



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**PREPARAÇÃO DE COLUNAS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA RECHEADAS COM POLISSILOXANOS (C1, C8 E
C14) IMOBILIZADOS SOBRE PARTÍCULAS DE SÍLICA POROSA
DE 5 μm**

Autor: Edivan Tonhi

Orientadora: Profa Dra Carol Hollingworth Collins

Campinas

Mai de 2004

IDADE	BC
CHAMADA	T/1/1100mp
	T613p
EX	
MBO BCI	60735
OC.	16-114-04
C	☐
D	☒
REÇO	11,00
IATA	18-11-04
CPD	

lib ID 3323 49

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

T613p

Tonhi, Edivan.

Preparação de colunas para cromatografia líquida de alta eficiência recheadas com polissiloxanos (C1, C8 e C14) imobilizados sobre partículas de sílica porosa de 5µm / Edivan Tonhi. -
- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientadora: Carol Hollingworth Collins

Tese (Doutorado) – Universidade
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Cromatografia líquida. 2. Fases estacionárias.
3. Polissiloxanos. 4. Imobilização. I. Collins, Carol
Hollingworth. II. Universidade Estadual de
Campinas. III. Título.

Dedico este trabalho à minha esposa Marli, que
sempre me incentivou e me acompanhou nos
momentos mais difíceis.

“Não consigo conceber um Deus que recompense e puna as suas criaturas, nem que tenha uma vontade do tipo que experimentamos em nós mesmos. Não consigo, nem quero conceber um indivíduo que sobreviva à sua morte física; que as almas fracas, por medo ou egoísmo absurdo, alimentem esses pensamentos. Eu me satisfaço com o mistério da eternidade da vida e com um vislumbre de compreender uma parte, por menor que seja, da razão que se manifesta na natureza.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Carol H. Collins pela orientação, amizade e principalmente por incentivar e acreditar em meu trabalho. Neste período em que estive na Unicamp tive um grande crescimento profissional e pessoal, pois a professora Carol é um exemplo a ser seguido por todos. Fico muito orgulhoso de falar para todas as pessoas que fui aluno e aprendiz de uma das melhores pesquisadoras deste país.

Ao Prof. Kenneth pela amizade e inestimável ajuda em meu crescimento científico e pessoal.

À Profa Isabel Cristina S. F. Jardim pela amizade e sugestões que me fizeram crescer muito.

Aos amigos do "Clube dos Quatro", Lúcio, Marcos e Valtinho pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos.

À Priscila pelo apoio, companheirismo e presteza com que atendeu minhas solicitações, principalmente quando eu não estava mais no laboratório diariamente.

Aos amigos Zahra, Dania, Carla, César, Nilva, Joseane, Gláucia, Ricardo, Sonia, Lais, Camila, Allan, Lika, Daniel, Marcelo, Leonardo, Wedson e Rosely pela agradável convivência.

Ao Stefan Bachmann e ao Prof. Klaus Albert do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Tübingen (Alemanha) pelas análises de RMN.

À Lúcia que me ensinou que sempre temos que correr atrás de nossos sonhos por mais difíceis que eles sejam.

Aos técnicos dos laboratórios de prestação de serviços da Unicamp pelas análises de TGA, IV, MEV, %C e área superficial.

Aos Professores e funcionários do Instituto de Química da Unicamp.

À Unicamp e ao Instituto de Química pela oportunidade.

À empresa IBRAS CBO pela irradiação das fases estacionárias com radiação- γ .

À FAPESP pela bolsa concedida.

Ao pessoal da seção de alunos, especialmente o André e a Bel.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que por omissão foram injustiçados.

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica

Mestrado em Ciências, com ênfase em Biomateriais - Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP

Período: março/1997 a março/1999.

Bacharel em Química, com ênfase tecnológica - Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP

Período: março/1993 a dezembro/1996.

2. Cursos

“Utilização e manutenção de colunas para HPLC” realizado no dia 17 de junho de 2002 - Merck, Auditório da EMS Sigma Pharma, Hortolândia, SP.

“Boas práticas de laboratório (GLP) – Colunas de HPLC/GPC” realizado no dia 12 de julho de 2002 - Waters, Auditório da EMS Sigma Pharma, Hortolândia, SP.

“Técnicas analíticas avançadas (CG/MS e LC/MS)” realizado no dia 31 de julho de 2002 - Analítica, Hotel Transamérica, São Paulo, SP.

“Aplicações da análise térmica na indústria farmacêutica” realizado no dia 21 de outubro de 2002 - Micronal, Auditório da EMS Sigma Pharma, Hortolândia, SP.

“Segurança em Laboratório” realizado no dia 26 de fevereiro de 2002 - Isolab, Auditório da EMS Sigma Pharma, Hortolândia, SP.

“Requisitos Gerais para Competências de Laboratórios de Ensaio e Calibração NBR ISO/IEC 17025” realizado no dia 10 de abril de 2003 - Garantia da Qualidade, Auditório da EMS Sigma Pharma, Hortolândia, SP.

“Estabilidade de produtos farmacêuticos” realizado nos dias 25 e 26 de abril de 2003 - Racine, Auditório da EMS Sigma Pharma, Hortolândia, SP.

3. Artigos

TONHI, E. ; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. “HPLC Stationary Phases Based on PMOS Immobilized on Silica by Different Processes. Part III. Stability Evaluation”, Journal of Chromatography A 987 (2003) 93-101.

TONHI, E. ; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. "HPLC Stationary Phases Based on PMOS Immobilized on Silica by Different Processes. Part II. Chromatographic Evaluation", *Journal of Chromatography A* 948 (2002) 109-119.

TONHI, E. ; BACHMANN, S.; ALBERT, K.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, K. E.; COLLINS, C. H. "HPLC Stationary Phases Based on PMOS Immobilized on Silica by Different Processes. Part I. Physical and Chemical Characterization", *Journal of Chromatography A* 948 (2002) 97-107.

TONHI, E.; PLEPIS, A. M. G. "Obtenção e Caracterização de Blendas Colágeno-Quitossana", *Química Nova* 25 (2002) 943-948.

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. "Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) Baseadas em Superfícies de Óxidos Inorgânicos Funcionalizados", *Química Nova* 25 (2002) 616-623.

4. Trabalhos apresentados em Congressos Internacionais: 4

5. Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais: 6

6. Bolsas obtidas

- Bolsa de iniciação científica concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no período de março de 1995 a setembro de 1996.
- Bolsa de mestrado concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), no período de março de 1997 a março de 1999.
- Bolsa de Doutorado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), no período de maio de 1999 a março de 2002.

7. Patente

"Processo para obtenção de fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência baseadas em polissiloxanos adsorvidos e imobilizados na superfície de sílica porosa", solicitação com número do pedido PI0204734.

RESUMO

PREPARAÇÃO DE COLUNAS PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA RECHEADAS COM POLISSILOXANOS (C1, C8 e C14) IMOBILIZADOS SOBRE PARTÍCULAS DE SÍLICA POROSA DE 5 μm .

Autor: Edivan Tonhi

Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

Neste trabalho foram obtidas e caracterizadas fases estacionárias reversas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) pela deposição de polissiloxanos com cadeias laterais C1 (polidimetilsiloxano), C8 (polimetiloctilsiloxano) e C14 (polimetiltetradecilsiloxano) sobre partículas de sílica porosa, seguido de imobilização por tratamento térmico, auto-imobilização e irradiação com radiações microondas e gama. Para as fases estacionárias obtidas foram feitas a caracterização físico-química, a avaliação cromatográfica e um estudo de estabilidade comparativo. Os resultados mostraram que os diferentes processos de imobilização promovem fases estacionárias com diferentes características físicas e elas se mostraram bastante promissoras para utilização em cromatografia líquida, na separação de compostos de naturezas e polaridades variadas e também em condições reais de análise. As principais vantagens destas fases estão relacionadas com a facilidade e o custo da preparação e também ao maior recobrimento dos grupos silanóis do suporte de sílica, que as tornam bastante promissoras na separação de compostos básicos. Todas as fases se mostraram bastante estáveis frente à fase móvel neutra, mas menos estáveis frente à fase móvel básica.

ABSTRACT

PREPARATION OF HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC COLUMNS PACKED WITH POLYSILOXANES (C1, C8 AND C14) IMMOBILIZED ON POROUS 5 μ m SILICA .

Author: Edivan Tonhi

Supervisor: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

In this work, reversed phases for High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) were obtained by deposition of polysiloxanes with different lateral chains, C1 (polydimethylsiloxane), C8 (polymethyloctylsiloxane) and C14 (polymethyltetradecylsiloxane), in HPLC silica particles, followed by immobilization using different processes: thermal treatment, self-immobilization and irradiation with microwaves and gamma radiation. Physical-chemical characterization, chromatographic evaluation and a comparative stability study of the stationary phases were carried out. The results show that different immobilization processes provide different physical characteristics in the prepared phases and that they are appropriate for chromatographic use in the separation of compounds with varied natures and polarities and also under real analysis conditions. The main advantages of these stationary phases are related to facility and cost of preparation and greater covering of the silanol groups of the silica support that results in superior performance in the separations of basic compounds. All the stationary phases were quite stable to neutral mobile phase, with less stability at higher pH.

SUMÁRIO

I. Introdução	1
I.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	1
I.2. Fases estacionárias para CLAE	4
I.2.1. Suportes cromatográficos	4
I.2.2. Fases reversas	7
I.2.2.1. Fases estacionárias quimicamente ligadas	7
I.2.2.2. Fases estacionárias com polímeros adsorvidos e imobilizados sobre o suporte	16
I.2.2.2.1. Caracterização das fases estacionárias	16
I.2.2.2.2. Tipos de imobilização de polímeros sobre suportes óxidos	24
I.2.2.2.2.1. Tratamento térmico	25
I.2.2.2.2.2. Microondas	25
I.2.2.2.2.3. Radiação gama	26
I.2.2.2.2.4. Auto-imobilização	27
I.3. Enchimento de colunas cromatográficas	27
I.3.1. Enchimento a seco	28
I.3.2. Enchimento por compressão da suspensão	29
I.3.3. Enchimento por sedimentação	29
I.3.4. Enchimento por suspensão a alta pressão	29
I.4. Estabilidade de fases estacionárias reversas	35
II. Objetivos	37
III. Parte experimental	38
III.1. Equipamentos	38
III.2. Materiais	40
III.2.1. Reagentes e solventes	40
III.2.2. Fase estacionária líquida e suporte cromatográfico	41
III.2.3. Coluna cromatográfica	41
III.3. Fases estacionárias	43

III.3.1. Fase estacionária SiO ₂ (PMOS)	43
III.3.1.1. Fase estacionária SiO ₂ (PMOS) otimizada	44
III.3.2. Fase estacionária SiO ₂ (PDMS)	45
III.3.3. Fase estacionária SiO ₂ (PMTDS)	46
III.3.4. Fase estacionária comercial	47
III.4. Enchimento das colunas	47
III.5. Avaliação cromatográfica das colunas	49
III.5.1. Fase móvel	49
III.5.2. Condicionamento das colunas	49
III.5.3. Testes cromatográficos das colunas	50
III.5.3.1. Misturas teste	50
III.5.3.2. Parâmetros cromatográficos	51
III.6. Caracterização físico-química das fases estacionárias	52
III.6.1. Porcentagem de carbono	52
III.6.2. Medidas de área superficial específica	53
III.6.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)	53
III.6.4. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	53
III.6.5. Análise termogravimétrica	54
III.6.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	54
III.6.7. Cromatografia de exclusão (GPC) dos polissiloxanos extraídos das fases estacionárias imobilizadas	54
III.7. Testes de estabilidade	55
III.7.1 . Teste de estabilidade com fase móvel neutra	55
III.7.2. Teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4	55
III.7.3. Teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0	56
III.8. Aplicações das fases estacionárias	57
IV. Resultados e discussão	59
IV.1. Fase estacionária SiO ₂ (PMOS)	59
IV.1.1. Avaliação físico-química	59
IV.1.1.1. Cromatografia de permeação em gel	59

IV.1.1.2. Porcentagem de carbono e área superficial	60
IV.1.1.3. Análise termogravimétrica	62
IV.1.1.4. Ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^{29}Si	63
IV.1.1.5. Espectroscopia no infravermelho	68
IV.1.1.6. Microscopia eletrônica de varredura	71
IV.1.2. Avaliação cromatográfica	71
IV.1.2.1. Mistura teste com compostos ácido, básico e neutros	71
IV.1.2.2. Mistura teste com compostos neutros	79
IV.1.3. Testes de estabilidade	83
IV.1.3.1. Teste de estabilidade com fase móvel neutra	83
IV.1.3.2. Teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4	88
IV.1.3.3. Teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0	93
IV.2. Fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$	98
IV.2.1. Avaliação físico-química	98
IV.2.1.1. Cromatografia de permeação em gel	98
IV.2.1.2. Porcentagem de carbono e área superficial	99
IV.2.1.3. Análise termogravimétrica	101
IV.2.1.4. Espectroscopia no infravermelho	102
IV.2.2. Avaliação cromatográfica	103
IV.2.2.1. Mistura teste com compostos ácido, básico e neutros	103
IV.2.2.2. Mistura teste com compostos neutros	108
IV.2.3. Testes de estabilidade com fase móvel neutra e fase móvel alcalina pH 8,4	113
IV.3. Fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$	117
IV.3.1. Avaliação físico-química	117
IV.3.1.1. Cromatografia de permeação em gel	117
IV.3.1.2. Porcentagem de carbono e área superficial	119
IV.3.1.3. Análise termogravimétrica	120
IV.3.1.4. Espectroscopia no infravermelho	123
IV.3.2. Avaliação cromatográfica	124
IV.3.2.1. Mistura teste com compostos ácido, básico e neutros	124

IV.3.2.2. Mistura teste com compostos neutros	128
IV.3.3. Testes de estabilidade com fase móvel neutra e fase móvel alcalina pH 8,4	132
IV.4. Comparação entre as fases estacionárias baseadas em diferentes polímeros imobilizados	137
IV.5. Aplicações das fases estacionárias imobilizadas	141
IV.5.1. Separação de pesticidas utilizando fase móvel alcalina (pH 10)	142
IV.5.2. Separação de pesticidas utilizando fase móvel ácida (pH 3,75)	143
V. Conclusões	146
VI. Perspectivas futuras	148
VII. Bibliografia	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de carbono, porcentagem de carga, massa específica e 60
área superficial das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas após a extração
do excesso do PMOS e da fase estacionária não imobilizada sem extração do
excesso de PMOS.

Tabela 2. Porcentagem de perda de massa durante a análise termogravimétrica de 63
 25°C a 935°C das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e não
imobilizada.

Tabela 3. Fator de retenção dos compostos ácido, básico e neutros da mistura 74
teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$
imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Colunas: 50
x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 4. Fator de assimetria para os compostos ácido, básico e neutros da 74
mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$
imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50
x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 5. Resolução entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e 75
neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias
 $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin
C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 6. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos ácido, 75
básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases
estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária
comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v);
vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 7. Eficiência (número de pratos) para os compostos ácido, básico e neutros 76
da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias
 $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin
C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 8. Fator de retenção dos compostos neutros da mistura teste para as 80
colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas
e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel:
metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 9. Fator de assimetria para os compostos neutros da mistura teste para as 80
colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas
e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel
metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 10. Resolução entre picos adjacentes para os compostos neutros da 81
mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$
imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50
x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 11. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos neutros 81
da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias
 $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin
C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 12. Eficiência (número de pratos) para os compostos da mistura teste com 82
compostos neutros para as colunas recheadas com as fases estacionárias
 $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin
C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 13. Porcentagem de carbono das fases estacionárias imobilizadas- 92
extraídas e da fase estacionária comercial (Rainin C8) antes e após o teste de
estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4.

Tabela 14. Porcentagem de carbono da fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada 97
por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16\text{h}$ e da fase estacionária comercial (Rainin C8) antes e
após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0.

Tabela 15. Porcentagem de carbono, porcentagem de carga, massa específica e 99
área superficial das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas após a extração
do excesso do PDMS e da fase estacionária não imobilizada sem extração do
excesso de PDMS.

Tabela 16. Porcentagem de perda de massa durante a análise termogravimétrica 102
de 25°C a 950°C das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas e
não imobilizada.

Tabela 17. Fator de retenção dos compostos ácido, básico e neutros da mistura 105
teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$
imobilizadas-extraídas. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v);
vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 18. Fator de assimetria para os compostos ácido, básico e neutros da 105
mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$
imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v);
vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 19. Resolução entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 106

Tabela 20. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 106

Tabela 21. Eficiência (número de pratos) para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 107

Tabela 22. Fator de retenção dos compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 110

Tabela 23. Fator de assimetria para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 110

Tabela 24. Resolução entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 111

Tabela 25. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 112

Tabela 26. Eficiência (número de pratos) para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 112

Tabela 27. Porcentagem de carbono, porcentagem de carga, massa específica e área superficial das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas após a extração do excesso do PMTDS e da fase estacionária não imobilizada sem extração do excesso de PMTDS. 119

Tabela 28. Porcentagem de perda de massa durante a análise termogravimétrica de 25°C a 950°C das fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas e não imobilizada. 122

Tabela 29. Fator de retenção dos compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 125

Tabela 30. Fator de assimetria para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 126

Tabela 31. Resolução entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 126

Tabela 32. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 127

Tabela 33. Eficiência (número de pratos) para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 127

Tabela 34. Fator de retenção dos compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 129

Tabela 35. Fator de assimetria para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 130

Tabela 36. Resolução entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹. 131

Tabela 37. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. 131

Tabela 38. Eficiência (número de pratos) para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fase estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. 132

Tabela 39. Fator de separação para os picos separados no cromatograma das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas. 138

Tabela 40. Fator de separação para os picos separados nos cromatogramas das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ com porcentagem de carga similares. 139

Tabela 41. Porcentagem de carbono das fases estacionárias baseadas em diferentes polímeros imobilizadas por tratamento térmico. 141

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Componentes básicos de um cromatógrafo a líquido. 2
- Figura 2. Fases estacionárias quimicamente ligadas: a) estericamente protegida por grupo volumoso e b) não protegida. 11
- Figura 3. Estrutura da fase estacionária diisopropil-alquil-amida. 12
- Figura 4. Representação esquemática da fase estacionária obtida pela polimerização horizontal de uma mistura de organossilanos com cadeias alifáticas C-1 e C-18. 15
- Figura 5. Líquido cristalino ligado longitudinalmente e lateralmente à superfície da sílica. 23
- Figura 6. Líquido cristalino ligado longitudinalmente e lateralmente ao polissiloxano. 23
- Figura 7. Representação esquemática de três fases estacionárias obtidas pela deposição de um polímero com mistura funcional. 24
- Figura 8. Porcentagem de PMOS retido em uma fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ em função do tempo. 28
- Figura 9. Representação esquemática de dois procedimentos diferentes de enchimento de colunas: com fluxo ascendente e descendente. 32
- Figura 10. Estrutura química dos polissiloxanos: 1) poli(dimetilsiloxano); 2) poli(metiloctilsiloxano); e 3) poli(metiltetradecilsiloxano). 42
- Figura 11. Esquema de uma coluna cromatográfica. 42
- Figura 12. Esquema do sistema de enchimento de colunas. 49
- Figura 13. Medida e cálculo do fator de assimetria do pico. 52
- Figura 14. Estrutura química dos pesticidas utilizados nas aplicações das fases estacionárias imobilizadas-extraídas. 58
- Figura 15. Cromatogramas de GPC de: a) PMOS puro; e PMOS extraídos das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; (e) irradiação com microondas; (f) irradiação com radiação- γ ; e (g) auto-imobilização. 59

Figura 16: Porcentagem de carbono em função da área superficial das fases 61 estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas.

Figura 17. Curvas termogravimétricas de: (a) sílica nua; e fases estacionárias 62 $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; (e) irradiação com microondas; (f) irradiação com radiação- γ ; (g) auto-imobilização; e (h) fase estacionária não imobilizada.

Figura 18. Espectros de ^{13}C -RMN para as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ 64 imobilizadas por: a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas, b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas, d) irradiação com microondas, e) irradiação com radiação- γ , f) auto-imobilização, e g) fase estacionária não imobilizada.

Figura 19. Espectros de ^{29}Si -RMN de (a) sílica Kromasil $5\mu\text{m}$ nua, com tratamento 65 ácido (refluxo em solução de HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ por 4 horas) e (b) sílica Kromasil $5\mu\text{m}$ nua, sem tratamento ácido.

Figura 20. Espectros de ^{29}Si -RMN para as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ 67 imobilizadas por: a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas, b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas, c) irradiação com microondas, d) irradiação com radiação- γ , e) auto-imobilização e f) fase estacionária não imobilizada.

Figura 21. Modelo esquemático para o processo de imobilização. 68

Figura 22. Espectros no infravermelho de (a) sílica Kromasil $5\mu\text{m}$ nua com 69 tratamento ácido (refluxo em solução de HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ por 4 horas) e (b) sílica Kromasil $5\mu\text{m}$ nua sem tratamento ácido.

Figura 23. Espectros no infravermelho das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ 70 imobilizadas por: a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas, b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas, c) irradiação com microondas, d) irradiação com radiação- γ , e) auto-imobilização; e f) fase estacionária não imobilizada.

Figura 24. Fotomicrografias das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: 72 (a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; (d) irradiação com microondas; (e) irradiação com radiação- γ ; e (f) auto-imobilização. Aumento de 1.500 vezes.

Figura 25. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases 73 estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas, b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas, c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas, d) irradiação com microondas, e) irradiação com radiação- γ , f) auto-imobilização; e g) coluna recheada com fase estacionária comercial Rainin C8. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

Figura 26. Atividade silanofílica em função da porcentagem de carbono para as 78 fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas.

Figura 27. Curvas de eficiência (calculada para o pico do acenafteno) em função 78 da vazão de fase móvel para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e a fase estacionária comercial Rainin C8. Condições: colunas: $50 \times 4 \text{ mm}$, fase móvel metanol:água 7:3 (v/v).

Figura 28. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases 79 estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas, b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas, c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas, d) irradiação com microondas, e) irradiação com radiação- γ , f) auto-imobilização; e g) coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-acetona, 3-benzonitrila, 4-benzeno, 5-tolueno e 6-naftaleno.

Figura 29. Hidrofobicidade em função da porcentagem de carbono das fases 83 estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas.

Figura 30. Parâmetros cromatográficos para o pico do fenol em função do volume 84 de fase móvel neutra passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; ● aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; ○ irradiação com microondas; Δ irradiação com radiação- γ ; T auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

Figura 31. Parâmetros cromatográficos para o pico da N,N-dimetilanilina em 85 função do volume de fase móvel neutra passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; ● aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; ○ irradiação com microondas; Δ irradiação com radiação- γ ; T auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

Figura 32. Parâmetros cromatográficos para o pico do naftaleno em função do 86 volume de fase móvel neutra passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; • aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; o irradiação com microondas; Δ irradiação com radiação- γ ; T auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

Figura 33. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em 87 função do volume de fase móvel neutra passado pela coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas. Compostos da mistura teste: T fenol; ■ N,N-dimetilanilina; e o naftaleno.

Figura 34. Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a fase 88 estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas (a) antes e (b) após passar 30.000 v_c de fase móvel neutra pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

Figura 35. Parâmetros cromatográficos para o pico do fenol em função do volume 89 de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; • aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; o irradiação com microondas; Δ irradiação com radiação- γ ; T auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

Figura 36. Parâmetros cromatográficos para o pico da N,N-dimetilanilina em 90 função do volume de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; • aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; o irradiação com microondas; Δ irradiação com radiação- γ ; T auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

Figura 37. Parâmetros cromatográficos para o pico do naftaleno em função do 91 volume de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; • aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; o irradiação com microondas; Δ irradiação com radiação- γ ; T auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

Figura 38. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com a fase 92 estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas (a) antes e (b) após passar $1.500\text{ }v_c$ de fase móvel alcalina pH 8,4 pela coluna e com a fase estacionária comercial Rainin C8 (c) antes e (d) após passar $1.500\text{ }v_c$ de fase móvel alcalina pH 8,4 pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5\text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

Figura 39. Parâmetros cromatográficos para o pico do fenol em função do volume 93 de fase móvel alcalina pH 10,0 passado pela coluna recheada com: ■ fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; e o fase estacionária comercial Rainin C8.

Figura 40. Parâmetros cromatográficos para o pico da N,N-dimetilanilina em 94 função do volume de fase móvel alcalina pH 10,0 passado pela coluna recheada com: ■ fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; e o fase estacionária comercial Rainin C8.

Figura 41. Parâmetros cromatográficos para o pico do naftaleno em função do 95 volume de fase móvel alcalina pH 10,0 passado pela coluna recheada com: ■ fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; e o fase estacionária comercial Rainin C8.

Figura 42. Fotomicrografias da fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada a 96 $120^\circ\text{C}/16$ horas :a) antes e b) após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0; e da fase estacionária comercial Rainin C8: c) antes e d) após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0. Aumento de 20.000 vezes.

Figura 43. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com a fase 97 estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas (a) antes e (b) após passar $1.600\text{ }v_c$ de fase móvel alcalina pH 10,0 pela coluna e com a fase estacionária comercial Rainin C8 (c) antes e (d) após passar $2.000\text{ }v_c$ de fase móvel alcalina pH 10,0 pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5\text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

Figura 44. Cromatogramas de GPC de: a) PDMS puro; e PDMS extraídos das 98 fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (e) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (f) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (g) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ .

Figura 45: Porcentagem de carbono em função da área superficial das fases 100 estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas.

Figura 46. Curvas termogravimétricas de: (a) sílica nua; e fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ 101
imobilizadas por: (b) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (e) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (f) auto-imobilização + irradiação com microondas; (g) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ ; e (h) fase estacionária não imobilizada.

Figura 47. Espectros no infravermelho das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ 103
imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ .

Figura 48. Cromatograma obtido com a coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ 104
imobilizada por aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

Figura 49. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases 104
estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ . Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno e 5-acenafteno.

Figura 50. Curva de eficiência (calculada para o pico do acenafteno) em função da 108
vazão de fase móvel para a coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas. Condições: coluna: $50 \times 4 \text{ mm}$, fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v).

Figura 51. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases 109
estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ . Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-acetona, 3-benzonitrila, 4-benzeno, 5-naftaleno e 6-tolueno.

Figura 52. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel neutra passado pela coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas. Compostos da mistura teste: ∇ fenol; $\blacksquare$ N,N-dimetilanilina; e o naftaleno. 113

Figura 53. Cromatogramas obtidos da coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas (a) antes e (b) após passar 30.000 v_c de fase móvel neutra pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno. 114

Figura 54. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pela coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas. Compostos da mistura teste: ∇ fenol; $\blacksquare$ N,N-dimetilanilina; e o naftaleno. 115

Figura 55. Cromatogramas obtidos da coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas (a) antes e (b) após passar 1.600 v_c de fase móvel alcalina (pH 8,4) pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno. 116

Figura 56. Cromatogramas de GPC de: (a) PMTDS antes da extração; (b) PMTDS após a primeira extração com isopropanol; e (c) PMTDS após a segunda extração com isopropanol. 117

Figura 57. Cromatogramas de GPC de: a) PMTDS puro; e PMTDS extraídos das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ . 118

Figura 58: Porcentagem de carbono em função da área superficial das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas. 120

Figura 59. Curvas termogravimétricas de: (a) PMTDS antes da extração dos oligômeros e (b) após a extração dos oligômeros. 121

Figura 60. Curvas termogravimétricas de: (a) sílica nua; fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ ; e (g) fase estacionária não imobilizada. 122

Figura 61. Espectros no infravermelho das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ 123
 imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$
 horas; (c) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (d) auto-
 imobilização + irradiação com microondas; e (e) auto-imobilização + irradiação
 com radiação- γ .

Figura 62. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases 124
 estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas;
 (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação
 com microondas; (d) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (e) auto-
 imobilização + irradiação com radiação- γ . Condições: fase móvel metanol:água 7:3
 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-
 fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

Figura 63. Curva de eficiência (calculada para o pico do acenafteno) em função da 128
 vazão de fase móvel para a coluna recheada com a fase estacionária
 $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ . Condições: coluna:
 $50 \times 4 \text{ mm}$, fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v).

Figura 64. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com fases 129
 estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b)
 aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com
 microondas; (d) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (e) auto-
 imobilização + irradiação com radiação- γ . Condições: fase móvel metanol:água 7:3
 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-
 acetona, 3-benzonitrila, 4-benzeno, 5-tolueno e 6-naftaleno.

Figura 65. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em 133
 função do volume de fase móvel neutra passado pela coluna recheada com a fase
 estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ .
 Compostos da mistura teste: T fenol; ■ N,N-dimetilanilina; e o naftaleno.

Figura 66. Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a fase 134
 estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ (a) antes
 e (b) após passar $30.000 v_c$ de fase móvel neutra pela coluna. Condições: fase
 móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm.
 Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

Figura 67. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em 135
 função do volume de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pela coluna recheada
 com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização +
 radiação- γ . Compostos da mistura teste: T fenol; ■ N,N-dimetilanilina; e o
 naftaleno.

Figura 68. Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a fase 136 estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ (a) antes e (b) após passar 1.600 v_c de fase móvel alcalina pH 8,4 pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de 0,5 mL min^{-1} . Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

Figura 69. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases 138 estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por aquecimento a 120°C/16 horas. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de 0,5 mL min^{-1} . Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

Figura 70. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases 139 estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ com porcentagem de cargas similares. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de 0,5 mL min^{-1} . Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracil, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

Figura 71. Hidrofobicidade e atividade silanofílica em função do número de 140 carbonos nas cadeias laterais dos polissiloxanos imobilizados na fase estacionária.

Figura 72. Separação dos compostos da mistura de pesticidas utilizando as 142 colunas recheadas com: (a) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a 240°C/4 horas; (b) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas; (c) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ ; e (d) coluna Purospher C18 5 μm (Merck). Condições: fase móvel acetonitrila:água 35:65 (v/v) pH 10, vazão de 0,7 mL min^{-1} . Detecção com arranjo de diodos a 235 nm. Compostos injetados: 1-carbendazin, 2-simazina, 3-atrazina, 4-diuron e 5-ametrina.

Figura 73. Espectros de absorção no UV dos pesticidas separados pelas 143 diferentes colunas utilizando fase móvel alcalina (pH 10).

Figura 74. Separação dos compostos da mistura de pesticidas utilizando as 144 colunas recheadas com: (a) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a 240°C/4 horas; (b) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas; (c) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ ; e (d) coluna Novapak C18 4 μm (Waters). Condições: fase móvel metanol:água 1:1 (v/v) pH 3,75, vazão de 0,8 mL min^{-1} . Detecção com arranjo de diodos a 230 nm. Compostos injetados: 1-bentazona, 2-cianazina, 3-cimazina, 4-atrazina, 5-diuron e 6-linuron.

Figura 75. Espectros de absorção no UV dos pesticidas separados pelas 145 diferentes colunas utilizando fase móvel ácida (pH 3,75).

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

As_{10} = Fator de assimetria a 10% da altura do pico

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-FR = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

C1, C8 e C14 = Representações do número de carbonos na cadeia lateral das fases estacionárias

CP-MAS-NMR = Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear com Polarização Cruzada segundo Rotação em um Ângulo Mágico

^{13}C -RMN = Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

GPC = Cromatografia por Exclusão (Permeação em Gel)

HPLC = High Performance Liquid Chromatography

IV = Espectroscopia no Infravermelho

k = Fator de retenção

LABCROM = Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida

MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura

N = Eficiência (número de pratos)

N,N-DMA = N,N-dimetilanilina

PBD = Poli(butadieno)

PDMS = Polidimetilsiloxano (C1)

PMOS = Polimetiloctilsiloxano (C8)

PMTDS = Polimetiloctadecilsiloxano (C14)

R_s = Resolução entre picos adjacentes

^{29}Si -RMN = Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si

TGA = Termogravimetria

t_M = Tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária

t_R = Tempo de retenção de um composto

α = Fator de separação entre picos adjacentes

μm = Micrômetro

I. INTRODUÇÃO

I.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma técnica de separação que, em menos de quarenta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para este crescimento estão relacionadas a sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa detectabilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina, alimentos, saúde pública, combustíveis, dentre outros campos.

Durante muitos anos se praticou a Cromatografia Líquida de uma forma chamada “clássica”, que consiste basicamente em colunas de vidro preenchidas com adsorventes, a qual utiliza a força da gravidade para forçar a passagem do eluente (solvente) através de uma coluna onde ocorre a separação¹.

A utilização de colunas de tamanho reduzido, preenchidas com material finamente pulverizado oferecendo grande resistência ao fluxo da fase móvel, resultou no uso de sistemas de bomba de alta pressão, denominando-se Cromatografia Líquida de Alta Pressão.

Entretanto, no início da década de 70 verificou-se que a alta pressão não era um fator importante na separação cromatográfica mas, sim, uma exigência decorrente da diminuição sucessiva do tamanho das partículas dentro da coluna. Apesar das controvérsias da nomenclatura da técnica, decidiu-se manter o símbolo HPLC, internacionalmente reconhecido, alterando o nome para High Performance Liquid Chromatography, literalmente cromatografia líquida de alto desempenho. No Brasil o nome mais encontrado é CLAE, enfatizando o seu aspecto mais importante, a alta eficiência obtida, comparada com as colunas abertas (“clássicas”).

O grande crescimento e a popularidade da CLAE foram impulsionados por vantagens na tecnologia em coluna e na instrumentação. O desenvolvimento de micropartículas como material de enchimento de melhor eficiência e estabilidade,

iniciadas por Halasz, Horváth e Kirkland²⁻⁴, e a introdução de fases ligadas, aumentaram a versatilidade da técnica e aperfeiçoaram a análise de misturas de vários componentes. Desde a década de 70 a CLAE tem se tornado uma valiosa ferramenta analítica e com grande aplicação para pesquisadores de diversos campos.

Um sistema de CLAE (Figura 1) é constituído basicamente de bomba de alta pressão, injetor, coluna, detector e um sistema de aquisição de dados.

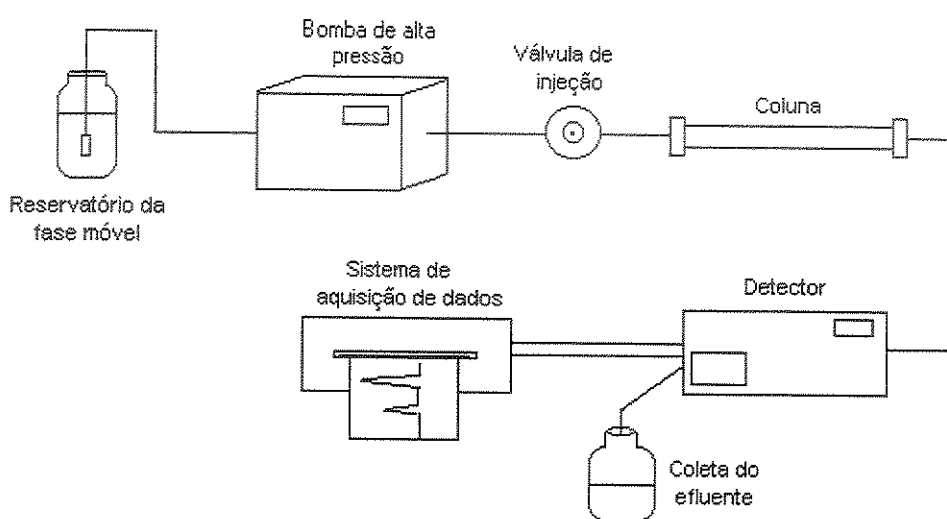


Figura 1. Componentes básicos de um cromatógrafo a líquido.

Com relação aos aspectos positivos desta técnica, pode-se citar:

- as separações em CLAE podem ser realizadas em escala de tempo diminuta, quando comparadas com outras técnicas de separação;
- a possibilidade de separar um elevado número de componentes de uma mistura com alto grau de pureza;
- a grande versatilidade, podendo ser utilizada para uma ampla variedade de amostras, tanto orgânicas como inorgânicas, além de permitir a análise de moléculas de uma vasta faixa de massas molares, desde baixas até polímeros de massas molares de vários milhões de daltons. Quanto a natureza da amostra, líquidos, sólidos (iônicos ou covalentes), gases (solúveis na fase móvel) e até compostos termicamente instáveis podem ser analisados;

- com relação à instrumentação, uma variedade muito grande de detectores são disponíveis, que podem detectar quantidades tão pequenas quanto picogramas (10^{-12} g) ou até 10^{-15} g com detecção por fluorescência, tornando-a importante na análise de poluentes, alimentos, produtos medicinais e outros; e
- a automação em CLAE, atualmente, permite a programação não somente da parte de análise como também no processamento de dados.

