



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Instituto de Química**  
**Departamento de Química Analítica**

**Dissertação de Mestrado**

***“Preparação e Caracterização de Fases Estacionárias de  
Dimetil-Metil-Fenil Siloxano Sobre Sílica Para  
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência”***

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isabel C. S. F. Jardim  
Orientadora

Josimara Lourenço  
Autora

Campinas  
- 2005 -

Aos meus pais, Sílvia e Osvaldo,  
exemplo de honestidade e dedicação.  
Obrigada pelo incentivo à minha carreira  
e à minha educação.

Aos meus irmãos, Janaina, Giovanna, Juliana e Júnior,  
pela grande amizade.

Ao meu filho, Pedro,  
que deu novo sentido à minha vida.

Dedico esta Dissertação.

## AGRADECIMENTOS

- A Deus.
- Ao Márcio, pelo companheirismo, compreensão e apoio durante estes anos. Seu incentivo foi fundamental para a conclusão deste projeto.
- À Profa. Dra. Isabel Jardim, pela excelente orientação, confiança, paciência e pelo exemplo de profissional e mulher.
- Aos professores Carol e Kenneth Collins pelas discussões e orientações sempre importantes a todo o grupo.
- À Laís, pela grande amizade, apoio e imensa ajuda, principalmente no início deste trabalho.
- À Vanessa, pela amizade e ajuda na finalização da parte experimental deste trabalho.
- Ao César, pelas sugestões e ajuda com os espectros de RMN.
- Aos amigos e colegas do LabCrom, Alessandra, Allan, Anízio, Camila, Carla, Christian, Cíntia, Dania, Daniel, Dione, Elias, Joseane, Karen, Leonardo, Liane, Lika, Louise, Lúcia, Marcelo, Márcia, Mariza, Neto, Nilva, Priscila e Roberta, pela agradável convivência no laboratório e inúmeras discussões sobre nossos trabalhos.
- Ao Instituto de Química da Unicamp, pela oportunidade e estrutura disponível para realização do meu trabalho.
- À Capes e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

## CURRICULUM VITAE

### FORMAÇÃO ACADÊMICA

#### **Graduação em Farmácia-Bioquímica, modalidade Fármaco e Medicamento**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo  
1996 a 2000

### EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

**Ouro Fino Saúde Animal Ltda.** – 10/2005 - Atual  
Supervisora de Operações Industriais

**EMS Sigma Pharma S/A** - 02/2005 a 10/2005  
Analista de Controle de Qualidade

**Galena Química e Farmacêutica Ltda.** - 07/2000 – 04/2002  
Estagiária – 07/2000 – 01/2001  
Assistente Técnica da Qualidade Sênior – 01/2001 – 04/2002

### INICIAÇÃO CIENTÍFICA

#### **“Isolamento e caracterização química e farmacológica parciais das toxinas presentes nas frações VIII e XII do veneno do escorpião *Tityus serrulatus*”**

12/1996 a 06/2000 – Depto. de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiane Arantes Braga  
Bolsista FAPESP de 08/1997 a 07/1999

### CURSOS

#### **“Contribuições da Química Analítica na Análise de Fármacos”**

07/2003, 4º CIFARP, Ribeirão Preto;

#### **“Eletroforese Capilar”**

11/2002, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Unicamp;

#### **“Técnicas Cromatográficas: Fundamentos e Aplicação”**

08/2001, Universidade de Ribeirão Preto;

#### **“Bioequivalência de Medicamentos”**

07/1998, 1º Enfarp, Ribeirão Preto;

#### **“Desenvolvimento Racional de Formas Farmacêuticas de Última Geração”**

03/1998 – 07/1998, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

## **CONGRESSOS E EVENTOS CIENTÍFICOS**

**“4<sup>nd</sup> Congress of Pharmaceutical Sciences”, 06/2003, Ribeirão Preto;**

**“26<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ”, 05/2003, Poços de Caldas;**

**“29<sup>a</sup> Reunião Anual da SBBq”, 05/2000, Caxambu;**

**“2<sup>nd</sup> Congress of Pharmaceutical Sciences”, 03/1999, Ribeirão Preto;**

**“1<sup>o</sup> Enfarp”, 07/1998, Ribeirão Preto;**

**“27<sup>a</sup> Reunião Anual da SBBq”, 05/1998, Caxambu.**

**TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NACIONAIS: 8**

**TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS: 1**

## RESUMO

**Título:** Preparação e Caracterização de Fases Estacionárias de Dimetil-Metil-Fenil Siloxano Sobre Sílica Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**Autora:** Josimara Lourenço

**Orientadora:** Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a coluna é frequentemente considerada como o “coração do sistema cromatográfico”, pois é nela que ocorre a separação. Dessa forma, a busca por fases estacionárias capazes de realizar separações com alta eficiência e desempenho tem sido uma constante em muitos laboratórios de pesquisa.

Polissiloxanos fenil substituídos têm sido extensivamente utilizados em cromatografia gasosa, mas a sua aplicação em CLAE tem despertado pouca atenção. Neste trabalho foram preparadas fases estacionárias para CLAE, com grupos fenil, a partir da sorção e subsequente imobilização por tratamento térmico do copolímero de dimetil(52-48%)-metil-fenil(48-52%) siloxano sobre a sílica (Kromasil, 5  $\mu\text{m}$ ).

Medidas da quantidade de carbono, volume de poro, área superficial específica, espectroscopia no infravermelho e RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^{29}\text{Si}$  foram realizadas para caracterizar físico-quimicamente as fases estacionárias. Também foram feitas avaliações cromatográficas utilizando misturas teste de compostos orgânicos de diferentes polaridades.

As fases estacionárias preparadas a partir do copolímero de dimetil(52-48%)-metil-fenil(48-52%) siloxano sobre a sílica e imobilizadas termicamente a 150  $^{\circ}\text{C}$ , por 4,5 horas apresentaram alta eficiência ( $77000 \text{ N m}^{-1}$ ), picos simétricos ( $A_s = 0,9$ ) e bom desempenho cromatográfico. Os parâmetros cromatográficos indicaram que o tratamento térmico melhorou o desempenho das fases estacionárias e proporcionou um aumento da estabilidade frente a fases móveis neutras e alcalinas.

## ABSTRACT

**Title:** Preparation and Characterization of Stationary Phases of Copolymer of Dimethyl-Methyl-Phenyl Siloxane on the Silica for High Performance Liquid Chromatography.

**Author:** Josimara Lourenço

**Supervisor:** Dr. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

In high-performance liquid chromatography (HPLC), the column is frequently considered as the “heart of the chromatographic system”, because is in the column that the separation occurs. In this way, the search for stationary phases able to achieve separations with high efficiency and performance has been a constant in many research laboratories.

Phenyl substituted polysiloxanes have been used extensively in gas chromatography, but their application in HPLC has received little attention. In this work were prepared stationary phases for HPLC, with phenyl groups, using sorption and subsequent thermal immobilization of the copolymer of dimethyl(52-48%)-methyl-phenyl(48-52%) siloxane on silica (Kromasil, 5  $\mu\text{m}$ ).

Measurement of amount of carbon, pore volume, specific surface area, infrared spectrum and NMR of  $^{13}\text{C}$  and  $^{29}\text{Si}$  were used to physical-chemically characterize the stationary phases. Chromatographic evaluations using test mixtures of organic compounds of different polarity were also carried out.

The stationary phases prepared from the copolymer of dimethyl(52-48%)-methyl-phenyl(48-52%) siloxane on silica gel and thermally immobilized for 4.5 h at 150  $^{\circ}\text{C}$  show high efficiency ( $77000 \text{ N m}^{-1}$ ), symmetrical peaks ( $A_s = 0.9$ ) and good chromatography performance. The chromatographic parameters show that the thermal treatment improved the performance of stationary phases and provided an increase of stability in neutral and basic mobile phases.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Suportes Para Fases Estacionárias.....	02
1.2. Fases Estacionárias Quimicamente Ligadas.....	04
1.3. Fases Estacionárias com Polímeros Sorvidos ou Imobilizados.....	05
1.4. Enchimento das Colunas .....	10
1.5. Avaliação Cromatográfica.....	11
2. OBJETIVOS.....	17
3. ETAPAS DO TRABALHO .....	17
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	18
4.1. Reagentes.....	18
4.2. Equipamentos .....	18
4.3. Suporte Cromatográfico .....	20
4.4. Fase Estacionária Líquida.....	20
4.5. Coluna Cromatográfica .....	21
4.6. Cromatografia por Exclusão por Tamanho .....	22
4.7. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho.....	22
4.8. Análise Termogravimétrica .....	22
4.9. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 e Silício 29 (RMN <sup>13</sup> C e <sup>29</sup> Si).....	22
4.10. Área Superficial, Volume e Diâmetro de Poro.....	23
4.11. Preparação das Fases Estacionárias.....	23
4.12. Extração por Solvente.....	23
4.13. Enchimento das Colunas .....	24
4.14. Preparação das Fases Móveis .....	25
4.15. Avaliação Cromatográfica.....	25
4.16. Testes de Estabilidade .....	25
4.17. Análise Elementar .....	26
4.18. Espessura da Camada de Copolímero Sobre a Sílica .....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
5.1. Cromatografia de Exclusão por Tamanho.....	28

5.2. Análise Termogravimétrica .....	29
5.3. Avaliação Cromatográfica.....	31
5.3.1. Avaliação da carga de copolímero.....	31
5.3.2. Avaliação da temperatura de imobilização.....	34
5.3.3. Avaliação do tempo de imobilização.....	37
5.4. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho .....	40
5.5. Área Superficial, Volume e Diâmetro de Poro.....	41
5.6. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 e Silício 29 (RMN <sup>13</sup> C e <sup>29</sup> Si).....	42
5.7. Testes de Estabilidade .....	45
6. CONCLUSÕES .....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de alguns elementos metálicos presentes na sílica Kromasil, lote AT 0235. ....	20
Tabela 2. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência da carga do copolímero, usando fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O 70:30 (v/v). ....	31
Tabela 3. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência da carga do copolímero, usando fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O 60:40 (v/v). ....	32
Tabela 4. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência da carga do copolímero, usando fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50 (v/v). ....	32
Tabela 5. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência da temperatura de imobilização, em um tempo fixo de 4 h. ....	35
Tabela 6. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência das condições de extração para fase sorvida. ....	37
Tabela 7. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência das condições de extração para fase imobilizada a 100 °C, por 4 h. ....	38
Tabela 8. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência das condições de extração para fase imobilizada a 150 °C, por 4 h. ....	38
Tabela 9. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência do tempo de imobilização, na temperatura de 150 °C. ....	40
Tabela 10. Características dos materiais de recheio. ....	41
Tabela 11. Porcentagem de carbono presente nas fases estacionárias, sorvida e imobilizada. ....	47

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grupos funcionais presentes na superfície da sílica.....	03
Figura 2. Modificadores organoassilanos (a) monofuncional, (b) bifuncional e (c) trifuncional. X = Cl ou OR; R, R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>3</sub> = radicais orgânicos.....	05
Figura 3. Cromatograma típico para cálculos dos parâmetros cromatográficos .....	11
Figura 4. Determinação da assimetria e fator de alargamento do pico.....	13
Figura 5. Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel.....	16
Figura 6. Estrutura molecular do copolímero.....	20
Figura 7. Polimento do tubo para confecção da coluna cromatográfica .....	21
Figura 8. Esquema representativo do sistema de enchimento da coluna.....	24
Figura 9. Cromatograma (GPC) do copolímero de dimetil-metil-fenil siloxano. Condições cromatográficas: coluna para cromatografia por permeação em gel American Polymer Standards, volume de injeção: 250 µL, fase móvel: THF, vazão 1,0 mL min <sup>-1</sup> , temperatura de 40 °C, detecção por índice de refração. ....	29
Figura 10. Termogramas: A) do copolímero em atmosfera inerte, B) do copolímero em atmosfera oxidante e C) da sílica.....	30
Figura 11. Curvas de van Deemter A) para a mistura teste 1 e B) para a mistura teste 2 ....	33
Figura 12. Cromatogramas obtidos na avaliação da influência da carga. A) Mistura teste 1: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL, MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50 (v/v), vazão 0,3 mL min <sup>-1</sup> , detecção UV a 254 nm. B) Mistura teste 2: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL, MeOH:H <sub>2</sub> O 60:40 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> , detecção UV a 254 nm. ....	34
Figura 13. Cromatogramas obtidos na avaliação da influência da temperatura de imobilização. A) Mistura teste 1: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 µL, MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50 (v/v), vazão 0,3 mL min <sup>-1</sup> , detecção UV a 254 nm. B) Mistura teste 2: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.	

Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 $\mu\text{L}$ , MeOH:H <sub>2</sub> O 60:40 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> , detecção UV a 254 nm. ....	36
Figura 14. Cromatogramas obtidos na avaliação da influência do tempo de tratamento térmico. A) Mistura teste 1: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 $\mu\text{L}$ , MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50 (v/v), vazão 0,3 mL min <sup>-1</sup> , detecção UV a 254 nm. B) Mistura teste 2: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10 $\mu\text{L}$ , MeOH:H <sub>2</sub> O 60:40 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> , detecção UV a 254 nm .....	39
Figura 15. Espectros no infravermelho A) copolímero de dimetil metil-fenil siloxano; B) sílica; C) fase autoimobilizada; e D) fase imobilizada termicamente a 150 °C por 4,5 h.....	41
Figura 16. Nomenclatura e deslocamentos químicos das espécies silício.....	42
Figura 17. Espectros de RMN <sup>29</sup> Si de A) sílica nua; B) fase estacionária sorvida e C) imobilizada termicamente a 150 °C por 4,5 h. ....	43
Figura 18. Espectros de RMN <sup>13</sup> C de fases estacionárias A) sorvida e B) imobilizada termicamente a 150 °C por 4,5 h.....	44
Figura 19. Teste de estabilidade com a fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50 (v/v): • Fase Imobilizada a 150 °C; ■ Fase sorvida. ....	45
Figura 20. Teste de estabilidade com fase móvel MeOH/NaHCO <sub>3</sub> 0,05 mol L <sup>-1</sup> + NaOH pH 9,0, 50:50 (v/v), a 40 °C: • Fase Imobilizada a 150 °C; ■ Fase sorvida .....	47

## 1. INTRODUÇÃO

A análise qualitativa e quantitativa de uma substância compreende várias etapas, como a amostragem, preparação da amostra, separação, identificação, integração e cálculos. A separação, identificação e determinação das substâncias presentes em uma amostra pode ser realizada usando cromatografia.

Essencialmente, a cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária (fase estacionária) enquanto a outra (fase móvel) é percolada através dela em uma direção definida<sup>1</sup>. Durante a passagem da fase móvel através da fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido, resultando em migrações diferenciais destes componentes<sup>2</sup>.

Existem várias formas de realizar o processo cromatográfico. A cromatografia líquida foi inicialmente feita em colunas de vidro com diâmetros de 1 a 5 cm e comprimento de 50 a 500 cm. Para assegurar vazões razoáveis à pressão atmosférica, o diâmetro das partículas de fase estacionária estava geralmente no intervalo de 150 a 200  $\mu\text{m}$ . No início do desenvolvimento da cromatografia líquida, percebeu-se que a eficiência da coluna podia ser aumentada através da diminuição do tamanho das partículas da fase estacionária. Entretanto, somente no final da década de 1960 foi desenvolvida a tecnologia para a produção e uso de fases estacionárias com partículas de diâmetro de 3 a 10  $\mu\text{m}$ . O nome Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi empregado para denominar esses novos procedimentos, que utilizavam equipamentos sofisticados a altas pressões<sup>3</sup>.

As vantagens da CLAE sobre a outra forma de cromatografia líquida, a cromatografia líquida clássica, são a resolução e eficiência alcançadas, que excedem de longe a do método mais antigo; alta reprodutibilidade, possibilidade de automação, reutilização das colunas sem necessidade de regeneração e diminuição do tempo de análise<sup>4</sup>.

Como a CLAE, a cromatografia gasosa (CG) é também uma técnica de alto desempenho. A diferença mais marcante entre as duas é que em CG são analisadas somente substâncias voláteis ou volatilizáveis a altas temperaturas sem degradação; ou substâncias que possuem um derivado volátil. Cerca de 20% dos compostos orgânicos conhecidos podem ser analisados por

CG sem tratamento prévio<sup>5</sup>. Independente da volatilidade e estabilidade térmica, a CLAE requer somente que a amostra seja solúvel na fase móvel<sup>2</sup>. Exceto para algumas substâncias, a maioria dos produtos orgânicos e inorgânicos satisfazem essa condição<sup>5</sup>. Graças às suas vantagens e à sua versatilidade, a CLAE tornou-se uma das mais importantes técnicas de separação.

Atualmente, a CLAE é considerada a técnica mais empregada na indústria química, mas suas aplicações se estendem a muitas outras áreas. Na indústria farmacêutica a CLAE é indispensável no controle de qualidade desde a matéria-prima até o produto final. Em laboratórios de controle ambiental, a CLAE é utilizada para monitorar e analisar pesticidas e outros contaminantes em água e solo. Na indústria alimentícia é utilizada para controle e determinação de toxinas e quantificação de nutrientes mesmo na presença de aditivos. Isto sem contar as suas aplicações na área médica, investigações forenses e, desde o final da década de 1980, na área esportiva em exames anti-dopping<sup>6</sup>.

Convencionalmente, em cromatografia líquida são empregadas fases estacionárias polares e fases móveis apolares. Em CLAE, tornou-se comum a prática do uso de fases estacionárias apolares com fases móveis aquosas, contendo várias proporções de modificadores orgânicos miscíveis. Este sistema é conhecido como cromatografia líquida em fase reversa e, em virtude de sua ampla faixa de aplicação, tornou-se, por volta de 1980, o modo de cromatografia dominante<sup>7</sup>, sendo até hoje o método mais utilizado para a separação de moléculas orgânicas polares ou apolares<sup>8</sup>. Os recheios mais utilizados em fase reversa consistem do suporte e da fase estacionária líquida em si.

