; Pessa, E. Gel Permeation Chromatographic Determination of Starches Using Alkaline Eluents. *J. Chromatogr.* **1991**, *536*, 251-254.

Suortti, T.; Gorenstein, M. V.; Roger, P. Determination of the Molecular Mass of Amylose. *J. Chromatogr. A.* **1998**, *828*(1-2), 515-521.

Tackx, P.; Tacx, J. Chain Architecture of LDPE as a Function of Molar Mass using Size Exclusion Chromatography and Multi-angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS). *Polymer.* **1998**, *39*(14), 3109-3113.

Tan, S.; Khor, E.; Tan, T.; Wong, S. The Degree of Deacetylation of Chitosan: Advocating the First Derivative UV-spectrophotometry Method of Determination. *Talanta.* **1998**, *45*, 713-719.

Tung, L. H. Method of Calculating Molecular Weight Distribution Function from Gel Permeation Chromatograms. III. Application of the Method. *J. Appl. Polym. Sci.* **1966**, *10*(9), 1271-1283.

Ulanski, P., Wojtasz-Pajak, A., Rosiak, J.M., von Sonntag, C.. Radiolysis and Sonolysis of Chitosan-Two Convenient Techniques for Controlled Reduction of the Molecular Weight. *Advan. Chitin Sci.* **2000**, *4*, 429-433.

Vander Heyden, Y.; Popovici, S.; Staal, B.; Schoenmakers, P. Contribution of the Polymer Standards' Polydispersity to the Band Broadening in Size-Exclusion Chromatography. *J. Chromatogr. A.* **2003**, *986*, 1-15.

Van Dijk, J.; Henkens, W.; Smit, J. The Determination of the Molecular Weight Distribution of Amylose by Gel Permeation Chromatography. *J. Polym. Sci.* **1976**, *14*, 1485-1493.

Vega, J.; Estenoz, D.; Oliva, H.; Meira, G. Analysis of a Styrene-Butadiene Graft Copolymer by Size Exclusion Chromatography. II. Determination of the Branching Exponent with the Help of a Polymerization Model. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2001**, *6*, 339-348.

Vega, J.; Meira, G. SEC of Simple Polymers with Molar Mass Detection in Presence of Instrumental Broadening. Computer Simulation Study on the Calculation of Unbiased Molecular Weight Distribution. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2001**, *24(7)*, 901-919.

Vega, J.; Scnöll-Bitai, I. Alternative Approaches for the Estimation of the Band Broadening Parameters in Single-detection Size Exclusion Chromatography. *J. Liq. Chromatogr. A.* **2005**, *1095*, 102-112.

Volet, G., Leseq, J. Non-Exclusion Effects in Aqueous CLE: Behavior of some Polyelectrolytes using On-Line Mass Detectors. *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, *17(3)*, 559-577.

von Sonntag, C. Free-radicals Reactions of Carbohydrates as Studied by Radiation Techniques. *Adv. Carbohyd. Chem. Biochem.* **1980**, *37*, 7-77.

Wasikiewicz, J.; Yoshii, F.; Nagasawa, N.; Wach, R.; Mitomo, H.. Degradation of

Chitosan and Sodium Alginate by Gamma Radiation, Sonochemical and Ultraviolet Methods. *Radiat. Phys. Chem.* **2005**, *73*(5), 287-295.

Wu, C. Ed. *Handbook of Size Exclusion Chromatography*; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1995; Vol. 69.

Wu, C., Ed. *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*; Academic Press: San Diego, California, 1999.

Wyatt, P. Light Scattering and the Solution Properties of Macromolecules. En *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques* (2nd. Edition). Wu, C., Ed; Chromatographic Science Series; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2003; Vol. 91, 623-655.

Yau, W. An Online Osmometer for Size Exclusion Chromatography: Preliminary Results. *J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp.* **1991**, *48*, 85-94.

Yau, W.; Stoklosa, H.; Bly, D. Calibration and Molecular Weight Calculations in GPC Using a New Practical Method for Dispersion Correction - GPCV2. *J. Appl. Polym. Sci.* **1977**, *21*, 1911-1920.

Yau, W.; Kirkland, J.; Bly, D. *Modern Size Exclusion Liquid Chromatography. Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography*; John Wiley & Sons, Ltd.: New York, 1979; 209-211.

Yokoyama, W.; Renner-Nantz, J.; Shoemaker, C. Starch Molecular Mass and Size by Size-Exclusion Chromatography in DMSO-LiBr Coupled with Multiple Angle Laser Light Scattering. *Cereal Chem.* **1998**, *75*, 530-535.

Yoo, S.; Jane, J. Molecular Weights and Gyration Radii of Amylopectins determined by High-Performance Size-Exclusion Chromatography equipped with Multi-Angle Laser-Light Scattering and Refractive Index Detectors. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *49*(3), 307-314.

You, S.; Lim, S. Molecular Characterization of Corn Starch Using an Aqueous HPSEC-MALLS-RI System Under Various Dissolution and Analytical Conditions. *Cereal Chem.* **2000**, *77*(3), 303-308.

Yu, L.; Rollings, J. E. Low-Angle Laser Light Scattering-Aqueous Size Exclusion Chromatography of Polysaccharides: Molecular Weight Distribution and Polymer Branching Determination. *J. Appl. Polym. Sci.* **1987**, *33*, 1909-1921.

Yu, L.; Rollings, J. E. Quantitative Branching of Linear and Branched Polysaccharide Mixtures by Size Exclusion Chromatography and On-Line Low-Angle Laser Light Scattering Detection. *J. Appl. Polym. Sci.* **1988**, *35*, 1085-1102.

Zimm, B.; Stockmayer, W. The Dimension of Chain Molecules containing Branches and Rings. *J. Chem. Phys.* **1949**, *17*, 1301-1314.