Embora tenha muitas vantagens, esta técnica apresenta algumas limitações, as principais delas são:

- o custo elevado de instrumentação e sua manutenção, com destaque para os suprimentos como as fases móveis; e
- assim como em outros métodos cromatográficos, a CLAE não possui a capacidade de fornecer informações que permitam a identificação definitiva dos picos, exceto com um detector qualitativo especial.

Dentre as modalidades de CLAE com mecanismos físicos de adsorção/absorção, existem duas delas que são baseadas na natureza da fase estacionária e móvel:

- Fase Normal: quando a fase estacionária possui grupos de natureza polar (-CN, -OH ou -NH₂), com o uso de fase móvel apolar (n-hexano ou diclorometano/isopropanol); e
- Fase Reversa: quando a fase estacionária possui grupos de natureza apolar (sílica modificada por grupos octil (C-8) ou octadecil (C-18), entre outros), com uso de fase móvel polar (geralmente uma mistura de metanol ou acetonitrila com água).

Na fase normal a fase estacionária pode ser a própria sílica ou outros óxidos, ou ainda pode envolver a sílica como suporte, coberta ou quimicamente ligada a outros grupos polares. Na fase reversa um suporte é coberto por um líquido fisicamente adsorvido ou quimicamente ligado, que é imiscível com a fase móvel; geralmente a fase estacionária é um hidrocarboneto. Há certas limitações no uso da fase estacionária fisicamente adsorvida em suporte sólido; a maior delas é que a fase estacionária poderá ser solubilizada pela fase móvel. Isto pode ser eliminado quando se utiliza a fase estacionária quimicamente ligada ou imobilizada.

I.2. Fases estacionárias para CLAE

I.2.1. Suportes cromatográficos

Por mais de 30 anos a sílica tem sido o material preferido para a preparação das fases estacionárias para CLAE em fase reversa (FR), sendo que é mecanicamente estável a altas pressões, pode ser facilmente modificada, existe um vasto conhecimento de sua estrutura e suas propriedades e é comercialmente disponível em uma grande variedade de tamanhos de partículas, formas e tamanhos de poros.

Por outro lado, as fases baseadas em sílica tendem a serem limitadas em dois aspectos importantes. Um destes aspectos está relacionado a não homogeneidade da sua superfície, que apresenta diferentes tipos de grupos silanóis^{5,6}, os quais afetam a funcionalização e, conseqüentemente, o mecanismo de retenção. Os silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) são ácidos e podem interagir fortemente com vários tipos de moléculas básicas (fármacos, bio-orgânicos, etc.) e adsorvê-las. Quando a adsorção é reversível, tem-se o problema de picos largos, assimétricos e com cauda, que são difíceis de serem tratados quantitativamente, além de poderem se sobrepor ou interferirem nos picos de outros solutos que eluem com tempos de retenção similares. Muitas vezes, a adsorção pode ser irreversível e os compostos depositados na superfície cromatográfica podem restringir o transporte de massa, bloquear sítios de interação normal e criar sítios ativos não específicos, afetando o desempenho da coluna, podendo até levá-la a deterioração irreversível⁷.

O segundo aspecto é a instabilidade da sílica e das fases estacionárias sintetizadas baseadas em sílica, tanto frente a fases móveis ácidas como básicas. Os grupos silanóis e siloxanos ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$) reagem com estas fases móveis, sofrendo dissolução, causando perda da fase estacionária e, eventualmente, colapso da estrutura do leito da coluna^{8,9}. Este problema de instabilidade em soluções de pH baixo¹⁰ ou alto¹¹⁻¹³ é muito importante em CLAE-FR, sendo que soluções com pH 2,5 ou pH 9,0 são recomendadas¹⁴ para a análise de diversos compostos contendo, em sua

estrutura, grupos ácidos como carboxílicos e fenólicos e básicos como aminas e amidas, tais como os encontrados em, por exemplo, fármacos e pesticidas.

Para evitar o problema de instabilidade da fase estacionária em soluções ácidas ou básicas, existe a possibilidade de substituir a sílica utilizada como suporte. Fases estacionárias com suportes de celulose ou polímeros de estireno-divinilbenzeno¹⁵ foram as primeiras a serem testadas, mas estas fases apresentam problemas de baixa resistência a altas pressões empregadas em CLAE. Outros suportes em uso são os óxidos inorgânicos como alumina, titânia e zircônia .

A alumina¹⁶⁻¹⁸ tem resistência mecânica comparável à sílica e maior resistência química, mas não é disponível comercialmente com tanta variedade. Uma vantagem da utilização da alumina como suporte é a sua estabilidade frente a fases móveis com pH acima de 12, podendo separar compostos básicos sem a necessidade de utilizar reagente par-iônico. Entretanto, uma desvantagem do seu uso ocorre na separação de ácidos carboxílicos, pois estes compostos se ligam irreversivelmente na sua superfície. Para separações com fase móvel em pH menores que 10 a alumina tem aplicação muito similar à sílica, entretanto, colunas de alumina apresentam menor número de pratos que as colunas de sílica.

A alumina não modificada é bastante utilizada como fase normal para separação de solutos fracamente polares. Em fase reversa, a alumina pode ser utilizada tanto com ligações covalentes de cadeias alquilas na sua superfície ou através de recobrimento superficial com uma camada de polímero. Por outro lado, fases comerciais disponíveis com este suporte são muito limitadas.

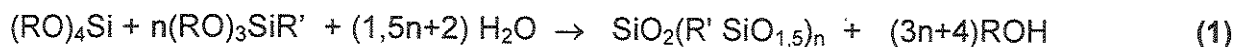
A zircônia^{16,17,19-22}, tanto porosa como não porosa, também está sendo utilizada como material de recheio ou suporte para CLAE, sendo que é quimicamente estável a pH extremos e temperaturas elevadas (maiores que 100°C), além de possuir alta resistência mecânica. O grande problema da utilização da zircônia é que a sua superfície tem sítios que são classificados como ácidos fortes de Lewis. Estes sítios ácidos são promovidos por átomos de zircônio (IV) que não estão com todas as suas ligações de coordenação completas e podem interagir com bases fortes de Lewis, como fosfatos, hidróxidos, fluoretos, e outros, produzindo picos com caudas ou até mesmo favorecendo a adsorção irreversível. Para prevenir o efeito dos sítios ácidos sobre a

superfície da zircônia, adicionam-se bases fortes de Lewis à fase móvel para competir com os grupos básicos do soluto, ou então pode-se modificar a sua superfície com fluoretos ou fosfatos.

A titânia^{17,19,23} tem as mesmas propriedades mecânicas da sílica, mas possui maior estabilidade química. É um óxido metálico anfótero que pode ser utilizado como trocador aniônico em pH ácido e trocador catiônico em pH alcalino. Em sua superfície existem os chamados grupos titanóis ácidos que, como a sílica, também adsorvem compostos básicos.

Como citado anteriormente, a sílica ainda é o óxido mais utilizado como suporte em CLAE-FR e muitos estudos vêm sendo feitos para tentar melhorar a sua estabilidade em pH extremos. Uma possibilidade é a modificação da sua superfície, aproveitando as suas propriedades favoráveis, tais como rigidez e reprodutibilidade de tamanho de poro e de partícula. A modificação superficial da sílica cromatográfica com os óxidos de magnésio²⁴, zircônio^{25,26} e titânio²⁷⁻²⁹ já foi relatada com resultados promissores, após a preparação de fases estacionárias com polímero adsorvido e imobilizado na sua superfície.

Outra possibilidade é a utilização de fases estacionárias híbridas com matriz orgânica-inorgânica. Estas fases são comercializadas pela Waters com o nome de X-Terra^{30,31} e são obtidas pela reação de um tetraalcoxissilano com um alquiltrialcoxissilano para formar um precursor, que é então utilizado para criar as partículas (reação 1):



Como resultado final obtém-se uma partícula contendo unidades inorgânicas (SiO_2) e orgânicas ($R'SiO_{1,5}$), com o grupo alquila (R') incorporado na matriz. O uso de diferentes grupos alquilas, assim como diferentes proporções dos materiais de partida, foram investigados e o material com as melhores propriedades foi aquele com composição $SiO_2(CH_3SiO_{1,5})_{0,5}$ ³⁰. As fases estacionárias quimicamente ligadas obtidas dos materiais híbridos, são mais estáveis que as fases quimicamente ligadas

convencionais e também apresentam um menor número de grupos silanóis, devido ao maior recobrimento superficial pelos grupos alquilas.

I.2.2. Fases reversas

Dentro da CLAE, estima-se que mais de 90% dos laboratórios de análise espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método que aplica a modalidade de CLAE-FR³². Esta modalidade apresenta várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa repetitividade dos tempos de retenção. Além disso, é muito aplicada na separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas.

Como as fases estacionárias para utilização como fase reversa devem apresentar caráter apolar e a superfície dos óxidos utilizados como suporte são polares, deve-se então introduzir grupos orgânicos apolares nas suas superfícies. Existem várias formas de se obterem as camadas orgânicas apolares sobre a superfície dos diferentes óxidos. O método mais comum ocorre através da introdução de monocamadas orgânicas via reação com reagentes apropriados, produzindo as chamadas fases quimicamente ligadas. Outros envolvem o recobrimento superficial dos óxidos com polímeros orgânicos.

I.2.2.1. Fases estacionárias quimicamente ligadas

A modificação da superfície da sílica e dos óxidos metálicos com a introdução de uma camada quimicamente ligada ao suporte tem como objetivo principal unir, em um só material, as propriedades químicas dos grupos orgânicos com a rigidez e a estabilidade térmica e hidrolítica do óxido inorgânico.

Existem vários procedimentos descritos para a formação de uma camada quimicamente ligada sobre a superfície de óxidos. Dentre eles, os principais são:

esterificação, cloração seguida de reação com reagente de Grignard ou composto organo-lítio e organossilanização. Outros dois procedimentos de menor importância nos dias de hoje são: organossilanização catalisada por amônia e organossilanização em fase de vapor^{33,34}. As reações mais importantes são descritas nos parágrafos a seguir.

A esterificação³⁵ foi utilizada no passado para modificar a superfície da sílica e envolve a reação de um álcool com o grupo silanol superficial, como mostrado na reação 2.



Devido a simplicidade, este método foi o primeiro a ser utilizado para obterem fases quimicamente ligadas. Entretanto, a ligação $\equiv\text{Si-O-C}$ é muito instável hidroliticamente e não pode ser utilizada com fases móveis aquosas ou alcoólicas. Por isso, estas fases foram rapidamente abandonadas.

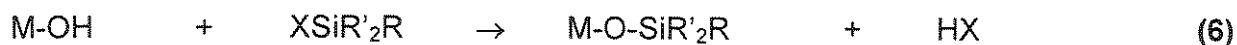
A cloração seguida de reação com reagente de Grignard ou composto organo-lítio também foi empregada³⁶ na modificação da sílica e consiste de uma etapa de cloração superficial com cloreto de tionila (reação 3), seguida pela ligação da cadeia alquila através de um reagente de Grignard (reação 4) ou um composto organo-lítio (reação 5).



Além do fato da ligação $\equiv\text{Si-C}$ ter menor estabilidade que as ligações Si-O-Si-R , formada na reação de organossilanização (descrita a seguir), o uso do reagente de Grignard ou o composto organo-lítio na síntese torna este procedimento economicamente inviável e também foi abandonado rapidamente.

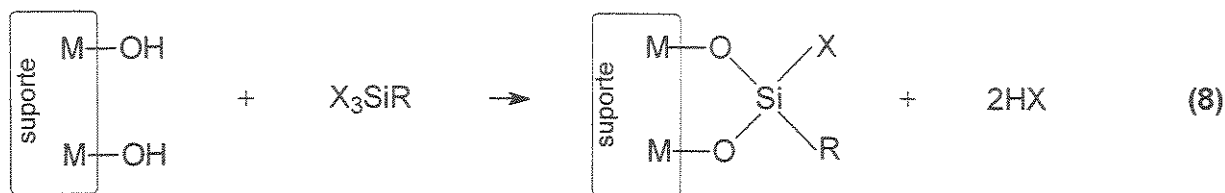
A organossilanização em condições anidras é o método mais utilizado atualmente para a modificação da superfície da sílica e dos óxidos metálicos^{20,33,36-40}.

Primeiramente, é necessário ativar os grupos hidroxilas da superfície do óxido através de aquecimento, removendo as moléculas de água ligadas à superfície do óxido por ligações de hidrogênio. Em seguida, promove-se a reação entre um organossilano monofuncional e os grupos hidroxilas superficiais, como mostrado na reação 6, onde M pode ser Si, Al, Ti ou Zr. O agente silanizante é representado por $\text{XSiR}'_2\text{R}$, onde X representa o grupo funcional reativo, que usualmente é um cloreto ou um grupo alcóxido (etoxi ou metoxi), R pode ser uma cadeia alifática ou uma cadeia alifática com grupos polares terminais, que se deseja introduzir no suporte, e R' geralmente é um grupo metila. Em fase reversa, R representa as cadeias C-8 e C-18, que são as mais utilizadas, sendo que cadeias de C-1 a C-30 também são encontradas⁴¹. Em fase normal, utiliza-se geralmente grupos terminais ciano ou amino ligados a uma cadeia alifática curta. As fases assim produzidas são comumente chamadas fases "tipo escova"⁴² ou fases "monoméricas"⁴³.



Reação similar, em condições anidras, também pode ser obtida utilizando reagentes difuncionais e trifuncionais, representados por $\text{X}_2\text{SiR}'\text{R}$ e X_3SiR , respectivamente, mas, neste caso, as condições da reação devem ser muito bem controladas, evitando principalmente a presença de água, que pode hidrolisar o agente silanizante, ocorrendo reações de condensação ou entrecruzamento entre os reagentes silanizantes. A reação pode acontecer entre um ou dois grupos hidroxilas do suporte, como mostrado nas reações 7 e 8. Em uma etapa final, os grupos X residuais são hidrolizados, produzindo outros grupos $\equiv\text{Si-OH}$.





O grande problema das reações 6, 7 e 8 é que não se consegue reagir todos os grupos hidroxilas superficiais, devido aos impedimentos estéricos. Para resolver este problema e eliminar os grupos hidroxilas residuais, promove-se mais uma reação posterior de silanização com um reagente organossilano com cadeias laterais pequenas como o clorotrimetilsilano. Este procedimento é chamado de capeamento^{44,45}. Com o capeamento consegue-se reduzir substancialmente o número de silanóis residuais, mas não totalmente. Apesar dos inconvenientes, as colunas obtidas com estas fases apresentam alta eficiência.

Outra forma de melhorar a estabilidade das fases estacionárias quimicamente ligadas é utilizar as chamadas fases estacionárias estericamente protegidas^{10,46}. Neste tipo de fase estacionária o reagente organossilano, além de possuir a cadeia alquila lateral que se deseja introduzir na fase estacionária, também tem dois grupos alquilas volumosos como o isobutil, que promovem a proteção dos grupos silanóis (Figura 2). Neste caso, obtêm-se um menor recobrimento do suporte devido a limitação estérica durante a reação de silanização, exibindo assim menor retenção dos solutos quando comparado com as fases estericamente não protegidas com mesma cadeia alquila lateral. Por outro lado, os silanóis são bem menos disponíveis para interagir com os solutos presentes na fase móvel, não necessitando de reação de capeamento para obter uma fase estacionária capaz de separar os compostos básicos sem cauda.

Dentre as variadas estruturas mostradas na literatura de fases estacionárias quimicamente ligadas, vem se destacando aquelas provenientes de reagentes silanizantes contendo grupos polares inseridos no meio das cadeias alquilas, por exemplo, um reagente como $\text{XSiR}_2(\text{CH}_2)_3\text{Y}(\text{C}_8\text{H}_{17})$ ou $\text{XSiR}_2(\text{CH}_2)_3\text{Y}(\text{C}_{18}\text{H}_{37})$, sendo que Y representa grupos de amido, uréia, carbamato ou amina⁴⁷⁻⁵¹. Estas fases exibem diferentes seletividades para compostos polares, são estáveis e reprodutíveis em fases móveis altamente aquosas e promovem picos bastante simétricos para compostos

básicos⁵². Uma vantagem da utilização destas fases, em comparação com as fases que possuem somente cadeias alquílicas, está relacionada com a necessidade de menor concentração de modificador orgânico na fase móvel. Com a presença do grupo polar na fase estacionária, e dependendo do soluto que se deseja separar e das condições da fase móvel, o mecanismo de retenção pode ocorrer por partição, troca-iônica ou ainda interações dipolo-dipolo^{50,53}.

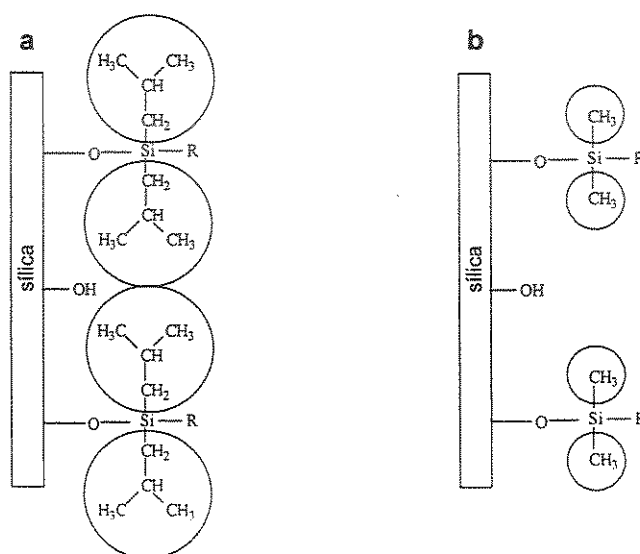


Figura 2. Fases estacionárias quimicamente ligadas: a) estericamente protegida por grupo volumoso e b) não protegida.

O grande problema destas fases está relacionado com a sua baixa estabilidade em pH extremos, quando comparada com as fases que possuem somente cadeias alquílicas longas. Para resolver este problema Kirkland et al. desenvolveram uma fase estacionária com grupos carbamatos no meio da cadeia alquílica e ainda estericamente protegidas com grupos isopropilas, como mostrado na Figura 3⁴⁹.

Fases estacionárias com cadeias alquílicas quimicamente ligadas a zircônia (ZrO_2)^{16,17,19-22}, titânia (TiO_2)^{17,19,54-57} e alumina (Al_2O_3)¹⁶⁻¹⁸ também já foram preparadas e testadas. Os seus desempenhos são somente razoáveis comparadas com as fases baseadas em sílica, devido a problemas de reprodutibilidade na produção das partículas do suporte e no rendimento da reação de derivação. A estabilidade hidrolítica

da ligação Si-O-M das fases quimicamente ligadas, em relação à hidrólise, diminui na seguinte sequência de M: Si >> Ti ~ Zr >> Al. Devido a isso, o método mais promissor de modificar a superfície de alumina, titânia e zircônia é o recobrimento com um polímero⁵⁸.

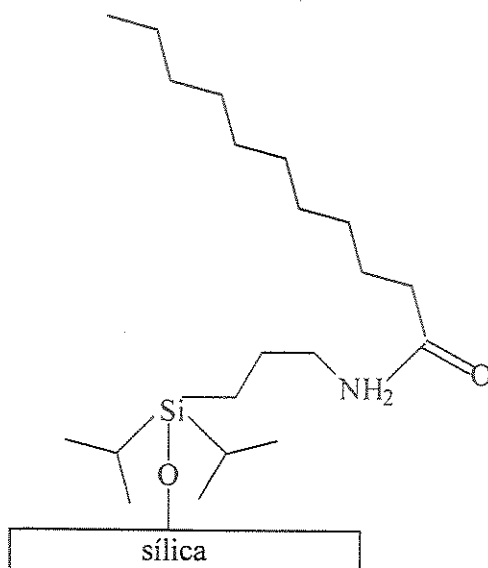
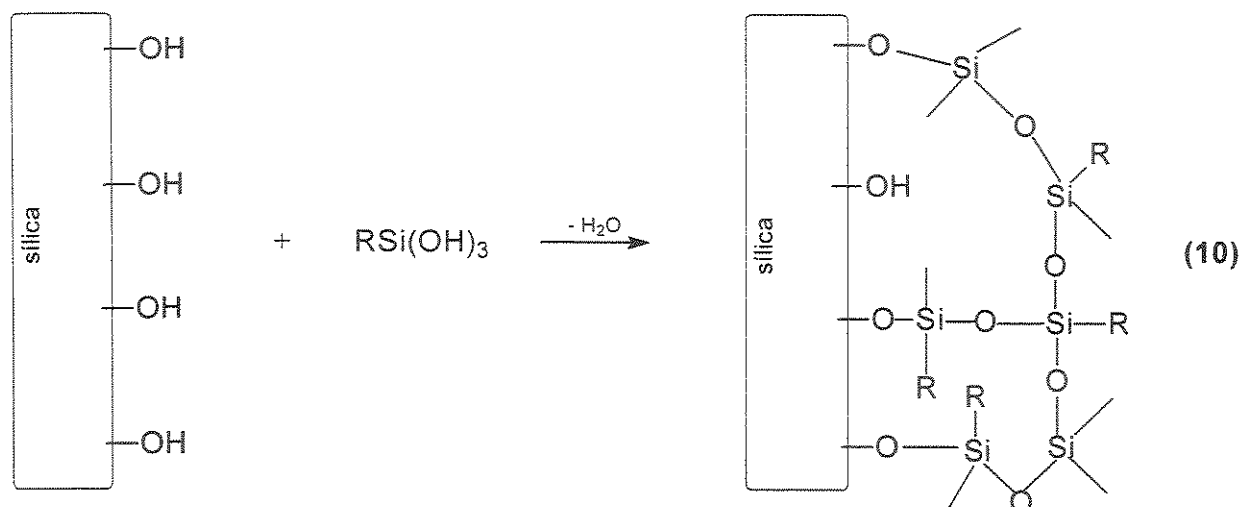
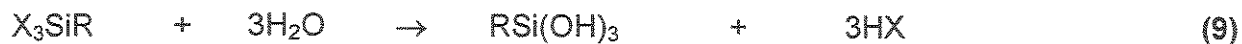


Figura 3. Estrutura da fase estacionária diisopropil-álquil-amida⁴⁹.

A reação de organossilanização na superfície do óxido também pode ser feita na presença de água³³, utilizando reagentes silanizantes difuncionais ou trifuncionais. Neste caso, ocorre inicialmente uma pré-hidrólise do agente silanizante (reação 9), formando grupos silanóis, os quais posteriormente reagem com os grupos silanóis da molécula vizinha e também com os grupos hidroxilas da superfície do suporte (reação 10). Nesta reação se estabelecem as ligações do tipo siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$) com a eliminação de água (condensação). Assim, o processo é constituído de reações do reagente silanizante em todas as direções, formando uma rede tridimensional sobre a superfície da sílica. Este tipo de fase estacionária quimicamente ligada é frequentemente chamada fase "polimérica"⁴³. Além de serem mais espessas, as fases obtidas com este tipo de reação apresentam maior estabilidade hidrolítica em comparação com as fases produzidas na reação 6.



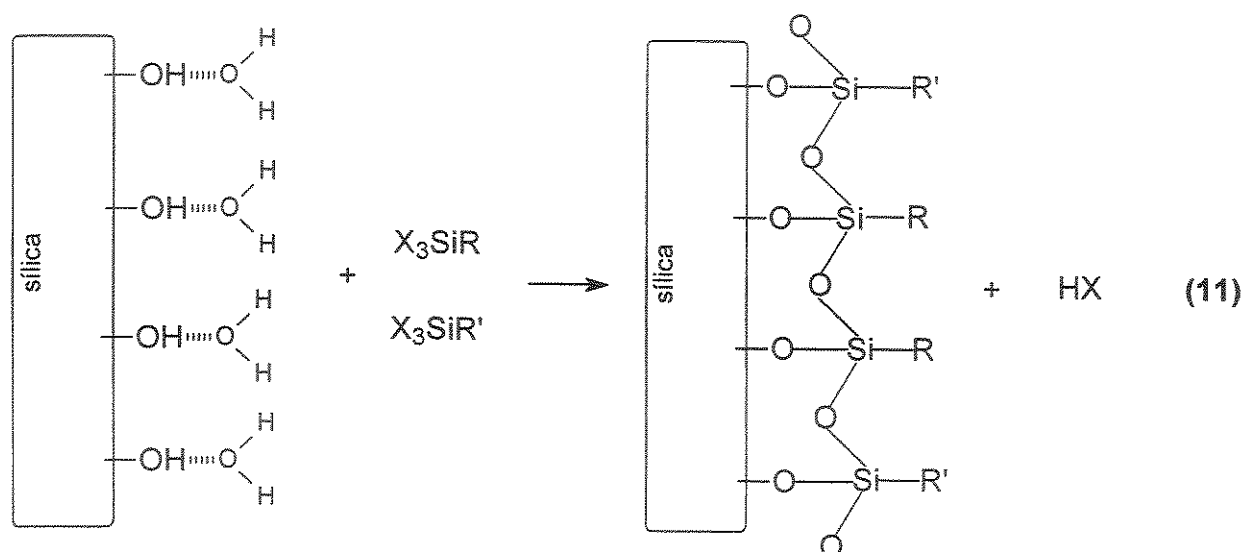
O maior problema encontrado neste processo é a dificuldade de se controlar a reação de entrecruzamento e a espessura da camada resultante, tornando o processo pouco reprodutível, sendo raramente formada uma camada uniforme sobre o suporte. A formação de camadas muito espessas sobre o suporte cromatográfico leva a fases estacionárias com baixo desempenho cromatográfico, devido ao problema da transferência de massa e consequente baixa eficiência.

Um trabalho recente mostrou a preparação de uma fase reversa para CLAE utilizando a reação de organossilanização na presença de água, constituída de polissiloxanos com cadeias alifáticas variadas (C-28 a C-42) sobre a superfície de sílica para a utilização na separação de carotenóides⁵⁹.

Um novo conceito para a obtenção de monocamadas sobre partículas de sílica foi criado por Wirth e Fatunmbi⁶⁰ nos últimos anos. O método é baseado na reação de silanos trifuncionais restrita à superfície do suporte.

O motivo do entrecruzamento restrito à direção horizontal está relacionado com a presença de água somente adsorvida na superfície do suporte durante a reação de organossilanização. Durante a reação, os reagentes trifuncionais são ligados um ao lado do outro e também à superfície da sílica, formando um filme ordenado e denso, denominado monocamada auto-organizada ("self-assembled monolayer"), como

mostrado na reação 11, na qual R é um grupo pequeno, como o metil e R' é um grupo maior como C-8 ou C-18.



Este entrecruzamento horizontal difere do entrecruzamento por organossilanização convencional em dois aspectos: primeiro, a monocamada é obtida de uma mistura de reagentes triclorofuncionais, que leva a uma monocamada contendo uma pequena quantidade dos grupos maiores, promovendo uma seletividade parecida com a das fases monoméricas. Segundo, a polimerização usa a água intrinsecamente adsorvida na superfície da sílica. A quantidade de água utilizada neste método é muito menor e pode ser controlada de forma reprodutível⁶¹. Como não há água em solução, o entrecruzamento ocorre somente quando os reagentes entram em contato com a superfície do suporte. Assim, estas fases estacionárias mostraram alta estabilidade hidrolítica e baixa atividade dos grupos silanóis superficiais⁶².

Para evitar limitações estéricas durante a reação, promoveu-se o entrecruzamento horizontal com uma mistura de organossilanos trifuncionais com cadeias alifáticas C1 e C18⁶³ como mostrado na Figura 4. A mistura promoveu uma barreira sólida imediatamente sobre a superfície da sílica. A distribuição do grupo C-18 sobre a superfície é controlada pelos grupos C-1, que atuam como espaçadores, proporcionando melhor interação dispersiva entre as longas cadeias alifáticas e o soluto. A monocamada orientada também promove uma barreira entre a fase móvel e a

superfície da sílica, impedindo a troca de prótons entre os silanóis residuais e a fase móvel e consequentemente reduzindo a formação de cargas superficiais. Estas fases foram submetidas a testes de estabilidade e se mostraram bastante resistentes tanto a fases móveis ácidas como básicas. A concentração dos grupos octadecil (C-18) pode ser ajustada variando a proporção dos reagentes organossilanos C-1 e C-18.

No início a maior dificuldade encontrada com este tipo de fase estacionária estava relacionada com a repetitividade de sua obtenção. Isto foi resolvido pelo controle da umidade da superfície da sílica antes de iniciar a reação⁶². Estas fases já foram bastante caracterizadas por métodos físicos e químicos nos últimos anos, não restando nenhuma dúvida da formação desta estrutura de monocamada auto-organizada.

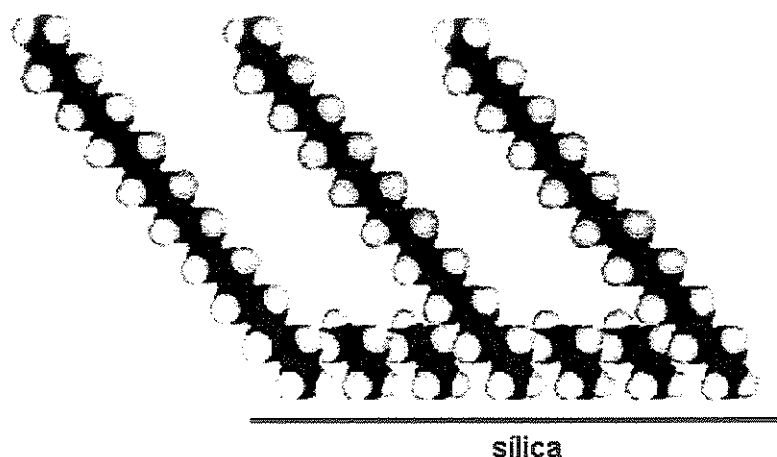
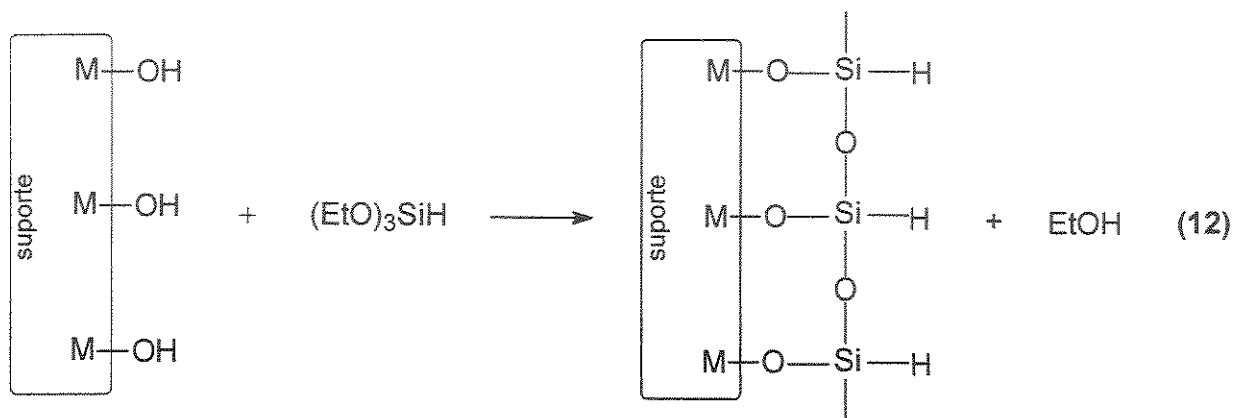


Figura 4. Representação esquemática da fase estacionária obtida pela polimerização horizontal de uma mistura de organossilanos com cadeias alifáticas C-1 e C-18⁶³.

Outro método, denominado recobrimento com hidreto intermediário, produz uma monocamada superficial de polissiloxanos com cadeias laterais alquilas em duas etapas. Primeiramente uma monocamada superficial de polissiloxano com grupamentos hidretos ($\equiv\text{Si-H}$) é produzida pela silanização da superfície do óxido inorgânico com o produto de hidrólise do trietoxissilano (TES) (reação 12). Logo após, hidrocarbonetos terminalmente insaturados, como o 1-octadeceno, são ligados ao polissiloxano na presença de um catalisador apropriado (reação 13).



Apesar da complexidade, este método produz um recobrimento de alta densidade de cadeias alquilas sobre o suporte, devido a pequena limitação estérica durante a reação de introdução destas cadeias sobre a superfície. Com a ligação $\equiv\text{Si}-\text{C}$ embutida, este recobrimento também proporciona uma alta estabilidade hidrolítica destas fases⁶⁴.

A formação da monocamada com hidretos ($\equiv\text{Si}-\text{H}$) sobre a superfície dos óxidos modificada com o TES é influenciada pela razão $\text{TES}/\text{OH}_{\text{superficial}}$. Quando esta razão for maior que 1 pode ocorrer uma maior polimerização do TES sobre a superfície, proporcionando o aparecimento de camadas mais espessas que podem interferir na eficiência cromatográfica⁶⁵.

1.2.2.2. Fases estacionárias com polímeros adsorvidos e imobilizados sobre o suporte

1.2.2.2.1. Caracterização das fases estacionárias

Nas últimas décadas, recobrimentos de suportes óxidos com polímeros têm se tornado um método de grande importância na preparação de fases estacionárias para CLAE-FR. Levando em consideração o desenvolvimento de fases estacionárias com camadas muito finas de polímeros (monocamadas), é óbvio que a diferença na velocidade de transferência de massa dos solutos nas fases modernas com polímeros e nas quimicamente ligadas estão ficando cada vez mais desprezíveis. A preparação destas fases estacionárias foi tão bem sucedida que atualmente inúmeras delas estão sendo comercializadas.

O objetivo de produzir fases com polímeros recobrindo um suporte é combinar a resistência mecânica da matriz inorgânica com a seletividade e inércia química dos polímeros orgânicos.

As principais vantagens das fases com polímeros sobre as quimicamente ligadas são: maior recobrimento dos sítios ativos do suporte e a possibilidade de maior seletividade da fase estacionária pela escolha do polímero apropriado. A seletividade é influenciada pela natureza e quantidade de grupos funcionais nas cadeias dos polímeros, pela espessura do filme polimérico e pela área superficial e estrutura de poros do suporte. A imensa variedade de polímeros orgânicos disponíveis possibilita preparar fases com uma grande faixa de seletividade.

A imobilização de polímeros sobre um suporte poroso é um processo complexo, influenciado pela contribuição dos diferentes tipos de interações entre o suporte e o polímero, entre as moléculas adjacentes na superfície do suporte, e também, pela solubilidade do polímero nas fases móveis. Não só as propriedades cromatográficas do composto polímero-suporte mas também o processo de imobilização do polímero são influenciados pelas propriedades do suporte. Portanto, a escolha do suporte com propriedades adequadas é de fundamental importância na preparação das fases com polímeros.

Existem vários tipos de recobrimentos. Uma forma de produzir o cobrimento polimérico consiste na polimerização de monômeros *in situ*⁶⁶, embora o procedimento mais comum usado em cromatografia consiste da adsorção física de um polímero previamente sintetizado, com composição química bem definida, sobre o suporte. Pode ocorrer um processo posterior de imobilização por reticulação (ligações cruzadas),

induzidas por peróxido⁶⁷⁻⁷¹, tratamento térmico^{68,72,73}, radiação ionizante- γ ^{66,67,74} e outras, ou ainda promover a ligação covalente entre o polímero e o suporte, produzindo uma monocamada ancorada⁶⁶. Neste último caso, o polímero deve apresentar grupos funcionais específicos ou reativos para se ligar ao suporte.

Entre os polímeros já utilizados estão o poli(etileno)^{75,76}, o poli(butadieno)^{16,68,77-88}, o poli(estireno)^{89,90}, o poli(dimetilsiloxano)⁷¹, o poli(metiloctilsiloxano)^{66-68,72,74,91,92} e o poli(metiloctadecilsiloxano)^{67,68,92}. Também são utilizados poliéteres, polissacarídeos, poliaminas, polinucleotídeos, poliamidas e proteínas. Dentre os suportes utilizados na preparação de fases estacionárias com polímeros estão a sílica^{16,67,69,75-78,87,88,91-99}, a zircônia^{16,20,75,76,81-86,89-90,100,101}, a titânia⁸⁶ e a alumina^{17,69,71,79,80,100}.