## **1.1. Suportes Para Fases Estacionárias**

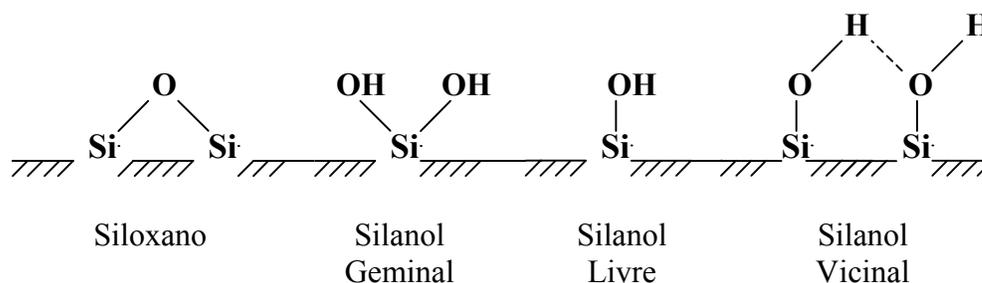
As matrizes dos principais suportes são inorgânicas ou polímeros orgânicos. Cada tipo de material tem seus prós e contras e a escolha de um material apropriado é governada pelas necessidades da separação desejada.

Com o avanço da tecnologia de polimerização em suspensão, é possível preparar polímeros semi-rígidos macroporosos, principalmente de polimetacrilato ou poliestireno, com considerável resistência mecânica e boa estabilidade química. Contudo, tais polímeros orgânicos apresentam baixas eficiências e incham quando certos solventes são usados como fases móveis, resultando em uma limitada resistência a pressões elevadas. Os inconvenientes referentes aos

polímeros orgânicos são as razões pelas quais se utilizam matrizes inorgânicas como carbono, hidroxiapatita, alumina e sílica, além de outros óxidos inorgânicos<sup>9</sup>.

A sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) tem sido o material de suporte preferido em CLAE, pois é mecanicamente estável às pressões necessárias para o enchimento das colunas, assim como nas separações; é comercialmente disponível em uma ampla faixa de tamanho de partículas e poros e pode ser facilmente modificada para produzir fases estacionárias com diferentes funcionalidades.

Entender a superfície da sílica é importante para a interpretação de suas propriedades cromatográficas. Ela consiste em uma rede de grupos silanóis (Figura 1), alguns dos quais podem formar ligações de hidrogênio com a água, e grupos siloxano ( $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ )<sup>8</sup>.



**Figura 1.** Grupos funcionais presentes na superfície da sílica.

Os grupos silanóis são os centros de adsorção na cromatografia em fase normal. Eles são hidrofílicos e interagem com grupos funcionais da fase móvel e das moléculas dos analitos. Em cromatografia em fase reversa, podem atuar como âncoras para ligações covalentes de polímeros ou substâncias que possuam um grupamento funcional apropriado<sup>9</sup>.

Comparada a outros suportes, a sílica apresenta inúmeras vantagens em termos de eficiência e desempenho, mas ela não é um suporte perfeito para CLAE. Os grupos silanóis são ácidos e, dependendo do pH, eles se dissociam, tornando a superfície da sílica carregada negativamente. Nas fases estacionárias quimicamente ligadas, a interação dos silanóis dissociados com analitos carregados positivamente pode resultar em picos assimétricos. Além disso, a estabilidade química do esqueleto de sílica frente a fases móveis alcalinas é restrita, pois a sua solubilidade aumenta exponencialmente em pH acima de 8,0, devido à formação do ânion silicato<sup>8</sup>, causando perda da fase estacionária e, conseqüentemente, o colapso da estrutura do leito cromatográfico, com perda irreversível da eficiência.

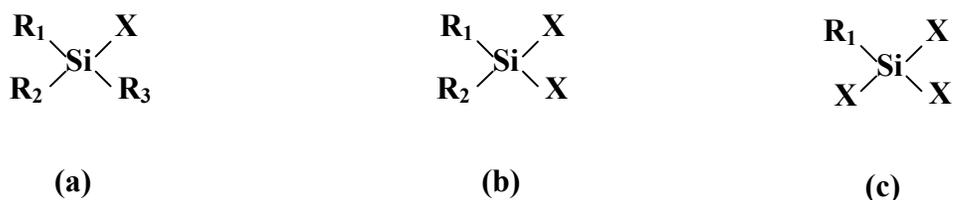
Impurezas metálicas são outra fonte de perda da eficiência cromatográfica e assimetria dos picos. Dependendo da quantidade de metal, a sílica pode ser classificada em tipo A, com alta quantidade de metais, e tipo B, com menor quantidade de metal. O teor de metais depende do processo de síntese e das matérias-primas utilizadas, mas geralmente, a sílica usada em cromatografia contém cerca de 0,1 a 0,3 % de metais. Diferentes autores demonstraram que sítios de adsorção fortes são, provavelmente, devido às impurezas metálicas, as quais interagem com solutos 50 vezes mais fortemente que os analitos com os silanóis livres. Além disso, alguns metais aumentam a acidez dos silanóis vizinhos, interagindo indiretamente com compostos básicos<sup>10</sup>.

## 1.2. Fases Estacionárias Quimicamente Ligadas

A síntese da sílica quimicamente modificada pode ser realizada de duas maneiras. Na primeira, a ligação é realizada durante a formação dos poros do suporte. Organo-halo ou alcoxissilanos são comumente empregados como materiais de partida e são convertidos por hidrólise, condensação ou polimerização em poli(organossiloxanos) rígidos, insolúveis e porosos ou em xerogéis de organossilicones. No produto final, os grupos organofuncionais são distribuídos sobre a superfície. Este modo é chamado modificação do “bulk”. O segundo método, chamado modificação de superfície, envolve a reação entre os grupos silanóis da sílica e organossilanos reativos apropriados<sup>10</sup>.

A modificação de superfície é considerada mais fácil e é mais comumente utilizada. Dependendo da técnica empregada, quatro tipos de ligações podem ser formadas:  $\equiv\text{Si-O-C}$ ,  $\equiv\text{Si-C}$ ,  $\equiv\text{Si-N}$ ,  $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ <sup>11</sup>. A ligação  $\equiv\text{Si-O-C}$ , geralmente, induz a problemas de estabilidade, enquanto a ligação  $\equiv\text{Si-C}$  é a mais estável. Entretanto, em virtude da disponibilidade dos reagentes e à facilidade do processo, a ligação siloxano,  $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ , tornou-se o procedimento padrão para todas as classes de fase ligadas<sup>2</sup>.

Os modificadores mais utilizados são os cloro e alcoxissilanos, que podem ser mono, bi ou trifuncionais (Figura 2). Dependendo dessas funções, as fases estacionárias podem apresentar diferentes características.



**Figura 2.** Modificadores organossilanos (a) monofuncional, (b) bifuncional e (c) trifuncional. X = Cl ou OR; R, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = radicais orgânicos.

Através da reação dos grupos hidroxilas da superfície da sílica com silanos mono ou bifuncionais, ou ainda, silanos trifuncionais na ausência de água, obtém-se as fases estacionárias monoméricas. Utilizando-se silanos bi e trifuncionais na presença de água ocorrem reações cruzadas que levam à polimerização vertical do modificador e, conseqüentemente, às fases estacionárias poliméricas.

As fases estacionárias poliméricas apresentam características cromatográficas interessantes, tais como melhor seletividade para separação de isômeros geométricos de compostos rígidos quando comparadas às fases estacionárias monoméricas, entretanto, podem apresentar alguns problemas como baixa eficiência e reprodutibilidade, lote a lote, além da dificuldade de determinar seu grau de polimerização<sup>12,13</sup>.

O maior problema das reações de silanização da superfície da sílica é que somente um número limitado de grupos silanóis reage devido a impedimento estérico. Os silanóis residuais são fracamente ácidos e podem alterar o mecanismo de retenção, contribuindo para a retenção indesejada e desempenho pobre, principalmente, de substâncias básicas<sup>10</sup>. Além disso, o pH da fase móvel não deve ser menor que 2,0, pois as ligações ≡Si-C podem ser hidrolisadas.

### 1.3. Fases Estacionárias com Polímeros Sorvidos ou Imobilizados

Embora colunas capilares com a parede recoberta venham sendo utilizadas há muito tempo em cromatografia gasosa, somente a partir do final da década de 1980, o recobrimento de suportes por polímeros tornou-se uma ferramenta importante em cromatografia líquida<sup>14</sup>. Sílicas recobertas por polímeros apresentam uma melhor blindagem dos silanóis residuais quando

comparadas com as sílicas silanizadas e conferem uma maior proteção ao esqueleto da sílica contra ataques de fases móveis agressivas<sup>9</sup>.

A excelente estabilidade mecânica da sílica pode ser combinada com a inércia química e seletividade única de polímeros através da sua imobilização sobre a sílica. A seletividade dos compósitos sílica-polímero pode ser amplamente variada e depende, principalmente, dos grupos funcionais do polímero imobilizado, da espessura da camada de polímero e da área superficial do suporte de sílica<sup>9</sup>.

O polímero pode formar um filme fino sobre a superfície do poro da sílica ou preencher todo o volume do poro. Também pode existir uma combinação das duas formas, ou uma forma intermediária, na qual o polímero é ligado à sílica por uma de suas extremidades e sua cadeia projeta-se, preenchendo parcialmente o poro. É muito difícil se obter uma monocamada uniforme de polímero sobre a sílica e, na maioria das vezes, o que ocorre é uma combinação dessas formas<sup>9</sup>.

A imobilização de polímeros sobre sílica é um processo complexo e é influenciado por diferentes tipos de interações adsorptivas. Não somente as propriedades cromatográficas das fases estacionárias como também o processo de imobilização em si são influenciados pelas propriedades da matriz de sílica. Assim, a escolha do suporte apropriado é muito importante para a preparação de uma fase estacionária. As propriedades químicas e de sorção da sílica não modificada dependem principalmente da concentração e do tipo de grupos silanóis, geminais, vicinais ou isolados, presentes na superfície<sup>9</sup>.

Muitas das propriedades cromatográficas dos materiais de recheio para CLAE são influenciadas pela estrutura das partículas do suporte. Sílicas não porosas são usadas para preparação de um tipo de material pelicular que possui apenas uma fina camada de polímero semipermeável sobre um núcleo sólido da sílica que atua como fase estacionária. Entretanto, sílica porosa ainda é o material preferido. A estrutura de poro da sílica determina essencialmente a possibilidade da imobilização e as propriedades do compósito resultante.

Suportes macroporosos são necessários para a imobilização de moléculas de alta massa molar, pois se evita o bloqueio dos poros, o que pode diminuir a eficiência da coluna. Em casos especiais, a sílica tem seus poros preenchidos por géis orgânicos. Nestes casos, propriedades vantajosas dos géis não rígidos e semi-rígidos podem ser combinadas à estabilidade da sílica a altas pressões.

A superfície específica do material compósito, geralmente, é menor do que aquela do material de partida, provavelmente devido ao entupimento dos poros menores pelas moléculas de polímeros. Contudo, se a sílica for modificada apropriadamente, a diferença na área específica do material de partida e do material compósito é relativamente pequena<sup>15</sup>.

A forma mais simples de preparar o compósito suporte-polímero é pela deposição da camada polimérica sobre a superfície do suporte, sem promover o entrecruzamento entre as cadeias de polímero e sem nenhum tipo de ligação química entre o suporte e polímero. Neste caso, ocorre a contribuição de um ou mais tipos de interações como dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre o polímero e o suporte. A insolubilidade do polímero na fase móvel é crucial neste tipo de fase estacionária<sup>9</sup>.

A necessidade de imobilização em fases estacionárias modificadas com polímeros é praticamente um consenso desde as décadas de 1970 e 1980, quando pesquisadores apontavam resultados negativos para fases estacionárias sorvidas sobre a superfície da sílica. Os trabalhos indicavam perda da fase estacionária por sua solubilidade na fase móvel. Na maioria dos casos, houve a necessidade de reações entre as cadeias do polímero ou entre o polímero e a superfície da sílica para estabilizar a camada de polímero<sup>6</sup>.

Existem várias maneiras de se imobilizar o polímero sobre o suporte, sendo mais comum a sorção de polímeros de composição química definida sobre o suporte e subsequente imobilização. O processo de imobilização pode ocorrer por entrecruzamento das cadeias ou ainda, promover a ligação covalente entre o suporte e um polímero com grupos funcionais reativos, produzindo uma monocamada ancorada, sendo induzidas por peróxidos<sup>9</sup>, tratamento térmico<sup>16</sup>, radiação ionizante<sup>17</sup>, radiação por microondas<sup>18</sup>, autoimobilização<sup>19</sup>.

Polímeros, quando tratados por radiação gama, sofrem cisão ou entrecruzamento da cadeia principal com mudanças em suas propriedades físico-químicas. Enquanto a cisão da cadeia principal diminui a massa molar média, com perda das propriedades poliméricas, o entrecruzamento leva ao aumento da massa molar, com melhoria das propriedades mecânicas. Espera-se que a radiação gama promova modificações estruturais no polímero que permitam seu entrecruzamento, levando a um aumento da massa molar e sua estabilização através da formação de um filme fino sobre a superfície do suporte, blindando os grupos hidroxilas ou reduzindo uma possível solubilização do polímero da fase móvel através do aumento de sua viscosidade<sup>17</sup>.

No caso da radiação de microondas e do tratamento térmico o agente de imobilização é a temperatura. A radiação microondas é um tipo de energia não ionizante que causa movimento molecular pelos fenômenos de migração iônica e rotação dipolar. O campo elétrico gerado pela radiação microondas é capaz de alinhar as moléculas polarizadas e, quando o campo decresce, as moléculas voltam ao estado inicial de desordem. Dependendo da frequência aplicada, essa movimentação de estado ordenado para desordem molecular pode ocorrer milhões de vezes por segundo, proporcionando um aquecimento muito rápido do meio. A radiação microondas em si não tem energia suficiente para romper ligações químicas, mas o aquecimento rápido induzido é o responsável pela imobilização do polímero sobre o suporte de sílica. Alguns trabalhos neste sentido foram realizados no LabCrom e mostraram resultados promissores<sup>18,20</sup>.

A autoimobilização é um processo de adsorção irreversível da camada polimérica sobre a sílica à temperatura ambiente, na ausência de iniciadores que induzem à imobilização. O polímero autoimobilizado torna-se insolúvel, provavelmente devido ao rearranjo de suas moléculas que apresentam vários pontos de adsorção sobre o suporte<sup>21</sup>. O processo de autoimobilização leva um tempo considerável para tornar-se completo e esse tempo depende das características específicas do suporte de sílica e do polímero<sup>22</sup>.

Vários polímeros podem ser utilizados como fase estacionária em CLAE, proporcionando ampla faixa de polaridade e seletividade a estas fases. A seletividade destas fases pode ser amplamente variada e depende, principalmente, dos grupos funcionais do polímero imobilizado, da espessura da camada de polímero e da área superficial do suporte de sílica<sup>9</sup>. Entre os polímeros mais utilizados estão o poli(metiloctilsiloxano)<sup>21,23</sup>, poli(metiloctadecilsiloxano)<sup>6, 24</sup>, e o polibutadieno<sup>18, 20, 25</sup>.

A busca por fases estacionárias capazes de realizar separações cromatográficas de compostos de caráter básico como peptídeos, por exemplo, é uma constante nos laboratórios de pesquisas. O reflexo disso pode ser observado na grande quantidade de trabalhos publicados em revistas especializadas<sup>26, 27, 28, 29</sup>.

Polissiloxanos fenil substituídos têm sido extensivamente utilizados em cromatografia gasosa<sup>30</sup>, entretanto, sua imobilização sobre a superfície da sílica para utilização em CLAE tem despertado pouca atenção. Neimark e Chertov<sup>31</sup> foram os primeiros a ligarem grupos fenil à superfície da sílica utilizando feniltriclorossilano e difenildiclorossilano. Posteriormente<sup>32</sup>,

diferentes polissiloxanos fenil substituídos foram utilizados para modificar a superfície da sílica obtendo-se fases estacionárias de diferentes polaridades.

A presença de anéis aromáticos confere à fase estacionária uma polaridade intermediária e tem um papel importante, graças a interações  $\pi$ - $\pi$  com os analitos<sup>33,34</sup>. Salo e Herrala<sup>34</sup> observaram o aumento da retenção de retinóides quanto maior o número de elétrons  $\pi$  em sua molécula, quando separados em uma fase estacionária aromática.

Em outro estudo realizado, Goss<sup>35</sup> comparou o desempenho de duas colunas disponíveis comercialmente, uma com grupos fenil e outra C18, na separação do ácido salicílico, algumas de suas impurezas e metabólitos. Os resultados mostraram uma melhora na simetria e resolução entre os picos quando separados com uma coluna com grupos fenil e, além disso, houve uma alteração na ordem de eluição dos compostos, sugerindo diferentes interações entre os analitos e os dois tipos de fases estacionárias.

Yang et al.<sup>33</sup> sintetizaram cinco fases estacionárias com grupo fenil com diferentes graus de polimerização através da ligação de poli(metilfenilsiloxanos) com OH terminais na superfície da sílica gel. As fases preparadas foram avaliadas e comparadas com uma coluna C18 disponível comercialmente. O resultado das análises de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e ciclossiloxanos indicaram, claramente, uma contribuição significativa das interações  $\pi$ - $\pi$  das fases estacionárias com grupo fenil no processo de separação.

Três diferentes fases estacionárias foram preparadas por Szabó et al.<sup>36</sup> utilizando sílica modificada por fenil-metil-di-clorossilano, di-fenil-di-clorossilano e tri-fenil-clorossilano. O efeito na separação e a seletividade das diferentes fases fenil preparadas foram avaliados e comparados com uma fase octadecil. A comparação entre as fases revelou que uma maior retenção foi observada para solutos menos polares na fase octadecil e para compostos aromáticos polares foi observada maior retenção nas fases com grupo fenil. A sílica gel modificada por fenil mostrou ser uma fase estacionária melhor para compostos aromáticos polares que a fase octadecil e uma boa alternativa a ela.

Szabó e Csató<sup>32</sup> realizaram um estudo comparativo utilizando três fases estacionárias preparadas com diferentes polissiloxanos fenil substituídos sobre a sílica e uma fase estacionária monomérica preparada com fenil-metil-di-clorossilano. A ordem de eluição dos analitos utilizados foi a mesma para todas as fases estacionárias preparadas, entretanto as sílicas modificadas por polissiloxanos mostraram-se melhores que a fase monomérica para separação de

compostos aromáticos apolares. Em relação à fase monomérica, as sílicas modificadas por fenil-polissiloxanos não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de carbono e concentração dos grupos orgânicos na superfície, entretanto apresentaram características hidrofóbicas significativamente maiores. O aumento da hidrofobicidade observado foi causado por interações adicionais das ligações siloxano (essencialmente hidrofóbicas) do modificador polimérico com os solutos.

Em virtude das características interessantes já mencionadas anteriormente e o número limitado de estudos realizados utilizando-se polissiloxanos fenil substituídos sobre a sílica, neste trabalho será explorada a aplicação de um novo polímero com grupos fenil, com polaridade intermediária, como fase estacionária para CLAE.

#### **1.4. Enchimento das Colunas**

Em CLAE, a coluna é freqüentemente descrita como o “coração do sistema cromatográfico”. Controlar a separação significa entender e controlar como os recheios são preparados e como as colunas são recheadas<sup>37</sup>. O enchimento de colunas não pode ser reduzido a uma ciência exata e, apesar de boas colunas serem produzidas utilizando uma ampla variedade de procedimentos diferentes, tentativas de otimizar as muitas variáveis e identificar as melhores técnicas têm encontrado sucesso limitado<sup>38, 39, 40</sup>.

O enchimento de colunas para CLAE pode ser feito a seco ou usando uma suspensão da fase estacionária em um solvente apropriado. Para partículas pequenas (<20 µm) e de grande área superficial (>300 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>) o método da suspensão é o mais adequado, pois as partículas ficam dispersas no líquido de tal maneira que não formam agregados. O enchimento a seco pode provocar a formação de aglomerados, resultando em um recheio instável com muitos espaços vazios<sup>1</sup>.

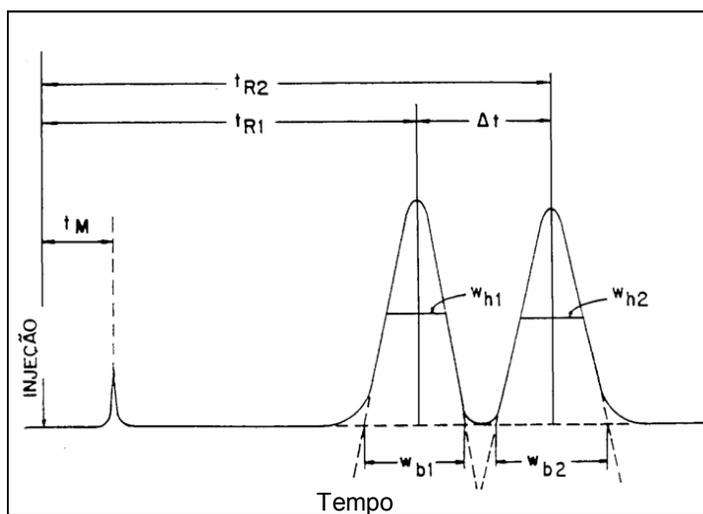
O objetivo é conseguir um leito o mais denso possível sem, contudo, quebrar as partículas. A suspensão é deslocada para dentro da coluna sob pressão e o leito cromatográfico é retido por um filtro. As partículas devem entrar na coluna com uma alta velocidade para que estas superem as forças friccionais exercidos pelo solvente de suspensão e pelas paredes da coluna. A velocidade de enchimento é dependente da pressão aplicada, viscosidade do solvente de suspensão e do diâmetro das partículas.

Os quesitos que devem ser observados ao se recheiar uma coluna são os seguintes:

- As partículas não devem formar agregados e sedimentar-se rapidamente durante o procedimento de enchimento;
- Devem acomodar-se no leito rapidamente;
- Cada partícula deve estar perfeitamente acomodada antes que outra partícula se choque com ela;
- O solvente de suspensão deve ser puro e conseguir 'molhar' toda a superfície da partícula;
- O solvente de suspensão deve ser prontamente removido do leito cromatográfico sem reagir com o recheio<sup>1</sup>.

### 1.5. Avaliação Cromatográfica

A avaliação do desempenho cromatográfico da coluna é feita através da análise de alguns parâmetros calculados a partir de valores extraídos do cromatograma. A Figura 3 mostra um cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes.



**Figura 3.** Cromatograma típico para cálculos dos parâmetros cromatográficos<sup>2</sup>.

Tempo de retenção do soluto ( $t_R$ ): é o tempo gasto desde o ato de injeção até a saída do máximo do pico do componente do sistema cromatográfico<sup>2</sup>.

Tempo de retenção de um composto não retido ( $t_M$ ): O  $t_R$  engloba todo o tempo que o componente em questão fica no sistema cromatográfico, quer na fase móvel, quer na fase

estacionária. Quando as moléculas do soluto ficam na fase móvel, elas devem movimentar-se com a mesma velocidade que as moléculas da própria fase móvel. Então, a parte do tempo que as moléculas do soluto estão na fase móvel é igual ao tempo gasto para as moléculas da fase móvel percorrerem o sistema<sup>2</sup>, que é denominado de tempo de retenção de um composto não retido.

Tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ): é o tempo que o soluto fica retido na fase estacionária<sup>2</sup>. É calculado pela diferença:

$$t'_R = t_R - t_M$$

Fator de retenção ( $k$ ): é calculado pela razão entre os tempos em que o soluto fica retido na fase estacionária e caminhando junto com a fase móvel<sup>2</sup>, sendo calculado por:

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Os valores ideais de  $k$  devem variar entre 2 e 10. Valores maiores indicam uma interação muito forte entre a fase estacionária e o soluto e, conseqüentemente, um longo tempo de análise. O inverso ocorrerá quando os valores forem menores que 2, prejudicando o processo de separação<sup>41</sup>.

Resolução entre os picos ( $R_s$ ): a resolução refere-se à separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada pela equação abaixo:

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

$t_{R1}$  e  $t_{R2}$  = tempos de retenção de dois picos adjacentes envolvidos no cálculo

$w_{b1}$  e  $w_{b2}$  = largura dos picos na base, em unidade de tempo

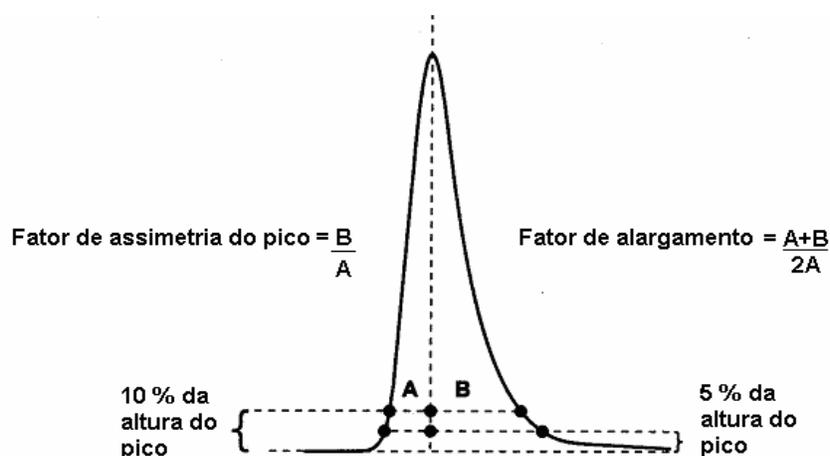
$w_{h1}$  e  $w_{h2}$  = largura dos picos à meia altura, em unidades de tempo

Valores acima de 1,5 são considerados ideais<sup>41</sup>, indicando uma boa separação entre os picos até a linha de base..

Fator de assimetria do pico a 10% da altura do pico ( $As_{10}$ ): é a medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido longitudinal a 10% de sua altura. O formato do pico pode afetar significativamente os valores de N. A eficiência da coluna só pode ser determinada em picos simétricos (com valores de assimetria entre 0,9 e 1,2, sendo que valores até 1,6 são admitidos) ou os erros podem ser suficientes para invalidar quaisquer resultados<sup>42</sup>.

Outra maneira de definir a forma de um pico é através do fator de alargamento a 5 % da sua altura (Tf, do inglês “Tailing Factor”). Nesta abordagem a assimetria é medida a 5 % da altura do pico<sup>43</sup>. O valor ideal de Tf seria 1,0 indicando que o pico cromatográfico é totalmente simétrico.

A Figura 4 mostra como é calculada a assimetria utilizando as duas maneiras:



**Figura 4.** Determinação da assimetria e fator de alargamento do pico.

Números de pratos (N): a eficiência apresentada por uma coluna é medida em termos de número de pratos. Um prato pode ser considerado equivalente a uma etapa de equilíbrio do soluto entre as duas fases, estacionária e móvel, análogo aos pratos teóricos da teoria de destilação. Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto, melhor será a separação<sup>2</sup>.

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2 = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2$$

Diversos são os fatores que afetam a eficiência de uma coluna, tais como o enchimento da coluna, temperatura, vazão da fase móvel, volume da amostra, tempo de retenção, técnica de injeção, além de propriedades físico-químicas da fase estacionária, como tamanho das partículas e dimensões da coluna.

Como existem colunas de diferentes tamanhos, é conveniente em CLAE expressar a eficiência em número de pratos por metro:

$$N/m = \frac{N}{L}$$

L = comprimento da coluna em metros

Quando há a necessidade de se comparar eficiências de colunas com fases estacionárias de tamanho de partículas diferentes utiliza-se o conceito de prato reduzido (h), que é a eficiência da coluna considerando-se também o tamanho da partícula do suporte. O cálculo pode ser feito através da equação:

$$h = \frac{L}{N \times dp}$$

dp = tamanho da partícula em metros

Altura de um prato (H): os parâmetros operacionais de uma coluna podem também ser avaliados e comparados com outras colunas através da altura de um prato (H), que corresponde à razão entre o comprimento da coluna e o número de pratos.

$$H = \frac{L}{N}$$

A equação de van Deemter utiliza o conceito de altura de prato para calcular a vazão ótima de trabalho para uma coluna levando em consideração também a influência de outros fatores determinantes da eficiência:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

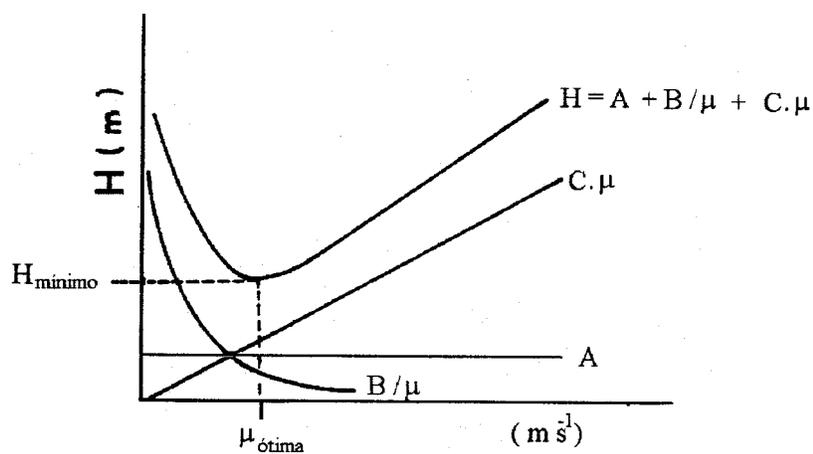
$\mu$  = velocidade linear da fase móvel, determinada pela equação:

$$\mu = \frac{L}{t_M}$$

O termo A, ou difusão turbilhonar, é responsável pelo alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto no interior da coluna cromatográfica. Uma forma de minimizar este efeito é utilizar colunas de diâmetro interno reduzido e partículas pequenas e uniformes<sup>41</sup>. O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares de fase móvel. O termo C equivale à transferência de massa e corresponde ao alargamento da banda devido à dificuldade de transferência de massa do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária. O termo C está subdividido em  $C_M$  e  $C_S$ , no qual  $C_M$  é a transferência de massa na fase móvel e  $C_S$ , a transferência de massa na fase estacionária. Para minimizar o termo C, o ideal é que a espessura da fase estacionária que recobre o suporte seja a menor possível.

O gráfico de H versus  $\mu$  fornece uma curva, como a da Figura 5, que é conhecida como curva de van Deemter. A curva de van Deemter mostra que existe uma vazão ótima que está

diretamente relacionada com a velocidade linear ótica ( $\mu_{\text{ótima}}$ ), na qual  $H$  terá um valor mínimo e corresponde ao valor máximo de eficiência da coluna. Na prática, esta é a maneira de selecionar a vazão ótica de uma corrida cromatográfica.



**Figura 5.** Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel.

## 2. OBJETIVOS

Neste trabalho, propõe-se a utilização de um novo polímero, o copolímero de dimetil-(48-52%) fenil-metil(52-48%) siloxano, como fase estacionária para CLAE. O objetivo é investigar a eficiência e a estabilidade das fases estacionárias preparadas a partir da sorção e imobilização por tratamento térmico do copolímero sobre a sílica.

## 3. ETAPAS DO TRABALHO

Para alcançar os objetivos propostos, este trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

1. Preparação da fase estacionária sorvida através do método de evaporação do solvente. Nesta etapa verificou-se a porcentagem ideal da carga do polímero sobre o suporte;
2. Preparação da fase estacionária imobilizada por meio de tratamento térmico. Nesta etapa foram testados a temperatura e o tempo de imobilização;
3. Caracterização, através de espectros de absorção no infravermelho, de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^{29}\text{Si}$ , análises termogravimétricas e porcentagem de carbono, do polímero, do suporte e das fases estacionárias preparadas;
4. Caracterização das fases estacionárias preparadas através de testes cromatográficos;
5. Verificação da estabilidade das fases estacionárias preparadas através de lavagem por solvente.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Reagentes

- Acetona p.a., Merck
- Água deionizada, sistema Milli-Q, Millipore
- Acenafteno 99%, Aldrich
- Ácido nítrico p.a., Synth
- Benzeno p.a., Synth
- Benzonitrila p.a., Riedel-de Haen
- Clorofórmio p.a., Merck
- Clorofórmio grau HPLC, Tedia
- Diclorometano p.a., Merck
- Fenol p.a., Ecibra
- Isopropanol grau HPLC, Mallinkrhodt
- Metanol grau HPLC, Tedia
- Naftaleno p.a., Vetec Química Fina
- N,N-dimetilanilina p.a., Fluka
- Padrões de Poliestireno Tosh, TSK Standarts:
  - 5,00x10<sup>2</sup>, lote TS 505
  - 2,63x10<sup>3</sup>, lote TS 502
  - 5,97x10<sup>3</sup>, lote TS 503
  - 9,10x10<sup>3</sup>, lote TS 203
- Pasta para esmerilhar válvulas número 360 F, Carborundum
- Tetraidrofurano grau HPLC, Tedia
- Uracila 98%, Aldrich

### 4.2. Equipamentos

- Cromatógrafo a líquido constituído de bomba de alta pressão, tipo recíproca, pistão duplo, Waters modelo 515; detector UV/Vis por arranjo de diodos, Waters modelo 996; injetor Rheodyne, com alça de amostragem de 10 µL, modelo 7725i; sistema de aquisição e tratamento de dados Millennium<sup>®</sup> 32, versão 3.05;

- Cromatógrafo a líquido, constituído de bomba de alta pressão, tipo recíproca, cabeça dupla, Waters modelo 510; detector por índice de refração, Refratômetro diferencial Waters, modelo 410; injetor Rheodyne, com alça de amostragem de 200  $\mu$ L, modelo 7725i; forno Waters modelo CHM; sistema de aquisição e tratamento de dados Millennium 2000, coluna por permeação em gel, American Polymer Standards Corporation, temperatura limites de 40 a 150  $^{\circ}$ C, dimensões de 7,8 x 300 mm, massa molar de 1000 a 20000;
- Agitador de frasco, Marconi modelo MA 161;
- Agitador magnético, Corning Glass Works modelo PC-351;
- Agitador roto torque, Cole-Parmer modelo 7637-01;
- Analisador elementar, Perkin-Elmer, modelo CHN-2400;
- Analisador termogravimétrico, TA Instruments modelo TGA-2050;
- Balança analítica, Fischer Scientific modelo A-250;
- Banho de ultrassom, Thorton modelo T14;
- Bomba de alta pressão, pneumática, pressurizada com nitrogênio, para enchimento de colunas, com faixa de pressão de 1000 a 30000 psi, Haskel modelo 51769;
- Bomba para enchimento de coluna de alta pressão, com faixa de pressão de 1000 a 10000 psi, Alltech, modelo 1666 Slurry Packer;
- Bomba de alta pressão, pneumática, pressurizada com nitrogênio, para enchimento de colunas, com faixa de pressão de 1000 a 19000 psi, Haskel;
- Espectrofotômetro de absorção no infravermelho, Perkin Elmer modelo FTIR 1600;
- Espectrofotômetro de absorção no infravermelho, Bomer Hartman & Braun, modelo MB;
- Espectrofotômetro de ressonância magnética nuclear, Bruker AC/300 MHz;
- Estufa a vácuo, Yamoto modelo ADP-21;
- Furadeira, Shulz, modelo FSB;
- Medidor de área superficial, Micrometrics, modelo ASAP 2010;
- Sistema Milli-Q Plus, Millipore.