A forma mais simples de preparar o compósito suporte-polímero é pela deposição de uma camada polimérica sobre a superfície do suporte, sem promover a reticulação entre as cadeias do polímero e também sem a ligação química entre o polímero e o suporte. Neste caso ocorre uma contribuição de um ou mais tipos de interações como dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre as cadeias do polímero e o suporte. A insolubilidade do polímero na fase móvel também é importante neste tipo de fase.

Duas formas bem diferentes são as mais utilizadas para colocar o polímero sobre o suporte. Na primeira, mistura-se o polímero em solução com o suporte e posteriormente evapora-se o solvente e, na segunda, promove-se a polimerização *in situ* de monômeros em solução sobre o suporte. A espessura do recobrimento nos dois casos pode ser controlada pela quantidade de polímero ou monômero no processo de deposição.

Mao e Fung⁷¹ obtiveram uma fase reversa para CLAE pela copolimerização *in situ* de ácido maleico e 1-octadeceno sobre a superfície de alumina. O copolímero foi reticulado com 1,4-divinilbenzeno. A interação do ácido carboxílico sobre a superfície da alumina é muito forte, ocorrendo um ancoramento do filme polimérico pela formação de duas ligações de hidrogênio fortes com a superfície para cada grupo carboxílico do polímero. A monocamada resultante propiciou estabilidade química à fase estacionária tanto em meio ácido como básico.

Li et al.¹⁰² estudaram os fatores que influenciam a deposição de poli(butadieno) (PBD) sobre zircônia porosa. Eles utilizaram peróxido de dicumil como agente de reticulação do polímero. Foi mostrado que o processo de deposição do polímero é influenciado pela velocidade de evaporação do solvente da solução, pela afinidade do polímero pela superfície do suporte e pela interação polímero-solvente. Em outro estudo¹⁰³ comparou-se a adsorção do PBD, também reticulado com peróxido de dicumil sobre sílica, alumina ou zircônia, e concluiu-se que estas fases apresentam comportamentos cromatográficos similares, embora a fase baseada em zircônia apresente sítios ácidos fortes de Lewis que não são protegidos pelo recobrimento.

Fases estacionárias para a separação de isômeros foram obtidas pela adsorção de polivinilamina^{104,105} ou o copolímero de vinilamina/álcool vinílico¹⁰⁶, reticulados sobre sílica. Após a reticulação foram introduzidas ciclodextrinas quimicamente ligadas às cadeias do polímero para promoverem a separação dos isômeros geométricos.

Recentes trabalhos em nosso Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LABCROM) utilizaram líquidos poliméricos, tais como o poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) ou o poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS), que se encontram adsorvidos, isto é, depositados, e depois imobilizados dentro dos poros da sílica cromatográfica nua. As fases estacionárias preparadas utilizando este método apresentaram propriedades cromatográficas similares às colunas comerciais recheadas com fases estacionárias contendo os mesmos grupos alquilas⁹²⁻⁹⁷.

Entre os resultados interessantes obtidos nesta pesquisa, um estudo da distribuição do PMOS líquido nos poros, quando os poros não estão cheios, indicou que ela não é uniforme; o líquido encontra-se preferencialmente distribuído em gotas ou "plugs" ⁹³. Esta distribuição é explicada como resultado do fenômeno de "instabilidade de Raleigh" no qual é energeticamente desfavorável para um líquido atingir uma configuração em uma grande área, tal como uma camada fina depositada na superfície dos poros da sílica, quando existe a opção da formação de "plugs" ⁹³. Quando uma certa quantidade do PMOS é sorvida nos poros da sílica como "plugs" e, depois de um certo período de repouso, as partículas de sílica contendo este líquido são submetidas a uma extração com um solvente forte, tal como CH₂Cl₂, somente uma porção do polímero é extraída, a restante está seguramente fixa nos poros^{92,107}. Desde que o

polímero livre é muito solúvel neste solvente, os resultados indicam que uma porção do polímero torna-se firmemente adsorvida, isto é, auto-imobilizada, com fortes atrações à superfície do suporte, de uma maneira útil para fins cromatográficos¹⁰⁷. A adsorção ocorre em muitos pontos de contato entre a superfície da sílica e a molécula longa (linear) do polissiloxano¹⁰⁸. Isto leva a um novo modelo desta fase estacionária com o polímero adsorvido, no qual o esqueleto de siloxano está espalhado dentro dos poros, acima da superfície da sílica, com os grupos octil estendidos para o centro do poro⁹⁸. Sendo assim, a estrutura da fase estacionária de PMOS adsorvido é formalmente similar à estrutura das fases estacionárias convencionais quimicamente ligadas, com os grupos octil estendidos para o centro do poro. Por outro lado, a estrutura da monocamada da fase estacionária quimicamente ligada tem um aspecto diferente desta estrutura, ou seja, a distribuição dos grupos alquilas é de baixo grau de organização na superfície, sendo que a reação de derivação tem um rendimento que implica em reação com, no máximo, 30 a 45% dos grupos silanóis disponíveis¹⁰⁹, dando um caráter não regular à superfície da sílica amorfa derivada. No caso do espalhamento das moléculas longas de PMOS (ou outro polímero com estrutura linear), os grupos alquil estão localizados, com regularidade, na cadeia do siloxano e existe um alto grau de organização inerente no sentido compacto ao longo do esqueleto da molécula. Isto deve ser refletido em propriedades físicas e cromatográficas diferentes, potencialmente favoráveis, para o caso das fases preparadas com polissiloxanos.

Outros trabalhos realizados no LABCROM envolvem a utilização de sílicas com suas superfícies modificadas. A reação de sílica com tetrabutóxido de zircônio resulta em sílica zirconizada ($\equiv\text{Si-O-ZrO}_x$)^{25,26}, enquanto a reação de sílica com tetrabutóxido de titânio ou tetracloreto de titânio produz sílica titanizada ($\equiv\text{Si-O-TiO}_x$)²⁷⁻²⁹. Estes dois novos suportes foram recobertos com PMOS pelo método de evaporação do solvente. Os resultados indicam que a adsorção encontrada com a sílica nua, isto é, a atração forte entre o polímero e a superfície¹⁰⁷, não é obtida com os suportes de sílica modificada com zircônio ou titânia e o líquido polimérico se arrasta lentamente com a passagem da fase móvel. Por outro lado, a imobilização por radiação gama²⁵⁻²⁹ mostrou-se muito efetiva com os suportes de sílica com superfícies modificadas. Testes

de estabilidade destas fases estacionárias, feitos pela passagem de volumes controlados de fase móvel, indicam que as fases estacionárias com PMOS imobilizado por radiação gama sobre a superfície da sílica zirconizada²⁶ ou a sílica titanizada²⁸ apresentam estabilidade cromatográfica igual ou melhor que as fases comerciais quimicamente ligadas.

Um resultado significativo obtido com estas fases estacionárias preparadas com as sílicas modificadas, com uma camada de PMOS imobilizada sobre as suas superfícies, é a sua estabilidade frente a fases móveis de pH elevado. Utilizando o desempenho cromatográfico como ferramenta de avaliação, não foi observado comportamento que indicasse degradação da sílica derivatizada com a passagem de volumes significativos de fases móveis básicas. Isto sugere que uma aplicação destas fases estacionárias seria na separação de compostos básicos utilizando fases móveis de pH elevado^{26,28}.

Outra forma de melhorar a estabilidade da fase estacionária é promovendo o ancoramento (ligação química) do polímero sobre o suporte. A ligação química entre o recobrimento polimérico e o suporte pode ocorrer de duas formas diferentes. Na primeira, uma reação de ligação é induzida após a deposição do polímero sobre o suporte^{110,111}. Neste caso deve haver grupos reativos específicos no polímero e no suporte para ocorrer a ligação covalente, caso isso não ocorra, deve-se introduzi-los. Na segunda, a ligação ocorre no momento da polimerização de monômeros sobre o suporte. Um exemplo deste procedimento é a reação de organossilanização na presença de água, descrita previamente⁶⁰⁻⁶².

São poucas as fases com polímeros quimicamente ligados ao suporte descritas na literatura. Duas delas foram preparadas para utilização como fase reversa e foram obtidas pelo recobrimento de sílica com copolímeros baseados em vinilmetildietoxissilano^{110,111}. Os copolímeros foram ligados à superfície da sílica através de ligações covalentes entre os grupos silanóis da sílica e o grupo etoxissilil dos copolímeros.

Novas fases reversas para CLAE também estão sendo desenvolvidas baseadas no recobrimento da superfície da sílica com líquidos cristalinos de baixa ou de alta

massa molar. Líquidos cristalinos representam um estado da matéria intermediário entre um sólido cristalino e um líquido isotrópico.

A imobilização destes líquidos cristalinos sobre o suporte pode ser feita de várias formas, dependendo dos grupos funcionais presentes nestes compostos. A imobilização mais frequente é feita pela ligação química do suporte com um reagente clorossilano modificado com o líquido cristalino, promovendo uma monocamada¹¹². O método de hidreto intermediário também é muito utilizado para a imobilização dos líquidos cristalinos de baixa ou de alta massa molar¹¹³.

Delaurent et al.¹¹⁴ produziram e caracterizaram uma fase estacionária constituída de cloroformato colestérico quimicamente ligado à aminopropil sílica através de uma ligação carbamato. Esta fase se mostrou bastante eficiente na separação de hidrocarbonetos aromáticos e também apresentou seletividade diferente das fases monoméricas C-18 convencionais.

Mais recentemente, um trabalho mostrou a configuração de quatro fases estacionárias diferentes com o mesmo líquido cristalino¹¹². As duas primeiras fases foram obtidas pela ligação química do líquido cristalino “longitudinalmente” e “lateralmente” à superfície da sílica (Figura 5). Nas outras duas, o líquido cristalino foi ligado “longitudinalmente” e “lateralmente” a um polissiloxano (Figura 6) que posteriormente foi depositado sobre a superfície da sílica pelo método de evaporação do solvente.

Foi mostrado que a seletividade destas fases estacionárias é altamente dependente da forma do líquido cristalino. Entre as fases estudadas, aquelas com o líquido cristalino fixado “lateralmente” ao polissiloxano apresentaram o melhor desempenho cromatográfico na separação de hidrocarbonetos aromáticos.

Um novo conceito de obtenção de fases estacionárias baseadas na combinação da técnica de adsorção polimérica sobre um suporte com o conceito de mistura funcional foi proposta por Kanda et al.^{115,116}. Estas fases são constituídas de grupos hidrofílicos intercalados com grupos hidrofóbicos presos a uma mesma monocamada de polímero depositada sobre a superfície da sílica. Estas fases foram preparadas com o objetivo de serem utilizadas na análise direta de fluídos biológicos.

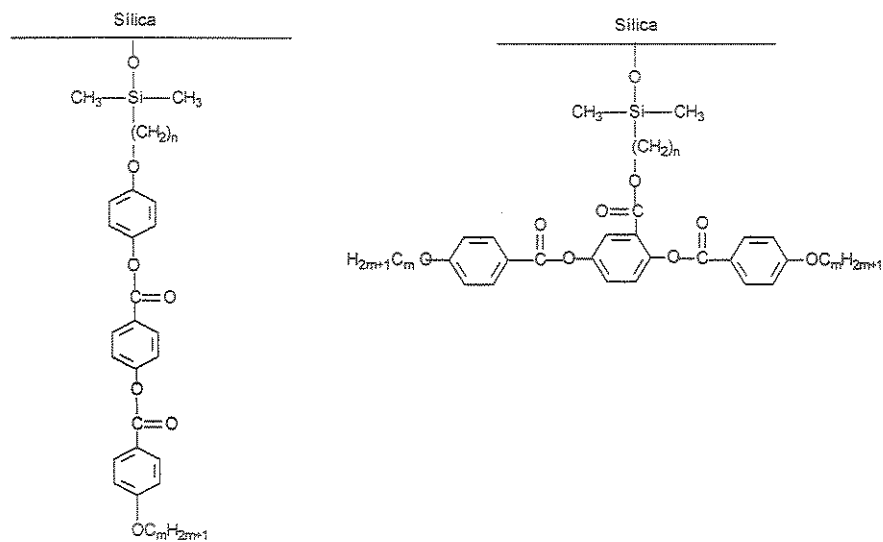


Figura 5. Líquido cristalino ligado longitudinalmente e lateralmente à superfície da sílica.

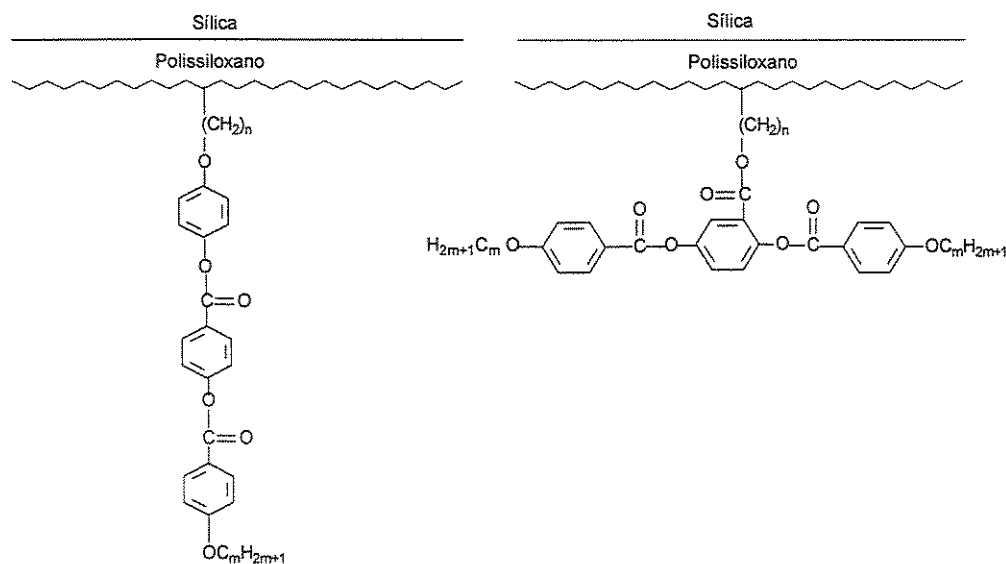
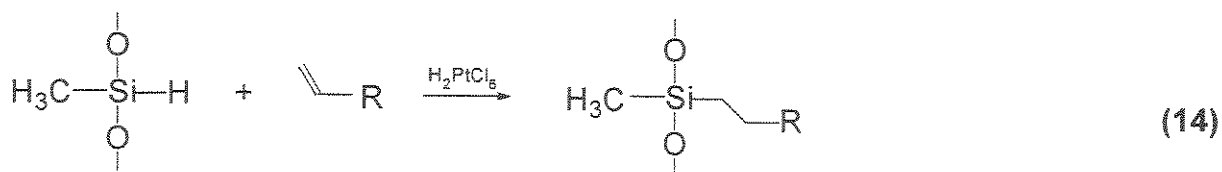


Figura 6. Líquido cristalino ligado longitudinalmente e lateralmente ao polissiloxano.

Para a preparação destas fases, primeiro deposita-se uma monocamada de polissiloxano através da reação de grupos hidretos (Si-H) sobre a superfície do suporte e, posteriormente, introduz-se os grupos hidrofóbicos (metil, fenil e octadecil) e

hidrofílicos (polioxietileno) na cadeia polimérica através de reação com um alqueno terminal, com auxílio de um catalisador apropriado (reação 14).



Três exemplos destas fases estacionárias são mostrados na Figura 7¹¹⁶, na qual o grupo hidrofílico para todas é o polioxietileno e os grupos hidrofóbicos são o metil, octil e fenil.

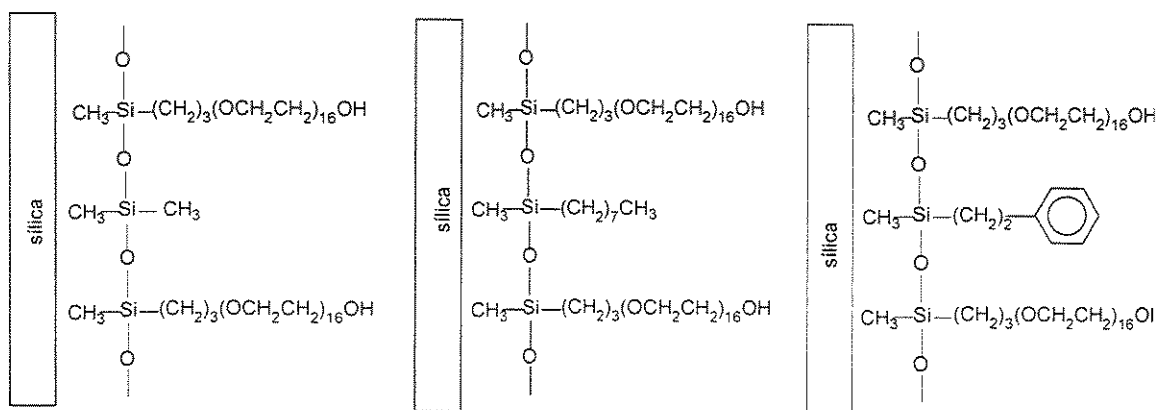


Figura 7. Representação esquemática de três fases estacionárias obtidas pela deposição de um polímero com mistura funcional¹¹⁶.

1.2.2.2.2. Tipos de imobilização de polímeros sobre suportes óxidos

Existem várias formas de promover a imobilização de polímeros sobre suportes de óxidos metálicos. Os mais utilizados e citados na literatura são: tratamento térmico com ou sem a presença de agentes geradores de radicais^{68, 72, 117, 118}, uso de radiação de alta energia (gama)^{68, 97, 98, 118} ou uso de reagentes químicos específicos indutores de

ligações cruzadas^{68,118}. Além destas, existem outras possibilidades em estudo no LABCROM, como microondas e auto-imobilização.

1.2.2.2.1. Tratamento térmico

Os primeiros trabalhos citando o uso do tratamento térmico para imobilizar polímeros em um suporte cromatográfico utilizavam o aquecimento na presença de agentes geradores de radicais, como azo-*t*-butóxido, dicumilperóxido ou alilmetacrilato, para produzir ligações cruzadas e consequentemente imobilização do polímero^{91,118,119}.

O uso da imobilização térmica de polímeros sobre suportes cromatográficos sem a presença dos geradores de radicais também foi mostrado por alguns autores. Entre os estudos pode-se citar o de Schomburg et al.⁶⁸, que imobilizaram polissiloxanos sobre sílica pelo aquecimento a 180°C, e em um estudo mais recente⁷³, foram estudadas temperaturas de 20°C até 280°C e foi mostrado que as fases preparadas com temperatura de imobilização até 120°C promovem a formação de uma monocamada sobre o suporte e estas fases produzem colunas eficientes para CLAE. Já as fases imobilizadas a temperaturas maiores que 180°C promovem a formação de bicamadas sobre a superfície do suporte, mas as colunas obtidas com estas fases não se mostraram apropriadas para o uso cromatográfico.

1.2.2.2.2. Microondas

A radiação de microondas localiza-se no espectro eletromagnético, na região de 30 GHz a 300 MHz (comprimento de onda de 1 cm a 1 m). Como uma grande faixa desta radiação é utilizada em radares e em telecomunicações, os equipamentos comerciais de microondas são restritos a comprimentos de onda de 12,2 cm ou 33,3 cm (2,45 GHz ou 900 MHz, respectivamente) evitando assim problemas de interferência. Os microondas domésticos utilizam geralmente 2,45 GHz.

Este tipo de radiação começou a ser utilizada para fins de pesquisa em meados da década de 80¹²⁰. É um tipo de energia não ionizante que causa movimento

molecular pelos fenômenos de migração iônica e rotação dipolar. A migração iônica é uma forma de migração condutiva (eletroforética) de íons dissolvidos em um campo elétrico aplicado. De forma geral, os parâmetros que afetam a condução iônica são a concentração, a mobilidade dos íons e a temperatura da solução^{121,122}. A rotação dipolar é originada quando o campo elétrico da energia microondas aumenta, ocorrendo um alinhamento das moléculas polarizadas do meio. Quando o campo decresce, devido a oscilação do mesmo, as moléculas inicialmente polarizadas retornam, pela própria agitação térmica, ao estado inicial de desordem, produzindo assim, uma energia associada. Em uma frequência aplicada de 2,45 GHz, o alinhamento e a desorganização das moléculas ocorrem cerca de 5×10^9 vezes por segundo, o que proporciona um aquecimento muito rápido.

A radiação eletromagnética de microondas não tem energia suficiente para romper ligações químicas, mas o aquecimento rápido induzido por ela, pode ser utilizada na imobilização de polímeros sobre suportes cromatográficos de forma mais rápida. Já foram concluídos alguns trabalhos com este objetivo no LABCROM, com resultados que mostraram a obtenção de fases estacionárias eficientes para utilização em CLAE^{123,124}.

1.2.2.2.3. Radiação gama

A radiação gama é uma radiação eletromagnética de origem nuclear, de alta energia, o que lhe confere um grande poder de penetração e uma alta capacidade de interagir com espécies atômicas ou moleculares¹²⁵. É devido a estes fatores e também a ausência de produtos de decomposição do agente iniciador que a radiação gama tornou-se um indutor excelente, em forma de energia, para iniciar um processo químico.

As fontes de radiação gama mais acessíveis são as que contêm os radionuclídeos cobalto-60 e cério-137. Apesar do tempo de meia-vida do cério-137 ser maior que o do cobalto-60, este último é preferido por liberar raios gamas mais energéticos.

Quando a radiação gama incide na matéria, ocorrem processos tais como excitação eletrônica e ionização. As moléculas excitadas ou ionizadas podem sofrer

cisões ou reagirem com outras espécies, através de radicais livres ou íons, produzindo novas substâncias químicas. Assim, o efeito mais marcante da radiação gama em polímeros é a formação de produtos menores (degradação) ou maiores (entrecruzamento)¹²⁶.

Já foi demonstrado na literatura que amostras de poli(dimetilsiloxanos), quando submetidas a radiação gama, sofrem um aumento de viscosidade¹²⁷, como consequência do entrecruzamento e do aumento da massa molar. A radiação gama pode produzir sítios ionizados e excitados na sílica, os quais podem reagir com as cadeias do polímero, produzindo ligações químicas. Assim, tanto o entrecruzamento como a ligação química do suporte trazem como resultado a imobilização.

I.2.2.2.2.4. Auto-imobilização

Alguns trabalhos recentes^{73,107} mostraram que polissiloxanos adsorvidos sobre partículas de sílica sem nenhum agente indutor de imobilização sofrem um processo denominado “auto-imobilização”, ou seja, a quantidade de polímero imobilizado no suporte aumenta com o passar do tempo mesmo a temperatura ambiente, que, provavelmente, deve ser o resultado de um rearranjo das moléculas do polímero produzindo uma configuração mais favorável de adsorção com a superfície do suporte, sendo este processo dependente do tempo. Isto foi comprovado em um estudo cinético, em que uma fase estacionária baseada em PMOS adsorvido sobre sílica foi submetida a um procedimento de extração do polímero não imobilizado em períodos variados de tempo, que mostrou que a quantidade de polímero retido aumenta com o tempo, como mostrado na Figura 8.

I.3. Enchimento de colunas cromatográficas

O objetivo das diferentes técnicas de enchimento de colunas é obter um leito cromatográfico homogêneo, denso, estável, reprodutível, capaz de gerar um alto desempenho cromatográfico e um tempo de vida longo da coluna.

Existem diversos métodos de enchimento de colunas, dentre eles, os mais importantes são: enchimento a seco, com compressão da suspensão, por sedimentação e por suspensão a alta pressão.

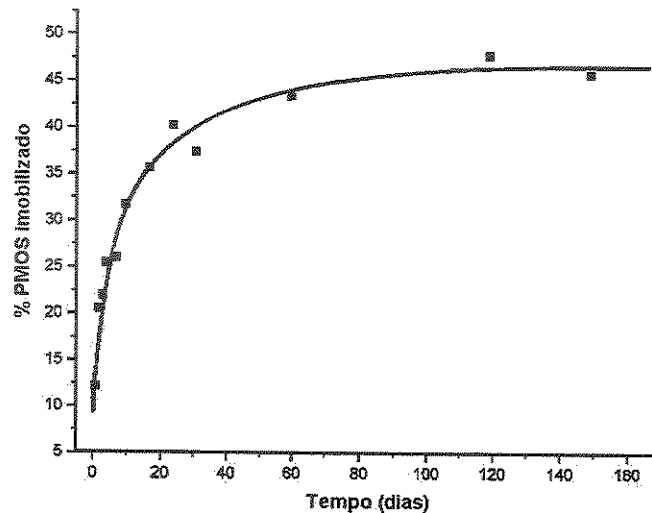


Figura 8. Porcentagem de PMOS retido em uma fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ em função do tempo¹⁰⁷.

1.3.1. Enchimento a seco

Nesta técnica, o material de enchimento é vagarosamente adicionado dentro da coluna e o leito é formado sobre a ação de vibração. Este tipo de enchimento é utilizado para partículas com diâmetro maior que $20\ \mu\text{m}$. Para partículas com diâmetro menor, esta técnica usualmente dá resultados pobres, devido à formação de aglomerados, provocado pela alta energia livre superficial das partículas pequenas, que não podem ser dispersas pela ação mecânica aplicada no enchimento. Mesmo para partículas grandes, a eficiência e a reprodutibilidade das colunas obtidas por este método não são muito boas¹²⁸.

I.3.2. Enchimento por compressão da suspensão

Neste método, a compressão pode ser axial, radial ou ambas. Tipicamente, a compressão radial é realizada pela aplicação de uma pressão através de um gás ou um líquido sobre uma parede flexível de um cartucho, que é preenchido com material de recheio^{129,130}. A compressão axial é obtida pelo movimento de um pistão dentro da coluna, que é preenchida com material de recheio em suspensão, forçando o solvente a sair pelo filtro oposto, obtendo assim, um leito cromatográfico por filtração¹³¹. O enchimento também pode ser feito aplicando-se simultaneamente a compressão radial e axial. O maior inconveniente desta técnica é a utilização de equipamentos sofisticados e de alto custo.

I.3.3. Enchimento por sedimentação

Esta técnica de enchimento de colunas é utilizada menos frequentemente e é baseada num processo de sedimentação das partículas da fase estacionária em suspensão por ação da gravidade. O procedimento é feito em duas etapas: a primeira consiste em preencher a coluna com uma suspensão e esperar a total sedimentação das partículas e a segunda etapa consiste em “solidificar” o leito pela passagem de um solvente coagulante¹³².

I.3.4. Enchimento por suspensão a alta pressão

Neste caso, uma suspensão do material de enchimento em um solvente adequado é acondicionada em um reservatório que é conectado à coluna. Um solvente de propulsão é então introduzido sobre alta pressão (usualmente 35 a 100 MPa), empurrando a suspensão em alta velocidade para dentro da coluna. Na extremidade oposta à coluna, o material de enchimento é retido por um filtro, ocorrendo assim, a formação do leito cromatográfico por filtração. O solvente de suspensão tem duas funções: impedir a aglomeração das partículas, mantendo-as dispersas através da

redução da intensidade das forças eletrostáticas de interação entre elas, e impedir a sedimentação. Este método é o mais popular para partículas de diâmetro menor que 20 μm , sendo que produz colunas com alta eficiência e boa reprodutibilidade¹³³.

Os problemas mais comumente encontrados durante o enchimento de colunas com esta técnica, e que devem ser evitados, são a sedimentação e aglomeração das partículas. As causas para a sedimentação são inúmeras, dentre elas pode-se citar: o solvente de suspensão tem densidade menor que a densidade das partículas, distribuição heterogênea do tamanho das partículas, presença de água no solvente de suspensão e outros. A aglomeração ocorre principalmente para partículas pequenas (menores que 5 μm), pois a medida que o tamanho é diminuído, a área superficial aumenta e isso provoca uma alta razão de energia de superfície/massa, que origina as forças eletrostáticas na superfície, que podem, por sua vez, causar aglomerações e impedir que as partículas se movimentem livremente na suspensão. Além disso, durante o enchimento com alta velocidade de impacto, cargas eletrostáticas podem ser geradas nas partículas à medida em que elas passam através de orifícios estreitos, formando aglomerados. A eficiência da coluna é afetada pelo tamanho dos aglomerados.

Dependendo do tipo de solvente empregado na suspensão, este método pode ainda ser classificado em:

- a) suspensão com densidade balanceada, que usa uma mistura de solventes, cuja composição é ajustada para ter a mesma densidade das partículas a serem utilizadas no enchimento. Com densidade igual ao solvente de suspensão, as partículas não sedimentam^{134,135};
- b) suspensão com solvente polar ao qual é adicionado um composto ionizado, resultando em uma dispersão eletrostática que impede a sedimentação¹³⁶;
- c) suspensão com solvente altamente viscoso, como glicerina, prevenindo assim a sedimentação das partículas. Utilizando este tipo de solvente ocorre uma alta resistência a vazão através da coluna, prolongando o tempo de enchimento¹³⁷;

- d) suspensão com solvente de baixa viscosidade, tanto apolar, como éter ou pentano, quanto polar, como acetona, metanol ou tetraidrofurano, na qual a sedimentação das partículas é prevenido pelo rápido enchimento da coluna¹³⁸; e
- e) suspensões utilizando soluções aquosas de surfactantes de baixa viscosidade e moderada pressão de enchimento¹³⁹.

Os principais parâmetros que devem ser considerados para proceder o enchimento de colunas utilizando suspensão a alta pressão são: características do solvente de suspensão e propulsão (viscosidade, densidade e propriedades coagulantes), condições da suspensão (concentração e formação de aglomerados), pressão (que afeta a velocidade das partículas durante o enchimento), geometria do sistema de enchimento (reservatório da suspensão, redutores e conexões), rugosidade da superfície interna do sistema de enchimento e da própria coluna e dimensões da coluna (diâmetro interno e comprimento). Outro parâmetro importante está relacionado com a direção do fluxo de enchimento, ou seja, o enchimento pode ser procedido de forma ascendente ou descendente, como mostrado na Figura 9.

Bristow et al.¹⁴⁰ descreveram as vantagens da utilização do sistema ascendente que, segundo os autores, elimina a formação de aglomerados no leito da coluna, sendo que eles tendem a descer devido a ação da gravidade e são rompidos pela ação do fluxo ascendente. Além disso, os autores indicam que este método promove a formação de um leito cromatográfico mais homogêneo, pois os aglomerados que se depositam na parte inferior do reservatório de suspensão não entram na coluna quando um excesso de fase estacionária é utilizado no enchimento e ainda não ocorre a formação de bolhas de ar dentro do reservatório e da coluna quando se promove a adição da suspensão dentro do sistema de enchimento, o que pode afetar também a qualidade do leito.

A escolha do solvente de suspensão é uma das etapas de maior importância no enchimento de colunas. Do ponto de vista de química coloidal existem dois tipos de solventes utilizados em suspensões: solventes coagulantes e não coagulantes. Nos solventes coagulantes as forças de atração entre as partículas são mais fortes que as forças de repulsão, causando aglomerações que são facilmente sedimentadas em forma de flocos. Nos solventes não coagulantes, a repulsão entre as partículas é mais forte que a atração. Assim, elas permanecem bastante dispersas na suspensão e não

sedimentam. Geralmente prefere-se utilizar solventes não coagulantes nas suspensões, pois promovem colunas mais eficientes¹⁴⁰. Alguns autores utilizam métodos que combinam os dois tipos de solventes, ou seja, utilizam um solvente não coagulante na suspensão para produzir um leito mais homogêneo e um solvente coagulante como propulsor para “solidificar” o leito¹⁴¹. Alguns trabalhos mostraram que o solvente de suspensão não tem muita importância no procedimento de enchimento de colunas, e sim, o fator importante para se obterem colunas com alto desempenho é a escolha adequada do solvente de propulsão, que deve ter propriedades coagulantes¹⁴². A pureza do solvente de suspensão também é um fator importante para o sucesso do enchimento, assim como a ausência de água.

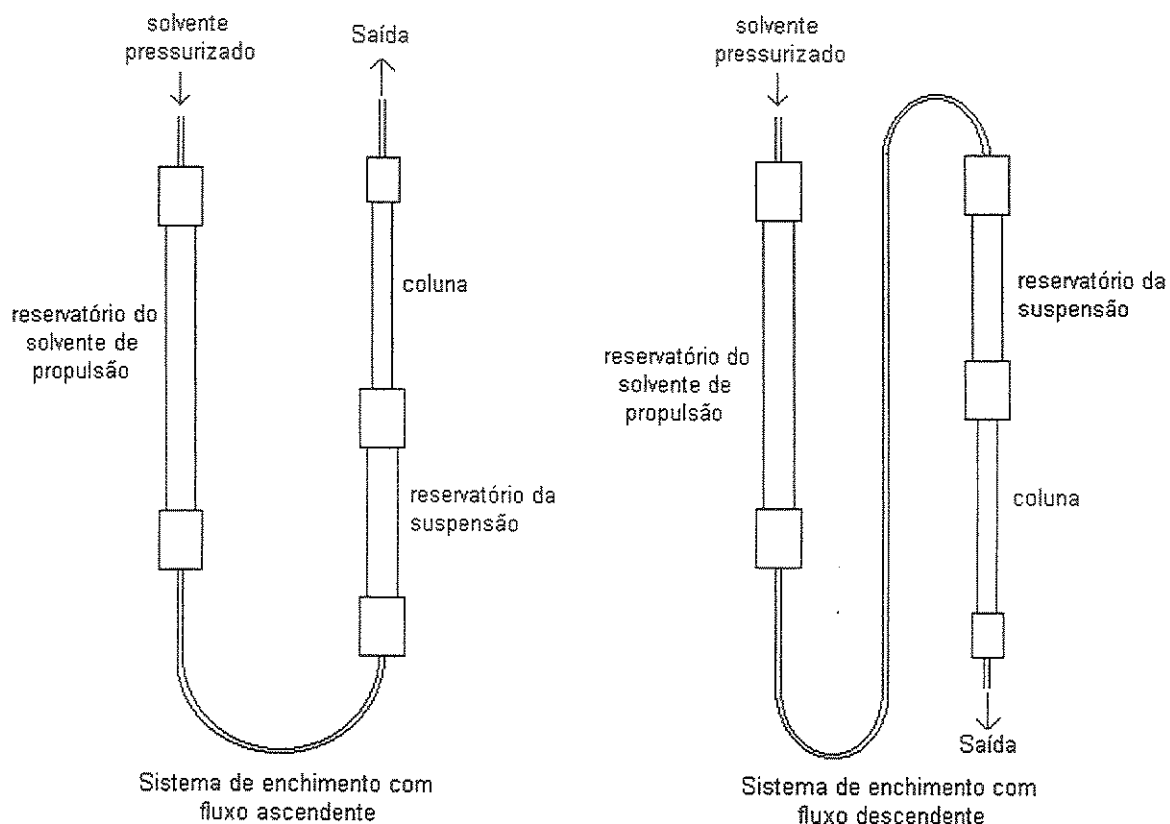


Figura 9. Representação esquemática de dois procedimentos diferentes de enchimento de colunas: com fluxo ascendente e descendente.

A maioria dos autores não considera a concentração da suspensão um fator muito importante no enchimento, embora alguns utilizem altas concentrações¹⁴³ e outros considerem que altas concentrações devem ser evitadas para reduzir os riscos de aglomerações¹⁴⁰. As concentrações mais utilizadas variam numa faixa de 1 – 30% (m/v).

Após algum tempo trabalhando com o desenvolvimento de métodos de enchimento de colunas cromatográficas, Verzele citou em um de seus trabalhos as seguintes conclusões¹³⁸:

- é necessário promover um polimento das paredes internas da coluna antes do enchimento;
- as colunas devem ser recheadas a altas pressões (maiores que 35 MPa), sendo que as partículas devem entrar na coluna em alta velocidade de forma a superar as forças de atrito com as paredes;
- para partículas menores que 5 μm é melhor utilizar o sistema ascendente com solventes de suspensão de baixa viscosidade, como por exemplo a acetona; e
- as suspensões devem ser homogêneas e estáveis, sendo que a sedimentação rápida das partículas pode levar a resultados indesejados.