### 4.3. Suporte Cromatográfico

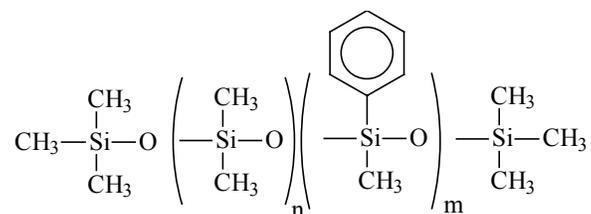
Como suporte cromatográfico foi utilizada a sílica porosa Kromasil, tipo B, forma esférica, tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , lote AT 0235. O conteúdo de alguns elementos metálicos presentes neste tipo de sílica foram determinados através de espectrometria de absorção atômica (Tabela 1) por J.S. Barone e encontram-se na tese de Lopes<sup>18</sup>.

**Tabela 1.** Conteúdo de alguns elementos metálicos presentes na sílica Kromasil, lote AT 0235.

Metais	Quantidade ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Alumínio	12
Ferro	12
Sódio	20
Titânio	<2
Cálcio	-
Magnésio	16

### 4.4. Fase Estacionária Líquida

Como fase estacionária líquida foi utilizado o copolímero de (48-52%) dimetil-(52-48%) fenil-metil siloxano, United Chemical Technologies Inc., Petrarch<sup>®</sup> Silanes and Silicones, código do produto PS063, lote 125009. Massa molar aproximada de 2500 daltons, viscosidade 125 cSt e densidade 1,07  $\text{g cm}^{-3}$  a 25 °C.

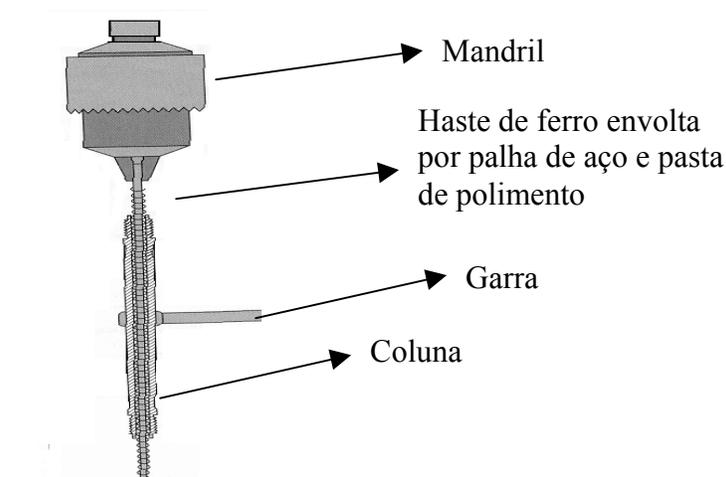


**Figura 6.** Estrutura molecular do copolímero.

## 4.5. Coluna Cromatográfica

Para a confecção das colunas cromatográficas, foram utilizados tubos de aço inoxidável 316, sem costura, polidos internamente. Dentre as muitas variáveis que podem, em princípio, afetar de maneira negativa a qualidade da separação cromatográfica está a rugosidade da superfície interna das colunas cromatográficas. Desta forma, uma superfície interna bem polida é extremamente importante, pois, assim, a resistência à vazão da fase móvel é minimizada e a eficiência é maximizada.

A superfície interna da coluna foi polida utilizando-se um procedimento desenvolvido no LabCrom<sup>44</sup>, no qual uma haste metálica, envolta com lã de aço e pasta de polimento com partículas abrasivas, foi fixada a uma furadeira e passada através dos tubos (Figura 7) até que se obtivesse uma superfície lisa e isenta de imperfeições, quando observada a olho nu. Após o polimento, os tubos foram deixados em uma solução aquosa de ácido nítrico 50% (v/v) por 24 h, lavados com detergente, água e etanol.



**Figura 7.** Polimento do tubo para confecção da coluna cromatográfica<sup>44</sup>.

A dimensão média das colunas, confeccionadas na oficina mecânica da Unicamp, foi de 60,2 mm de comprimento e 3,98 mm de diâmetro interno.

#### 4.6. Cromatografia de Exclusão por Tamanho

Na análise cromatográfica por exclusão foi utilizada uma coluna American Polymer Standards Corporation (7,8 x 300 mm), cuja faixa de trabalho é de 1000 a 20000 daltons, fase móvel tetraidrofurano, a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, detecção das amostras por índice de refração, à temperatura de 40 °C. Os padrões, de massas molares menores que 1000 daltons, foram diluídos em tetraidrofurano, a uma concentração de aproximadamente 0,05% (m/v). Os padrões com massas molares maiores que 1000 daltons e a amostra do copolímero foram diluídas no mesmo solvente a uma concentração de aproximadamente 0,1% (m/v).

#### 4.7. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos na região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>. Os espectros das amostras de sílica e das fases estacionárias, sorvida e imobilizada, foram obtidos utilizando o acessório de reflectância difusa, enquanto que, para amostras líquidas, os espectros foram obtidos a partir de um filme do material sobre uma janela de NaCl.

#### 4.8. Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram realizadas sob atmosfera inerte (nitrogênio ou argônio) e atmosfera oxidante, de 25 a 1000 °C, a uma velocidade de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. Os termogramas foram obtidos em porcentagem de perda de massa versus temperatura.

#### 4.9. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 e Silício 29 (RMN <sup>13</sup>C e <sup>29</sup>Si)

Os espectros de RMN de <sup>29</sup>Si e <sup>13</sup>C com CP/MAS (polarização cruzada segundo rotação em ângulo mágico) foram obtidos em um espectrômetro Bruker ASX 300, usando um rotor de zircônia, em velocidade de rotação de 3500 Hz, contendo amostras de 200-250 mg. Os espectros foram obtidos utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação do ângulo mágico. O tempo de contato foi de 5 ms e o intervalo entre os pulsos de 1,5 s. O alargamento de banda usada foi de 30 Hz e a largura espectral para todos os espectros foi de aproximadamente 25 kHz.

#### **4.10. Área Superficial, Volume e Diâmetro de Poro**

O volume de poro total foi avaliado pela conversão do volume de nitrogênio adsorvido para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro de poro foi determinado a partir do volume total de poro e da área de superfície BET. Esta medida foi feita para a sílica nua, para a fase estacionária sorvida contendo 50 % de copolímero e para a fase estacionária imobilizada termicamente a 150 °C, por 4,5 h.

#### **4.11. Preparação das Fases Estacionárias**

O método utilizado na preparação das fases estacionárias sorvidas foi o método de evaporação do solvente, amplamente empregado em outros trabalhos<sup>21</sup>. A suspensão da sílica, previamente ativada a 150 °C, por 16 h, e a solução do copolímero foram preparadas separadamente em diclorometano na proporção de 12 mL de diclorometano para cada grama de material. A solução do copolímero foi então agitada em agitador magnético por 10 min e tanto ela quanto a suspensão de sílica foram sonicadas por 10 minutos. Adicionou-se a solução polimérica lentamente à suspensão de sílica e esta mistura foi agitada durante 10 min, sonicada por 10 min e mantida sob agitação durante 3 horas. A seguir o frasco foi deixado na capela para evaporação do diclorometano, que permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 7 dias, obtendo-se, assim, a fase estacionária sorvida.

As fases estacionárias sorvidas foram colocadas em um reservatório fechado, de aço inoxidável 316 L, de dimensões de 10 x 105 mm e aquecidas em diferentes temperaturas por diferentes períodos de tempo, utilizando um forno comum para obtenção das fases imobilizadas.

#### **4.12. Extração por Solvente**

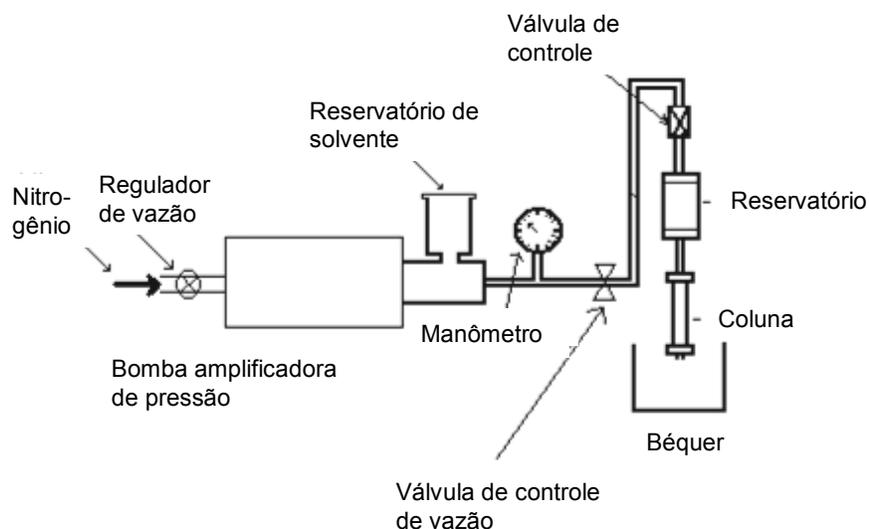
As fases estacionárias foram colocadas em um reservatório de dimensões de 10 x 105 mm para extração. Através do reservatório, conectado à bomba de alta pressão do cromatógrafo, fluiu o solvente extrator, hexano ou a seqüência clorofórmio e metanol, a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, por diferentes períodos de tempo.

Após o período de extração, as fases estacionárias foram retiradas do reservatório, transferidas para um béquer e deixadas em capela para evaporação total do solvente.

### 4.13. Enchimento das Colunas

As suspensões das fases estacionárias foram preparadas em tubos de vidro com tampas, a uma concentração de 10 % (m/v), utilizando clorofórmio como solvente de suspensão. As suspensões ficaram sob agitação, em agitador roto-torque, por 16 h, no mínimo. As colunas foram recheadas utilizando-se bomba pneumática, pressurizada com nitrogênio, a uma pressão de 5000 (35 MPa) ou 6000 psi (42 MPa), e metanol como solvente de propulsão.

Inicialmente, o reservatório de suspensão foi limpo com etanol, seguido de clorofórmio. A coluna vazia, com filtro e demais acessórios em uma de suas extremidades, foi conectada ao reservatório da suspensão. A suspensão da fase estacionária foi transferida ao reservatório e seu volume foi completado com clorofórmio. A válvula controladora do solvente propulsor foi aberta, deixando-se passar 80 mL do solvente. Após a passagem do solvente, a válvula foi fechada, a coluna desconectada e sua outra extremidade foi fechada com os acessórios adequados. Antes da avaliação cromatográfica, a coluna foi condicionada por 3 h, utilizando-se a fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v), a uma vazão de 0,2 mL min<sup>-1</sup>.



**Figura 8.** Esquema representativo do sistema de enchimento da coluna.

#### 4.14. Preparação das Fases Móveis

Fases móveis de MeOH:H<sub>2</sub>O nas proporções de 50:50, 60:40 e 70:30 (v/v) foram preparadas medindo-se separadamente as quantidades adequadas de cada solvente e misturando-as. A mistura foi filtrada em uma membrana de Nylon de 0,45 mm e degaseificada, utilizando-se, simultaneamente por 10 minutos, vácuo e ultra-som.

#### 4.15. Avaliação Cromatográfica

A avaliação das FE preparadas foi realizada através da determinação de parâmetros cromatográficos obtidos de compostos eluídos de misturas sintéticas. Os parâmetros cromatográficos foram determinados no comprimento de onda de 254 nm, através do sistema de aquisição e tratamento de dados Millennium<sup>®</sup> 32, versão 3.05.

Foram utilizadas duas misturas teste para a avaliação cromatográfica: a mistura teste um contendo uracila, acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno; e a mistura teste dois contendo uracila, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno, ambas dissolvidas em MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v). Na primeira mistura teste foram utilizados o  $t_R$  obtido para o naftaleno, N,  $A_s$  e  $k$  calculados para o naftaleno e a  $R_s$  calculada para o par tolueno-naftaleno. Na segunda mistura teste foi utilizada a  $A_s$  da N,N-dimetilanilina.

As misturas não foram preparadas quantitativamente, mas sim de forma que os compostos tivessem uma concentração suficiente para que os seus picos nos cromatogramas possuíssem uma altura razoável.

Inicialmente, a vazão utilizada foi de 0,2 mL min<sup>-1</sup> e foi definida com base em outros estudos desenvolvidos no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida do Instituto de Química da Unicamp (LabCrom). Após a escolha da melhor composição da fase móvel, foi construída a curva de van Deemter, para a determinação da vazão ótima.

#### 4.16. Testes de Estabilidade

Os testes de estabilidade química foram realizados através da passagem de fase móvel pela coluna cromatográfica seguida da avaliação periódica dos parâmetros cromatográficos obtidos após a injeção da mistura teste um. Antes de cada avaliação, as colunas foram condicionadas por 10 min com a mesma fase móvel utilizada na análise da mistura, na vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>.

O teste de estabilidade com fase móvel de pH neutro foi realizado com MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v), a uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, à temperatura ambiente, até 20.000 vezes o volume da coluna. Para avaliar a estabilidade das colunas cromatográficas em condições drásticas, foi utilizado como fase móvel MeOH:NaHCO<sub>3</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> + NaOH, pH 9,0, 50:50 (v/v); a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, à temperatura de 40 °C.

#### 4.17. Análise Elementar

Após o teste de estabilidade, os recheios foram submetidos à análise elementar em um equipamento 2400 da Perkin Elmer, para determinação da quantidade de carbono. As análises foram realizadas em duplicata, utilizando-se 1 mg de amostra adicionada a 1 mg de mistura oxidante composta de Pb<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NaF na proporção 1:1 (m/m).

#### 4.18. Espessura da Camada de Copolímero Sobre a Sílica

Para que a espessura da camada de copolímero,  $\tau$ , seja calculada, assume-se que os poros da sílica são cilíndricos com diâmetro constante,  $d$ , e que o polímero depositado nos poros da sílica forme uma camada homogênea. É possível calcular essa espessura pela seguinte equação<sup>16</sup>:

$$\tau = \left( \frac{\sqrt{d^2 - Fd^2} - d}{2} \right)$$

A fração  $F$  representa a relação entre a quantidade de copolímero efetivamente presente nos poros do suporte de sílica e a quantidade de copolímero necessária para preenchê-los completamente:

$$F = \frac{\bar{m}_{\text{COP retido}}}{\bar{m}_{\text{COP poros cheios}}}$$

A  $\bar{m}_{\text{COP retido}}$  é calculada utilizando o valor obtido da porcentagem de carbono através da análise elementar.

Através da análise elementar, obteve-se que 52,4% da massa do copolímero é referente ao carbono, assim, deve-se utilizar a equação abaixo para seu cálculo:

$$\bar{m}_{\text{COP retido}} = \frac{\%C}{52,4 - \%C}$$

A  $\bar{m}_{\text{COP poros cheios}}$  é obtida através da equação abaixo:

$$\bar{m}_{\text{COP poros cheios}} = v_{\text{p}_{\text{sílica}}} \times \rho_{\text{polímero}}$$

Onde  $v_{\text{p}_{\text{sílica}}}$  é o volume do poro da sílica, em mL g<sup>-1</sup>, e  $\rho_{\text{polímero}}$  é a densidade do copolímero, em g mL<sup>-1</sup>.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Cromatografia de Exclusão por Tamanho

A cromatografia de exclusão por tamanho é a modalidade cromatográfica na qual o perfil de eluição representa uma distribuição da massa molar dos analitos. Quando aplicada a uma série homóloga de polímeros, determina de maneira rápida e útil a massa molar e a forma dessas macromoléculas<sup>2</sup>.

Uma característica essencial de materiais poliméricos é a sua massa molar, pois a massa molar e sua distribuição têm profunda influência em suas propriedades e nos processos de adsorção. Isto se deve ao fato de que a adsorção é restringida pela extensão da superfície e tem-se observado que a adsorção aumenta com o aumento do comprimento da cadeia do material polimérico. Mas, no caso de materiais porosos a adsorção diminui com o aumento da massa molar do material polimérico. A explicação para este fato é que o material poroso oferece apenas poros de tamanhos compatíveis com os tamanhos das moléculas poliméricas, isto é, somente moléculas com massas molares pequenas entraram nos poros de menores diâmetros e volumes.

É útil definir várias médias da massa molar de polímeros, sendo as mais comuns a numérica,  $\overline{M}_n$ , e a ponderal,  $\overline{M}_w$ <sup>45</sup>.

Baseado em um número de moléculas,  $N_i$ , de uma massa particular,  $M_i$ , tem-se a Massa Molar Média Numérica,  $\overline{M}_n$ , definida por:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i}$$

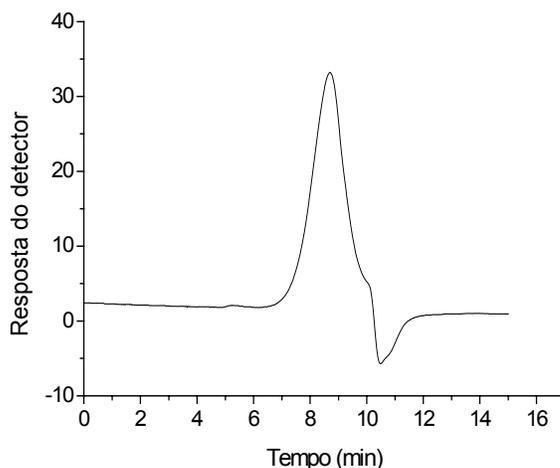
Uma consequência importante desta definição é que a  $\overline{M}_n$ , em gramas, contem o Número de Avogadro de moléculas. Para o copolímero analisado, o valor de  $\overline{M}_n$  encontrado foi de 1843.

Utilizando-se a fração de massa,  $w_i$ , de moléculas de uma determinada massa,  $M_i$ , tem-se a definição de Massa Molar Média Ponderal,  $\overline{M}_w$ .

$$\overline{M}_w = \frac{\sum w_i M_i}{\sum w_i} = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i}$$

$\overline{M}_w$  é provavelmente mais útil que  $\overline{M}_n$  para expressar a massa molar de um polímero, pois ela reflete mais precisamente as propriedades físicas de um polímero. A  $\overline{M}_w$  determinada para o dimetil metil-fenil siloxano foi de 2791, muito próximo à massa molar indicada no catálogo do fabricante, de aproximadamente, 2500. A polidispersividade encontrada foi de 1,5.

A Figura 9 mostra o cromatograma obtido no teste realizado com o copolímero de dimetil-metil-fenil siloxano.



**Figura 9.** Cromatograma do copolímero de dimetil-metil-fenil siloxano. Condições cromatográficas: coluna para cromatografia por permeação em gel American Polymer Standards, volume de injeção: 250  $\mu\text{L}$ , fase móvel: THF, vazão 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , temperatura de 40  $^{\circ}\text{C}$ , detecção por índice de refração.

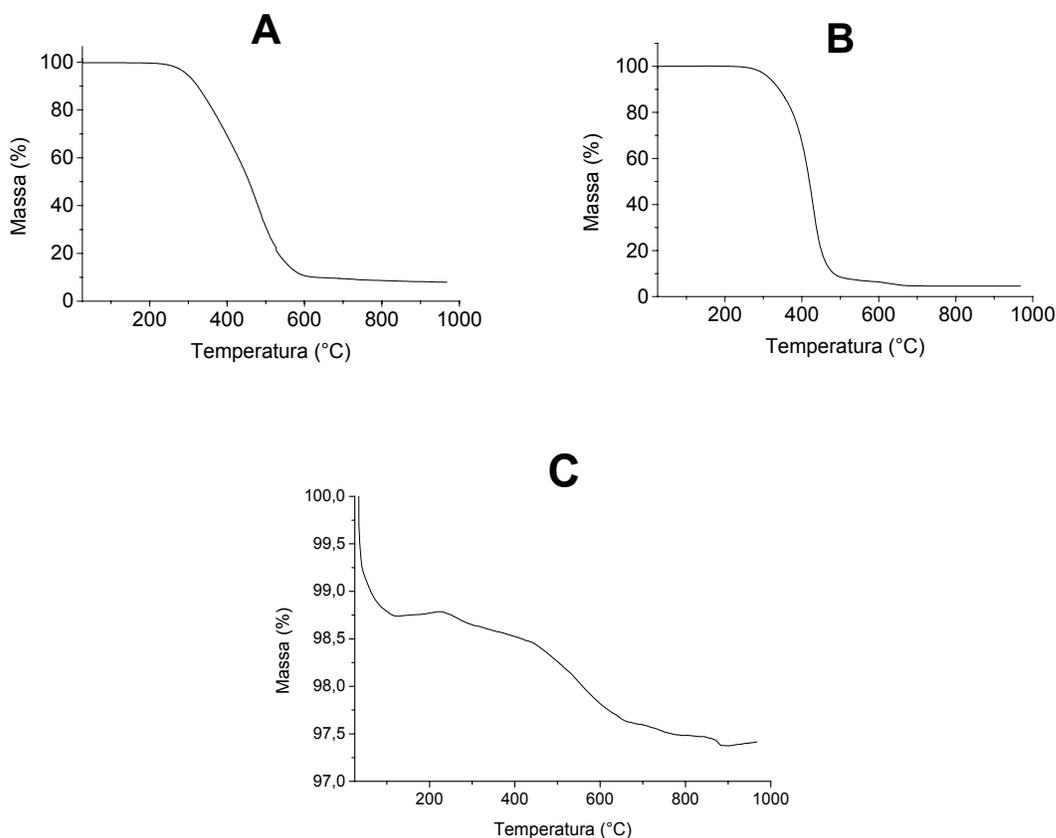
## 5.2. Análise Termogravimétrica

A termogravimetria (TG) faz parte de um conjunto de ferramentas importantes utilizadas para a caracterização de materiais e é especialmente útil para a determinação de qualquer constituinte volátil em sólidos. Na análise termogravimétrica, a massa da amostra é

continuamente monitorada enquanto a temperatura é aumentada a uma razão constante. A perda de massa ocorre quando compostos voláteis adsorvidos são eliminados e, a temperaturas mais altas, quando ocorre degradação da amostra com formação de produtos voláteis<sup>46</sup>.

Observa-se nos termogramas A e B da Figura 10, que o copolímero é altamente estável, pois suporta temperaturas próximas a 300 °C, tanto em atmosfera inerte, quanto em oxidante. Dessa maneira, ele pode ser utilizado em imobilizações térmicas até essa temperatura sem sofrer degradação considerável.

Já no termograma C da Figura 10, referente à sílica, pode-se observar a perda das camadas mais externas de água adsorvidas fracamente até 120 °C. A partir de 200 °C, inicia-se a perda da primeira camada de água, fortemente adsorvida por ligações de hidrogênio. Nessas duas etapas, a perda de água é reversível. A partir de 450 °C, os grupos silanóis perdem água e produzem ligações tipo siloxano, sendo que esta perda é irreversível a partir de 650 °C<sup>10</sup>.



**Figura 10.** Termogramas: **A)** do copolímero em atmosfera inerte, **B)** do copolímero em atmosfera oxidante e **C)** da sílica.

### 5.3. Avaliação Cromatográfica

#### 5.3.1. Avaliação da carga de copolímero

Na primeira etapa do trabalho, foi avaliada a carga de copolímero, utilizando fases estacionárias sorvidas. Nas Tabelas 2 a 4 encontram-se os valores dos parâmetros cromatográficos obtidos com a injeção das misturas 1 e 2 na avaliação da influência da carga do copolímero no desempenho cromatográfico das fases preparadas.

Com todas as cargas testadas foram obtidas fases estacionárias capazes de resolver os componentes das misturas teste com alta eficiência. Os resultados foram semelhantes nas três cargas testadas, podendo-se observar, de um modo geral, eficiência ligeiramente melhor com a carga inicial de 50%. A fase preparada com carga de 60% apresentou aspecto úmido mesmo após a evaporação total do solvente, indicando que há um excesso do copolímero.

Foram utilizadas três composições de fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O, 70:30, 60:40 e 50:50 (v/v), e verificou-se que em todos os casos foram obtidas separações dos componentes das misturas teste.

Deve-se ressaltar os bons resultados de assimetria obtidos para a N,N-dimetilanilina, indicando que houve um bom recobrimento dos silanóis livres na superfície da sílica, responsáveis pelo alargamento de picos de substâncias básicas.

**Tabela 2.** Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência da carga do copolímero, usando fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v).

Carga (%)	t <sub>R</sub> * (min)	k*	As*	N/m* (m <sup>-1</sup> )	Rs**	As***
40 <sup>(1)</sup>	6,6	1,1	1,3	75000	2,4	1,4
50 <sup>(2)</sup>	6,3	1,1	1,3	80000	2,4	1,3
60 <sup>(2)</sup>	6,0	1,0	1,2	78000	2,3	1,3

<sup>(1)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 1 coluna.

<sup>(2)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 2 colunas (total de 6 injeções).

\* Calculado para o naftaleno.

\*\*Calculado para o par tolueno-naftaleno.

\*\*\*Calculado para a N,N-dimetilanilina.

**Tabela 3.** Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência da carga do copolímero, usando fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v).

Carga (%)	t <sub>R</sub> * (min)	k*	As*	N/m* (m <sup>-1</sup> )	Rs**	As***
40 <sup>(1)</sup>	10,6	2,3	1,2	80000	4,6	1,3
50 <sup>(2)</sup>	10,0	2,3	1,1	83000	4,6	1,3
60 <sup>(2)</sup>	9,0	2,0	1,1	82000	4,3	1,4

<sup>(1)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 1 coluna.

<sup>(2)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 2 colunas (total de 6 injeções).

\* Calculado para o naftaleno.

\*\*Calculado para o par tolueno-naftaleno.

\*\*\*Calculado para a N,N-dimetilanilina.

**Tabela 4.** Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência da carga do copolímero, usando fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v).

Carga (%)	t <sub>R</sub> * (min)	k*	As*	N/m* (m <sup>-1</sup> )	Rs**
40 <sup>(1)</sup>	19,3	5,0	1,0	83000	7,7
50 <sup>(2)</sup>	19,3	5,2	1,0	85000	7,9
60 <sup>(2)</sup>	17,6	4,7	1,0	86000	7,9

<sup>(1)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 1 coluna.

<sup>(2)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 2 colunas (total de 6 injeções).

\* Calculado para o naftaleno.

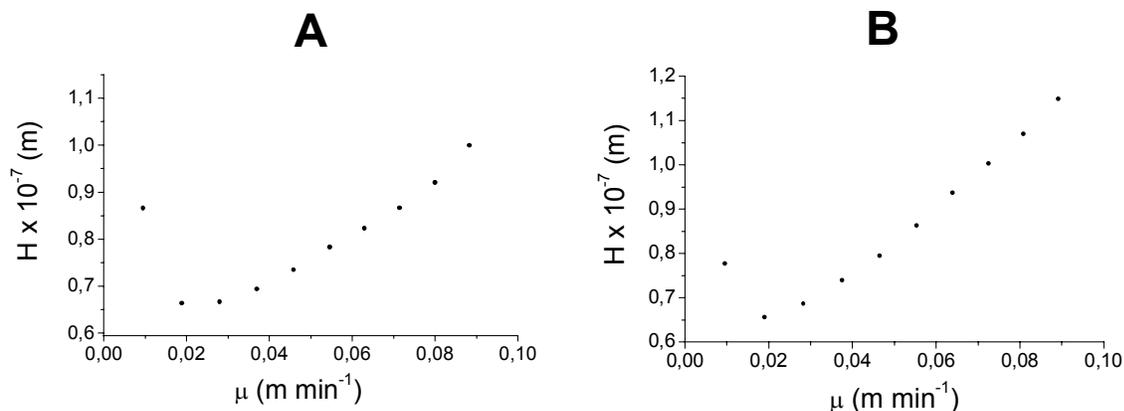
\*\*Calculado para o par tolueno-naftaleno.

\*\*\*Calculado para a N,N-dimetilanilina.

Observa-se que a retenção na fase estacionária com carga inicial de 50 % é ligeiramente maior que na fase estacionária com carga inicial de 60 %. Isto pode ocorrer em função de uma melhor distribuição do copolímero sobre a sílica na fase estacionária com 50 % de carga, que justifica também a ligeira melhora na eficiência.

Baseado nos resultados obtidos, a fase estacionária escolhida para os estudos subsequentes foi a de carga inicial de 50%. Considerando-se como prioridade a eficiência e simetria dos picos, as melhores composições de fase móvel foram MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v) e MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v), para as misturas 1 e 2, respectivamente.

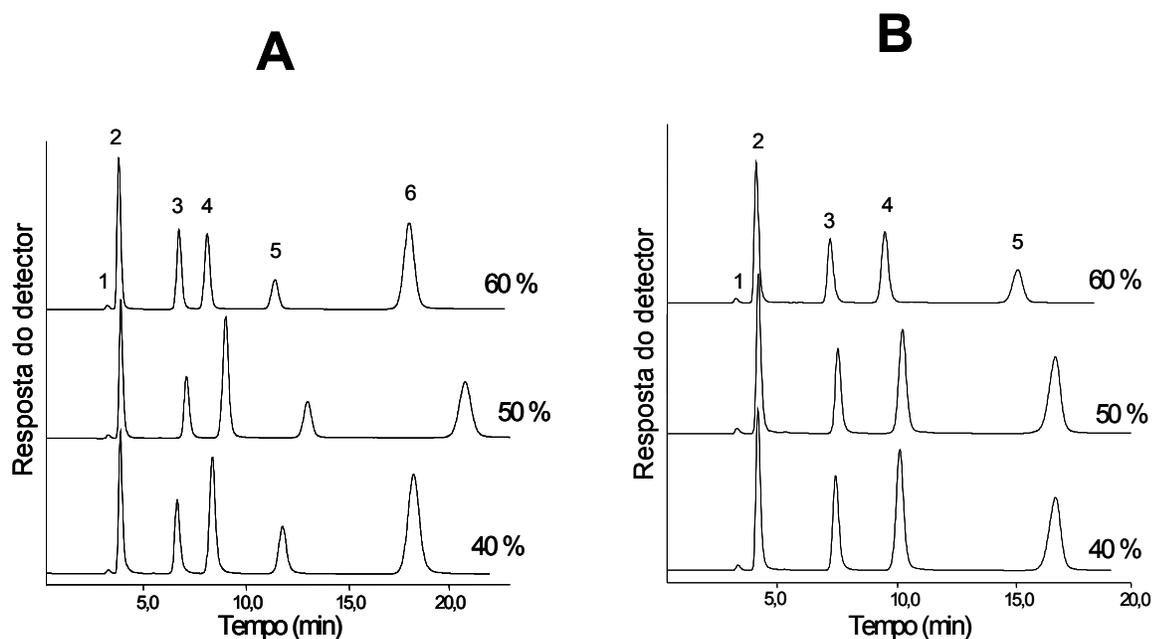
Para a determinação da vazão ótima, foram construídas as curvas de van Deemter para as duas misturas teste, nas melhores condições.



**Figura 11.** Curvas de van Deemter **A)** para a mistura teste 1 (fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v)) e **B)** para a mistura teste 2 (fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v)), utilizando uma coluna recheada com fase estacionária sorvida com 50 % de carga.

Como se pode observar na curva A da Figura 11 praticamente não existe diferença entre a altura de um prato nos pontos que representam a vazão 0,2 e 0,3 mL min<sup>-1</sup>. Assim, determinou-se como vazão ótima para a análise da primeira mistura teste 0,3 mL min<sup>-1</sup>, com o objetivo de diminuir o tempo de retenção e, conseqüentemente, o tempo de análise sem perda significativa de eficiência (menos de 500 pratos por metro). Já na curva B da Figura 11, referente à análise da mistura teste 2, há uma diferença significativa de eficiência entre 0,2 e 0,3 mL min<sup>-1</sup> (4000 pratos por metro), que não justifica a utilização de uma vazão maior.

Na Figura 12 estão os cromatogramas obtidos na avaliação da carga do copolímero, nas condições determinadas pela curva de van Deemter.



**Figura 12.** Cromatogramas obtidos na avaliação da influência da carga. **A)** Mistura teste 1: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10  $\mu\text{L}$ , MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v), vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV a 254 nm. **B)** Mistura teste 2: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10  $\mu\text{L}$ , MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV a 254 nm.

### 5.3.2. Avaliação da temperatura de imobilização

Neste ponto do trabalho, em virtude de problemas mecânicos, foi necessária a utilização de uma nova bomba para o recheio das colunas cromatográficas. Várias colunas recheadas nesta nova bomba, utilizando-se o procedimento anterior, apresentaram resultados de assimetria em torno de 0,3, inclusive a coluna recheada com a fase sorvida, indicando que a mudança da bomba alterou profundamente o enchimento das colunas ocasionando problemas no leito cromatográfico.

A adição de uma etapa de extração do excesso de copolímero da fase estacionária com CHCl<sub>3</sub>, 1,0 mL min<sup>-1</sup>, por 2 h, seguido de MeOH, 1,0 mL min<sup>-1</sup>, por 2 h, melhorou o enchimento

das colunas e os resultados obtidos foram muito bons, apesar de não se igualarem àqueles obtidos com a bomba Haskel. Além da etapa de extração, a pressão utilizada durante o enchimento foi alterada para 6000 psi.

Determinado o novo procedimento, foi fixado o tempo de 4 h de tratamento térmico e foram testadas as temperaturas de 80, 100, 120 150, 180 e 200 °C. Na Figura 13 estão os cromatogramas obtidos na avaliação da influência da temperatura de imobilização e na Tabela 5 estão apresentados os valores dos parâmetros cromatográficos obtidos.

**Tabela 5.** Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência da temperatura de imobilização, em um tempo fixo de 4 h.

	$t_R^*$ (min)	$k^*$	$R_s^{**}$	$A_s^*$	$N/m^* (m^{-1})$	$A_s^{***}$
<b>Sorvida</b> <sup>(2)</sup>	15,3	5,9	8,3	1,0	75000	1,4
<b>80 °C</b> <sup>(2)</sup>	12,8	5,1	6,7	1,0	63000	1,2
<b>100 °C</b> <sup>(2)</sup>	14,9	6,1	7,6	0,9	72000	1,2
<b>120 °C</b> <sup>(2)</sup>	12,7	5,0	6,7	1,0	63000	1,2
<b>150 °C</b> <sup>(2)</sup>	23,7	11,0	8,6	0,9	72000	1,2
<b>180 °C</b> <sup>(2)</sup>	22,5	10,5	8,5	1,0	71000	1,3
<b>200 °C</b> <sup>(1)</sup>	27,6	13,4	3,8	1,2	13000	0,9

<sup>(1)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 1 coluna.

<sup>(2)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 2 colunas (total de 6 injeções).

\* Calculado para o naftaleno.