Apesar das colunas recheadas com partículas menores apresentarem maior eficiência do que aquelas recheadas com partículas maiores, já é conhecido que o enchimento torna-se cada vez mais difícil quando se diminui o tamanho das partículas. Assim, conclui-se que um procedimento que produz colunas com alta eficiência para partículas de 10 μm ou maiores pode não ser eficaz para o enchimento de colunas com partículas menores. Isto, de fato acontece, pois é notado que a maioria dos autores que promovem enchimento utilizando partículas de 10 μm ou maiores utilizam o sistema descendente, sendo que neste caso ocorre pouca aglomeração das partículas. Já para partículas pequenas, que tendem a se aglomerar e sedimentar com maior facilidade, é mais utilizado o sistema ascendente, a menos que a suspensão seja bastante estável e a sedimentação lenta, podendo neste caso usar tanto o procedimento ascendente como o descendente.

A qualidade da superfície interna das colunas também exerce um efeito importante sobre o desempenho das colunas obtidas pelo método de enchimento por suspensão a alta pressão. Alguns autores compararam a eficiência de colunas com superfícies polidas e não polidas com dois métodos diferentes de injeção de amostra, injeção central e injeção distribuída por toda secção transversal da coluna. Os resultados mostraram que para o método de injeção central as colunas polidas e não polidas apresentaram a mesma eficiência, enquanto que, para o método de injeção distribuída, a coluna polida apresentou maior eficiência do que as colunas não polidas¹⁴⁴.

As irregularidades da superfície interna da coluna afetam a consolidação do leito cromatográfico. Sem atrito entre a parede e o material de enchimento, o leito cromatográfico formado deverá apresentar alta homogeneidade, promovendo desta forma, colunas com maior eficiência. Por outro lado, o atrito é de fundamental importância para a estabilidade mecânica do leito dentro da coluna. Com base nestas idéias deve haver uma faixa de rugosidade ideal, que promova uma alta eficiência sem afetar a estabilidade mecânica do leito¹⁴⁵.

A pressão de enchimento também tem um efeito importante sobre a qualidade das colunas. Alguns autores mostraram que colunas recheadas com maior pressão possuem recheios com maior densidade, e conseqüentemente, porosidade externa menor. Nos experimentos, as colunas foram preenchidas com fases estacionárias comerciais (Kromasil e Zorbax C-18, 10 μm , esféricas) com pressões variando de 7 até 70 MPa. Tanto a eficiência como o fator de retenção aumentaram com a pressão¹⁴⁶.

Atualmente já se sabe que a não uniformidade do fluxo sobre o leito cromatográfico, provocado principalmente pela heterogeneidade do recheio da coluna (regiões com diferentes densidades), limita o desempenho das colunas cromatográficas. Alguns trabalhos demonstraram que a densidade do leito é maior na saída e próximo às paredes da coluna e o perfil do fluxo é bastante dependente das dimensões da coluna^{147,148}. Também já foi mostrado que as dimensões da coluna exercem grande influência sobre os parâmetros cromatográficos como: resolução, capacidade de aceitação de amostra, tempo de análise e eficiência¹⁴⁹.

Um dos maiores problemas obtidos com o enchimento de colunas é a pobre reprodutibilidade do leito, medido pela sua eficiência. Stanley et al. mostraram que a reprodutibilidade pode se aproximar de 90% para colunas analíticas e por volta de 80% para colunas semi-preparativas, que são recheadas com procedimentos similares¹⁵⁰.

Em decorrência das inúmeras variáveis envolvidas nos procedimentos de enchimento de colunas, existem atualmente inúmeros métodos de enchimento descritos na literatura. Assim, fica claro que ainda não há um método que seja universal e capaz de produzir colunas sempre com alta qualidade e eficiência. O que mais se encontra na literatura são muitas controvérsias a respeito dos procedimentos, levando o pesquisador que deseja obter colunas de alta qualidade, a desenvolver seu próprio método, adaptando e otimizando as condições de enchimento.

1.4. Estabilidade de fases estacionárias reversas

Fases estacionárias baseadas em sílica são consideradas estáveis no intervalo de pH entre 3 e 8. Por outro lado, muitas separações em cromatografia exigem condições fora desta faixa, nas quais as fases reversas comumente utilizadas em CLAE apresentam uma diminuição de seu tempo de vida útil. Isto estimulou muitas pesquisas para a melhoria da qualidade das fases estacionárias reversas, em relação a estabilidade, principalmente para a separação de solutos básicos, especialmente fármacos, para os quais são desejáveis picos simétricos. Assim, muitas tentativas têm sido feitas na preparação de fases estáveis e seletivas, sem a existência de interações indesejáveis entre o soluto e a fase estacionária.

A estabilidade das colunas recheadas com fases estacionárias quimicamente ligadas, baseadas em sílica, está diretamente relacionada com o tipo e pureza do suporte de sílica e a natureza da fase ligada, mas também depende fortemente das condições de análise como: pH da fase móvel, temperatura, tipo e concentração do tampão e modificador orgânico utilizados na fase móvel¹⁵¹. Resumidamente, condições cromatográficas que apresentem as características descritas a seguir aumentam a

velocidade de dissolução da sílica e, portanto, diminuem o tempo de vida útil da coluna¹⁵²:

- fases móveis com tampões de carbonato e fosfato (bem mais agressivos que os tampões orgânicos e boratos);
- fases móveis contendo tampões com concentrações maiores que $0,05 \text{ mol L}^{-1}$;
- temperaturas maiores que 40°C ; e
- utilização do metanol como modificador orgânico ao invés da acetonitrila.

O tempo de vida de uma coluna é definido individualmente para cada tipo de separação cromatográfica e dependerá do grau de perda de retenção e resolução a serem toleradas antes da troca da coluna. Com as fases reversas convencionais, o primeiro sinal de degradação da coluna é usualmente o decréscimo do fator de retenção (k)¹⁵³. No caso de colunas mais estáveis a altos pH, o k permanece constante, ainda que a solubilização da sílica tenha ocorrido. No entanto, o tempo de vida destas últimas é também limitado e o desempenho cromatográfico começa a ser prejudicado. Assim, a melhor forma de avaliar a estabilidade de uma coluna é pela perda da eficiência e o aumento do fator de assimetria¹⁵².

O fato de um recheio ser estável permite que as características da coluna permaneçam inalteradas tanto tempo quanto seja possível, reduzindo assim, a frequência de substituição da mesma. Por isso, métodos para avaliar a estabilidade de fases ligadas têm sido assunto de muitos estudos. Para estes estudos são utilizadas diversas condições de análise, não existindo um procedimento geral estabelecido. Os métodos mais recentes de avaliação da estabilidade de fases estacionárias^{11,109,153-155} utilizam grandes volumes de fase móvel, devido ao aumento da resistência das fases estacionárias atuais ao ataque de fases móveis. Para reduzir os problemas de descarte de solvente, neste trabalho optou-se por utilizar também um teste mais rápido, utilizando condições mais drásticas de fase móvel¹⁵².

II. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar fases estacionárias baseadas em polissiloxanos com cadeias laterais C1 (poli(dimetilsiloxano) - PMOS), C8 (poli(metiloctilsiloxano) - PMOS) e C14 (poli(metiltetradecilsiloxano) - PMTDS), imobilizados na superfície de sílica porosa de 5 μm .

As etapas envolvidas neste trabalho para alcançar o objetivo proposto foram:

- preparar as fases estacionárias sorvidas $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$;
- promover diferentes formas de imobilização dos polissiloxanos nos suportes;
- fazer a caracterização físico-química e cromatográfica das fases preparadas;
- realizar testes de estabilidade; e
- mostrar algumas aplicações das fases estacionárias obtidas.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Equipamentos

Aagitador magnético: Corning Glass Works, modelo PC-351.

Aagitador rototorque: Cole-Parmer, modelo 51769.

Analizador elementar: Perkin Elmer, modelo 2400.

Analizador termogravimétrico: TA Instruments, modelo TGA-2050.

Balança analítica: Fisher Scientific, modelo A-250, sensibilidade de 0,0001 g.

Bomba de enchimento: Haskel, modelo 51769, com faixa de pressão de 6,9 a 344,8 MPa (1.000 a 50.000 psi).

Banho Maria: Nova Técnica, modelo NT 245.

Cromatógrafos a líquido

O equipamento utilizado neste trabalho para caracterização cromatográfica e testes de estabilidade das fases estacionárias consistiu dos seguintes componentes:

- bomba de alta pressão recíproca, do tipo pistão com dupla cabeça, marca Shimadzu, modelo LC-10AD;
- detector UV de comprimento de onda fixo (254 nm) com cela de 13 μL de volume, marca Alltech, modelo 450 UV;
- injetor marca Rheodyne com alça de amostragem de 5 μL , modelo 8125; e
- sistema de aquisição de dados via computador utilizando o software Chrom Perfect for Windows, versão 3.52.

Para os experimentos de aplicações das fases estacionárias foi utilizado um sistema de CLAE da Waters composto por:

- bomba de alta pressão recíproca, do tipo pistão com dupla cabeça, modelo 515;
- detector UV-VIS com arranjo de diodos modelo PDA 996;
- injetor marca Rheodyne com alça de amostragem de 10 μ L, modelo 7725i; e
- sistema de aquisição de dados via computador utilizando o software Millenium, versão 3.0.

Cromatógrafo para Permeação em Gel

O equipamento de GPC marca Waters utilizado neste trabalho consistiu dos seguintes componentes:

- bomba de alta pressão recíproca, do tipo pistão com dupla cabeça, modelo 510;
- detector de índice de refração, modelo 410;
- injetor U6K
- forno para coluna;
- sistema de aquisição de dados utilizando software Millenium

Espectrômetro de Infravermelho: Perkin Elmer, modelo, FT-IR 1600.

Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear com Polarização Cruzada segundo Rotação em um Ângulo Mágico (CP-MAS-NMR): Bruker, modelo ASX 300 NMR e Bruker, modelo DSX 200 NMR.

Estufa: Yamato, modelo ADP-21.

Forno da coluna: Eldex Laboratories, modelo CH-150.

Forno de Microondas: Questron, modelo QWave 3000.

Linha de vácuo: equipada com bomba de vácuo LeyBold-Heraus.

Microscópio Eletrônico de Varredura: Jeol, modelo JSM-T300.

Medidor de área superficial (BET): Micromeritics, modelo FlowSorb 2300

pHmetro: Digimed, modelo DC21

Ultra-som: Thorton, modelo T14.

III.2. Materiais

III.2.1. Reagentes e solventes

- Acenafteno p.a. (Aldrich)
- Ácido fosfórico p.a. (Mallinckrodt)
- Água deionizada, sistema Milli-Q (Millipore)
- Ametrina, pureza de 96,8% (Novartis)
- Atrazina, pureza de 97,7% (Novartis)
- Bentazona, pureza de 99,9% (BASF)
- Benzeno p.a. (Synth)
- Benzonitrila p.a. (Riedel-de Haën)
- Bicarbonato de sódio p.a. (Fisher)
- Carbendazim, pureza de 99,3% (Riedel-de-Haën)
- Cianazina, pureza de 98,0% (Cyanamid)
- Clorofórmio para cromatografia, LiChrosolv (Merck)
- Diuron, pureza de 99,3% (Du Pont)
- Etanol para cromatografia, LiChrosolv (Merck)
- Etilbenzeno p.a. (Merck)
- Fenol p.a. (Labsynth)
- Hexano para cromatografia (Tedia)
- Hidróxido de amônio p.a. (Synth)
- Linuron, pureza de 99,5% (Hoescht)
- Metanol para cromatografia, Omnisolv (Merck)
- Naftaleno p.a. (Vetec)
- N,N-Dimetilanilina p.a. (Fluka)
- Simazina, pureza de 98,3% (Novartis)

- Tolueno p.a. (Merck)
- Tolueno para cromatografia (Mallinckrodt)
- Uracila p.a. (Aldrich)
- Sílica Rainin C-8 (Varian), esférica, com tamanho médio de partículas de 5 μm

III.2.2. Fase estacionária líquida e suporte cromatográfico

Polímeros utilizados como fase estacionária líquida:

- **Poli(dimetilsiloxano) (PDMS)**: produto PS043 da Petrarch/Hüls America, massa molar média de 28.000 Da e densidade de 0,97 g mL⁻¹ (dados do fabricante);
- **Poli(metiloctilsiloxano) (PMOS)**: produto PS140 da Petrarch/Hüls America, massa molar média de 6.200 Da e densidade de 0,91 g mL⁻¹ (dados do fabricante); e
- **Poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS)**: produto PS134 da Petrarch/Hüls America, massa molar média de 9.400 Da e densidade de 0,89 g mL⁻¹ (dados do fabricante).

As estruturas químicas dos polissiloxanos utilizados neste trabalho estão mostradas na Figura 10.

- **Sílica utilizada como suporte cromatográfico**: Kromasil (Akzo Nobel), forma esférica, tamanho médio de partícula de 5 μm , volume de poro específico de 0,89 mL g⁻¹ e área de superfície específica de 330 m² g⁻¹ (dados do fabricante).

III.2.3. Coluna cromatográfica

Os corpos das colunas cromatográficas foram confeccionados na oficina de mecânica fina do Instituto de Química da UNICAMP a partir de tubos de aço inoxidável 316, sem costura, com diâmetro interno de 3,4 mm e externo de 9,5 mm. Estes tubos foram transformados em colunas com duas dimensões: (1) 50 mm de comprimento, 4,0 mm de diâmetro interno e 9,5 mm de diâmetro externo; e (2) 125 mm de comprimento, 4,0 mm de diâmetro interno e 9,5 mm de diâmetro externo.

As superfícies internas das colunas preparadas apresentam bastante irregularidades e foram polidas com lã de aço de acordo com o procedimento do

LABCROM¹⁵⁶. As partes constituintes da coluna cromatográfica são mostradas na Figura 11.

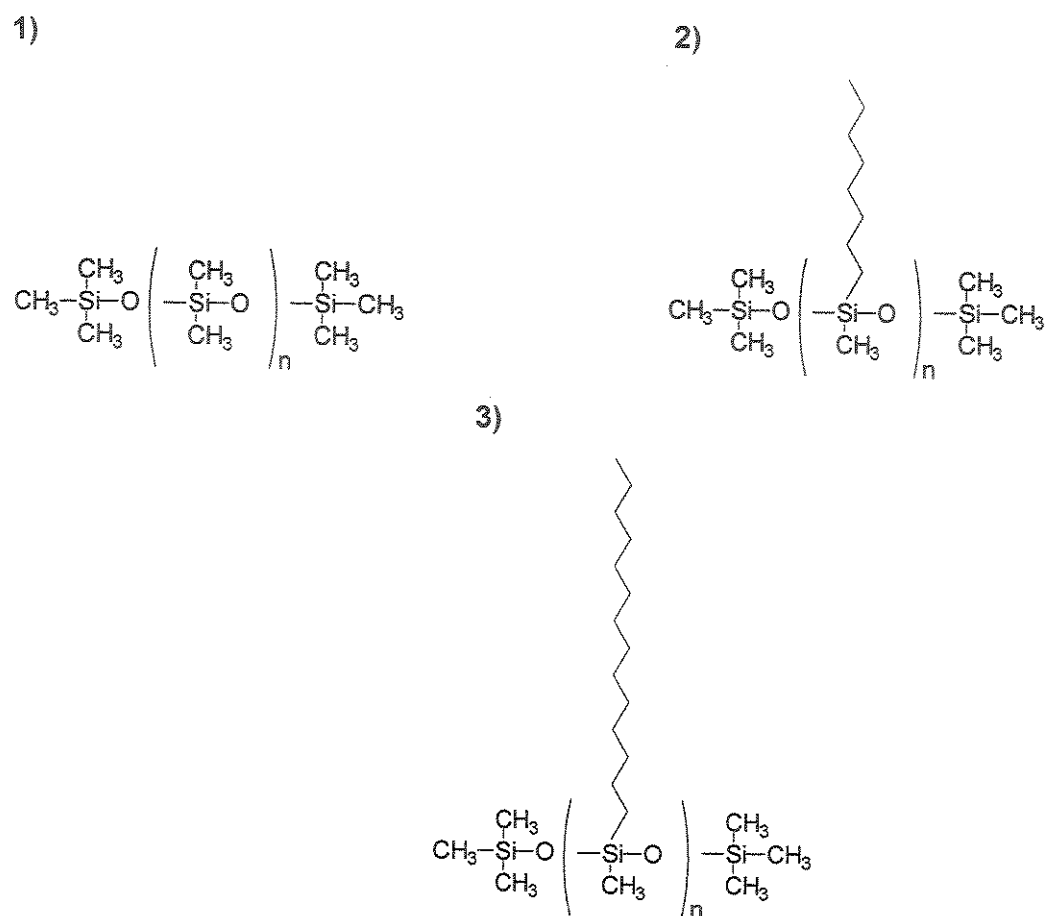


Figura 10. Estrutura química dos polissiloxanos: 1) poli(dimetilsiloxano); 2) poli(metiloctilsiloxano); e 3) poli(metiltetradecilsiloxano).

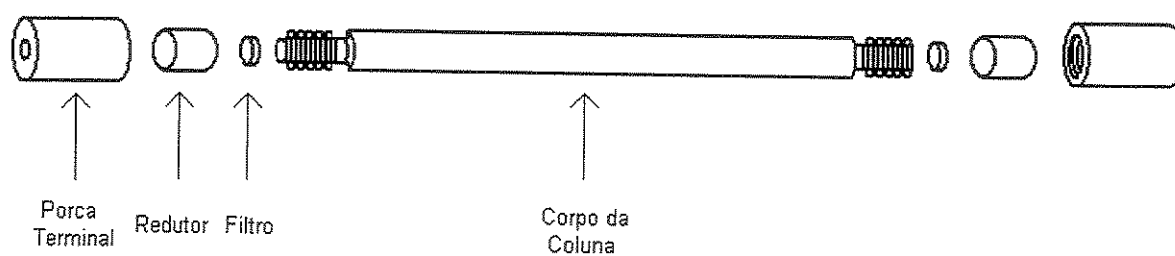


Figura 11. Esquema de uma coluna cromatográfica.

III.3. Fases estacionárias

III.3.1. Fase estacionária SiO₂(PMOS)

Antes da preparação da fase estacionária SiO₂(PMOS) a sílica foi ativada por tratamento térmico a 150°C por 17 horas. Logo após, a fase estacionária sorvida foi preparada utilizando o método de evaporação do solvente. Primeiramente preparou-se uma solução de PMOS em hexano na concentração de 10% (m/v) em um béquer e posteriormente adicionou-se lentamente a sílica na solução, obtendo a proporção de 1,22 g de PMOS por 1g de sílica. Todo este procedimento foi feito sob agitação e temperatura controlada de 40°C. A agitação foi mantida até a evaporação de 2/3 do hexano. O restante do solvente foi evaporado da solução a temperatura ambiente. O tempo gasto foi de uma semana.

A proporção de 1,22 g de PMOS por 1 g de sílica é suficiente para preencher totalmente os poros da sílica e ainda ter um excesso de 50% de polímero fora dos poros da sílica. Este raciocínio também foi feito para preparar as fases sorvidas baseadas em PDMS e PMTDS, como descrito a seguir.

A fase estacionária obtida pela evaporação do solvente foi inicialmente homogeneizada com bastão de vidro e separada em cinco porções. Cada porção foi submetida a um procedimento diferente de imobilização do polímero:

- auto-imobilização por 30 dias^{73,107}. Este procedimento consistiu em deixar a fase estacionária em repouso por 30 dias;
- irradiação com radiação-γ (dose 80 kGy). A irradiação foi feita na empresa IBRAS CBO (Campinas, SP) através de uma fonte de cobalto-60, em ampolas de vidro seladas sob ar contendo as fases estacionárias;
- aquecimento a 120°C por 4 horas. A fase estacionária foi colocada em béquer aberto dentro da estufa com a temperatura já em equilíbrio;
- aquecimento a 220°C por 4 horas. A fase estacionária foi colocada em béquer aberto dentro da estufa com a temperatura já em equilíbrio;

- irradiação com microondas na potência de 495 watts por 15 minutos^{123,124}. A irradiação foi feita em forno de microondas, sendo que a fase estacionária ficou dentro de um frasco de PTFE (Teflon) aberto.

Após cada procedimento de imobilização, extraiu-se o excesso de PMOS (não imobilizado) da fase estacionária passando hexano, com auxílio de uma bomba cromatográfica, na vazão de 0,5 mL min⁻¹, por 4 horas, a temperatura ambiente.

A solução de hexano contendo PMOS proveniente da extração da fase estacionária foi colocada em um béquer sob fluxo de ar para evaporação do hexano e posterior análise do PMOS por cromatografia de exclusão (permeação em gel, GPC).

III.3.1.1. Fase estacionária SiO₂(PMOS) otimizada

Com base nos resultados iniciais das fases estacionárias SiO₂(PMOS), descritas acima, tentou-se obter uma fase estacionária com maior estabilidade e melhores propriedades cromatográficas. Para obter esta fase, primeiramente foi feito a reidroxilação da sílica. Este é um procedimento muito citado na literatura na obtenção de fases estacionárias quimicamente ligadas e envolve o aquecimento da sílica em soluções diluídas de ácidos ou bases¹⁵⁷⁻¹⁶¹. A reidroxilação afeta o número e os tipos de silanóis superficiais e reduz os níveis de traços de metais presentes na sílica¹⁶². Uma melhoria significativa na performance cromatográfica das fases provenientes de sílicas reidroxiladas nas análises de compostos básicos já foi relatada na literatura¹⁶³, o que foi atribuído à diminuição dos grupos superficiais da sílica com maior acidez. Dentre os procedimentos mais utilizados estão o tratamento da sílica com soluções de ácidos diluídos como HNO₃, HCl ou HF^{164,165}.

Neste trabalho, a sílica foi reidroxilada por tratamento com ácido nítrico 0,01 mol L⁻¹, em refluxo por 4 horas. Terminado o tratamento, a sílica foi lavada sequencialmente pela passagem de metanol por 3 horas a 3 mL min⁻¹, isopropanol por 30 min a 2 mL min⁻¹ e hexano por 2 h a 2 mL min⁻¹, e seca a 40°C por 3 horas. Para confirmar o aumento do número de silanóis após o tratamento ácido, foram obtidos os espectros no infravermelho e ²⁹Si-RMN da sílica antes e após o tratamento ácido.

Após a reidroxilação e a ativação da sílica a 150°C por 17 horas, foi preparada a fase estacionária SiO₂(PMOS) sorvida da mesma forma descrita no item anterior. Esta fase estacionária foi imobilizada por aquecimento a 120°C por 16 horas e, neste caso, a extração do excesso do PMOS foi feita pela passagem de metanol (1,0 mL min⁻¹ por 2 horas) e clorofórmio (1,0 mL min⁻¹ por 2 horas) a temperatura ambiente. A mudança da forma de extração do excesso de polímero não imobilizado foi baseado em alguns trabalhos feitos no LABCROM que mostraram que fases estacionárias provenientes da extração sequencial com metanol e clorofórmio apresentam maior eficiência que as fases provenientes da extração com hexano¹²³.

O PMOS proveniente da extração da fase estacionária foi seco sob fluxo de nitrogênio e, posteriormente, foi analisado por cromatografia de exclusão (permeação em gel, GPC).

III.3.2. Fase estacionária SiO₂(PDMS)

A fase estacionária SiO₂(PDMS) sorvida foi preparada da mesma forma que a fase SiO₂(PMOS) otimizada, também com sílica reidroxilada, mas neste caso, a proporção foi de 1,30 g de PDMS por 1 g de sílica.

Com base nos resultados obtidos com as fases estacionárias SiO₂(PMOS) concluiu-se que a fase com maior quantidade de polímero imobilizado apresentou melhores propriedades cromatográficas e também maior estabilidade química. Assim, para as fases SiO₂(PDMS) utilizou-se procedimentos de imobilização que promovessem maior quantidade de polímero imobilizado. Em alguns casos utilizaram-se dois procedimentos sequenciais. Os procedimentos de imobilização foram:

- aquecimento a 80°C por 30 horas;
- aquecimento a 120°C por 16 horas;
- aquecimento a 240°C por 4 horas;
- aquecimento a 80°C por 30 horas, seguido por irradiação com microondas na potência de 495 watts, por 15 minutos;
- auto-imobilização por 30 dias, seguido por irradiação com radiação-γ (dose 80 kGy); e

- auto-imobilização por 30 dias, seguido por irradiação com microondas na potência de 495 watts, por 15 minutos.

Neste caso, os excessos de PDMS (não imobilizados) das fases estacionárias também foram extraídos passando metanol ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$ por 2 horas) e clorofórmio ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$ por 2 horas) a temperatura ambiente.

Os PDMS provenientes da extração das fases estacionárias foram secos sob fluxo de nitrogênio e, posteriormente, foram analisados por cromatografia de exclusão (permeação em gel, GPC).

III.3.3. Fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$

A fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ sorvida foi preparada da mesma forma que a fase $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ otimizada e a fase $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$, também com sílica reidroxilada, mas neste caso a proporção foi de 1,20 g de PMTDS por 1g de sílica.

O PMTDS utilizado nesta fase estacionária passou por um procedimento de purificação, pois o polímero adquirido apresentava uma grande quantidade de oligômeros (verificado por GPC e TGA). A purificação consistiu em promover a extração dos oligômeros utilizando funil de separação e isopropanol como solvente. Foram feitas duas etapas de extração sequenciais. Inicialmente foram pesados 80 g de PMTDS em um funil de separação de 1 L e adicionado 800 mL de isopropanol (solução 10% m/v). Esta solução foi agitada vigorosamente por 3 min e deixada em repouso por 4 horas para a separação das fases. Logo após, foi retirada a fase contendo o isopropanol. Em seguida, foi adicionado mais 800 mL de isopropanol, agitado vigorosamente por mais 3 min e deixado em repouso por mais 4 horas. Após retirada da segunda porção de isopropanol, o polímero foi deixado a temperatura ambiente, em frasco aberto, na capela para evaporação do solvente por 3 dias e, posteriormente, em esfufa a 60°C sob 0,08 MPa de vácuo, por 5 horas. A eficiência do procedimento de purificação foi verificada por GPC e TGA.

Após preparação da fase estacionária, os procedimentos de imobilização utilizados foram:

- aquecimento a 80°C por 30 horas;
- aquecimento a 120°C por 16 horas;
- aquecimento a 80°C/30 horas, seguido por irradiação com microondas na potência de 495 watts, por 15 minutos;
- auto-imobilização por 30 dias, seguido por irradiação com radiação- γ (dose 80 kGy); e
- auto-imobilização por 30 dias, seguido por irradiação com microondas na potência de 495 watts, por 15 minutos.

Os excessos de PMTDS (não imobilizados) das fases estacionárias foram extraídos passando metanol (1,0 mL min⁻¹ por 2 horas) e clorofórmio (1,0 mL min⁻¹ por 2 horas) a temperatura ambiente.

Os PMTDS provenientes da extração das fases estacionárias foram secos sob fluxo de nitrogênio e, posteriormente, foram analisados por cromatografia de exclusão (permeação em gel, GPC).

III.3.4. Fase estacionária comercial

Neste trabalho também foi adquirida uma fase estacionária comercial quimicamente ligada, Rainin C8, esférica, tamanho de partículas de 5 μ m, que foi utilizada para recheiar colunas, as quais foram submetidas a testes comparativos com as fases estacionárias SiO₂(PMOS) obtidas neste trabalho.

III.4. Enchimento das colunas

As colunas foram recheadas utilizando o método de suspensão a alta pressão no modo descendente. Utilizou-se uma suspensão da fase estacionária com concentração de 10% (m/v) em clorofórmio. De acordo com o volume da coluna, foi pesada uma quantidade adequada de fase estacionária em um tubo de ensaio e posteriormente adicionado o clorofórmio. A suspensão foi mantida em agitação por aproximadamente 15 horas em um agitador rototorque. Após agitação da suspensão as colunas foram recheadas utilizando o sistema mostrado na Figura 12, que consiste de coluna,

reservatório de suspensão de 32 mL, reservatório de solvente de propulsão, bomba de enchimento Haskel e cilindro de nitrogênio.

Antes de iniciar o enchimento, foram verificados possíveis vazamentos no sistema. Vazamentos podem gerar variações na pressão de enchimento, causando uma distribuição não homogênea da fase estacionária, resultando em colunas com baixa eficiência. Para isto, a coluna foi acoplada ao reservatório da suspensão, tendo colocado um filtro e uma tampa na parte inferior da coluna. Com todas as válvulas do sistema fechadas, preencheu-se o reservatório de suspensão e do solvente propulsor com metanol. Acionou-se a válvula de controle de pressão até obter 38 MPa (5.000 psi) e abriu-se a válvula do solvente. Não havendo vazamentos, o sistema estava pronto para iniciar o enchimento da coluna. Após o teste de vazamentos fechou-se a válvula do solvente e desconectou-se a coluna, permitindo a saída do metanol do reservatório da suspensão.

Para o enchimento, conectou-se novamente a coluna ao reservatório de suspensão, com o filtro na parte inferior para permitir a passagem do solvente e evitar a saída da fase estacionária. Transferiu-se a suspensão para o respectivo reservatório, completou-o com clorofórmio e tampou-o em seguida. Acertou-se a pressão para 38 MPa (5.000 psi) e abriu-se a válvula de saída do solvente de propulsão, que empurra a suspensão para a coluna, deixando passar 80 mL de solvente pela coluna recheada. Fechou-se a válvula de saída do solvente, deixando a coluna em repouso no sistema por 20 minutos para despressurização. Em seguida, desconectou-se a coluna do reservatório de suspensão, colocando um outro filtro terminal no local em que estava conectada no reservatório e tampando as suas extremidades.

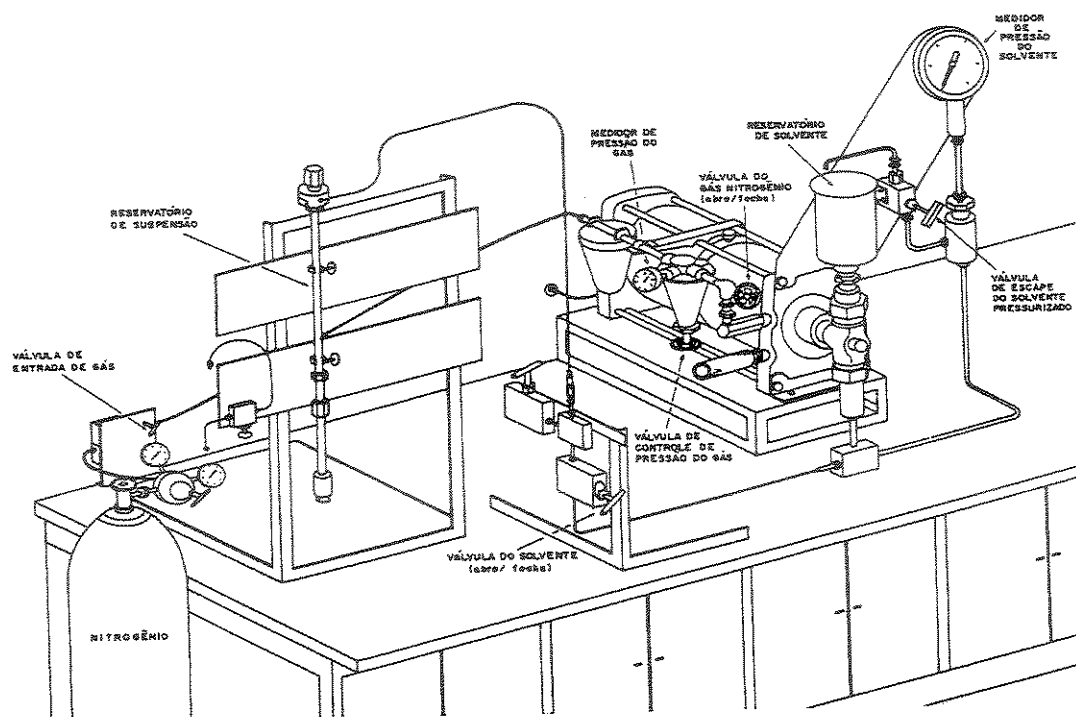


Figura 12. Esquema do sistema de enchimento de colunas.

III.5. Avaliação cromatográfica das colunas

III.5.1. Fase móvel

Os solventes utilizados neste trabalho como fase móvel foram previamente filtrados através de membrana de Nylon de $0,45\ \mu\text{m}$ de porosidade e desgaseificados com ultrassom e vácuo.

III.5.2. Condicionamento das colunas

Depois de recheadas, as colunas foram condicionadas com a fase móvel para eliminar todos os vestígios de solventes usados no enchimento e para a fase estacionária ficar em equilíbrio com a fase móvel. Neste trabalho, as colunas foram

condicionadas no cromatógrafo a líquido com fase móvel metanol:água 7:3 (v/v) a uma vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, por 3 horas.

III.5.3. Testes cromatográficos das colunas

III.5.3.1. Misturas teste

As colunas (50 x 4 mm) foram avaliadas cromatograficamente com base na separação dos compostos de duas misturas teste. A primeira contendo compostos com propriedades ácida, básica e neutras (uracila, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno, etilbenzeno e acenafteno)¹⁶⁶. Esta mistura, por apresentar compostos ácido e básico, é apropriada para os estudos de interação com a superfície do suporte de sílica, o que pode ser avaliado pelo tempo de retenção dos compostos, pela atividade silanofílica e pela simetria dos picos. A segunda mistura teste foi constituída de compostos neutros de variadas polaridades (uracila, acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno)¹⁶⁷. Neste caso, é possível obter a seletividade das fases estacionárias para os compostos com polaridades variadas e também avaliar a hidrofobicidade das fases.

Estas misturas foram preparadas qualitativamente em concentrações tais que os picos nos cromatogramas apresentassem uma altura razoável, utilizando atenuação e “threshold” adequados. As misturas foram dissolvidas em fase móvel metanol:água 7:3 (v/v) e armazenadas em geladeira.

As condições utilizadas nos testes cromatográficos foram: temperatura ambiente, detecção em comprimento de onda de 254 nm, fase móvel metanol:água 7:3 (v/v) e vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Esta vazão de fase móvel foi determinada a partir da curva de van Deemter, segundo a qual, existe uma vazão ótima, na qual a eficiência da coluna é máxima¹⁶⁸.

III.5.3.2. Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos utilizados na avaliação das colunas foram: número de pratos (medida da eficiência) (N), fator de retenção (k), fator de assimetria do pico calculado a 10% da sua altura (As_{10}), fator de separação (α) e resolução (R_s) entre picos adjacentes.

Os cálculos dos parâmetros cromatográficos foram obtidos através do software Report Write Plus (Justice Innovations).

A eficiência foi calculada pela seguinte equação:

$$N = 5,5 (t_R/w_h)^2$$

onde t_R é o tempo de retenção do pico e w_h é a largura do pico a meia altura.

O tempo de retenção de um soluto (t_R) é o tempo que este gasta desde o momento de injeção até a saída do máximo do pico, ou seja, engloba todo o tempo que o componente fica no sistema cromatográfico. Para saber a parte do tempo em que as moléculas do soluto estão na fase móvel é utilizado o tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária (t_M). Neste caso, foi utilizado o pico da uracila.

O fator de retenção (k) diz respeito a retenção de um soluto na coluna, determinado pela razão dos tempos que as moléculas ficam retidas na fase estacionária e percorrem a coluna na fase móvel:

$$k = (t_R - t_M)/t_M$$

O fator de assimetria (As) a 10% da altura do pico foi calculado como mostrado na Figura 13.

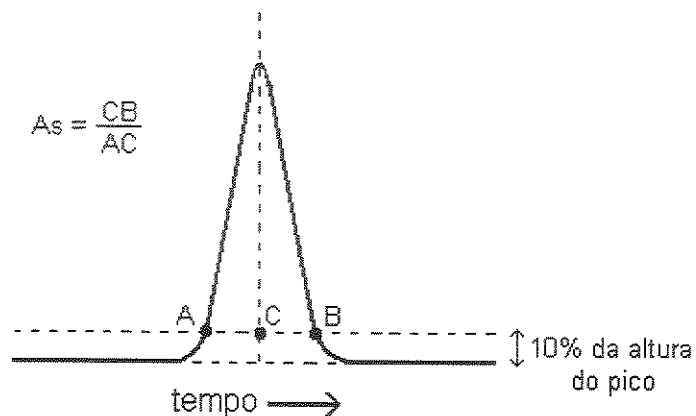


Figura 13. Medida e cálculo do fator de assimetria do pico.