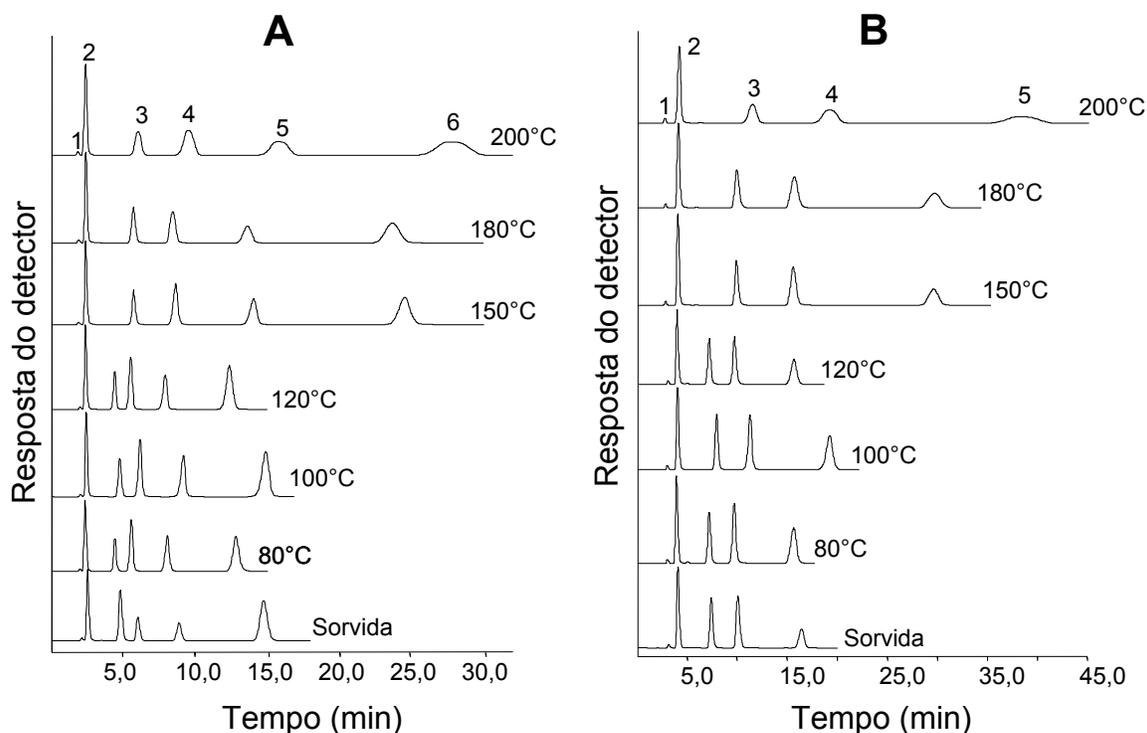
\*\*Calculado para o par tolueno-naftaleno.

\*\*\*Calculado para a N,N-dimetilanilina.

Com exceção da fase estacionária imobilizada a 200 °C, todas as colunas apresentaram bom desempenho cromatográfico. Os melhores resultados foram obtidos com as fases estacionárias sorvida e com tratamento térmico a 100 e 150 °C. As fases estacionárias imobilizadas termicamente não apresentaram melhores resultados de eficiência que as fases estacionárias sorvidas, entretanto, apresentaram uma melhor simetria para o composto básico, a N,N-dimetilanilina, indicando que houve melhor recobrimento dos silanóis livres.

Não foi observado um aumento do tempo de retenção proporcional à temperatura de aquecimento, o que indicaria um aumento gradual na camada do copolímero sobre a sílica. Como em outros trabalhos do grupo<sup>16</sup>, observou-se um salto no fator de retenção dos analitos a partir de uma determinada temperatura, o que indicaria a formação de uma dupla camada do copolímero sobre a sílica.

As fases imobilizadas a 100 e 150 °C apresentaram retenção ligeiramente maior que as fases imobilizadas a 120 e 180 °C, respectivamente. Isto ocorreu também, provavelmente, em função da melhor acomodação do copolímero sobre a superfície da sílica nessas temperaturas.



**Figura 13.** Cromatogramas obtidos na avaliação da influência da temperatura de imobilização. **A)** Mistura teste 1: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10  $\mu\text{L}$ , MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v), vazão 0,3 mL  $\text{min}^{-1}$ , detecção UV a 254 nm. **B)** Mistura teste 2: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10  $\mu\text{L}$ , MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v), vazão 0,2 mL  $\text{min}^{-1}$ , detecção UV a 254 nm.

### 5.3.3. Avaliação do tempo de imobilização

Para a avaliação do melhor tempo de tratamento térmico, foram selecionadas as temperaturas de 100 e 150 °C, que, dentre as fases estacionárias imobilizadas, apresentaram melhor desempenho cromatográfico.

Neste ponto do trabalho, foi necessária outra mudança da bomba de enchimento, o que afetou novamente, de maneira negativa, o recheio das colunas. Foram testadas mudanças de alguns parâmetros na extração, que se revelou uma etapa crucial para obtenção de colunas com bom desempenho cromatográfico. Variou-se o tempo de extração com o CHCl<sub>3</sub> e foi testada extração com hexano, a 50 °C, pois este procedimento mostrou-se eficiente em outros trabalhos do grupo<sup>47, 48</sup>. O enchimento com hexano como solvente de propulsão, apesar de ter apresentado bons resultados em outros trabalhos<sup>47, 48</sup>, foi ineficiente com a fase sorvida (Tabela 6). O cromatograma da coluna recheada utilizando-se hexano como solvente propulsor apresentou picos muito baixos e largos, e tempo de análise longo, indicando que não houve extração suficiente do excesso de copolímero.

**Tabela 6.** Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência das condições de extração para fase sorvida.

Fase sorvida	t <sub>R</sub> * (min)	k*	Rs**	As*	N/m* (m <sup>-1</sup> )
Sem extração	13,5	5,4	7,4	0,7	78000
CHCl <sub>3</sub> , 2 h, MeOH, 2 h <sup>(2)</sup>	13,4	5,3	7,3	0,6	80000
CHCl <sub>3</sub> , 3 h, MeOH, 2 h <sup>(1)</sup>	13,7	5,8	7,9	0,8	85000
CHCl <sub>3</sub> , 4 h, MeOH, 2 h <sup>(1)</sup>	13,9	5,8	7,3	0,6	73000
Hexano, 3 h <sup>(2)</sup>	16,7	7,0	8,1	0,7	78000

<sup>(1)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 1 coluna.

<sup>(2)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 2 colunas (total de 6 injeções).

\* Calculado para o naftaleno.

\*\*Calculado para o par tolueno-naftaleno.

Nos testes realizados com a fase sorvida, apesar de todos os parâmetros estarem fora do intervalo aceito para simetria (0,9 a 1,2, sendo que valores de 1,6 são admitidos<sup>42</sup>), eles foram ligeiramente melhores para extração com CHCl<sub>3</sub>, 1,0 mL min<sup>-1</sup>, por 3 h seguida de 2 h com MeOH, a 1,0 mL min<sup>-1</sup>, que para a extração com hexano a 1,0 mL min<sup>-1</sup>, a 50 °C, que apresentou

resultado semelhante ao obtido com a coluna recheada sem extração. As duas condições de extração foram então testadas com a fase imobilizada a 100 °C.

**Tabela 7.** Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência das condições de extração para fase imobilizada a 100 °C, por 4 h.

<b>Imobilização a 100 °C</b>	<b>t<sub>R</sub>* (min)</b>	<b>k*</b>	<b>Rs**</b>	<b>As*</b>	<b>N/m* (m<sup>-1</sup>)</b>
<b>Sem extração <sup>(1)</sup></b>	13,0	5,3	7,4	0,7	77000
<b>CHCl<sub>3</sub>, 3 h, MeOH, 2 h <sup>(2)</sup></b>	13,1	5,4	7,0	0,7	73000
<b>Hexano, 3 h <sup>(2)</sup></b>	13,6	5,4	6,2	0,6	54000

<sup>(1)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 1 coluna.

<sup>(2)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 2 colunas (total de 6 injeções).

\* Calculado para o naftaleno.

\*\*Calculado para o par tolueno-naftaleno.

Como pode-se observar na Tabela 7 nenhuma das colunas obtidas apresentou resultados de simetria dentro dos parâmetros aceitáveis. Por isso, foram realizados testes com a fase imobilizada a 150 °C, com as melhores condições de extração observadas para a fase imobilizada a 100 °C.

**Tabela 8.** Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência das condições de extração para fase imobilizada a 150 °C, por 4 h.

<b>Imobilização a 150 °C</b>	<b>t<sub>R</sub>* (min)</b>	<b>k*</b>	<b>Rs**</b>	<b>As*</b>	<b>N/m* (m<sup>-1</sup>)</b>
<b>Sem extração <sup>(2)</sup></b>	20,1	8,9	8,4	0,7	77000
<b>CHCl<sub>3</sub>, 3 h, MeOH, 2 h <sup>(2)</sup></b>	17,4	7,4	7,7	1,0	72000

<sup>(1)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 1 coluna.

<sup>(2)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 2 colunas (total de 6 injeções).

\* Calculado para o naftaleno.

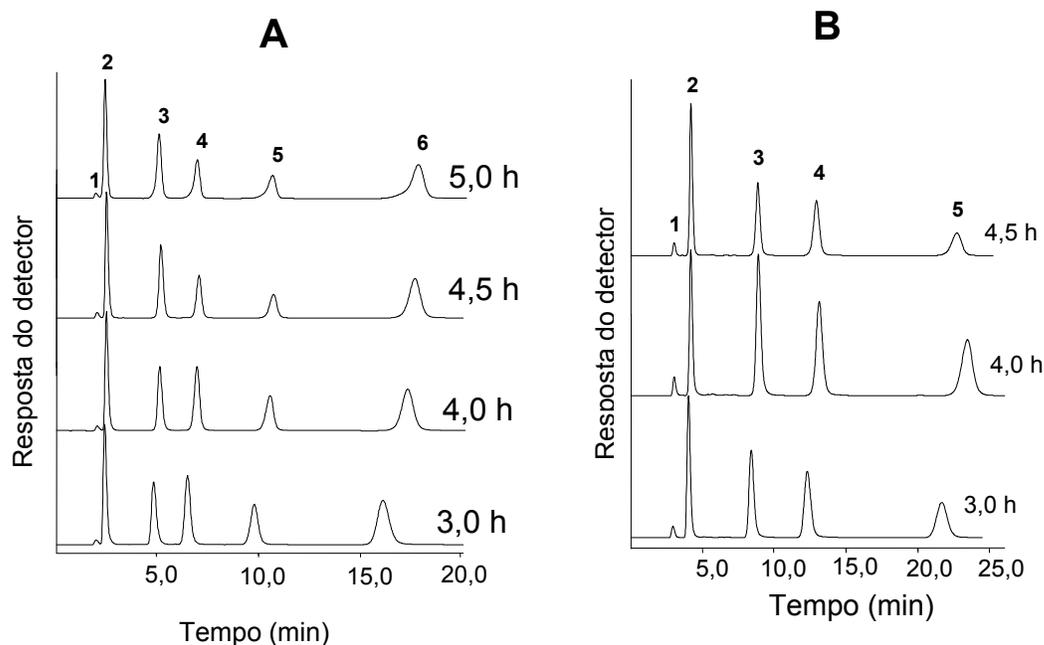
\*\*Calculado para o par tolueno-naftaleno.

Com a fase imobilizada a 150 °C foram obtidas colunas com resultados de simetria dentro dos parâmetros aceitáveis quando realizada a extração com CHCl<sub>3</sub>, 1,0 mL min<sup>-1</sup> por 3 h, seguida de MeOH, 1,0 mL min<sup>-1</sup>, por 2 h (Tabela 8). Os parâmetros cromatográficos obtidos foram praticamente os mesmos que os obtidos anteriormente com a segunda bomba de enchimento.

Assim, a fase imobilizada a 150 °C foi a escolhida para os testes subsequentes com a variação do tempo de tratamento térmico.

Inicialmente foram testados 3 e 5 h de tratamento térmico (Tabela 9), porém ambos apresentaram piores resultados quando comparados ao tempo de 4 h. Tentou-se, assim, o tempo de tratamento intermediário de 4,5 h, que mostrou, além de maior eficiência, uma melhor assimetria para o composto básico *N,N*-dimetilanilina. Portanto, a melhor condição de imobilização foi determinada como sendo a de 150 °C, por um período de 4,5 h.

Na Figura 14 estão os cromatogramas obtidos na avaliação do tempo de tratamento térmico.



**Figura 14.** Cromatogramas obtidos na avaliação da influência do tempo de tratamento térmico. A) Mistura teste 1: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10  $\mu\text{L}$ , MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v), vazão 0,3 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV a 254 nm. B) Mistura teste 2: Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol (3) *N,N*-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. Condições cromatográficas: volume de injeção: 10  $\mu\text{L}$ , MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV a 254 nm.

**Tabela 9.** Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação da influência do tempo de imobilização, na temperatura de 150 °C.

Tempo	t <sub>R</sub> * (min)	k*	Rs**	As*	N/m* (m <sup>-1</sup> )	As***
3,0 h <sup>(1)</sup>	15,9	6,7	7,0	1,1	58000	1,4
4,0 h <sup>(2)</sup>	17,4	7,4	7,7	1,0	72000	1,4
4,5 h <sup>(2)</sup>	17,6	7,4	7,7	0,9	77000	1,1
5,0 h <sup>(2)</sup>	17,5	7,5	7,7	0,5	70000	-

<sup>(1)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 1 coluna.

<sup>(2)</sup> Resultados referentes à média de 3 injeções em 2 colunas (total de 6 injeções).

\* Calculado para o naftaleno.

\*\* Calculado para o par tolueno-naftaleno.

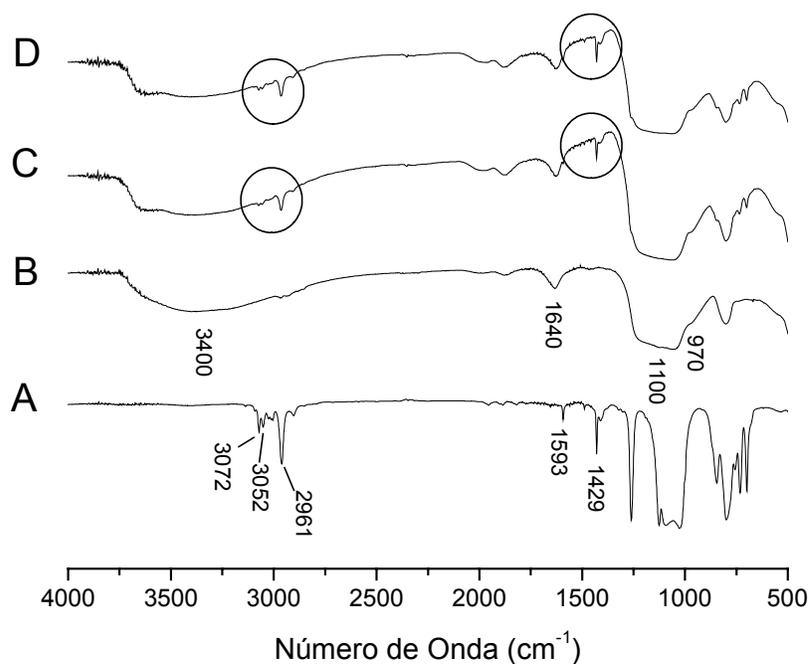
\*\*\* Calculado para a N,N-dimetilanilina.

#### 5.4. Espectroscopia de Absorção no Infravermelho

Na Figura 15 estão apresentados os espectros no infravermelho da sílica (B), do copolímero (A) e das fases estacionárias sorvida (C) e tratada termicamente a 150 °C por 4,5 h (D). No espectro infravermelho (IV) do dimetil metil-fenil siloxano, Figura 15 A, pode-se ressaltar a presença de algumas bandas mais importantes, como uma banda média em 2961 cm<sup>-1</sup> e bandas fracas acima de 3000 cm<sup>-1</sup>, referentes ao estiramento das ligações C-H de carbonos sp<sup>3</sup> e sp<sup>2</sup>, respectivamente. De 1800 a 2000 cm<sup>-1</sup>, aproximadamente, pode-se observar bandas fracas, características de anéis aromáticos, chamadas “overtone”. Também caracterizando o anel aromático, observa-se um par de bandas em 1429 e 1593 cm<sup>-1</sup>, correspondente ao estiramento das ligações C=C de aromático.

No espectro da sílica, Figura 15 B, observam-se bandas em torno de 3400 e 1640 cm<sup>-1</sup>, referentes às vibrações de grupos hidroxilas ligados à água fisicamente adsorvida por ligações de hidrogênio e também aos grupos hidroxilas geminais. É importante também ressaltar a presença das bandas em 1100 e 970 cm<sup>-1</sup>, correspondentes ao estiramento da ligação Si-O e à deformação da ligação Si-O-H dos silanóis livres, respectivamente.

Nos espectros das fases estacionárias, Figura 15 C e Figura 15 D, além das bandas em 3400, 1640 e 1100 cm<sup>-1</sup> presentes na sílica, observam-se bandas fracas próximas a 3000 e 1400 cm<sup>-1</sup>, referentes, respectivamente, ao estiramento das ligações C-H de carbonos sp<sup>3</sup> e sp<sup>2</sup> e ao estiramento das ligações C=C do anel aromático do copolímero sorvido e imobilizado na superfície do suporte.



**Figura 15.** Espectros de absorção no infravermelho **A)** copolímero de dimetil metil-fenil siloxano; **B)** sílica; **C)** fase sorvida; e **D)** fase imobilizada termicamente a 150 °C, por 4,5 h.

## 5.5. Área Superficial, Volume e Diâmetro de Poro

**Tabela 10.** Características dos materiais de recheio.

Material	Área superficial específica $S_{BET}$ ( $m^2 g^{-1}$ )	Diâmetro de Poro (nm)	Volume de Poro ( $cm^3 g^{-1}$ )	Porcentagem de carbono (%)	$\tau$ (nm)
Sílica nua	313	11,4	0,890	-	-
FE sorvida	209	8,04	0,608	6,70	0,457
FE imobilizada	208	7,71	0,570	8,90	0,649

Os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que, com a sorção e imobilização térmica do copolímero sobre a sílica, houve uma diminuição de todos os parâmetros analisados, principalmente da área superficial. Estes resultados já eram esperados, já que com a sorção e/ou imobilização do copolímero ocorre obstrução dos poros menores da sílica pelo copolímero. Apesar disso, como se pôde avaliar através dos parâmetros cromatográficos obtidos com as

misturas teste, a espessura da camada de polímero formada é suficientemente fina para que haja transferência de massa adequada.

## 5.6. Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 e Silício 29 (RMN $^{13}\text{C}$ e $^{29}\text{Si}$ )

A funcionalidade dos silanos e os tipos de ligações químicas encontradas nas fases estacionárias podem ser determinados pela espectroscopia de RMN de  $^{29}\text{Si}$ . A Figura 16 mostra a nomenclatura e os deslocamentos químicos característicos das espécies de silício que podem ser encontrados na superfície da sílica modificada<sup>49</sup>.

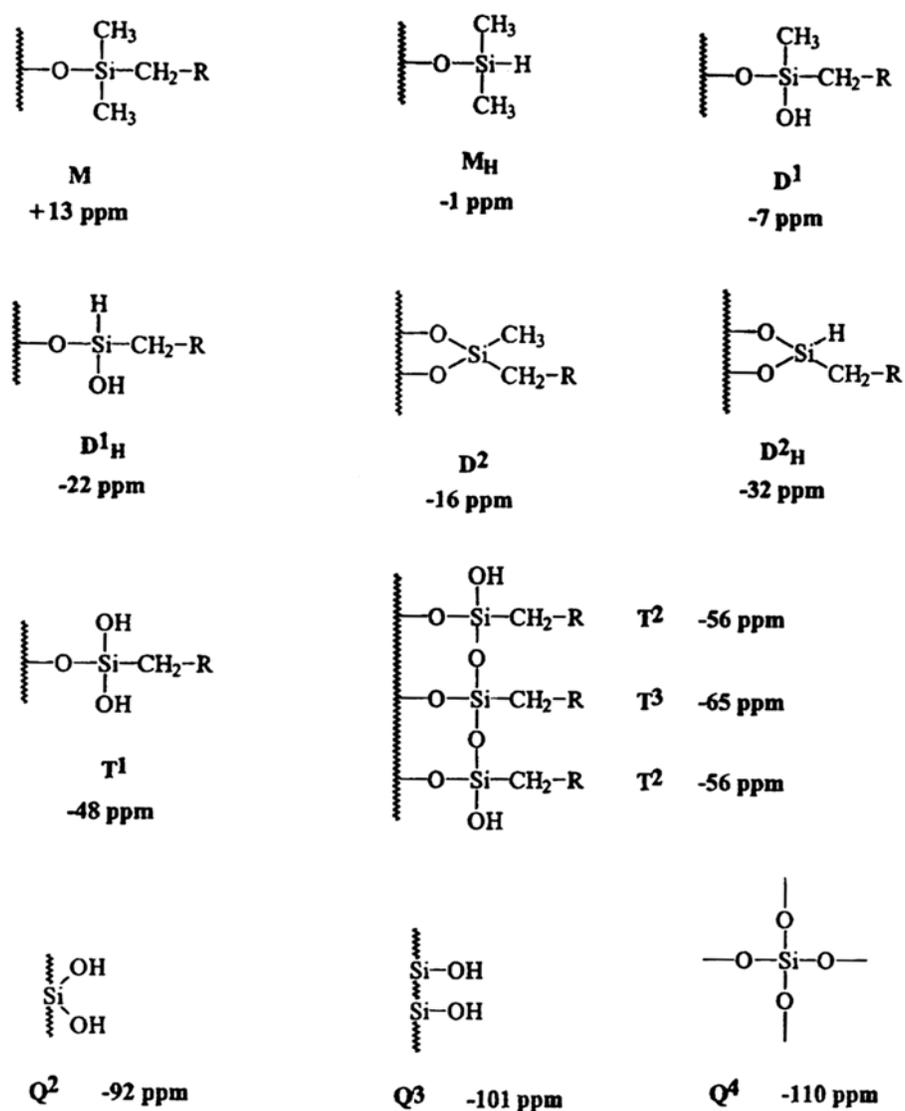
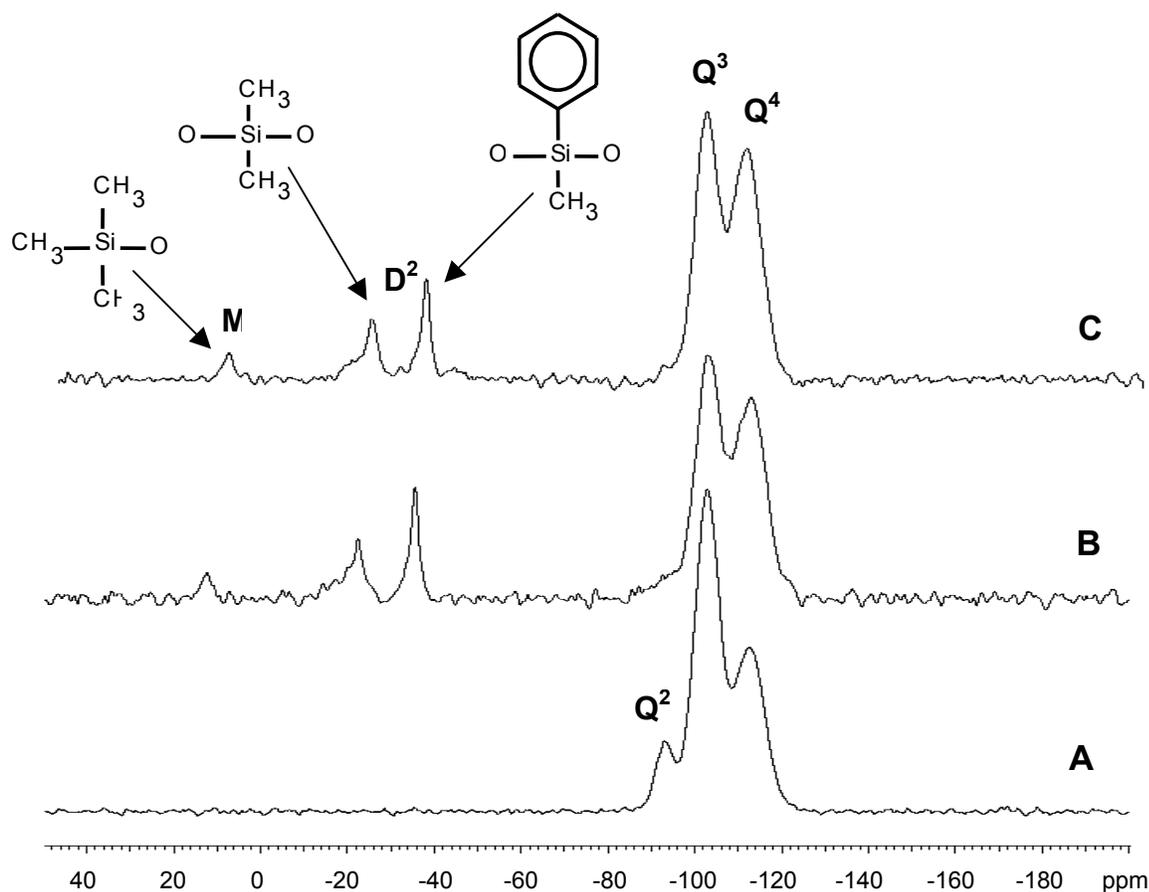


Figura 16. Nomenclatura e deslocamentos químicos das espécies de silício<sup>49</sup>.

No espectro de  $^{29}\text{Si}$  da sílica gel mostrado na Figura 17 pode-se observar os grupos que compõem a estrutura da sílica, que consiste basicamente de ligações tipo siloxano e silanóis. Os grupos silanóis são representados por picos em aproximadamente -92 ppm, atribuídos aos silanóis geminais, chamados  $\text{Q}^2$ , e em aproximadamente -101 ppm, atribuídos aos silanóis livres e vicinais, denominados  $\text{Q}^3$ . As ligações tipo siloxano são representadas por um pico, denominado  $\text{Q}^4$ , em aproximadamente -110 ppm.



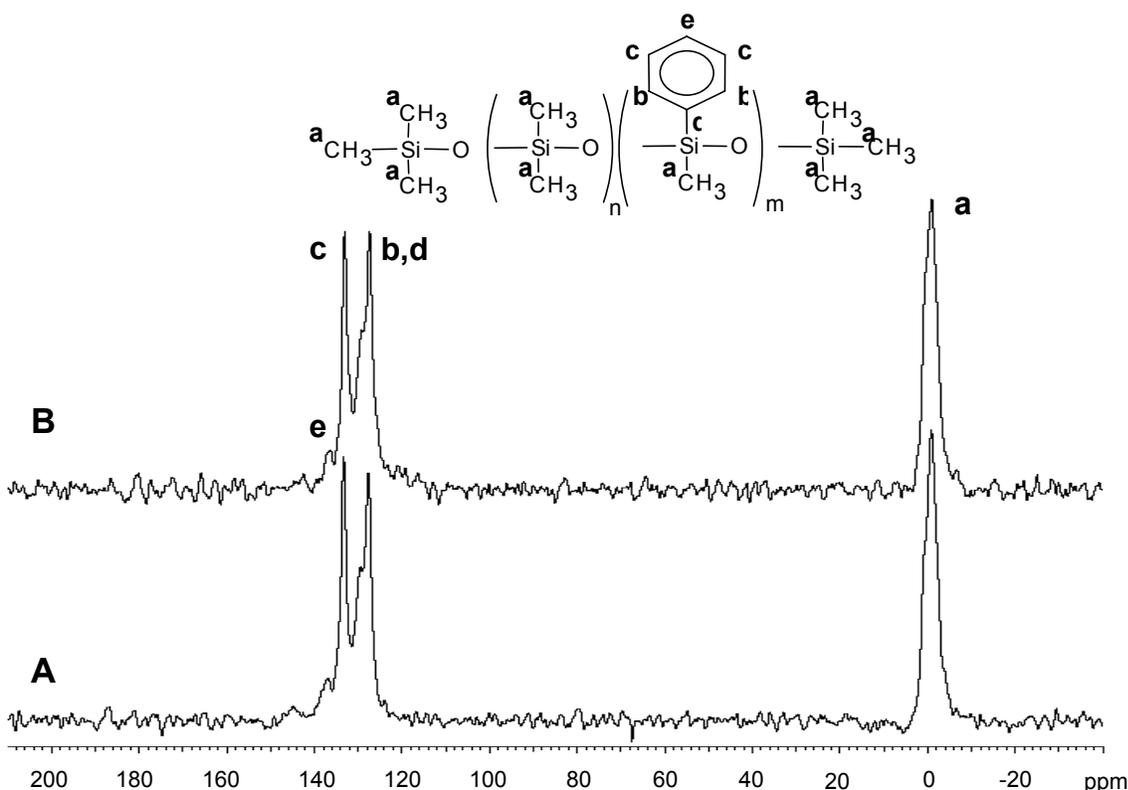
**Figura 17.** Espectros de RMN  $^{29}\text{Si}$  de **A)** sílica nua; **B)** fase estacionária sorvida e **C)** imobilizada termicamente a 150 °C, por 4,5 h.

Os espectros das fases estacionárias sorvida e imobilizada termicamente não apresentam nenhuma diferença significativa entre si. Pode-se notar em ambas a presença de espécies M, referentes aos grupos trimetil terminais do copolímero, e duas espécies  $\text{D}^2$ , também devido ao copolímero. Em -22 ppm, existe um pico referente a espécies difuncionais ligadas a cadeias

alquílicas, já a espécie observada em  $-35$  ppm é em virtude da presença de anéis aromáticos ligados ao silício, que altera seu deslocamento químico para valores próximos a  $-34$  ppm em relação aos substituintes do tipo n-alquila<sup>33</sup>.

Apesar dos espectros de RMN medidos pela técnica CP/MAS não serem quantitativos, pode-se ressaltar a diminuição quase total do pico referente aos silanóis geminais da sílica, indicando que houve um bom recobrimento dessas espécies pelo copolímero. Pode-se inferir também que ocorreu uma alteração na proporção entre as espécies  $Q^3$  e  $Q^4$ , com diminuição das espécies  $Q^3$  em relação às espécies  $Q^4$ , indicando que parte dos grupos silanóis livres e vicinais também interagiram com o copolímero.

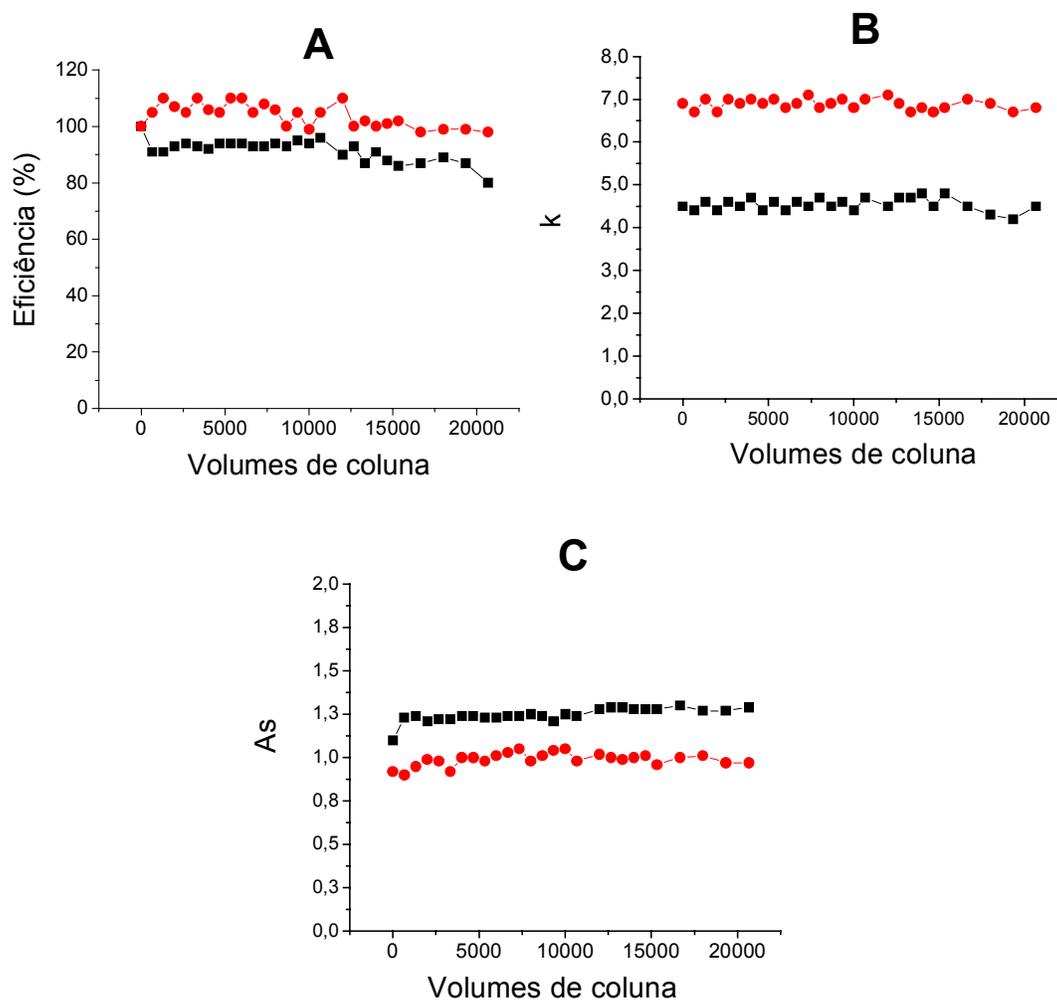
A Figura 18 apresenta os espectros de RMN de  $^{13}C$  das fases estacionárias sorvida e imobilizada termicamente. Assim como nos espectros de RMN de  $^{29}Si$ , não se observa nenhuma diferença significativa entre as duas fases estacionárias. Os espectros apresentam um pico em 0 ppm, que representa as espécies  $Si-CH_3$ , e picos entre 120 e 140 ppm, referentes aos carbonos dos anéis aromáticos do copolímero<sup>50</sup>.



**Figura 18.** Espectros de RMN  $^{13}C$  de fases estacionárias **A)** sorvida e **B)** imobilizada termicamente a 150 °C por 4,5 h.

## 5.7. Testes de Estabilidade

Os testes de estabilidade foram realizados com duas colunas, uma recheada com a fase estacionária sorvida e outra com a fase estacionária imobilizada na melhor condição encontrada, ou seja, 150 °C por 4,5 h. Na Figura 19 estão representados os resultados obtidos.



**Figura 19.** Teste de estabilidade com a fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v): ● Fase Imobilizada a 150 °C; ■ Fase sorvida.

Pode-se observar que em ambos os casos as colunas mostraram boa estabilidade. Na coluna recheada com a fase sorvida houve uma perda de 20 % em relação à eficiência inicial após a passagem de 20.000 volumes de coluna, enquanto que na fase imobilizada termicamente houve

pouca modificação no mesmo intervalo. Na fase imobilizada, houve um ligeiro aumento da eficiência logo no início do teste, talvez em virtude de uma melhor acomodação da fase estacionária e alteração no leito cromatográfico. Não houve, em nenhum dos testes, diminuição significativa do fator de retenção, o que poderia indicar perda do copolímero.