A resolução e o fator de separação para picos adjacentes foram calculados pelas seguintes equações:

$$R_s = 1,17(t_{R2} - t_{R1})/(w_{h1} + w_{h2})$$

$$\alpha = k_2/k_1$$

neste caso os índices 1 e 2 indicam os picos adjacentes.

Neste trabalho todos os parâmetros cromatográficos mostrados nas tabelas não são a média de várias corridas cromatográficas, ou seja, foram retirados de apenas um cromatograma, apesar de ter sido feita a confirmação do resultado colocado na tabela pela avaliação cromatográfica de duas colunas recheadas com a mesma fase estacionária.

III.6. Caracterização físico-química das fases estacionárias

III.6.1. Porcentagem de carbono

Obteve-se a porcentagem de carbono através de análise elementar das fases estacionárias com polímero não imobilizado e imobilizado para avaliar a porcentagem de polissiloxano (% de carga) em cada fase estacionária.

O método empregado utiliza a combustão para converter o carbono em CO_2 , que é, então, medido em função da sua condutividade térmica.

III.6.2. Medidas de área superficial específica

Para as medidas de área superficial das fases estacionárias foi empregado o método BET (Brunauer, Emmett e Teller), que se baseia na determinação do volume de nitrogênio adsorvido a diferentes pressões, na temperatura do nitrogênio líquido.

III.6.3. Espectroscopia no infravermelho (IV)

As fases estacionárias foram analisadas por espectroscopia no IV para avaliar a presença de silanóis residuais e as possíveis alterações causadas pelos diferentes procedimentos de imobilização. Os espectros de transmissão foram obtidos sob a forma de pastilhas de brometo de potássio, no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} .

III.6.4. Ressonância magnética nuclear (RMN)

As fases estacionárias baseadas em PMOS foram analisadas por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear com Polarização Cruzada segundo Rotação em um Ângulo Mágico (CP-MAS), analisando os núcleos ^{13}C e ^{29}Si , para avaliar as possíveis interações entre o suporte e o polímero e as alterações químicas causadas pelos diferentes procedimentos de imobilização.

Os espectros de ^{13}C -RMN com CP/MAS foram obtidos usando um rotor de ZrO_2 com 4 mm de diâmetro interno e uma velocidade de rotação de 10.000 Hz. O intervalo do pulso do próton a 90° foi de $7\text{ }\mu\text{s}$, o tempo de contato e o tempo de espera foi de 3 ms e 3 s, respectivamente. O alargamento de banda utilizado foi 10 Hz.

Os espectros de ^{29}Si -RMN com CP/MAS foram obtidos usando um rotor de ZrO_2 com 7 μm de diâmetro interno e uma velocidade de rotação de 3.500 Hz, contendo amostras de 200-250 mg. O tempo de contato de polarização cruzada foi de 5 ms e o tempo de intervalo de pulso foi de 1 s. Foram acumulados 1,5 FIDs ("Free Induction Decay" ou decaimento livre induzido) com tempo de aquisição de 30 ms em número de pontos de 1 kb, que foram preenchidos com zero até 8 kb, antes da transformação de Fourier. O alargamento de banda utilizada foi de 30 Hz e a largura espectral para todos os espectros foi de aproximadamente 20 kHz.

III.6.5. Análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi utilizada para determinar a estabilidade térmica das fases estacionárias antes e após os procedimentos de imobilização. Utilizaram-se amostras de aproximadamente 10 mg e as medidas foram feitas numa razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ em atmosfera oxidante (ar).

III.6.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A análise morfológica das fases estacionárias imobilizadas foi feita através das fotomicrografias das partículas com aumento de 1.500 e 20.000 vezes. Para efetuar este procedimento as partículas foram recobertas com uma fina camada de ouro.

Através desta técnica, pode-se observar a forma das partículas da fase estacionária, as características da sua superfície e a distribuição do tamanho das partículas.

III.6.7. Cromatografia de exclusão (GPC) dos polissiloxanos extraídos das fases estacionárias imobilizadas

Os polímeros extraídos das fases estacionárias foram analisados por GPC para obter a distribuição da massa molar dos polissiloxanos, e assim, determinar se houve

degradação ou a formação de ligações cruzadas das cadeias do polímero durante o procedimento de imobilização.

A análise foi feita em um cromatógrafo a líquido utilizando as seguintes condições: colunas Utrastyrigel 500 e 1000 angstroms (conectadas em série) com partículas de 7 μm de tamanho médio; volume de injeção de 150 μL ; temperatura da coluna e do detector de 40°C; e tolueno como fase móvel a 1,0 mL min^{-1} . As soluções de polissiloxanos foram injetadas na concentração de 0,5 % (v/v) em tolueno.

III.7. Testes de estabilidade

III.7.1. Teste de estabilidade com fase móvel neutra

Algumas das colunas foram submetidas ao teste de estabilidade com fase móvel neutra. Este teste consistiu em passar fase móvel metanol:água 7:3 (v/v) na coluna a uma vazão de 1,0 mL min^{-1} e injetar uma mistura teste, composta de uracila, fenol, N,N-dimetilanilina e naftaleno, periodicamente para avaliar o desempenho da coluna no decorrer do tempo. No momento da avaliação cromatográfica a vazão da fase móvel foi diminuída para 0,5 mL min^{-1} . Os parâmetros cromatográficos utilizados na avaliação foram porcentagem de eficiência (N) inicial, fator de assimetria a 10% da altura do pico (As) e fator de retenção (k). A % de N inicial é calculado com relação à eficiência no início do teste, ou seja, é uma medida em porcentagem de quanto de eficiência a coluna perde com o decorrer do teste.

III.7.2. Teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4

Uma vez que as fases estacionárias desenvolvidas tenham resistido ao teste de estabilidade com fase móvel neutra, aplicou-se o estudo de estabilidade desenvolvido no LABCROM com fase móvel alcalina e temperatura elevada¹⁵².

Neste teste, utilizou-se uma fase móvel alcalina (pH 8,4) constituída de metanol:água 1:1 (v/v) com 0,05 mol L⁻¹ de bicarbonato de sódio e temperatura da coluna de 60°C, condições estas que aceleram a degradação da fase estacionária, sendo possível assim, obterem avaliações mais rápidas com menor gasto de fase móvel.

O procedimento de avaliação consistiu em passar a fase móvel alcalina pH 8,4 pela coluna na vazão de 0,6 mL min⁻¹, com auxílio de uma bomba cromatográfica, por 1 hora, ficando a coluna dentro de um forno a 60°C. Logo após a coluna é retirada do forno e acoplada ao cromatógrafo a líquido, fazendo-se passar fase móvel metanol:água 7:3 (v/v) na vazão de 0,5 mL min⁻¹, por 15 minutos, para retirada da fase móvel alcalina e do sal (bicarbonato de sódio) de dentro da coluna e ainda baixar a temperatura da coluna para a ambiente. Em seguida, injeta-se a mistura teste composta de uracila, fenol, N,N-dimetilanilina e naftaleno. Após a obtenção do cromatograma, a coluna é colocada novamente dentro do forno a 60°C e submetida a passagem de fase móvel alcalina por mais 1 hora. Assim, a amostra-padrão foi injetada de uma em uma hora até o final do teste.

Novamente, as fases estacionárias desenvolvidas tenham resistido ao teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4, aplicou-se o estudo de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0 e temperatura elevada

III.7.3. Teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0

O procedimento utilizado no teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0 é similar ao empregado com pH 8,4, embora, neste caso, a fase móvel alcalina metanol:água 1:1(v/v) com 0,05 mol L⁻¹ de bicarbonato de sódio teve o pH acertado em 10,0 com NaOH concentrado e foi passado pela coluna a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. Os testes cromatográficos foram feitos em intervalos de uma hora até o final do teste.

III.8. Aplicações das fases estacionárias

Algumas fases estacionárias obtidas neste trabalho foram submetidas à aplicações utilizando fases móveis ácida e básica, mas para estes experimentos foram recheadas colunas com dimensões de 125 x 4 mm.

Para mostrar uma aplicação das fases estacionárias imobilizadas desenvolvidas neste trabalho com fase móvel básica, foram utilizadas as mesmas condições de análise de um método já validado para determinação de pesticidas em frutas¹⁶⁹. Como critério de comparação, também foi testada a mesma coluna comercial (125 x 3 mm) utilizada no mesmo trabalho¹⁶⁹ com fase estacionária quimicamente ligada, Purospher C18, 5 μm , na separação dos seguintes pesticidas: atrazina, simazina e ametrina (herbicidas triazínicos), diuron (herbicida uréico) e carbendazin (fungicida benzimidazólico). Esta mistura de pesticidas foi preparada qualitativamente em concentrações tais que os picos nos cromatogramas apresentassem uma altura razoável, utilizando atenuação e “threshold” adequados. As condições de análise foram: fase móvel acetonitrila:água 35:65 (v/v) pH 10,0 (ajustado com hidróxido de amônio), vazão de 0,7 mL min⁻¹, temperatura ambiente, volume de injeção de 10 μL e detecção em 235 nm¹⁶⁹.

Para a aplicação com fase móvel ácida, foram utilizadas as mesmas condições de análise de um método também já validado para determinação de pesticidas em solos¹⁷⁰. Foram testadas as colunas recheadas com as fases estacionárias obtidas neste trabalho e também a mesma coluna comercial (150 x 3,9 mm) utilizada no método validado¹⁷⁰ com fase estacionária quimicamente ligada, Novapak C18, 4 μm , na separação dos seguintes pesticidas: bentazona (herbicida tiodiazínico), cianazina, simazina e atrazina (herbicidas triazínicos), diuron e linuron (herbicidas uréicos). Esta mistura de pesticidas também foi preparada qualitativamente em concentrações tais que os picos nos cromatogramas apresentassem uma altura razoável, utilizando atenuação e “threshold” adequados. As condições de análise foram: fase móvel metanol:água 1:1 (v/v) pH 3,75 (ajustado com ácido fosfórico), vazão de 0,8 mL min⁻¹, temperatura ambiente, volume de injeção de 10 μL e detecção em 230 nm¹⁷⁰.

A estrutura química dos pesticidas utilizados nas aplicações são mostrados na Figura 14.

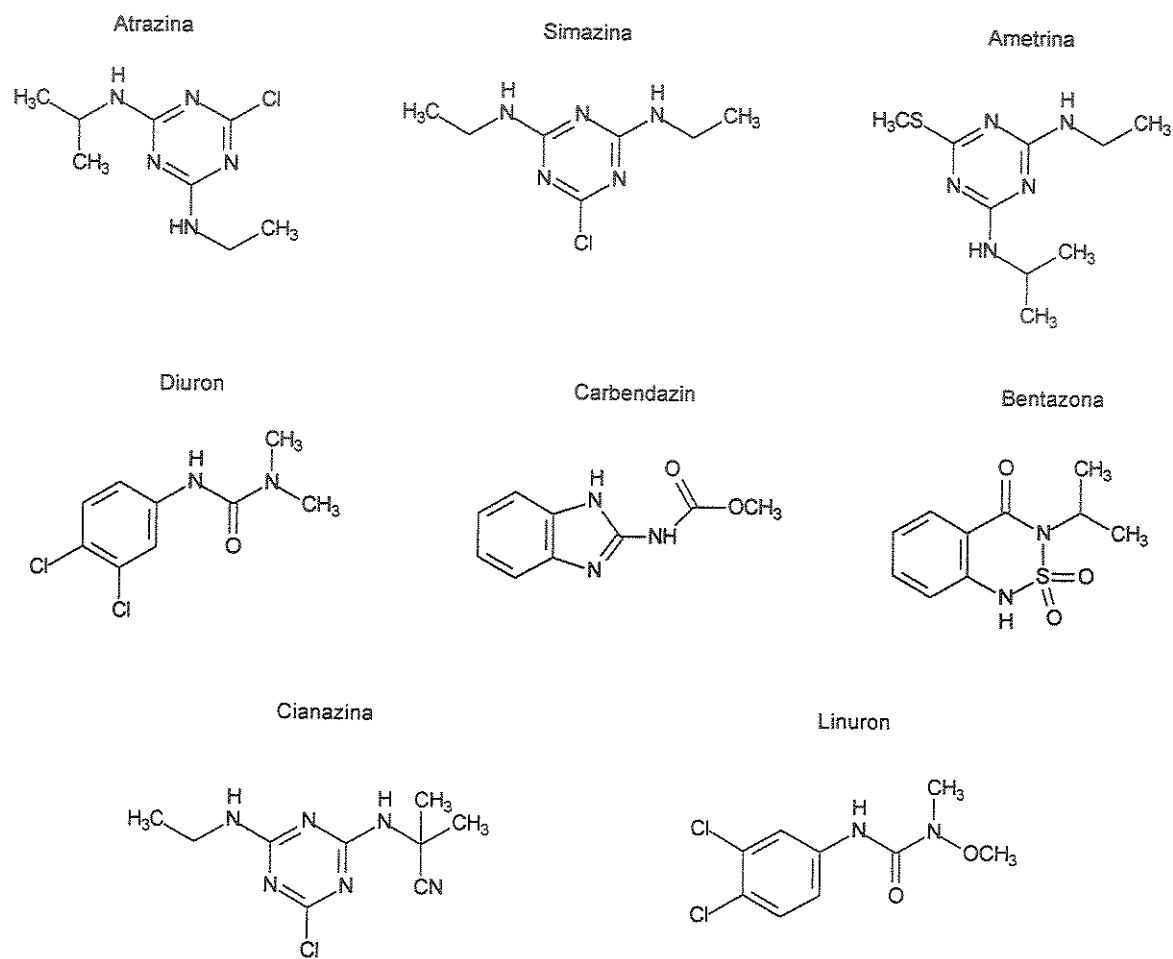


Figura 14. Estrutura química dos pesticidas utilizados nas aplicações das fases estacionárias imobilizadas-extraídas.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$

IV.1.1. Avaliação físico-química

IV.1.1.1. Cromatografia de permeação em gel

Os polímeros extraídos das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas e o PMOS puro foram submetidos à análise por GPC e os cromatogramas obtidos estão mostrados na Figura 15.

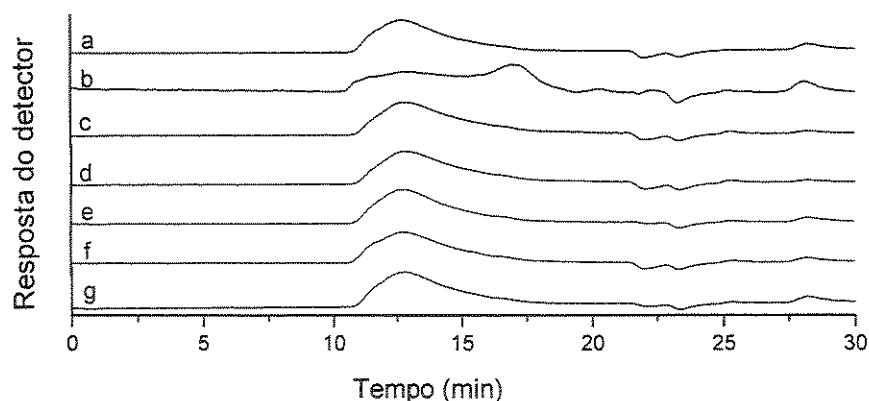


Figura 15. Cromatogramas de GPC de: a) PMOS puro; e PMOS extraídos das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; (e) irradiação com microondas; (f) irradiação com radiação- γ ; e (g) auto-imobilização.

Pode ser notado que os polímeros extraídos das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas apresentaram o mesmo perfil do PMOS puro (sem tratamento nenhum), indicando que não sofreram alterações estruturais, exceto o polímero extraído da fase estacionária aquecida a $220^\circ\text{C}/4$ horas. Neste caso, ocorreu a degradação do polímero, sendo que apareceu um pico de menor massa molar próximo de 17 minutos, que não aparece nos outros cromatogramas (Figura 15b). A degradação também foi

evidenciada pela coloração amarelada da fase estacionária tratada a 220°C, sendo que as demais apresentaram cor branca.

IV.1.1.2. Porcentagem de carbono e área superficial

Após a etapa de imobilização e extração do excesso de PMOS, as fases estacionárias SiO₂(PMOS) foram submetidas a análise elementar e medida de área superficial (Tabela 1). A partir da porcentagem de carbono das fases (%C_{FE}) foram obtidas a porcentagem de carga e a massa específica através das equações abaixo:

$$\% \text{ de carga} = (m_{\text{PMOS}} / m_{\text{FE}}) \times 100$$

$$m_{\text{especifica}} = m_{\text{PMOS}} / m_{\text{SiO}_2} = \%C_{\text{FE}} / (62 - \%C_{\text{FE}})$$

onde:

m_{FE} = massa de fase estacionária; m_{SiO_2} = massa de sílica; $m_{\text{especifica}}$ = massa específica, $m_{\text{PMOS}} = \%C_{\text{FE}} / 62$; e 62 = constante, considerando que 62% da massa total do PMOS é carbono.

Tabela 1. Porcentagem de carbono, porcentagem de carga, massa específica e área superficial das fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas após a extração do excesso do PMOS e da fase estacionária não imobilizada sem extração do excesso de PMOS.

Fase estacionária	220°C/4h	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação-γ	auto-imobilizada	não imob.
% C	21,0 ± 0,5	23,3 ± 0,5	14,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	12,4 ± 0,5	5,8 ± 0,5	33,7 ± 0,5
% carga	33,9 ± 0,8	37,6 ± 0,8	23,4 ± 0,8	15,3 ± 0,8	20,0 ± 0,8	9,4 ± 0,8	54,4 ± 0,8
$m_{\text{especifica}}$ (g _{PMOS} /g _{SiO₂})	0,51 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,10 ± 0,01	1,17 ± 0,01
Área superficial (m ² g ⁻¹)	34	5	157	241	194	258	-

Das fases estacionárias imobilizadas, as tratadas termicamente apresentaram maior porcentagem de carga. As fases irradiadas com microondas e radiação-γ apresentaram recobrimentos intermediários e a fase auto-imobilizada foi a que

apresentou menor recobrimento. Apesar das fases estacionárias imobilizadas a 220°C/4 horas e 120°C/16 horas apresentarem cargas similares, o PMOS da primeira sofreu degradação, como mostrado por GPC.

Os diferentes procedimentos de imobilização promoveram fases estacionárias com cargas variadas. O processo mais eficaz de imobilização (120°C/16 horas) reteve 70% de todo polímero inicial da fase estacionária de partida (sem imobilização e extração, com 54% de carga), enquanto a auto-imobilização conseguiu reter apenas 17% de todo polímero.

Como pode ser notado na Figura 16, a área superficial diminuiu proporcionalmente com o aumento da porcentagem de carga das fases. Isto já era esperado, pois com o aumento da porcentagem de carga, os poros ficam mais preenchidos e consequentemente diminui-se a área superficial da fase estacionária resultante.

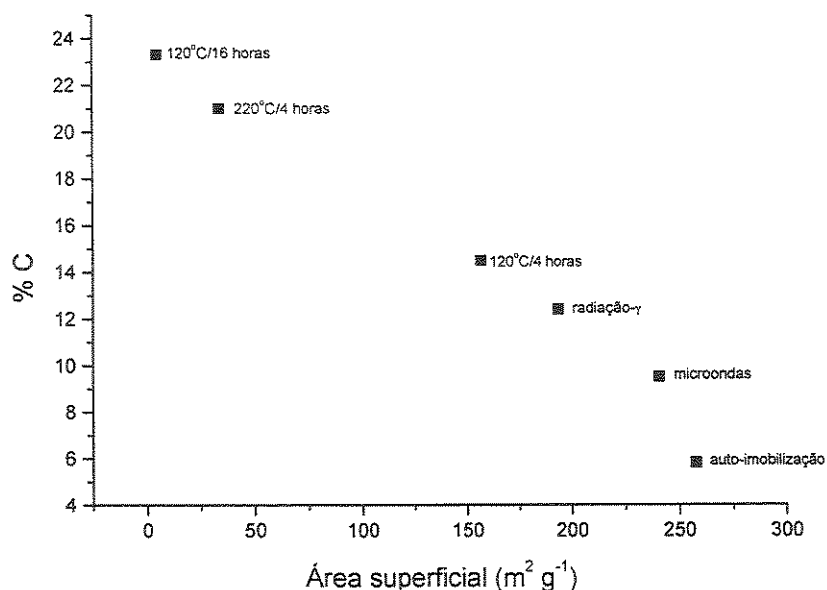


Figura 16: Porcentagem de carbono em função da área superficial das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas.

IV.1.1.3. Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas da sílica nua e das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e não imobilizada estão mostradas na Figura 17. A curva da sílica nua (Figura 17a) indica somente a perda de água adsorvida na faixa de temperatura estudada. Para a fase estacionária tratada a $220^\circ\text{C}/4$ horas (Figura 17b), a perda de massa ocorreu por volta de 280°C , sendo que os compostos voláteis já foram removidos durante a imobilização pelo tratamento térmico. Neste caso o PMOS resultante ficou mais estável termicamente devido a sua modificação estrutural, como demonstrado por GPC.

As demais curvas (Figuras 17c-g) mostraram uma grande perda de massa próximo de 215°C , que deve estar relacionado com a quebra das ligações Si-O e consequente formação de polissiloxanos cíclicos voláteis de baixa massa molar, ou então, a quebra da ligação entre as cadeias alifáticas dos polímeros e a formação de produtos gasosos voláteis^{171,172}.

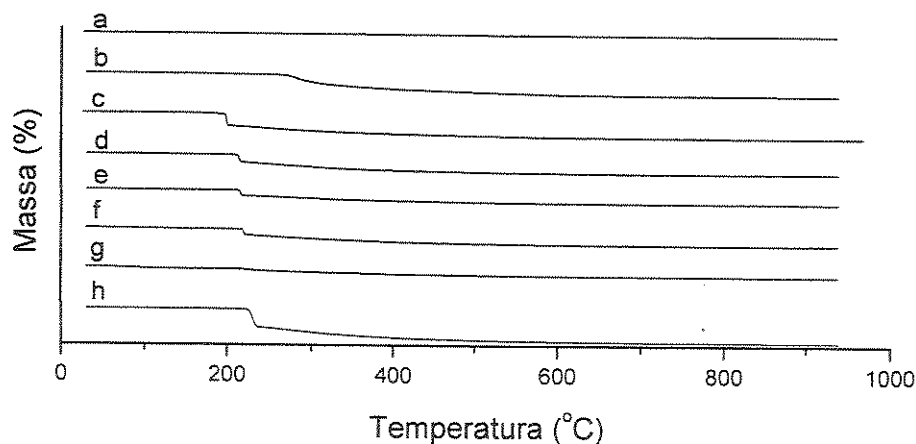


Figura 17. Curvas termogravimétricas de: (a) sílica nua; e fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; (e) irradiação com microondas; (f) irradiação com radiação- γ ; (g) auto-imobilização; e (h) fase estacionária não imobilizada.

A perda de massa para todas as fases estacionárias na faixa de temperatura estudada foi proporcional a quantidade de polímero imobilizado (Tabela 2). Assim, a amostra não imobilizada (Figura 17h) apresentou a maior perda de massa e a fase estacionária auto-imobilizada a menor perda (Figura 17g).

Tabela 2. Porcentagem de perda de massa durante a análise termogravimétrica de 25°C a 935°C das fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas-extraídas e não imobilizada.

Fase estacionária	220°C/4h	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação-γ	auto-imobilizada	não imob.
Perda de massa (%) (25 – 935°C)	23,45	26,04	20,62	14,40	17,61	8,84	36,43
% carga	33,9 ± 0,8	37,6 ± 0,8	23,4 ± 0,8	15,3 ± 0,8	20,0 ± 0,8	9,4 ± 0,8	54,4 ± 0,8

IV.1.1.4. Ressonância magnética nuclear de ¹³C e ²⁹Si

A Figura 18 mostra os espectros de ¹³C-RMN das fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas e não imobilizada. O grupo metila ligado diretamente a cadeia do polissiloxano (C-a) promove o aparecimento de uma banda em 0 ppm, que foi maior para a fase tratada a 220°C/4 horas (Figura 18a), mostrando que houve um aumento na formação de ligações Si-C com este procedimento de imobilização. Esta fase estacionária também mostrou bandas em aproximadamente 180 ppm e entre 60 e 80 ppm, provavelmente relacionados com a formação de ligações do tipo O=C-OH, CH-OH e CH₂-OH durante o tratamento térmico.

Os outros espectros (Figura 18b-g) não apresentaram evidências da formação de novas ligações nas fases estacionárias. Para todas as fases estacionárias, os átomos de carbono da cadeia lateral C-8 (C-1 a C-8) mostraram ressonâncias na faixa de 15 a 40 ppm.

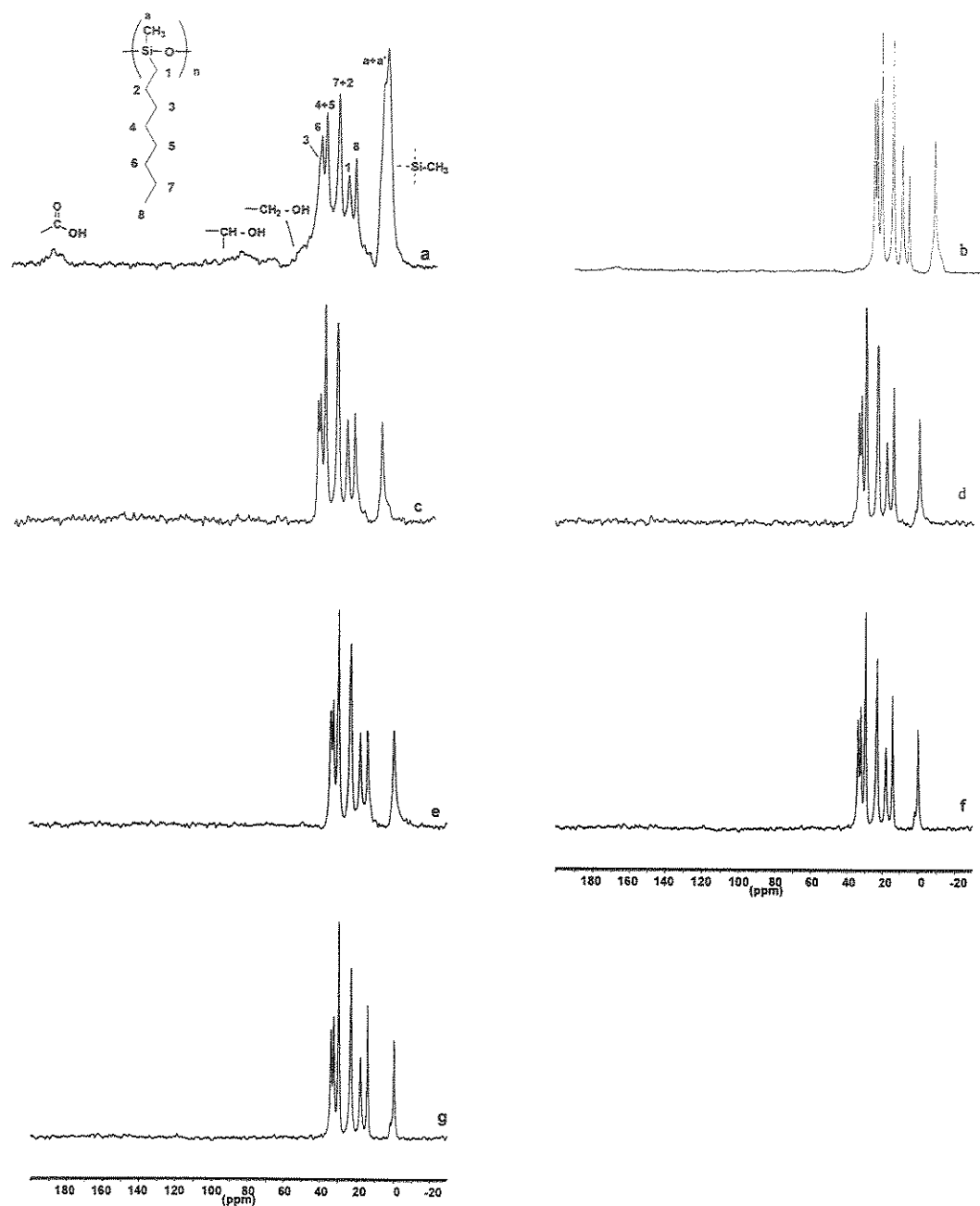


Figura 18. Espectros de ^{13}C -RMN para as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas, b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas, d) irradiação com microondas, e) irradiação com radiação- γ , f) auto-imobilização, e g) fase estacionária não imobilizada.

Como mencionado na parte experimental (Seção III.3.1.1), a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas foi preparada com sílica reidroxilada. A sílica foi reidroxilada por tratamento ácido (solução diluída de HNO_3). Os espectros de ^{29}Si -RMN da sílica reidroxilada e da sílica sem tratamento ácido estão mostrados na Figura 19. Não foi evidenciada nenhuma alteração na estrutura da sílica após o tratamento ácido, pois os espectros da amostra com tratamento (Figura 19a) e sem tratamento ácido (Figura 19b) se mostraram essencialmente idênticos.

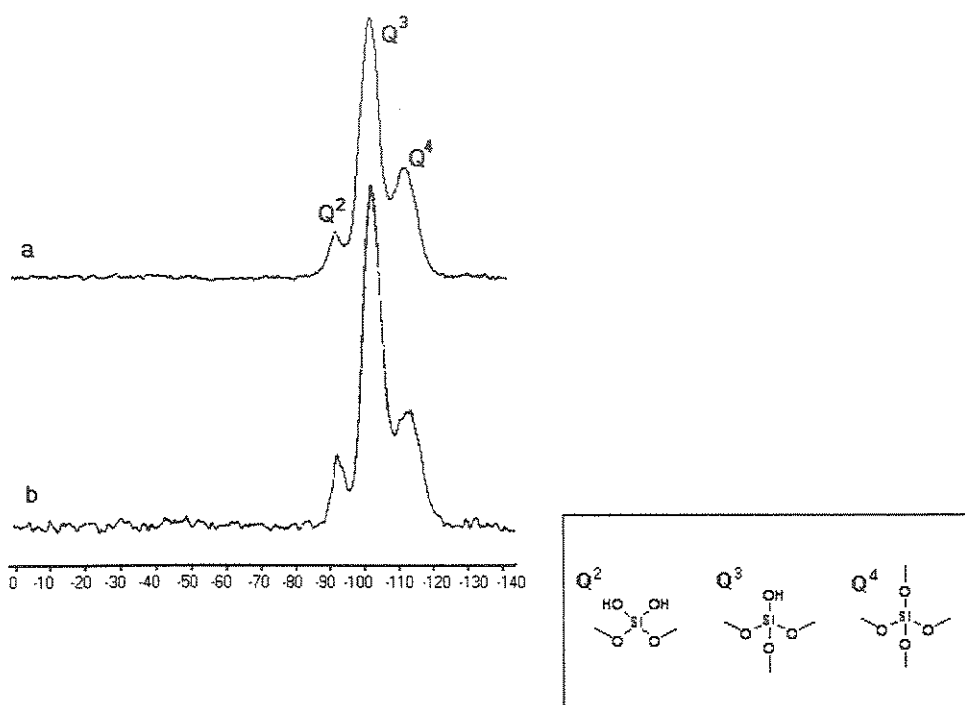


Figura 19. Espectros de ^{29}Si -RMN de (a) sílica Kromasil $5\mu\text{m}$ nua, com tratamento ácido (refluxo em solução de HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ por 4 horas) e (b) sílica Kromasil $5\mu\text{m}$ nua, sem tratamento ácido.

Os espectros de ^{29}Si -RMN das fases estacionárias imobilizadas e não imobilizada estão mostrados na Figura 20. Todas as fases estacionárias apresentaram bandas a -22 ppm relacionados a ressonância da cadeia do polissiloxano ($\text{D}^{2'}$). Nas fases estacionárias imobilizadas, as bandas relacionadas aos grupos D^1 , D_H^1 , $\text{D}^{2'}$ e M

podem ser detectadas, exceto para a fase auto-imobilizada (Figura 20e). As bandas D^1 e D_H^1 podem ser explicadas pela quebra de algumas ligações Si-O-Si da cadeia do polissiloxano durante o processo de imobilização. Algumas cadeias do PMOS são fisicamente adsorvidas (grupos $D^{2''}$) enquanto outras são quimicamente ligadas à superfície do suporte (grupos $D^{2'}$). Alguns grupos também atribuem a banda próxima de -20 ppm (grupos $D^{2'}$) a formação de pequenos polissiloxanos cíclicos¹⁰⁸, mas isto não deveria aparecer nestas amostras, pois estes compostos são arrastados com o procedimento de extração. A ausência destas bandas na fase auto-imobilizada mostra que este não é um processo eficiente de imobilização de PMOS sobre a sílica Kromasil, embora algumas destas bandas já tenham sido observadas em fases estacionárias obtidas pela adsorção e auto-imobilização de PMOS sobre sílica Davisil¹⁰⁷. Este resultado pode estar relacionado com a presença de maior número de sítios reativos superficiais sobre a sílica Davisil que apresenta maior quantidade de traços de metais e consequentemente maior acidez.

As bandas dos grupos T^3 em -65 ppm e dos grupos T^2 em -55 ppm nas amostras tratadas termicamente (Figuras 20a e b) aumentam significativamente com o aumento da temperatura do tratamento térmico. Estas bandas aparecem em função da diminuição das bandas Q^2 e Q^3 (entre -80 e -100 ppm), as quais correspondem aos grupos silanóis da sílica, que são eliminados durante a formação das ligações químicas entre dois grupos silanóis e entre o PMOS e a superfície do suporte. A banda Q^4 não se alterou, pois está relacionada com as ligações do tipo siloxano do interior da estrutura da sílica. Entretanto, pode ser concluído que reações entre a cadeia do polissiloxano e o suporte ou entre as próprias cadeias do polímero podem ocorrer como resultado do processo de imobilização. A fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas não foi analisada por ^{29}Si -RMN, pois estes experimentos foram feitos anteriormente a sua preparação na Universidade de Tübingen na Alemanha.

Com base nos resultados obtidos com os espectros de ^{29}Si e ^{13}C -RMN mostrados acima, ficou evidente que ocorre a ligação do polímero com o suporte, após a etapa de imobilização por tratamento térmico, e esta ligação ocorre entre os grupos silanóis da sílica com as cadeias do PMOS, segundo o modelo proposto na Figura 21.

Figure 1 displays six stacked ^{13}C NMR spectra, labeled (a) through (f), showing the chemical shift (ppm) on the x-axis ranging from 20 to -140. The spectra show various peaks corresponding to different carbon environments in polyacetylene. Key peaks are labeled: $\text{D}^{2''}$, T^3 , Q^4 , Q^3 , Q^2 , T^2 , D^1 , D^2 , $\text{D}^1 + \text{H}$, and M . The spectra illustrate the evolution of the carbon environments as the sample is subjected to different treatments or conditions.

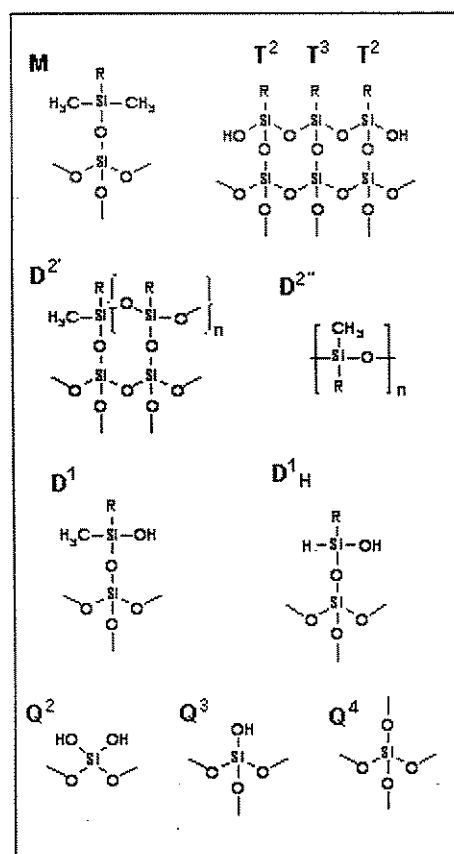


Figura 20. Espectros de ^{29}Si -RMN para as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas, b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas, c) irradiação com microondas, d) irradiação com radiação- γ , e) auto-imobilização e f) fase estacionária não imobilizada.

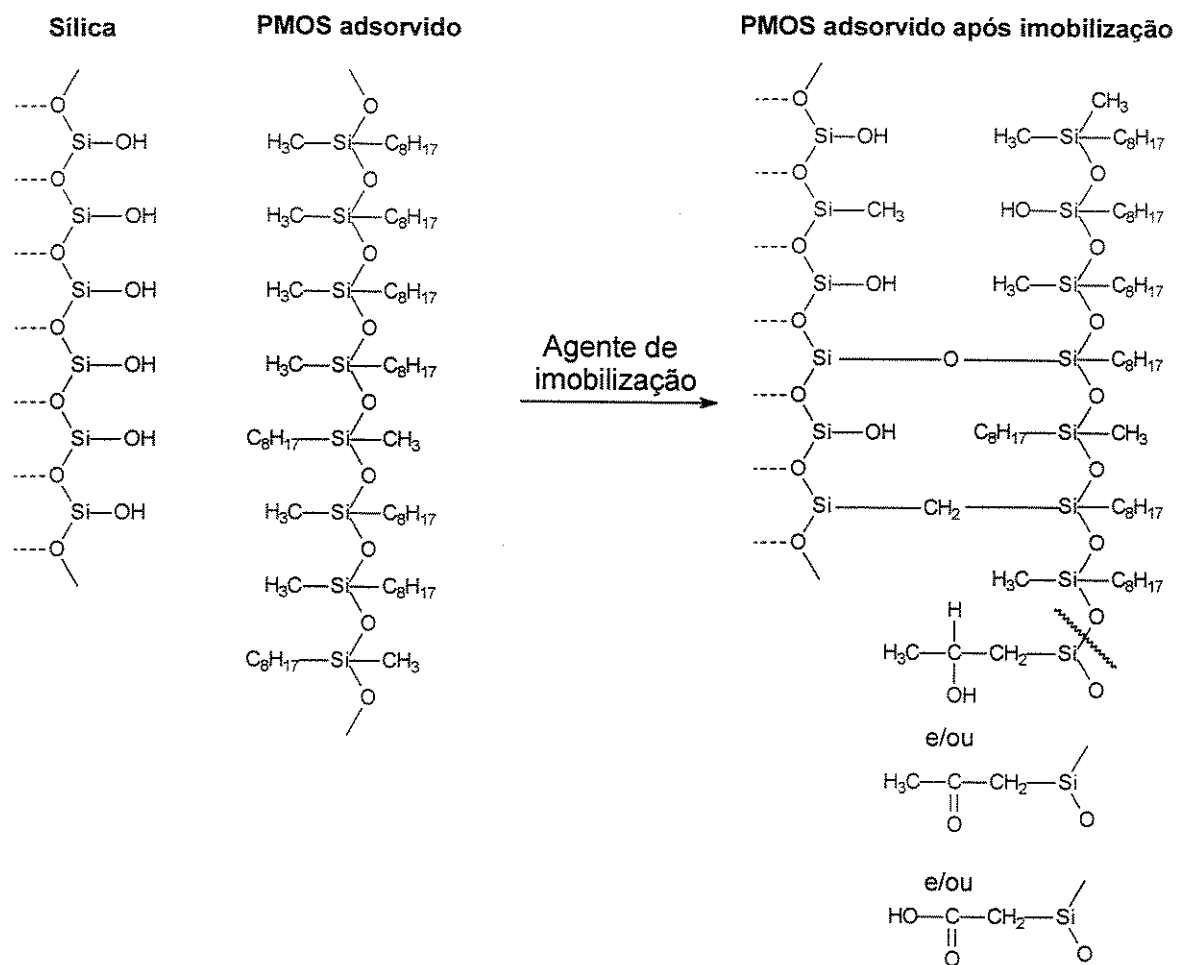


Figura 21. Modelo esquemático para o processo de imobilização¹⁷³.

IV.1.1.5. Espectroscopia no infravermelho

Com o objetivo de descobrir se houve alteração estrutural da sílica após o processo de reidroxilação, obtiveram-se os espectros no IV antes e após o tratamento ácido (Figura 22). Pode ser notado que os espectros são bastante semelhantes, não evidenciando assim alterações significativas na sua estrutura e confirmando os resultados obtidos por ²⁹Si-RMN.

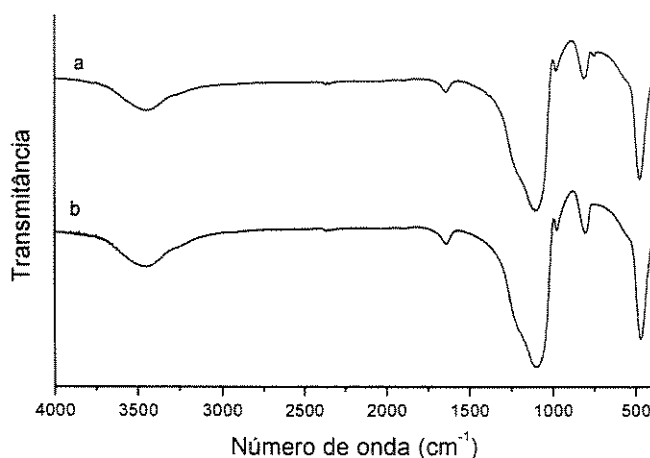


Figura 22. Espectros no infravermelho de (a) sílica Kromasil 5µm nua, com tratamento ácido (refluxo em solução de HNO_3 0,01 mol L^{-1} por 4 horas) e (b) sílica Kromasil 5µm nua, sem tratamento ácido.

Também foram obtidos os espectros no infravermelho das fases estacionárias imobilizadas-extraídas (Figura 23). As bandas dos espectros entre 3000 e 3800 cm^{-1} são atribuídas aos diferentes grupos silanóis. A sobreposição das bandas e a presença de água adsorvida tornam quase impossível fazer a determinação quantitativa dos diferentes tipos de silanóis. As bandas em aproximadamente 2850 a 2950 cm^{-1} são características de estiramento das ligações CH_2 e CH_3 e as bandas em aproximadamente 1100 cm^{-1} estão relacionadas aos grupos siloxanos.

A formação da ligação $\text{C}=\text{O}$ evidenciada no espectro de RMN ^{13}C para a fase estacionária imobilizada a 220°C/4 horas foi confirmada pela presença da banda no espectro próximo de 1700 cm^{-1} desta amostra (Figura 23a) e que não aparece nas outras amostras (Figura 23b-g). Outra banda característica dos grupos silanóis (próxima de 975 cm^{-1}) foi mais intensa no espectro da amostra auto-imobilizada (Figura 223e) e esteve quase ausente nos espectros das amostras tratadas termicamente (Figuras 23a e b). Isto mostra que os grupos silanóis nas fases estacionárias estão recobertos e diminuem com o aumento do carregamento e preenchimento dos poros promovido pelos diferentes processos de imobilização.

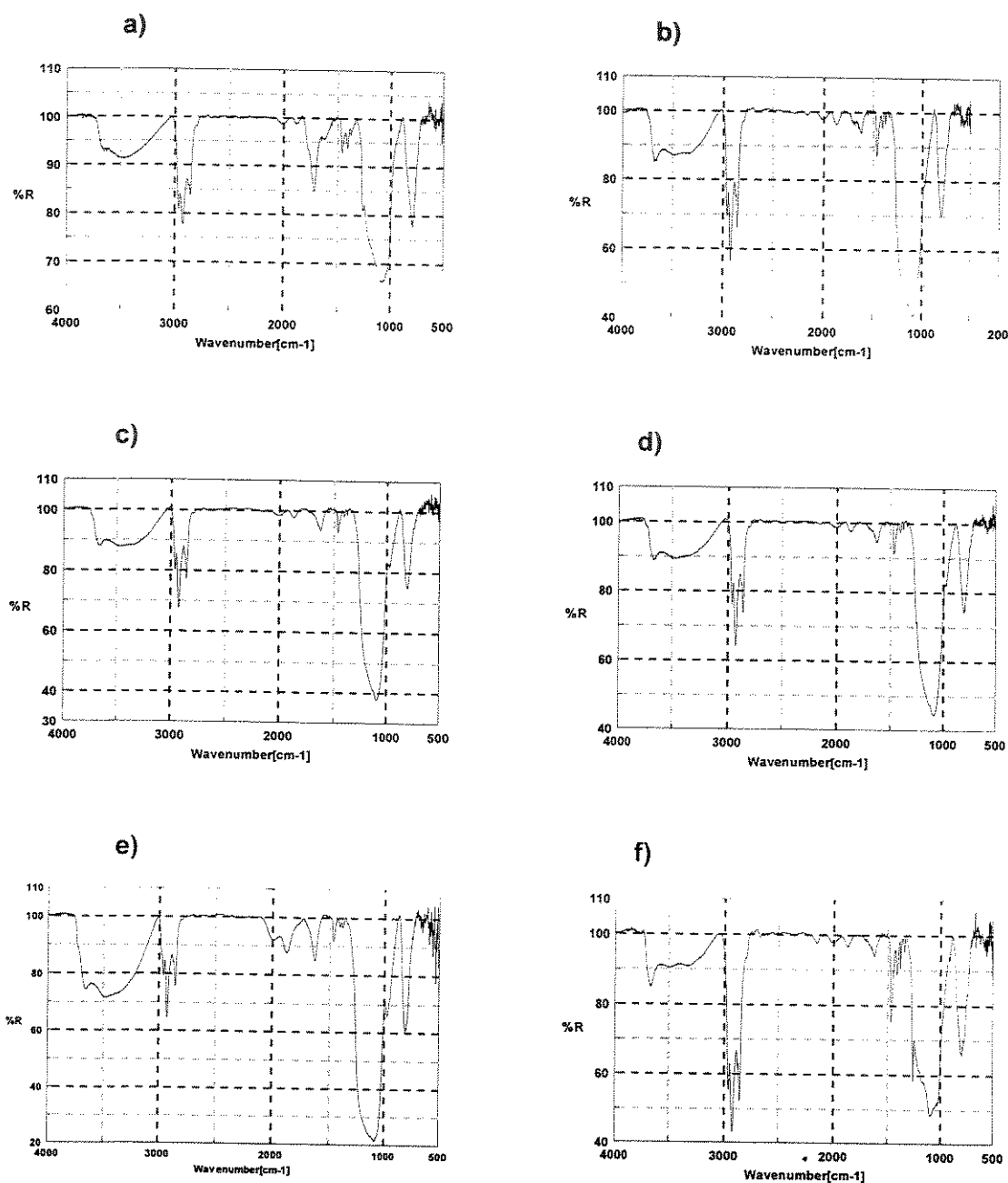


Figura 23. Espectros no infravermelho das fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas por: a) aquecimento a 220°C/4 horas, b) aquecimento a 120°C/4 horas, c) irradiação com microondas, d) irradiação com radiação-γ, e) auto-imobilização; e f) fase estacionária não imobilizada.

IV.1.1.6. Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias das fases estacionárias imobilizadas-extraídas estão mostradas na Figura 24. A fase estacionária tratada a 220°C/4 horas (Figura 24a) apresentou uma aglomeração das partículas, mesmo depois de ser submetida ao procedimento de extração do excesso de PMOS. A presença de uma camada externa de polímero sobre as partículas de sílica sugere que esta fase estacionária não seja adequada para uso cromatográfico, como foi comprovado neste trabalho e será discutido a seguir. As outras fases estacionárias (Figura 24b-e) mostram partículas esféricas e separadas, indicando que o processo de extração do excesso de polímero foi eficiente.

IV.1.2. Avaliação cromatográfica

IV.1.2.1. Mistura teste com compostos ácido, básico e neutros

Os compostos de variadas naturezas utilizados na mistura teste foram: uracila, fenol (ácido), N,N-dimetilanilina (básico), naftaleno (neutro), etilbenzeno (neutro) e acenafteno (neutro). Os cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial (Rainin C8) estão mostrados na Figura 25.

A coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 220°C/4 horas (Figura 25a) não separou os compostos desta mistura teste. Isto deve estar relacionado com a aglomeração das partículas proveniente da degradação do PMOS durante o procedimento de imobilização, como mostrado por GPC e MEV. Desta forma, não foi possível obter os parâmetros cromatográficos para cada composto da mistura teste para esta coluna.

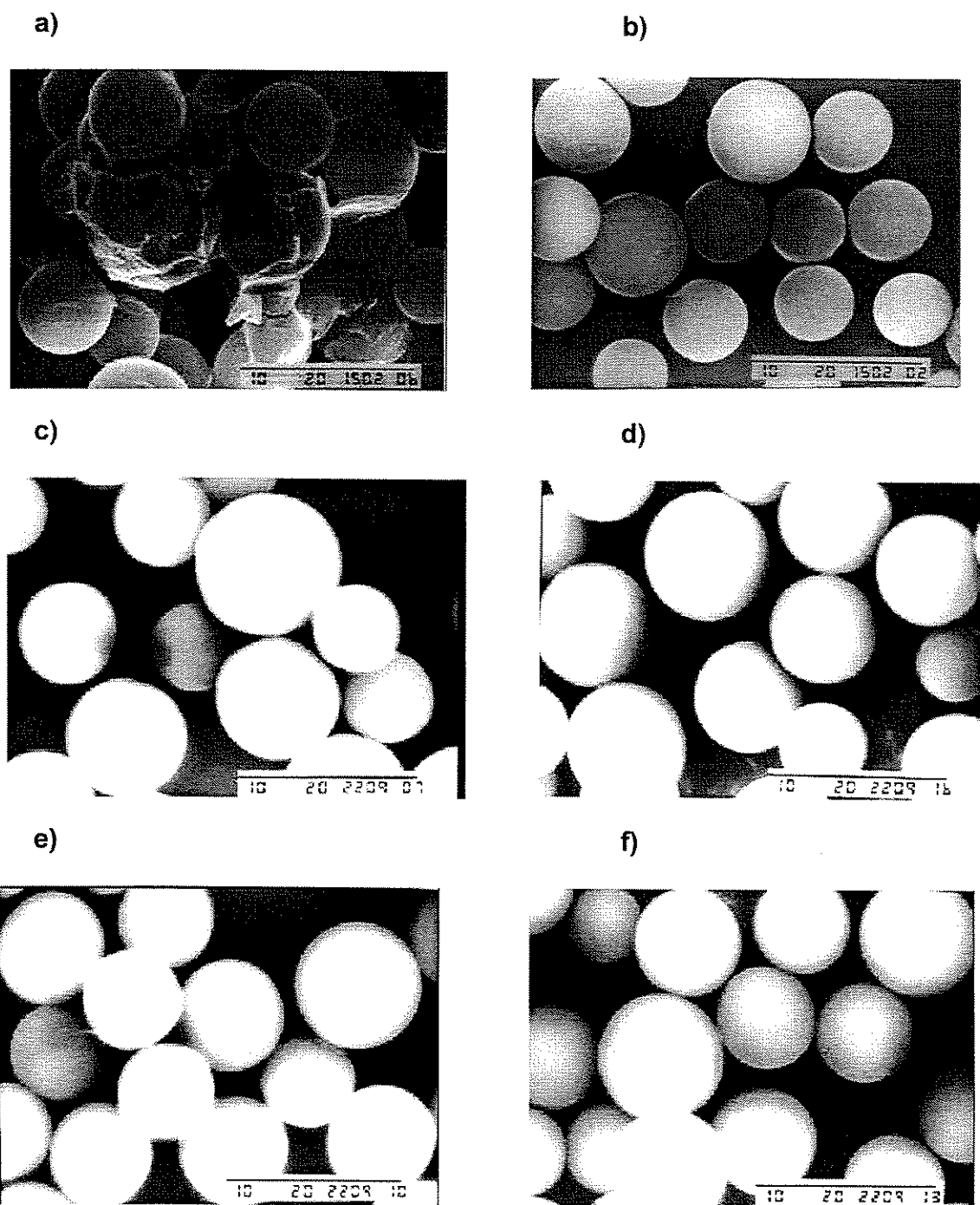


Figura 24. Fotomicrografias das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a 220°C/4 horas; (b) aquecimento a 120°C/16 horas; (c) aquecimento a 120°C/4 horas; (d) irradiação com microondas; (e) irradiação com radiação- γ ; e (f) auto-imobilização. Aumento de 1.500 vezes.

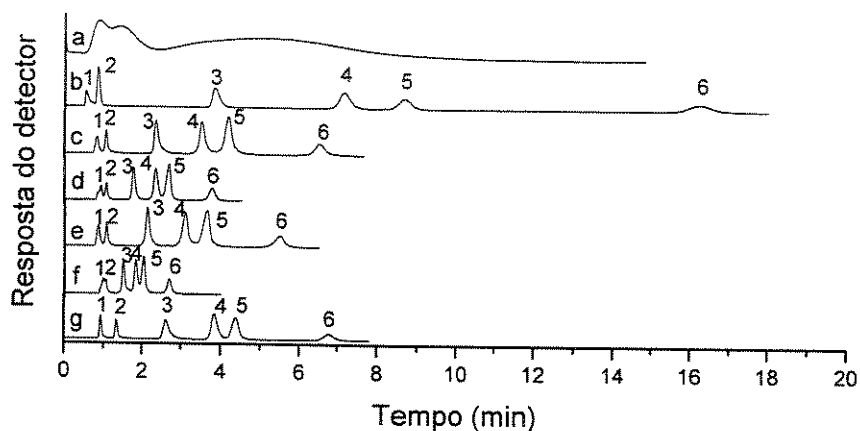


Figura 25. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas, b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas, c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas, d) irradiação com microondas, e) irradiação com radiação- γ , f) auto-imobilização; e g) coluna recheada com fase estacionária comercial Rainin C8. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

A coluna recheada com a fase estacionária auto-imobilizada também não foi capaz de separar completamente todos os compostos da mistura teste (Figura 25f). Este resultado deve estar relacionado com a baixa quantidade de polímero imobilizado por este procedimento de imobilização, promovendo um baixo recobrimento polimérico do suporte (Tabela 1), o qual não foi eficiente na retenção dos compostos, promovendo assim, uma separação pobre. Talvez, se fosse utilizado um maior tempo de auto-imobilização, esta fase poderia ter apresentado um maior recobrimento polimérico e melhor desempenho cromatográfico, como já mostrado em outros trabalhos utilizando outras sílicas¹⁰⁸, embora, neste caso, tenha sido possível obter alguns parâmetros cromatográficos para alguns compostos da mistura teste.

As outras colunas (Figuras 25b-e) foram eficientes para a separação dos compostos da mistura teste.

Os parâmetros cromatográficos dos picos dos compostos da mistura teste (fator de retenção, fator de assimetria, eficiência, resolução e fator de separação) são apresentados nas Tabelas 3 a 7.

Tabela 3. Fator de retenção dos compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação-γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Fenol	0,56	0,28	0,14	0,23	0,04	0,44
N,N-DMA	6,13	2,08	0,90	1,48	0,48	1,82
Naftaleno	12,20	3,82	1,52	2,59	0,79	3,15
Etilbenzeno	15,06	4,79	1,88	3,24	1,00	3,71
Acenafteno	29,13	8,26	3,07	5,38	1,61	6,30

Tabela 4. Fator de assimetria para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação-γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Fenol	1,23	1,56	1,04	1,45	-	1,80
N,N-DMA	1,76	1,66	1,51	1,40	1,38	2,06
Naftaleno	1,40	1,28	1,41	1,28	-	1,44
Etilbenzeno	1,14	0,78	0,57	0,72	-	1,09
Acenafteno	1,26	1,00	0,94	0,95	0,96	1,24

Tabela 5. Resolução entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação-γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Fenol-N,N-DMA	13,44	9,87	5,33	7,40	2,63	6,42
N,N-DMA-Naftaleno	8,11	5,84	3,24	4,43	2,14	4,35
Naftaleno-Etilbenzeno	2,83	2,40	1,64	1,95	1,22	1,73
Etilbenzeno-Acenafteno	9,07	6,27	4,33	4,79	3,25	6,00

Tabela 6. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação-γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Fenol-N,N-DMA	10,95	7,17	6,43	6,43	-	4,14
N,N-DMA-Naftaleno	2,00	1,84	1,69	1,75	1,76	1,73
Naftaleno-Etilbenzeno	1,23	1,25	1,24	1,25	1,27	1,18
Etilbenzeno-Acenafteno	1,93	1,73	1,63	1,66	1,61	1,70

Tabela 7. Eficiência (número de pratos) para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação-γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Fenol	620	1570	1370	1440	-	2140
N,N-DMA	2420	2750	2120	2290	2090	1350
Naftaleno	3200	2860	2260	2320	2060	2900
Etilbenzeno	3720	2720	2430	2060	2200	3000
Acenafteno	3430	3070	2670	2410	2500	3140

Os diferentes valores para o fator de retenção (Tabela 3) mostram que as colunas apresentaram diferentes separações em função do grau de recobrimento polimérico promovido por cada procedimento de imobilização (Tabela 1).

Os valores do fator de assimetria (Tabela 4) mostram que as fases promoveram cromatogramas com picos bastante simétricos para o acenafteno, embora algumas colunas tenham mostrado picos com fator de assimetria um pouco elevado para o nafataleno e com cauda frontal ($A_s < 0,9$) para o etilbenzeno. Para o composto ácido (fenol) somente as fases estacionárias imobilizadas por irradiação com microondas e aquecimento a 120°C/16 horas apresentaram picos mais simétricos, enquanto para o composto básico (N,N-dimetilanilina) todas as fases apresentaram picos mais simétricos do que o obtido com a fase estacionária comercial quimicamente ligada Rainin C8. Não foi possível obter o fator de assimetria para a maioria dos compostos da fase estacionária auto-imobilizada, pois não houve separação suficiente dos picos no cromatograma. Isto é confirmado pelo valor da resolução entre os picos adjacentes (Tabela 5), no qual todas as colunas separam os compostos da mistura teste, exceto a coluna recheada com a fase estacionária auto-imobilizada, que mostrou uma resolução muito pobre para a maioria dos compostos.

O fator de separação entre picos adjacentes (Tabela 6) variou muito pouco para a maioria das fases estacionárias, mostrando um valor significativamente maior para a fase com maior recobrimento polimérico (aquecimento a 120°C/16 horas).

A eficiência das colunas obtidas a partir dos diferentes compostos variou muito (Tabela 7), embora esta propriedade seja bastante influenciada pelo enchimento da coluna. A fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas apresentou maior eficiência para os compostos com maior tempo de retenção, embora tenha mostrado menor eficiência para os compostos com menor tempo de retenção.

A atividade silanofílica das colunas foi determinada pela razão entre o fator de retenção do composto básico (N,N-dimetilanilina) e o fator de retenção do composto hidrofóbico (acenafteno), como descrito por Neue et al.¹⁷⁴. Uma curva do fator de retenção relativo entre N,N-dimetilanilina e acenafteno em função da porcentagem de carbono da fase estacionária é mostrada na Figura 26. A atividade silanofílica diminui proporcionalmente com o aumento da porcentagem de carbono das fases estacionárias. Isto está relacionado com o recobrimento progressivo dos grupos silanóis superficiais com o aumento da porcentagem de carga das fases.

As curvas de eficiência (calculadas para o pico do acenafteno) versus a vazão da fase móvel foram obtidas para cada coluna (Figura 27). As colunas recheadas com as fases estacionárias imobilizadas-extraídas apresentaram curvas similares à fase estacionária comercial (Rainin C8). A coluna recheada com a fase estacionária comercial apresentou maior eficiência em vazões mais elevadas, indicando melhor transferência de massa e um termo C menor na equação de van Deemter^{1,168} e a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas apresentou maior eficiência na vazão ótima, embora para esta fase, a vazão ótima tenha sido 0,2 mL min⁻¹, enquanto para as demais colunas imobilizadas tenha sido 0,4 mL min⁻¹ e para a coluna recheada com a fase estacionária comercial tenha sido 0,5 mL min⁻¹.

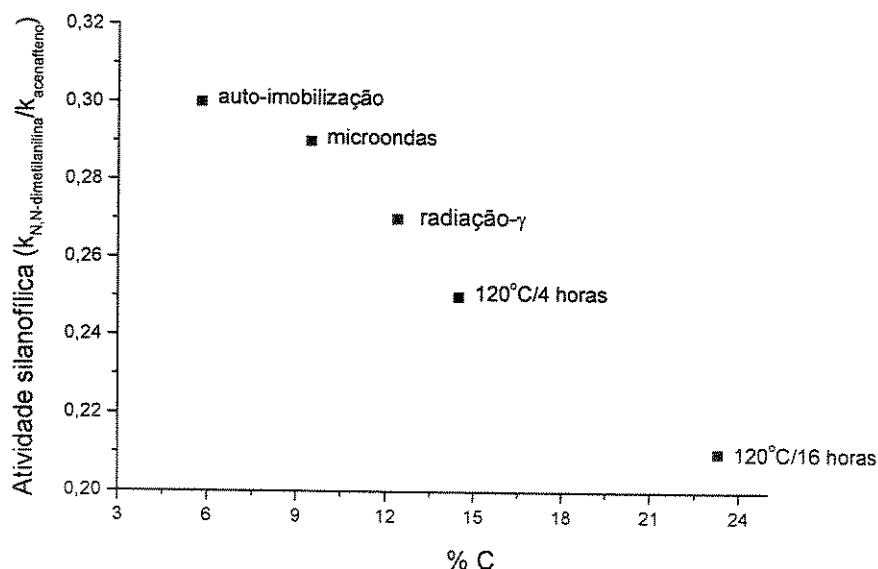


Figura 26. Atividade silanofílica em função da porcentagem de carbono para as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas.

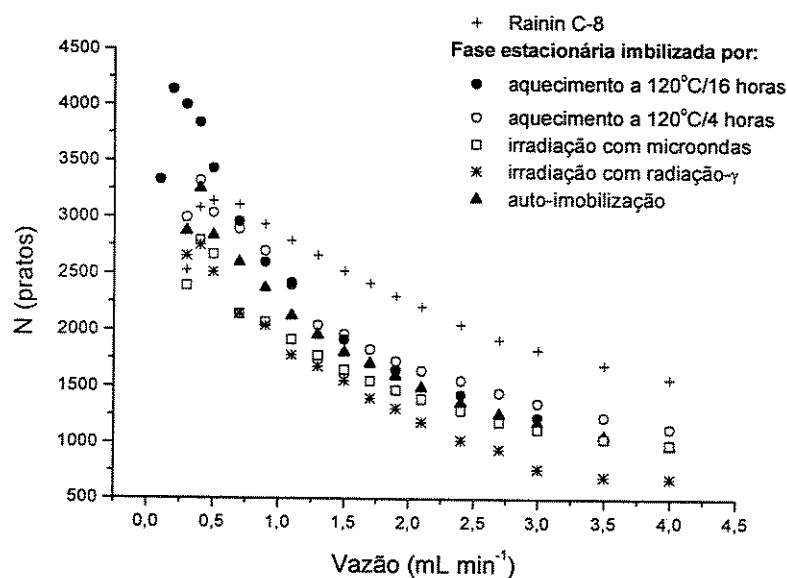


Figura 27. Curvas de eficiência (calculada para o pico do acenafteño) em função da vazão de fase móvel para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e a fase estacionária comercial Rainin C8. Condições: colunas: 50 x 4 mm, fase móvel metanol:água 7:3 (v/v).

IV.1.2.2. Mistura teste com compostos neutros

Os compostos neutros com diferentes polaridades utilizados na mistura teste foram: uracila, acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. Os cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial (Rainin C8) estão mostrados na Figura 28.

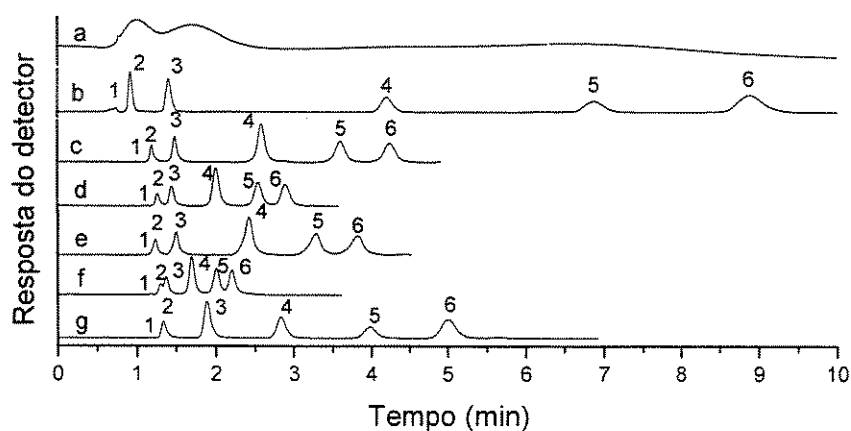


Figura 28. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: a) aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas, b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas, c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas, d) irradiação com microondas, e) irradiação com radiação- γ , f) auto-imobilização; e g) coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-acetona, 3-benzonitrila, 4-benzeno, 5-tolueno e 6-naftaleno.

Como observado para a mistura teste contendo compostos ácido, básico e neutros, a coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas também não separou os compostos da mistura teste contendo apenas compostos neutros (Figura 28a), e neste caso, também não foi possível obterem os parâmetros cromatográficos para esta coluna. A coluna recheada com a fase auto-imobilizada também não separou todos os compostos desta mistura teste (Figura 28f), mas neste caso, foi possível obterem alguns dos parâmetros cromatográficos para os compostos. As demais colunas recheadas com as fases estacionárias imobilizadas-

extraídas foram eficientes na separação dos compostos da mistura teste (Figuras 28b-e). Os parâmetros cromatográficos (fator de retenção, fator de assimetria, resolução, fator de separação e eficiência) obtidos a partir dos cromatogramas dos compostos da mistura teste com compostos neutros estão mostrados nas Tabelas 8 a 12.

Tabela 8. Fator de retenção dos compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação- γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Acetona	0,28	0,14	0,14	0,14	0,10	0,13
Benzonitrila	0,95	0,42	0,30	0,39	0,16	0,60
Benzeno	4,81	1,48	0,80	1,24	0,43	1,40
Tolueno	8,52	2,47	1,29	2,04	0,70	2,37
Naftaleno	11,29	3,09	1,60	2,54	0,86	3,25

Tabela 9. Fator de assimetria para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação- γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Acetona	1,40	1,55	1,63	1,30	-	1,77
Benzonitrila	1,37	1,43	1,48	1,17	-	1,62
Benzeno	1,28	1,15	1,34	0,99	1,26	1,38
Tolueno	1,24	0,99	1,26	0,86	-	1,24
Naftaleno	1,41	1,04	1,20	0,90	-	1,23

Tabela 10. Resolução entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação- γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Acetona – Benzonitrila	4,19	3,26	1,76	2,40	0,72	4,02
Benzonitrila - Benzeno	13,14	8,08	4,32	5,88	2,75	5,17
Benzeno – Tolueno	7,20	4,97	3,23	3,81	2,47	4,60
Tolueno – Naftaleno	3,71	2,47	1,77	1,91	1,38	3,21

Tabela 11. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação- γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Acetona – Benzonitrila	3,39	3,00	2,14	2,79	1,60	4,62
Benzonitrila - Benzeno	5,06	3,52	2,67	3,18	2,69	2,33
Benzeno – Tolueno	1,77	1,67	1,61	1,65	1,63	1,69
Tolueno – Naphthaleno	1,33	1,25	1,24	1,25	1,23	1,37

Tabela 12. Eficiência (número de pratos) para os compostos da mistura teste com compostos neutros para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas-extraídas e com a fase estacionária comercial Rainin C8. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	120°C/16h	120°C/4h	microondas	radiação-γ	auto-imobilizada	Rainin C8
Acetona	1490	3330	2730	2350	-	1950
Benzonitrila	1720	3530	2720	2435	2290	2400
Benzeno	3320	3570	2900	2517	3250	2830
Tolueno	3670	3600	3000	2520	3610	3040
Naftaleno	3180	3730	3010	2680	3210	3200

Novamente, pode ser observado pelos valores do fator de retenção (Tabela 8) que as colunas apresentaram diferentes separações em função do grau de recobrimento polimérico resultante de cada procedimento de imobilização. De um modo geral, todas as fases proporcionaram cromatogramas com picos bastante simétricos (Tabela 9). Não foi possível obter o fator de assimetria para a maioria dos compostos no cromatograma da coluna recheada com a fase estacionária auto-imobilizada, sendo que não houve separação suficiente dos picos. Isto foi confirmado pelos resultados de resolução para os picos adjacentes (Tabela 10), na qual todas as colunas separaram os compostos da mistura teste, exceto a coluna recheada com a fase estacionária auto-imobilizada.

O fator de separação entre picos adjacentes (Tabela 11) variou muito pouco para a maioria das fases estacionárias, mostrando um valor significativamente maior para a fase com maior recobrimento polimérico (aquecimento a 120°C/16 horas).

A eficiência das colunas obtidas a partir dos diferentes compostos desta mistura teste (Tabela 12) também variou bastante. Novamente, a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas apresentou maior eficiência para os compostos com

maior tempo de retenção, embora tenha mostrado a menor eficiência para os compostos com menor tempo de retenção.

A hidrofobicidade das fases estacionárias foi determinada pelo método de Galusko¹⁷⁵, no qual a hidrofobicidade é expressa por $(k_{\text{tolueno}} + k_{\text{benzeno}})/2$. A curva de hidrofobicidade em função da porcentagem de carbono da fase estacionária é mostrada na Figura 29. Como esperado, a hidrofobicidade aumenta proporcionalmente com o aumento da porcentagem de carbono da fase estacionária, devido ao aumento na quantidade de cadeias alquilas na superfície da fase estacionária quando se aumenta a porcentagem de carga da fase. Então, a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas mostrou maior hidrofobicidade, enquanto a fase auto-imobilizada mostrou a menor hidrofobicidade.

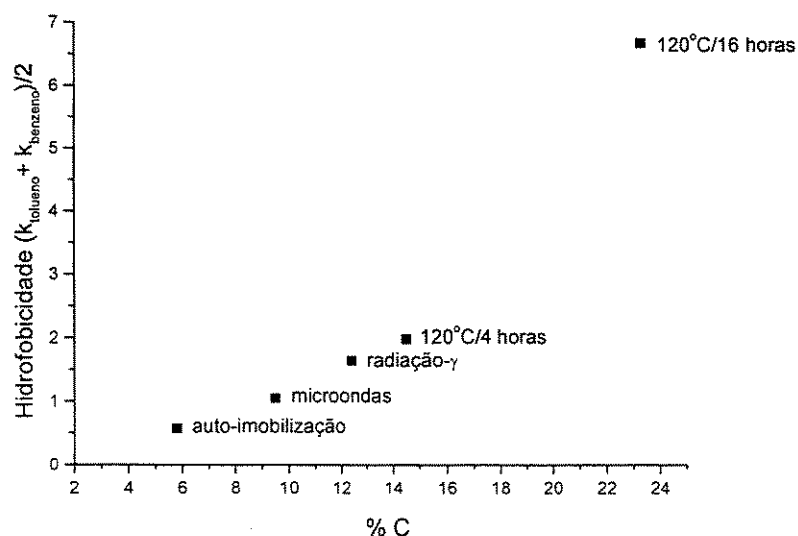


Figura 29. Hidrofobicidade em função da porcentagem de carbono das fases estacionárias SiO₂(PMOS) imobilizadas-extraídas.

IV.1.3. Testes de estabilidade

IV.1.3.1. Teste de estabilidade com fase móvel neutra

Inicialmente as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e a fase estacionária comercial Rainin C8 foram submetidas a um teste de estabilidade com fase móvel neutra, metanol:água 7/3 v/v, a temperatura ambiente. Neste trabalho o volume de fase móvel passado pela coluna é expresso em volume de coluna (v_c), como comumente utilizado na literatura. O volume de coluna foi calculado em relação ao tempo de retenção do composto não retido (uracila). Para as colunas utilizadas neste trabalho o v_c é de 0,40 mL. O teste com fase móvel neutra consistiu em passar 5.000 v_c desta fase móvel pelas colunas recheadas com as fases estacionárias. Os gráficos de parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste (fenol, N,N-dimetilanilina e naftaleno) em função do volume de fase móvel passado pelas colunas são mostrados nas Figuras 30, 31 e 32.