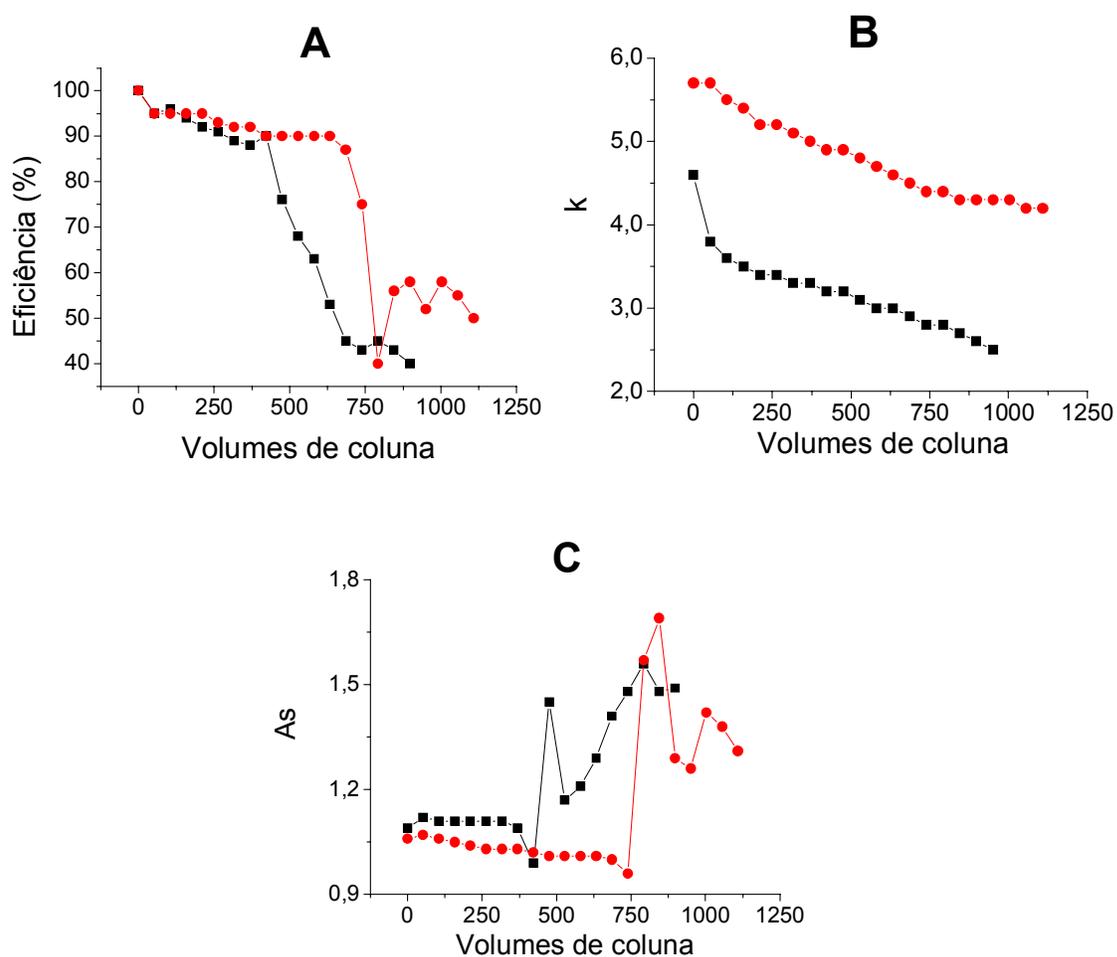
Analisando o fator de assimetria para o naftaleno, nota-se que ele sofreu um aumento inicial na coluna recheada com a fase estacionária sorvida atingindo valores de 1,1 até muito próximos a 1,3, que ainda estão dentro dos valores aceitáveis na literatura, permanecendo estável até 20.000 volumes de coluna. Já na coluna recheada com a fase imobilizada termicamente, o fator de assimetria variou de 0,9 a 1,0, estando assim dentro do intervalo aceito e com melhores valores<sup>42</sup>.

Na Figura 20 estão os resultados obtidos no teste de estabilidade em condições mais drásticas para colunas recheadas com as fases estacionárias, sorvida e imobilizada termicamente por 4,5 h, a 150 °C.

A fase estacionária imobilizada termicamente manteve 90 % de sua eficiência inicial até cerca de 690 volumes de coluna, quando diminuiu drasticamente para 40 % em torno de 790 volumes de coluna. Já a fase estacionária sorvida apresentou uma diminuição gradativa de sua eficiência, sendo que, em 475 volumes de coluna, a perda de eficiência tornou-se mais acelerada, atingindo 50 % de sua eficiência inicial com a passagem de 650 volumes de coluna de fase móvel alcalina.

Como observado em outros trabalhos no LabCrom<sup>51</sup>, após o colapso do leito cromatográfico, com uma queda brusca da eficiência e um grande aumento do fator de assimetria, houve uma ligeira recuperação, provavelmente em virtude de uma reacomodação das partículas da fase estacionária no leito cromatográfico.

Em ambos os casos, observou-se que o fator de retenção diminuiu progressivamente. Nos experimentos com fase móvel neutra, essa diminuição da retenção ocorreu em virtude da perda do copolímero arrastado fisicamente pela fase móvel. Já nos experimentos com fase móvel alcalina, além da perda de copolímero em virtude do arraste da fase móvel ocorreu também a perda do material de recheio, com a dissolução da sílica. Isso pôde ser comprovado visualmente, pois quando a coluna foi aberta para desempacotá-la foi observado um grande espaço vazio no leito cromatográfico.



**Figura 20.** Teste de estabilidade com fase móvel MeOH:NaHCO<sub>3</sub> 0,05 mol L<sup>-1</sup> + NaOH, pH 9,0, 50:50 (v/v), a 40 °C: ● Fase Imobilizada a 150 °C; ■ Fase sorvida.

**Tabela 11.** Porcentagem de carbono presente nas fases estacionárias, sorvida e imobilizada.

Fase estacionária	Antes do teste de estabilidade	Após teste de estabilidade com fase móvel neutra	Após teste de estabilidade em condições drásticas
Sorvida	6,7 %	5,5 %	4,6 %
Imobilizada a 150 °C, 4,5 h	8,9 %	7,3 %	6,6 %

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que a utilização do copolímero de dimetil(48-52%)-metil-fenil(48-52%) siloxano sobre a sílica produz fases estacionárias com grande potencialidade em cromatografia líquida de alta eficiência. A maioria das colunas obtidas apresentou bom desempenho cromatográfico, boa eficiência e estabilidade química.

Avaliando o processo de imobilização por tratamento térmico, pode-se concluir que, dentre as condições testadas, a imobilização a 150 °C apresentou os melhores resultados de eficiência e simetria e, para esta temperatura, o tempo de 4,5 h de tratamento foi considerado o mais adequado.

Os bons resultados do fator de assimetria para a N,N-dimetilanilina indicaram que houve um bom recobrimento dos silanóis livres pelo copolímero. A diminuição quase total do pico referente às espécies Q<sup>2</sup>, silanóis geminais, e a diminuição das espécies Q<sup>3</sup>, silanóis livres e vicinais, em relação às espécies Q<sup>4</sup>, siloxanos, nos espectros de RMN de <sup>29</sup>Si reforçam essa hipótese, e indicam que os silanóis geminais e vicinais também interagiram com o copolímero.

A espessura da camada de copolímero formada foi bem menor que aquelas obtidas em outros trabalhos do grupo<sup>6,51</sup>, não sendo suficiente para formar uma monocamada uniforme sobre a sílica. Assim, pode-se afirmar que os bons resultados do fator de assimetria para a N,N-dimetilanilina não só se devem ao recobrimento dos silanóis livres pelo copolímero, mas também a sua seletividade diferencial promovida pelos grupos fenil.

As colunas recheadas com as fases estacionárias preparadas a partir da sorção e imobilização por tratamento térmico do copolímero sobre a sílica apresentaram boa estabilidade, tanto com fase móvel neutra quanto com fase móvel alcalina, sendo que o tratamento térmico promoveu um ligeiro aumento da estabilidade.

O copolímero de dimetil(48-52%)-metil-fenil(48-52%) siloxano como fase estacionária para CLAE é muito promissor e sua utilização deve continuar sendo investigada, para verificar a sua potencialidade na aplicação em diversos tipos de amostra, como por exemplo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, e a eficiência de diferentes agentes de imobilização, tal como radiação por microondas e autoimobilização.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. POOLE, C. F. e POOLE, S. K. **Chromatography today**. Elsevier Science B. V., Amsterdam-Holanda, 1991.
2. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. e BONATO, P. S. (coordenadores). **Introdução a métodos cromatográficos**. 7<sup>a</sup> ed., Unicamp, Campinas, 1997.
3. SKOOG, D. A.; HOOLER, F. J. e NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. Trad. Igenes Caracelli, 5<sup>a</sup>. ed, Bookman, Porto Alegre, 2002.
4. HAMILTON, R. J. e SEWEL, P. A. **Introduction to high performance liquid chromatography**. Halsted Press, New York, 1978.
5. MEYER, V. R. **Practical high performance liquid chromatography**. 2<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 1994.
6. CHAUDHRY, Z. F. **Novas fases estacionárias para CLAE preparadas por imobilização térmica de PMODS sobre diferentes suportes de sílica**. Tese de doutorado, Campinas, 2005.
7. HUPE, K.; McNAIR, H. M.; KOK, W. T.; BRUIN, G. J.; POPPE, H.; POOLE, C.; CHESTER, T. L.; WIMALASENA, R. L.; WILSON, G. S.; BIDLINGMEYER, B.; ARMSTRONG, D. W.; SCOTT, R. P. W.; WIDMER, M.; MAJORS, R. E.; OUCHI, G. I. The past 10 years in chromatography. **LC-GC**, 18, 211, 1992.
8. POOLE, C. F. e SCHUETTE, S. A. **Contemporary practice of chromatography**. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam-Holanda, 1984.
9. PETRO, M.; BEREK, D. Polymers immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography. **Chromatographia**, 37, 549, 1993.
10. STELLA, C.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J.-L. e TCHAPLA, A. Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic Tests and their importance for evaluating these supports. Part I. **Chromatographia Supplement**, 53, 113, 2001
11. SCOTT, R. P. W. **Silica gel and bonded phases. Their production, properties and use in LC**. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 1993.
12. KIRKLAND, J. J.; DeSTEFANO, J. J. Controlled surface porosity supports with chemically-bonded organic stationary phases for gas and liquid chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, 8, 309, 1970.
13. NOVOTNY, M.; BEKTESCH, S. L.; GROHMANN, K. L. Chemically bonded stationary phases with variable selectivity. **J. Chromatogr.**, 83, 25, 1973.

- 
14. HANSON, M. e UNGER, K. K. Polymer coatings as stationary phases in high-performance liquid chromatography. **Trends Anal. Chem.**, 11, 368, 1992.
  15. SANDER, L. C; WISE, S. A. Influence of substrate parameters on column selectivity with alkyl bonded-phase sorbents. **J. Chromatogr.**, 316, 163, 1984.
  16. BOTTOLI, C. B. G. **Sorção, imobilização e extração de polissiloxanos em sílicas porosas para uso em cromatografia líquida de alta eficiência.** Tese de doutorado, IQ-Unicamp, 2002.
  17. SILVA, R. B. **Preparação de fases estacionárias para CLAE a partir de poli(metiloctilsiloxano) sobre a sílica titanizada.** Tese de doutorado, IQ-Unicamp, 2001.
  18. LOPES, N. P. **Fases estacionárias de sílica e polibutadieno para cromatografia líquida de alta eficiência.** Tese de doutorado, IQ-Unicamp, 2004.
  19. COLLINS, K. E.; BOTTOLLI, C. B. G.; VIGNA, C. R. M.; BACHMANN, S.; ALBERT, K.; COLLINS, C. H. Self-immobilization of poly(methyloctylsiloxane) on high performance chromatography silica. **J. Chromatogr. A**, 1029, 43, 2004.
  20. MORAIS, L. S. R. **Preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência a partir de sílica titanizada e polibutadieno.** Dissertação de mestrado, IQ-Unicamp, 2003.
  21. BOTTOLI, C. B. G.; VIGNA, C. R. M.; FISCHER, G.; ALBERT, K.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Self-immobilization and/or thermal treatment for preparing silica-poly(methyloctylsiloxane) stationary phases. **J. Chromatogr. A**, 1030, 217, 2004.
  22. BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. Chromatographic evaluation of self-immobilized stationary phases for reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr. A**, 987, 87, 2003.
  23. JARDIM, I. C. S. F.; ANAZAWA, T. A.; COLLINS, K. E. Radiation immobilization of poly(methyloctylsiloxane) on silica for use in HPLC: a uniform layer mode. **J. Chromatogr. A**, 849, 229, 1999.
  24. HETEM, M. J. J. DE HAAN, J. W.; CLAESSENS, H. A.; CRAMERS, C. A. Characterization and stability of silanized and polymer-coated octadecyl reversed phases. **J. Chromatogr.**, 540, 53, 1991.
  25. HANSON, M.; UNGER, K. K. Non-porous polybutadiene-coated silicas as stationary phases in reversed-phase chromatography. **J. Chromatogr.**, 517, 269, 1990.
  26. BENTROP, D., ENGELHARDT, H., KOHR, J. Poly(methylglutamate)-coated surfaces in HPLC and CE. **Chromatographia**, 32, 171, 1991.

- 
27. VANROELENBOSCH, M., SANDRA, P. Mixed phase of superox 20M and OV-1 in fused-silica and glass-capillary gas-chromatography. **Chromatographia**, 14, 345, 1981.
  28. OYLER, A.R., ARMSTRONG A. L., CHA, J. Y., ZHOU, M. X., YANG, Q., ROBINSON, R. I., DUNPHY, R. BURINSKY, D. J. Hydrophilic interaction chromatography on amino-silica phases complements reversed-phase HPLC and capillary electrophoresis for peptide analysis. **J. Chromatogr. A**, 724, 378, 1996
  29. OLSEN, B.A. Hydrophilic interaction chromatography using amino and silica columns for determination of polar pharmaceuticals and impurities. **J. Chromatogr. A**, 913, 113, 2001.
  30. HÄGGLUND, I.; JANÁK, K.; BLOMBERG, L.; BENGARD, A.; CLAUDE, S. G.; LYMANN, M.; TABACCHI, R. Chromatographic properties of different methyl-phenyl (1:1) substituted silicone stationary phases for open-tubular gas chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, 29, 396, 1991.
  31. NEIMARK, I. E.; CHERTOV, V. M. Adsorptive and ion-exchange properties of silica modified by a radical with acid functions. **Dokl. Akad. Nauk SSSR**, 138, 877, 1961.
  32. SZABÓ, G.; CSATÓ, E. Preparation and retention characteristics of different phenylpolysiloxane phases for reversed-phase liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, 463, 345, 1983.
  33. YANG, M. H.; CHEN, I. L.; WU, D. H. Chemically bonded phenylsilicone stationary phases for the liquid chromatographic separation of polycyclic aromatic hydrocarbons and cyclosiloxanes. **J. Chromatogr. A**, 722, 97, 1996.
  34. SALO, M.; HERRALA, S. Retention of retinoids on an aromatic stationary phase in reversed-phase liquid chromatography. **Chromatographia**, 37, 501, 1993.
  35. GOSS, J. D. Improved liquid chromatography of salicylic acid and some related compounds on a phenyl column. **J. Chromatogr. A**, 828, 267, 1998.
  36. SZABÓ, G., CSATÓ, E., OFFENMÜLLER, K., DÉVAI, M., BORBÉLY-KUSZMANN, A., LIPTAI, G. Preparation and retention characteristics of different phenyl phases for reversed-phase liquid chromatography. **Chromatographia**, 26, 255, 1988.
  37. McMASTER, M. C. **HPLC – A practical user's guide**. VCH Publishers, Inc, New York, 1994.
  38. YANG, F. J. **Microbore column chromatography. A unified approach to chromatography**. Dekker, New York, 1989.

- 
39. VERZELE, M., DEAWELE, C., DUQUET, D. Observations and ideas on slurry packing of liquid-chromatography columns. **J. Chromatogr.**, 391, 111, 1987.
40. MARTIN, M. e GUIOCHON, G. Review and discussion of various techniques of packing of columns for high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, 10, 194, 1977.
41. NEUE, U. D. **HPLC columns: Theory, technology and practice**. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1997.
42. SNYDER, L. R. e KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 1979.
43. SNYDER, L.R; KIRKLAND, J.J; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**. 2<sup>nd</sup> ed., Wiley, New York, 1997.
44. COLLINS, K.E; FRANCON, A.C; JARDIM, I.C.S.F; RADOVANOVICK, E; GONSALVES, M.C. The effects of inner surface roughness of microbore column blanks on column performance. **LC-GC.**, 18, 107, 2000.
45. CAMPBELL, D.; PETHRICK, R. A. e WHITE, J. R. **Polymer characterization**. 2<sup>nd</sup> ed., Stanley Thornes Ltd., Cheltenham, Reino Unido, 2000.
46. HAMILTON, R. J. e SEWEL, P. A. **Introduction to high performance liquid chromatography**. Halsted Press, New York, 1978.
47. XAVIER, A. M.; JARDIM, I. C. S. F. Efeito da temperatura e da pressão na extração do excesso de PMOS e PMODS de fases estacionárias imobilizadas termicamente. **27<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2004.
48. XAVIER, A. M.; JARDIM, I. C. S. F. Extração de poli(metiloctilsiloxano) e poli(metiloctadecilsiloxano), de fases estacionárias, simultânea ao enchimento de colunas. **27<sup>a</sup>. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2004.
49. ALBERT, K., BAYER, E. Characterization of bonded phases by solid state NMR spectroscopy, **J. Chromatogr.**, 544, 345, 1991.
50. TRAMMELL, B. C., MA, L., LUO, H., HILLMYER, M. A., CARR, P. W. Synthesis and characterization of hypercrosslinked, surface-confined, ultra-stable silica-based stationary phases. **J. Chromatogr. A**, 1060, 61, 2004.
51. OGAYA, C. L., **Fases estacionárias de poli(metiloctilsiloxano) sorvido e imobilizado por tratamento térmico sobre sílicas de diferentes purezas e com diferentes pré-tratamentos**. Dissertação de Mestrado, IQ-UNICAMP, 2004.