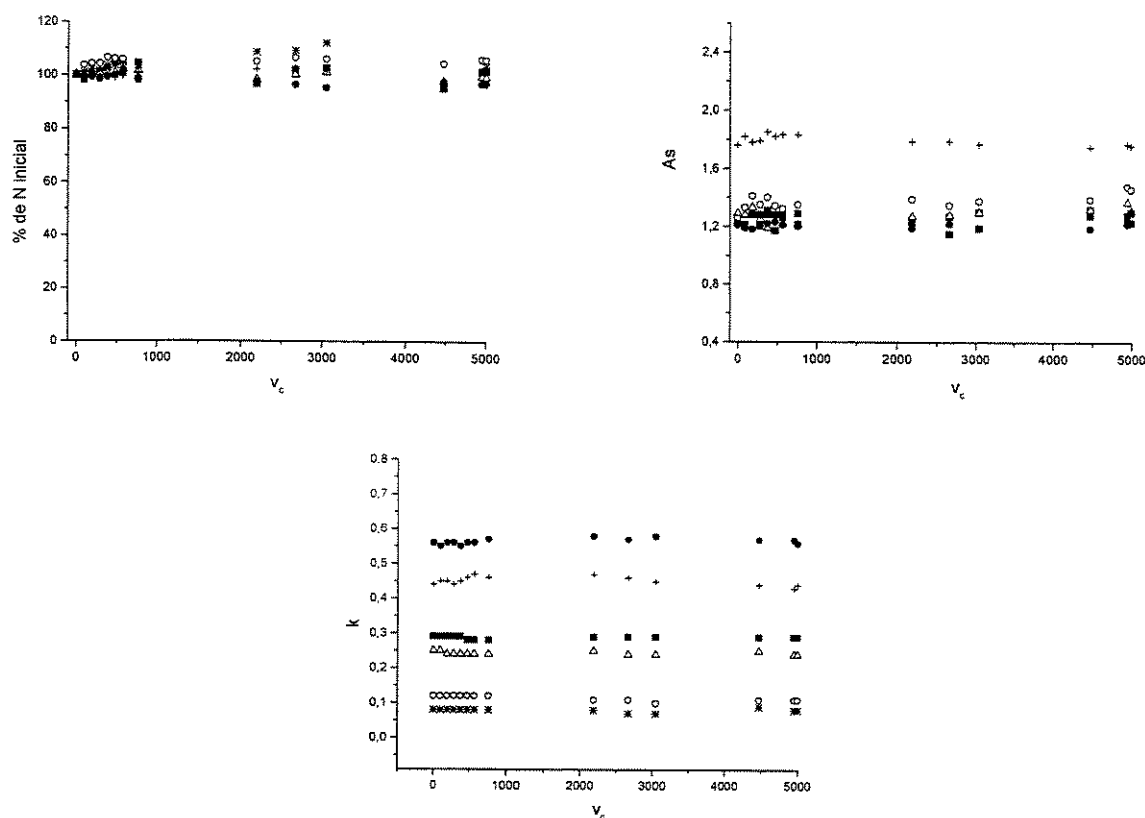


Figura 30. Parâmetros cromatográficos para o pico do fenol em função do volume de fase móvel neutra passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a 120°C/4 horas; ● aquecimento a 120°C/16 horas; ○ irradiação com microondas; △ irradiação com radiação- γ ; * auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

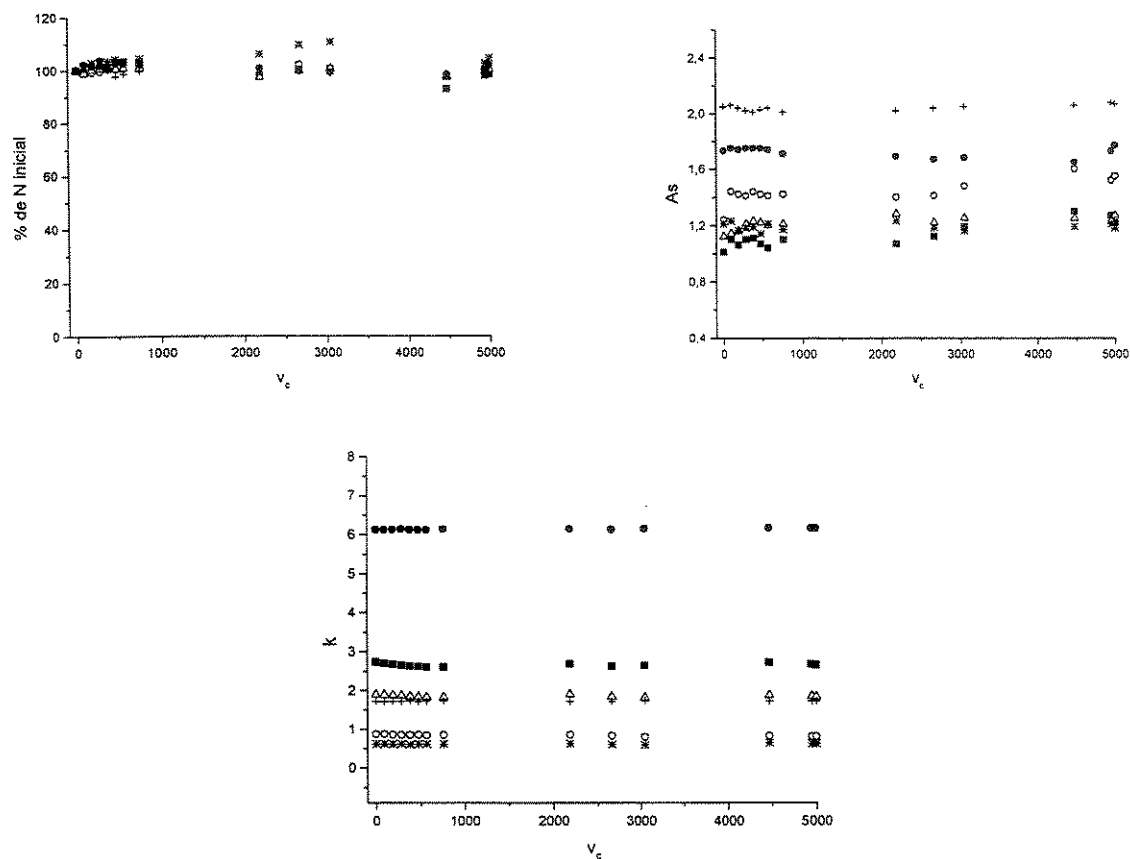


Figura 31. Parâmetros cromatográficos para o pico da N,N-dimetilanilina em função do volume de fase móvel neutra passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; ● aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; o irradiação com microondas; Δ irradiação com radiação- γ ; * auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

Todas as fases estacionárias imobilizadas-extraídas e a fase estacionária comercial Rainin C8 se apresentaram bastante estáveis quando testadas com a fase móvel neutra, pois não houve alteração significativa para os parâmetros cromatográficos dos compostos da mistura teste depois de passar 5.000 v_c de fase móvel através das colunas a temperatura ambiente (Figuras 30, 31 e 32).

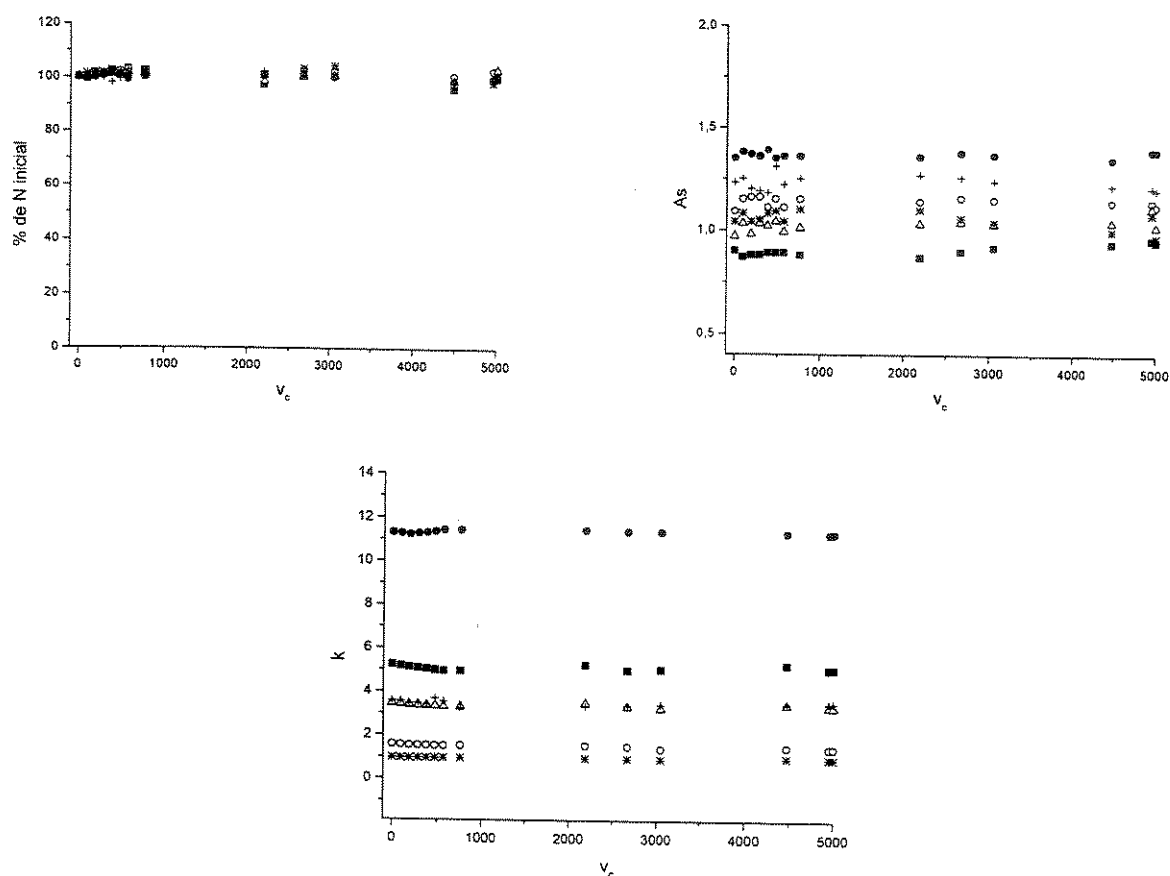


Figura 32. Parâmetros cromatográficos para o pico do naftaleno em função do volume de fase móvel neutra passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas; ● aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; ○ irradiação com microondas; Δ irradiação com radiação- γ ; * auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

Devido às dificuldades como tempo de análise, disponibilidade de equipamento e volume de fase móvel, um teste mais prolongado utilizando fase móvel neutra, comparável com muitos testes mostrados na literatura¹⁵⁵, foi feito apenas em uma das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas. A fase escolhida para este teste foi a imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas. Neste teste, passou-se 30.000 v_c de fase móvel neutra pela coluna a temperatura ambiente. Os resultados estão mostrados na Figura 33. Novamente, após passar 30.000 v_c de fase móvel neutra, não houve alteração significativa dos parâmetros cromatográficos para todos os compostos

da mistura teste. Os cromatogramas obtidos antes e após o teste de estabilidade estão mostrados na Figura 34.

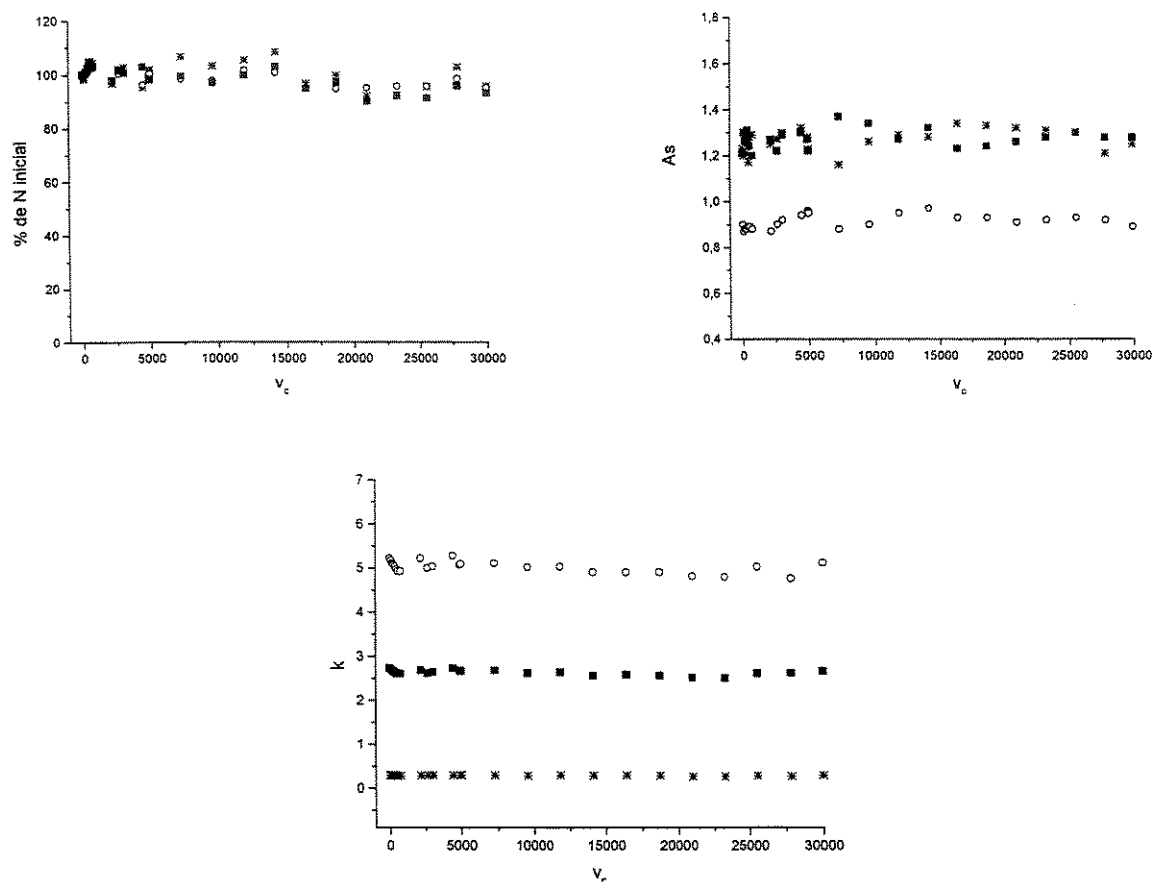


Figura 33. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel neutra passado pela coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas. Compostos da mistura teste: * fenol; ■ N,N-dimetilanilina; e o naftaleno.

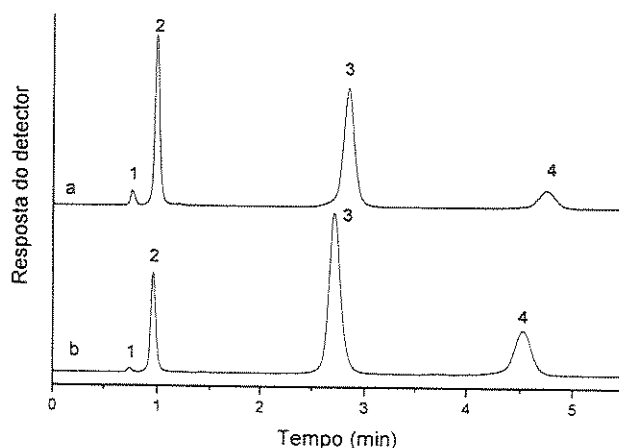


Figura 34. Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/4$ horas (a) antes e (b) após passar 30.000 v_c de fase móvel neutra pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

IV.1.3.2. Teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4

Como todas as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas e a fase estacionária comercial Rainin C8 suportaram o teste com fase móvel neutra, elas também foram submetidas ao teste com fase móvel alcalina (pH 8,4) a temperatura de 60°C . Os gráficos de parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste (fenol, N,N-dimetilanilina e naftaleno) em função do volume de fase móvel alcalina passado pela coluna são mostrados nas Figuras 35, 36 e 37.

Pelos gráficos de % de N inicial em função do volume de fase móvel passado pela coluna pode ser notado que a eficiência da coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas se manteve estável durante todo teste de estabilidade para os três compostos da mistura teste. Para as demais colunas recheadas com as fases imobilizadas-extraídas, a estabilidade se mostrou dependente da porcentagem de carregamento polimérico de cada fase. Assim, as fases imobilizadas por tratamento térmico ou irradiação com radiação-gama apresentaram maior estabilidade, quando comparado com as fases imobilizadas por irradiação com

microondas ou por auto-imobilização. A fase estacionária comercial Rainin C-8 mostrou uma pequena perda na eficiência durante todo o teste.

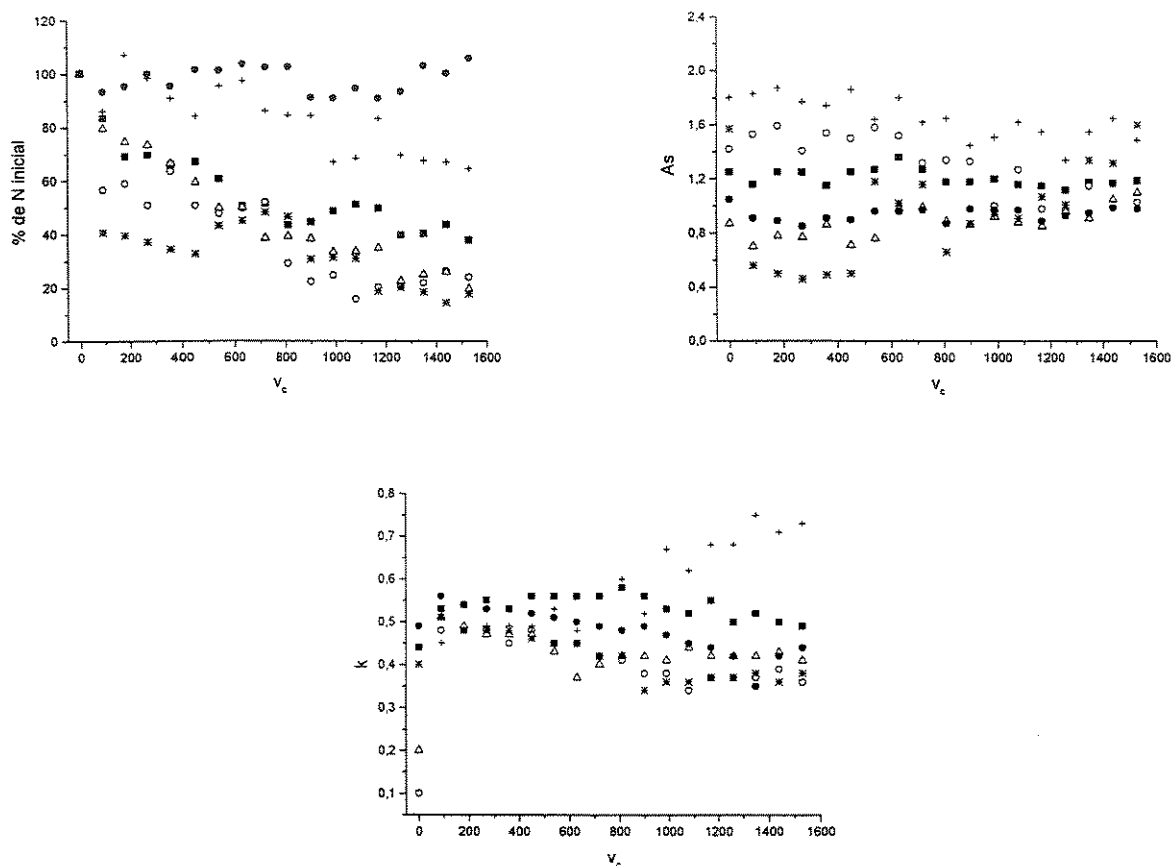


Figura 35. Parâmetros cromatográficos para o pico do fenol em função do volume de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a 120°C/4 horas; ● aquecimento a 120°C/16 horas; ○ irradiação com microondas; Δ irradiação com radiação- γ ; * auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

O fator de assimetria dos diferentes compostos da mistura teste sofreu maior alteração para a coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por auto-imobilização, enquanto para as demais colunas, este parâmetro cromatográfico não sofreu grande variação.

Quanto ao fator de retenção, todas as fases estacionárias imobilizadas apresentaram leve queda neste parâmetro para todos os compostos durante o teste, embora a fase estacionária comercial tenha mostrado um considerável aumento na retenção do fenol.

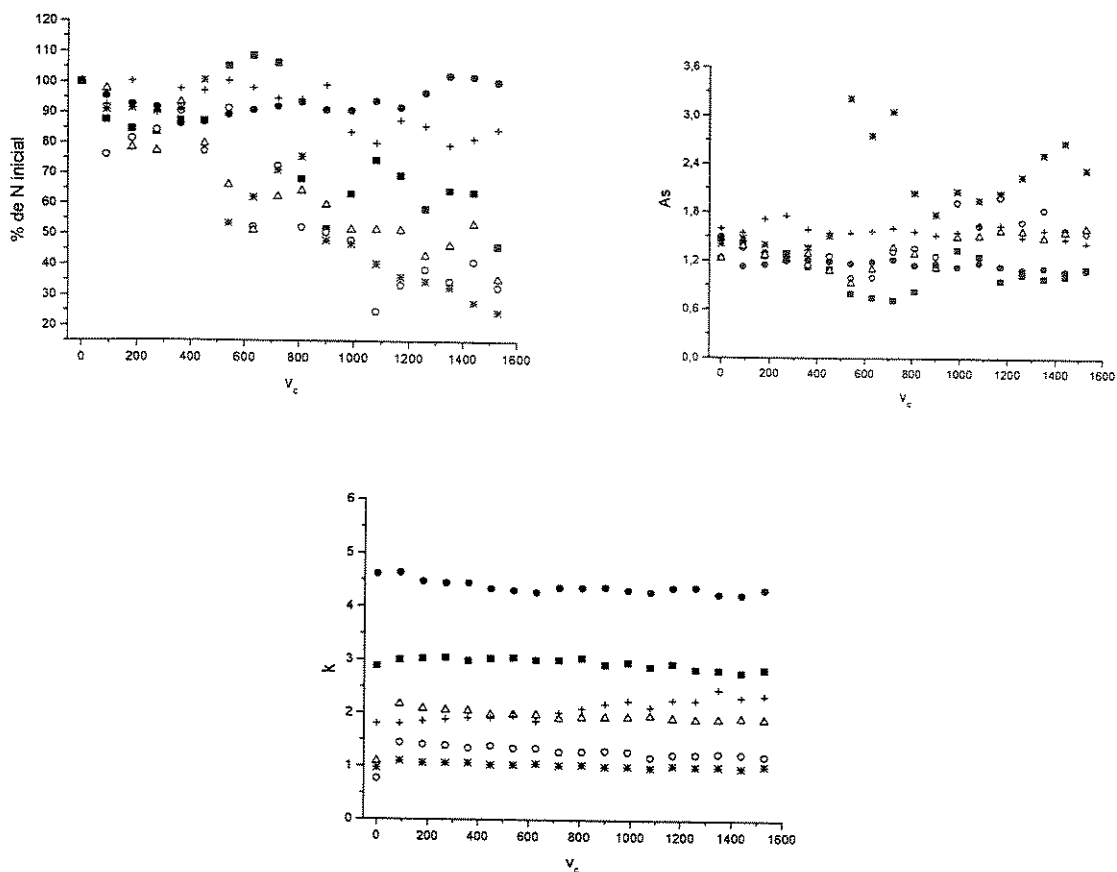


Figura 36. Parâmetros cromatográficos para o pico da N,N-dimetilanilina em função do volume de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a 120°C/4 horas; ● aquecimento a 120°C/16 horas; ○ irradiação com microondas; △ irradiação com radiação- γ ; * auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

A fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas mostrou-se mais estável que as demais, sendo que houve menor variação dos parâmetros cromatográficos no decorrer do teste, e a fase auto-imobilizada apresentou a menor estabilidade. Em geral, a estabilidade das fases estacionárias imobilizadas variou de

acordo com a porcentagem de carga, ou seja, quanto maior a quantidade de polímero imobilizado maior a estabilidade da fase. Isto ocorre devido ao maior recobrimento superficial do suporte de sílica que a torna mais protegida do ataque básico.

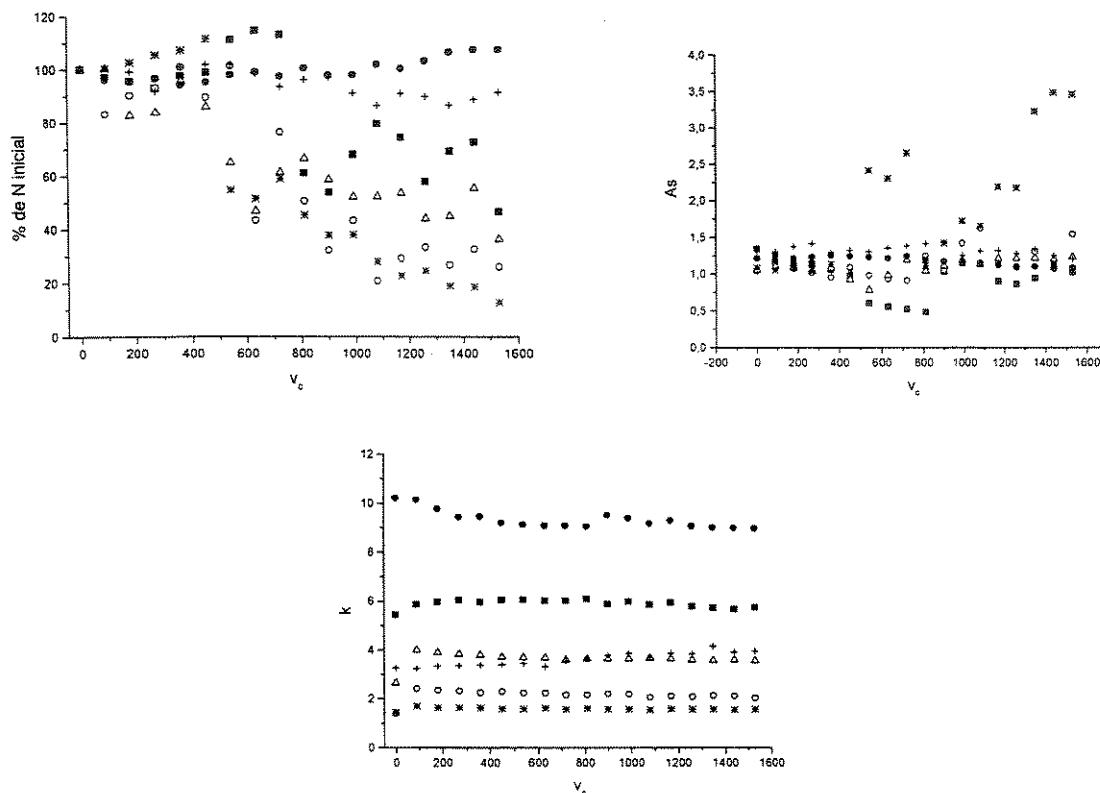


Figura 37. Parâmetros cromatográficos para o pico do naftaleno em função do volume de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pelas colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas por: ■ aquecimento a 120°C/4 horas; ● aquecimento a 120°C/16 horas; ○ irradiação com microondas; △ irradiação com radiação- γ ; * auto-imobilização; e + coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8.

A instabilidade das fases estacionárias imobilizadas está relacionado com a dissolução do suporte de sílica com a passagem de fase móvel alcalina¹⁷⁶, que é evidenciado pelo aumento da porcentagem de carbono de todas as fases estacionárias depois do teste de estabilidade (Tabela 13), como resultado do aumento da razão polímero/sílica, observado quando somente o suporte é dissolvido, sem perda do polímero da fase estacionária. Isto resulta em uma redistribuição das cadeias do

polímero sobre o suporte cromatográfico e, então, proporciona alterações na eficiência e retenção dos compostos. Para o caso da fase estacionária comercial, ocorreu a diminuição da %C como consequência da perda da fase ligada (Tabela 13).

Tabela 13. Porcentagem de carbono das fases estacionárias imobilizadas-extraídas e da fase estacionária comercial (Rainin C8) antes e após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4.

	120°C/4h	120°C/16h	microondas	radiação- γ	auto-imobilizada	Rainin C8
%C antes do teste	14,5	23,3	9,5	12,4	5,8	7,2
%C após o teste	16,7	23,5	10,4	14,0	5,9	6,9

Os cromatogramas obtidos antes e após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4 para as colunas recheadas com a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas e a fase estacionária comercial Rainin C8 estão mostrados na Figura 38.

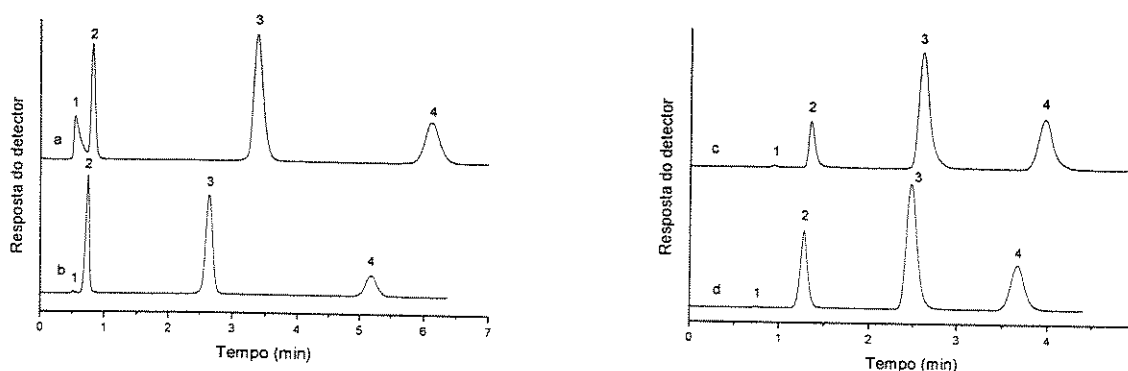


Figura 38. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas (a) antes e (b) após passar 1.500 v_c de fase móvel alcalina pH 8,4 pela coluna e com a fase estacionária comercial Rainin C8 (c) antes e (d) após passar 1.500 v_c de fase móvel alcalina pH 8,4 pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de 0,5 mL min^{-1} . Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

IV.1.3.3. Teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0

A fase estacionária obtida por aquecimento a 120°C/16 horas e a fase estacionária comercial Rainin C8 também foram testadas frente a fase móvel alcalina pH 10,0 a 60°C, sendo que foram estas fases que se mostraram mais estáveis frente ao teste com a fase móvel alcalina pH 8,4. Esta condição é muito mais drástica que a anterior e promove uma degradação maior das fases estacionárias. Os gráficos dos parâmetros cromatográficos para os picos dos compostos da mistura teste (fenol, N,N-dimetilanilina e naftaleno) em função do volume de fase móvel pH 10,0 passado pela coluna estão apresentados nas Figuras 39, 40 e 41.

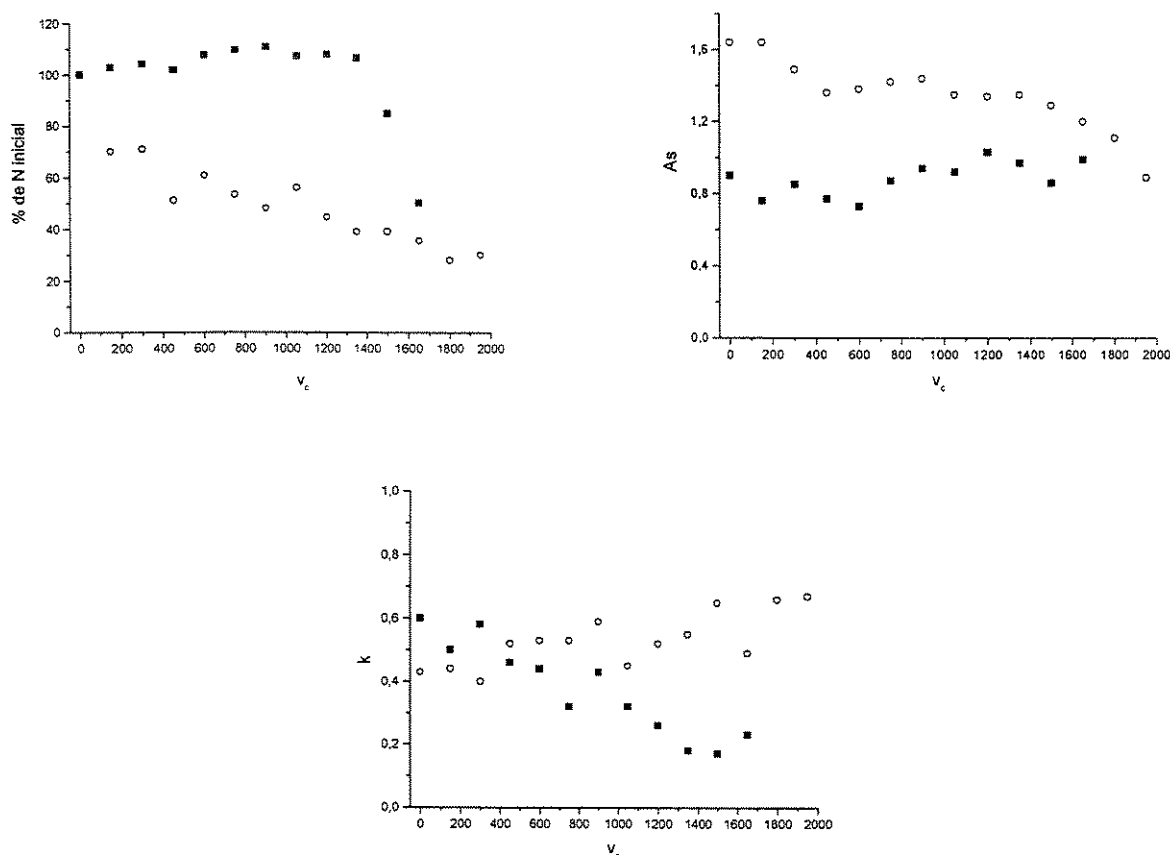


Figura 39. Parâmetros cromatográficos para o pico do fenol em função do volume de fase móvel alcalina pH 10,0 passado pela coluna recheada com: ■ fase estacionária SiO₂(PMOS) imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas; e o fase estacionária comercial Rainin C8.

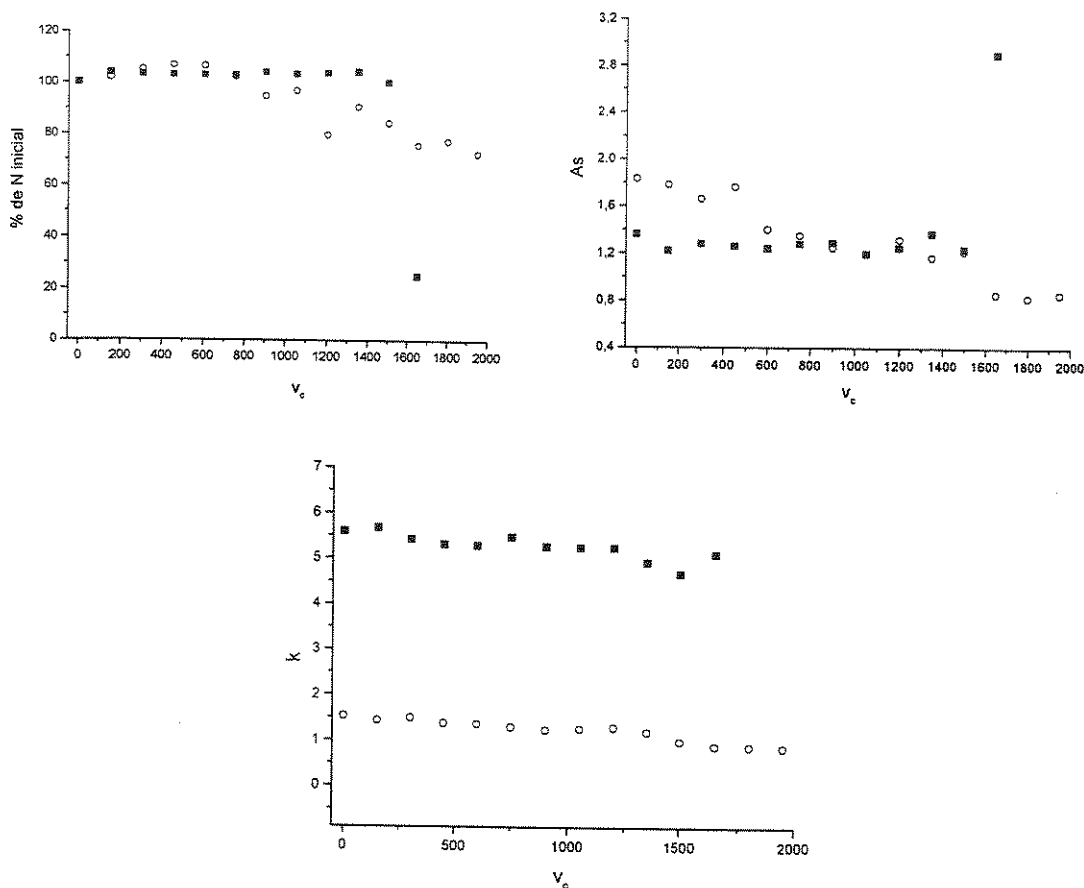


Figura 40. Parâmetros cromatográficos para o pico da N,N-dimetilanilina em função do volume de fase móvel alcalina pH 10,0 passado pela coluna recheada com: ■ fase estacionária SiO₂(PMOS) imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas; e o fase estacionária comercial Rainin C8.

Pelos gráficos de % de N inicial em função do volume de fase móvel passado pela coluna pode ser notado que a eficiência da coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas se manteve estável até aproximadamente 1.100 V_c com esta fase móvel agressiva, antes de degradar totalmente. A coluna recheada com a fase estacionária comercial Rainin C8 apresentou uma diminuição gradativa de sua eficiência durante todo o teste de estabilidade. Este mesmo comportamento também é evidente para o fator de assimetria dos compostos da mistura teste.

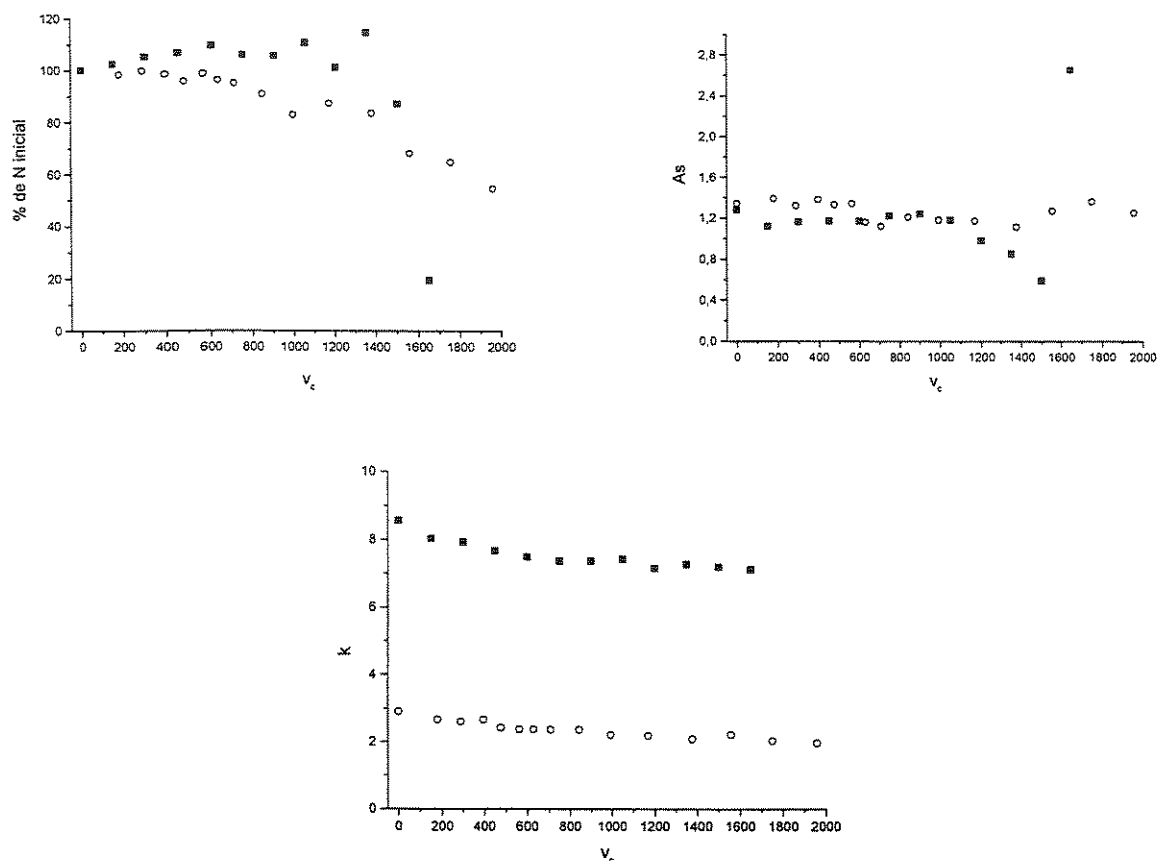


Figura 41. Parâmetros cromatográficos para o pico do naftaleno em função do volume de fase móvel alcalina pH 10,0 passado pela coluna recheada com: ■ fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; e o fase estacionária comercial Rainin C8.

O fator de retenção dos compostos da mistura teste para as duas colunas diminuiu gradativamente durante o teste com fase móvel alcalina pH 10,0, menos o fenol, que para a coluna recheada com a fase estacionária comercial (Rainin C8), apresentou considerável aumento de retenção, comportamento este também ocorrido no teste com fase móvel alcalina pH 8,4.

Após a degradação da fase estacionária imobilizada a $120^\circ\text{C}/16$ horas, não foi mais possível obter os parâmetros cromatográficos para esta coluna, devido à sobreposição de picos no cromatograma.

Novamente, a degradação da fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas é devido a dissolução do suporte de sílica, como mostrado nos resultados de porcentagem de carbono (Tabela 14), que aumentou no final do teste de estabilidade. Este resultado foi confirmado pelo estudo morfológico por microscopia eletrônica de varredura (Figura 42), que indica que a partícula de sílica é esférica antes do teste de estabilidade e com buracos (parcialmente dissolvida) depois do teste. Mais uma vez, a fase estacionária comercial apresentou diminuição da %C como consequência da perda da fase ligada (Tabela 14).

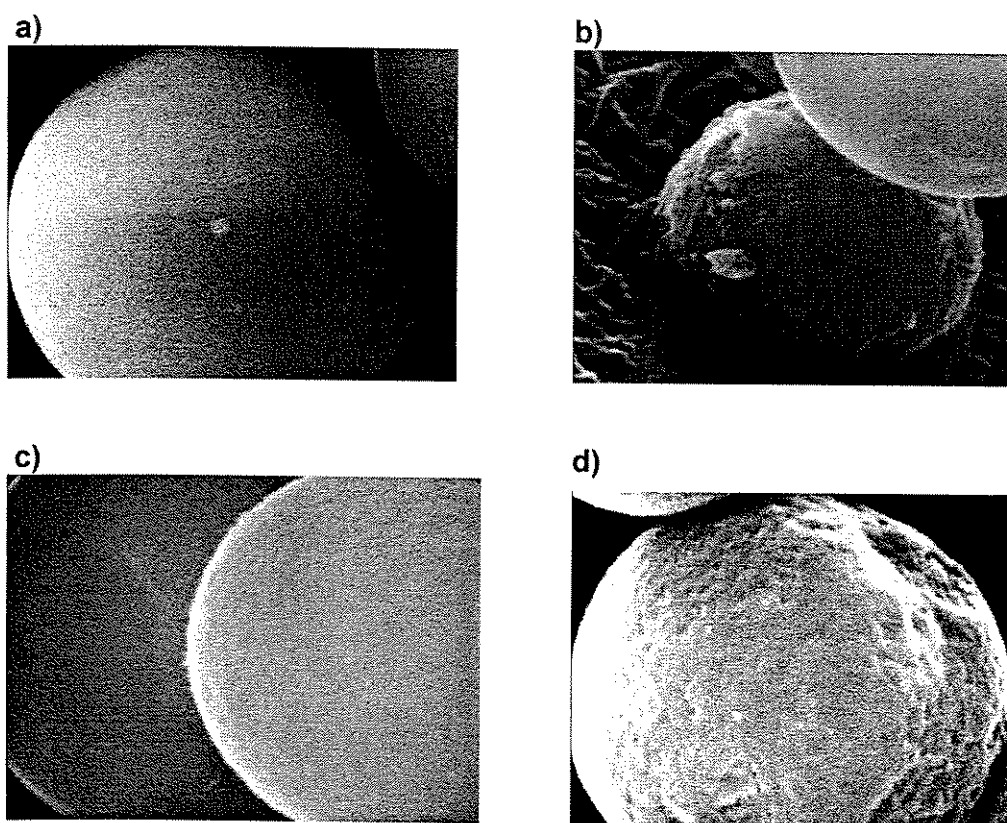


Figura 42. Fotomicrografias da fase estacionária SiO_2 (PMOS) imobilizada a 120°C/16 horas :a) antes e b) após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0; e da fase estacionária comercial Rainin C8: c) antes e d) após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0. Aumento de 20.000 vezes.

Tabela 14. Porcentagem de carbono da fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16\text{h}$ e da fase estacionária comercial (Rainin C8) antes e após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0.

Fase estacionária	$120^\circ\text{C}/16\text{h}$	Rainin C8
%C antes do teste	23,3	7,2
%C após o teste	24,8	6,6

Os cromatogramas obtidos antes e após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 10,0 para as colunas recheadas com a fase estacionária imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas e a fase estacionária comercial Rainin C8 estão mostrados na Figura 43.

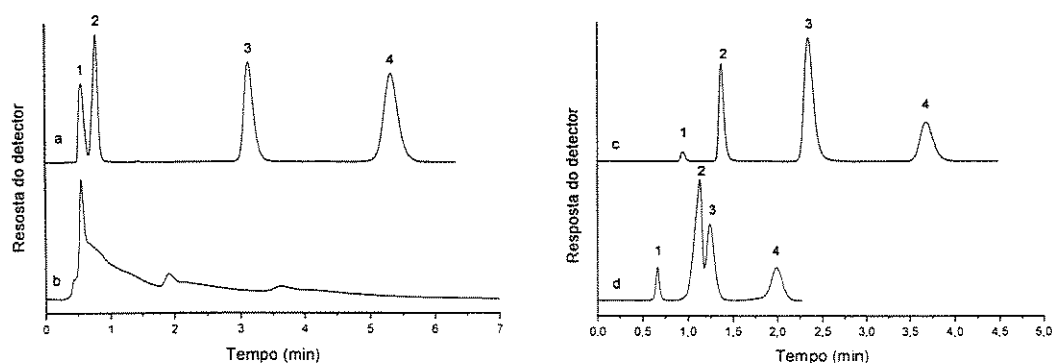


Figura 43. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas (a) antes e (b) após passar 1.600 v_c de fase móvel alcalina pH 10,0 pela coluna e com a fase estacionária comercial Rainin C8 (c) antes e (d) após passar 2.000 v_c de fase móvel alcalina pH 10,0 pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

IV.2. Fase estacionária SiO₂(PDMS)

IV.2.1. Avaliação físico-química

IV.2.1.1. Cromatografia de permeação em gel

Os polímeros extraídos das fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas e o PDMS puro também foram submetidos à análise por GPC e os cromatogramas obtidos estão mostrados na Figura 44.

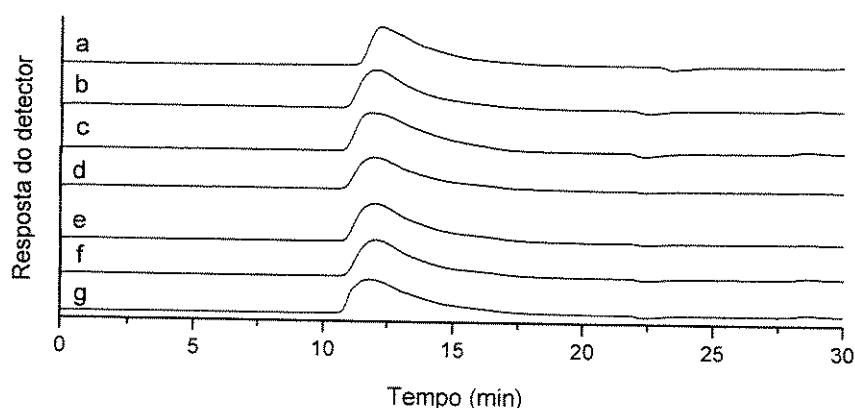


Figura 44. Cromatogramas de GPC de: a) PDMS puro; e PDMS extraídos das fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas por: (b) aquecimento a 80°C/30 horas; (c) aquecimento a 120°C/16 horas; (d) aquecimento a 240°C/4 horas; (e) aquecimento a 80°C/30 horas + irradiação com microondas; (f) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (g) auto-imobilização + irradiação com radiação-γ.

Pode ser notado pelos cromatogramas da Figura 44 que os polímeros extraídos das fases estacionárias SiO₂(PDMS) após a etapa de imobilização apresentaram o mesmo perfil do PDMS puro (sem tratamento nenhum), indicando que não sofreram alterações estruturais durante os procedimentos de imobilização.

IV.2.1.2. Porcentagem de carbono e área superficial

As fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas foram submetidas a análise elementar e medida de área superficial (Tabela 15). Como já citado para as fases estacionárias baseadas em PMOS, a porcentagem de carga e a massa específica foram obtidas a partir da porcentagem de carbono das fases (%C_{FE}), utilizando as equações abaixo:

$$\% \text{ de carga} = (m_{\text{PDMS}} / m_{\text{FE}}) \times 100$$

$$m_{\text{específica}} = m_{\text{PDMS}} / m_{\text{SiO}_2} = \%C_{\text{FE}} / (32,5 - \%C_{\text{FE}})$$

onde:

m_{FE} = massa de fase estacionária; m_{SiO_2} = massa de sílica; $m_{\text{específica}}$ = massa específica, $m_{\text{PDMS}} = \%C_{\text{FE}} / 32,5$; e 32,5 = constante, considerando que 32,5% da massa total do PDMS é carbono.

Tabela 15. Porcentagem de carbono, porcentagem de carga, massa específica e área superficial das fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas após a extração do excesso do PDMS e da fase estacionária não imobilizada sem extração do excesso de PDMS.

Fase estacionária	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ	não-imob.
% C	9,1 ± 0,5	10,5 ± 0,5	11,9 ± 0,5	10,1 ± 0,5	8,6 ± 0,5	12,0 ± 0,5	17,7 ± 0,5
% carga	28 ± 2	32 ± 2	37 ± 2	31 ± 2	26 ± 2	37 ± 2	55 ± 2
$m_{\text{específica}}$ (g _{PDMS} /g _{SiO₂})	0,39 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,59 ± 0,02	1,22 ± 0,02
Área superficial (m ² g ⁻¹)	87	73	48	75	95	48	0,3

Neste caso, não houve uma grande diferença na porcentagem de carga das fases estacionárias obtidas pelos diferentes procedimentos de imobilização. A diferença de carga entre o procedimento mais eficaz do menos eficaz foi de apenas 11,0%, além

de que, alguns procedimentos tenham promovido recobrimentos similares a outros. Os procedimentos mais eficazes de imobilização (240°C/4 horas e auto-imobilização + radiação- γ) retiveram 67% de todo polímero inicial da fase estacionária de partida (sem imobilização e extração, com 55% de carga), enquanto o procedimento por auto-imobilização + microondas conseguiu reter 47% de todo polímero.

As fases estacionárias imobilizadas por auto-imobilização + radiação- γ e aquecimento a 240°C/4 horas apresentaram o maior recobrimento polimérico. As fases imobilizadas a 80°C/30 horas + microondas e 120°C/16 horas apresentaram recobrimentos intermediários e as fases imobilizadas por auto-imobilização + microondas e 80°C/30 horas apresentaram os menores recobrimentos.

Como pode ser notado na Figura 45, a área superficial diminuiu linearmente com o aumento da porcentagem de carga das fases imobilizadas-extraídas.

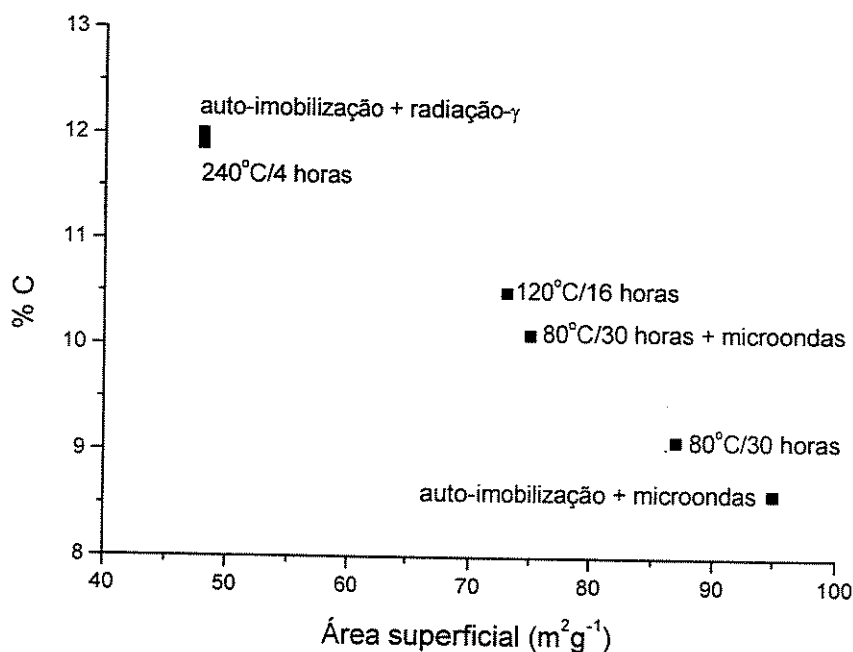


Figura 45. Porcentagem de carbono em função da área superficial das fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas.

IV.2.1.3. Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas da sílica nua e das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas e não imobilizada estão mostradas na Figura 46. Para as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas o ponto de maior perda de massa ocorreu entre 370 a 430°C e está relacionado com a degradação térmica do polímero. As fases estacionárias baseadas no PDMS se mostraram mais estáveis termicamente do que as fases baseadas no PMOS, as quais tiveram a perda de massa mais acentuada próximo de 215°C. Isto se deve a maior estabilidade térmica do PDMS. Pode ser notado também que o PDMS ficou mais estável termicamente nas fases estacionárias imobilizadas-extraídas (Figuras 46b-g) em comparação com a fase estacionária não imobilizada (Figura 46h), que começou a degradar em aproximadamente 350°C.

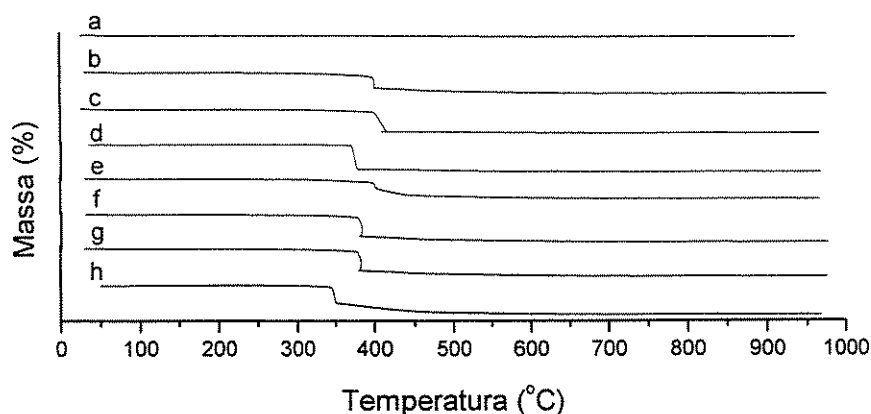


Figura 46. Curvas termogravimétricas de: (a) sílica nua; e fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a 80°C/30 horas; (c) aquecimento a 120°C/16 horas; (d) aquecimento a 240°C/4 horas; (e) aquecimento a 80°C/30 horas + irradiação com microondas; (f) auto-imobilização + irradiação com microondas; (g) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ ; e (h) fase estacionária não imobilizada.

Como já citado anteriormente, a curva da sílica nua (Figura 46a) mostrou somente a perda de água adsorvida na faixa de temperatura estudada. A perda de

massa para todas as fases estacionárias na faixa de temperatura estudada está mostrada na Tabela 16. Para as fases estacionárias imobilizadas-extraídas a perda de massa foi proporcional à porcentagem de carregamento. Assim, as fases com maior porcentagem de carga apresentaram maior perda de massa. Também pode ser notado que o máximo de massa perdida para estas fases estacionárias baseadas em PDMS foi de aproximadamente 20%, mesmo para a fase estacionária não imobilizada e não extraída, que apresentou porcentagem de carga de 55%. Isto se deve a grande estabilidade térmica do PDMS.

Tabela 16. Porcentagem de perda de massa durante a análise termogravimétrica de 25°C a 950°C das fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas e não imobilizada.

Fase estacionária	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ	não-imob.
Perda de massa (%) (25 – 950°C)	15,4	17,1	19,2	16,3	14,2	19,3	20,1
% carga	28	32	37	31	26	37	55

IV.2.1.4. Espectroscopia no infravermelho

As fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas também foram submetidas a análise por espectroscopia no infravermelho e os espectros estão mostrados na Figura 47. A banda larga acima de 3000 cm⁻¹ é atribuída a absorção da radiação dos diferentes grupos silanóis e a banda em aproximadamente 1100 cm⁻¹, relacionada aos grupos siloxanos, se mostrou tão larga que ficou impossível detectar a banda característica dos grupos silanóis (próxima de 975 cm⁻¹).

Os espectros das fases obtidas por diferentes procedimentos de imobilização se mostraram bastante semelhantes, confirmando os resultados obtidos por GPC, que mostraram que os polímeros não sofreram alterações durante a imobilização.

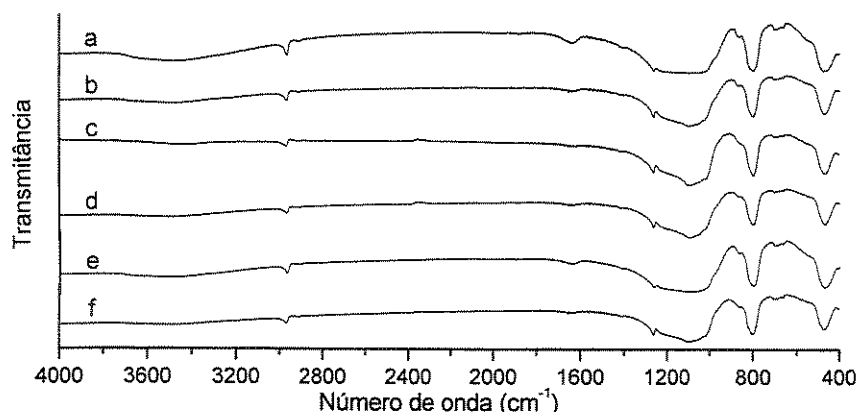


Figura 47. Espectros no infravermelho das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ .

IV.2.2. Avaliação cromatográfica

IV.2.2.1. Mistura teste com compostos ácido, básico e neutros

As fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas também foram testadas cromatograficamente utilizando uma mistura teste composta de uracila, fenol (ácido), N,N-dimetilanilina (básico), naftaleno (neutro) e acenafteno (neutro). Neste caso, o etilbenzeno foi excluído da mistura teste, pois estas fases estacionárias não separaram o pico do etilbenzeno do pico do acenafteno, como exemplificado na Figura 48 para a fase estacionária imobilizada por aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas. Esta separação não melhorou mesmo após alterar a força cromatográfica da fase móvel variando-se a proporção dos seus constituintes. Para ocorrer esta separação, deve-se utilizar solventes que proporcionem seletividade disitnta entre os compostos.

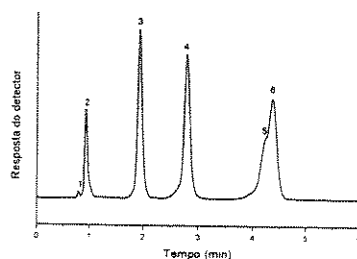


Figura 48. Cromatograma obtido com a coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

Os cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as diferentes fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas utilizando a mistura teste sem etilbenzeno estão mostrados na Figura 49.

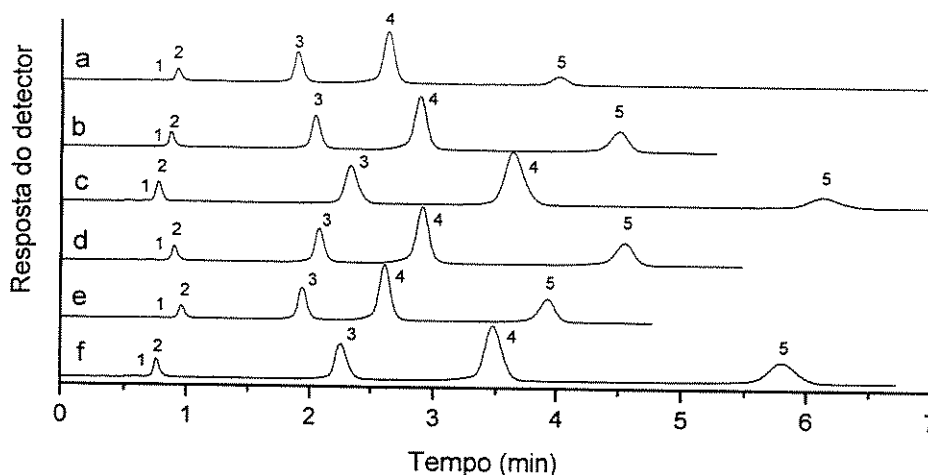


Figura 49. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ . Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno e 5-acenafteno.

Todas as colunas mostraram boa separação dos compostos da mistura teste em pequeno intervalo de tempo (menos que 7 minutos). Os parâmetros cromatográficos dos picos dos compostos da mistura teste (fator de retenção, fator de assimetria, eficiência, resolução e fator de separação) são mostrados nas Tabelas 17 a 21.

Tabela 17. Fator de retenção dos compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Fenol	0,23	0,30	0,48	0,29	0,26	0,25
N,N-DMA	1,52	2,03	3,48	1,96	1,55	2,70
Naftaleno	2,52	3,31	6,00	3,16	2,43	4,70
Acenafteno	4,36	5,72	10,79	5,50	4,17	8,52

Tabela 18. Fator de assimetria para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Fenol	1,61	1,62	1,54	1,57	1,63	1,64
N,N-DMA	1,17	1,09	1,26	1,08	1,13	1,30
Naftaleno	0,97	0,95	1,32	0,97	0,93	1,10
Acenafteno	0,98	0,99	1,16	0,97	0,99	0,96

Os diferentes valores para o fator de retenção (Tabela 17) mostram que as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas também apresentaram diferentes separações em função do grau de recobrimento polimérico promovido por cada procedimento de imobilização (Tabela 15).

Tabela 19. Resolução entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Fenol-N,N-DMA	9,33	10,96	10,74	10,78	9,25	11,07
N,N-DMA-Naftaleno	5,08	5,43	5,45	5,31	4,64	5,49
Naftaleno-Acenafteno	6,73	7,31	6,59	7,28	6,48	6,78

Tabela 20. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Fenol-N,N-DMA	6,60	6,77	7,25	6,76	5,96	10,80
N,N-DMA-Naftaleno	1,66	1,63	1,72	1,61	1,57	1,74
Naftaleno-Acenafteno	1,73	1,73	1,80	1,74	1,72	1,81

Tabela 21. Eficiência (número de pratos) para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Fenol	2090	1920	1020	1930	2150	1200
N,N-DMA	3520	3620	2300	3660	3600	2440
Naftaleno	4010	4110	2570	4160	4080	2800
Acenafteno	4300	4700	2700	4480	4170	2960

Os valores do fator de assimetria (Tabela 18) mostram que todas as fases promoveram cromatogramas com picos bastante simétricos para os compostos neutros e para o composto básico (N,N-dimetilanilina), evidenciando assim, que houve um significativo recobrimento dos grupos silanóis do suporte. O pico do composto ácido (fenol) se mostrou menos simétrico para todas as colunas ($As > 1,5$).

Pelos valores da resolução entre picos adjacentes (Tabela 19) conclui-se que os picos foram muito bem separados para todas as colunas, embora a coluna imobilizada por auto-imobilização + radiação-γ tenha se mostrado um pouco melhor que as demais. Até a coluna com menor recobrimento polimérico (auto-imobilizada + microondas) teve um excelente desempenho na separação dos compostos da mistura teste.

O fator de separação entre picos adjacentes (Tabela 20) variou muito pouco para a maioria das fases estacionárias, mostrando um valor significativamente maior para a fase com maior recobrimento polimérico (auto-imobilização + radiação-γ).

A eficiência para os picos dos diferentes compostos da mistura teste (Tabela 21) variou bastante, embora esta propriedade seja bastante influenciada pelo enchimento da coluna. De um modo geral, as fases estacionárias imobilizadas por aquecimento a 120°C/16 horas e aquecimento a 80°C/30 horas, com ou sem tratamento posterior com microondas, apresentaram maior eficiência que as demais colunas.

A curva de eficiência (calculada para o pico do acenafteno) versus vazão da fase móvel para a coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas é mostrada na Figura 50. A vazão ótima para esta coluna foi de 0,5 mL min⁻¹.

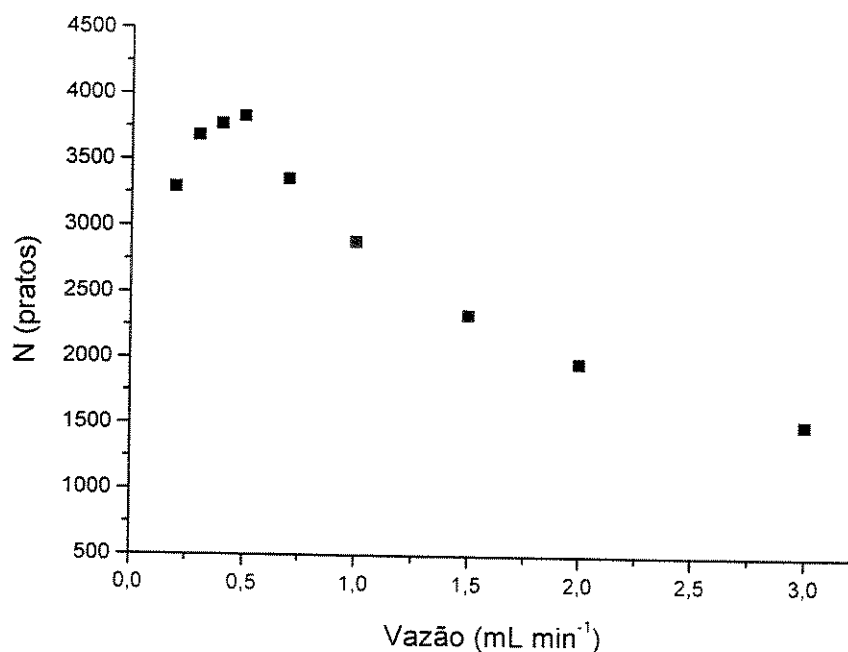


Figura 50. Curva de eficiência (calculada para o pico do acenafteno) em função da vazão de fase móvel para a coluna recheada com a fase estacionária SiO₂(PDMS) imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas. Condições: coluna: 50 x 4 mm, fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v).

IV.2.2.2. Mistura teste com compostos neutros

Os compostos neutros com diferentes polaridades utilizados na mistura teste foram: uracila, acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. Os cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas estão mostrados na Figura 51.

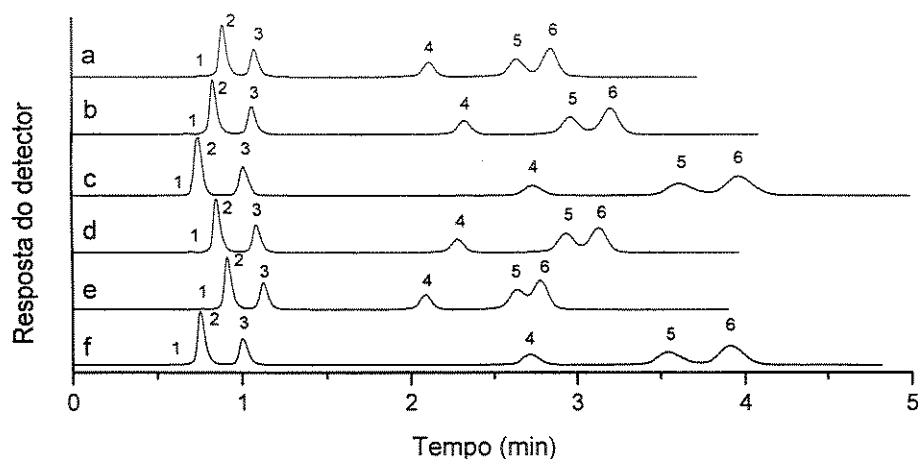


Figura 51. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ . Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-acetona, 3-benzonitrila, 4-benzeno, 5-naftaleno e 6-tolueno.

Todas as colunas mostraram cromatogramas com os picos bastante separados, exceto a coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por auto-imobilização + microondas, que não separou os picos naftaleno/tolueno. Em comparação com as colunas recheadas com as fase estacionárias baseadas em PMOS, ocorreu uma inversão na ordem de eluição para os compostos tolueno e naftaleno, provavelmente devido a conformação espacial diferenciada promovida pelas fases baseadas em PMOS e PDMS, levando a seletividade distinta entre as fases para estes compostos. Os parâmetros cromatográficos (fator de retenção, fator de assimetria, resolução, fator de separação e eficiência), obtidos a partir dos cromatogramas dos compostos da mistura teste com compostos neutros, estão mostrados nas Tabelas 22 a 26.

Tabela 22. Fator de retenção dos compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Acetona	0,17	0,24	0,39	0,21	0,18	0,25
Benzonitrila	0,42	0,58	0,92	0,56	0,47	0,66
Benzeno	1,79	2,48	4,16	2,27	1,71	3,52
Naftaleno	2,47	3,43	5,83	3,20	2,43	4,90
Tolueno	2,75	3,79	6,49	3,48	2,61	5,52

Tabela 23. Fator de assimetria para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Acetona	1,76	1,75	1,05	1,57	1,62	1,79
Benzonitrila	1,44	1,48	1,35	1,31	1,32	1,51
Benzeno	1,05	0,95	1,28	0,96	1,00	1,13
Naftaleno	1,00	1,05	1,21	0,98	-	1,46
Tolueno	1,07	0,97	1,21	1,12	-	1,00

Novamente, o fator de retenção (Tabela 22) foi dependente do recobrimento polimérico resultante de cada procedimento de imobilização. Todas as fases proporcionaram cromatogramas com picos bastante simétricos (Tabela 23), embora algumas colunas tenham mostrado valores um pouco acima de 1,5 para o pico da acetona. Não foi possível obter o fator de assimetria para os picos do naftaleno e do

tolueno para a fase estacionária imobilizada por auto-imobilização + microondas, sendo que não houve separação suficiente dos picos. Isto foi confirmado pelos resultados de resolução para os picos adjacentes (Tabela 24), onde todas as colunas separaram os compostos da mistura teste, exceto a coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por auto-imobilização + microondas, que não separou os picos tolueno/naftaleno.

Tabela 24. Resolução entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Acetona – Benzonitrila	2,33	2,89	2,95	2,92	2,54	2,88
Benzonitrila - Benzeno	9,49	10,98	11,01	10,37	8,59	11,53
Benzeno – Naftaleno	3,36	3,74	3,45	3,78	3,36	3,57
Naftaleno – Tolueno	1,16	1,26	1,16	1,02	0,71	1,35

O fator de separação entre picos adjacentes (Tabela 25) variou muito pouco para a maioria das fases estacionárias, mostrando um valor significativamente maior para a fase com maior recobrimento polimérico (auto-imobilizada + radiação-γ).

A eficiência das colunas obtidas a partir dos diferentes compostos desta mistura teste (Tabela 26) também variou bastante, sendo que nesse teste as melhores colunas também foram as imobilizadas por aquecimento a 80°C/30 horas e 120°C/16 horas.

Tabela 25. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Acetona – Benzonitrila	2,47	2,41	2,35	2,67	2,61	2,64
Benzonitrila – Benzeno	4,26	4,27	4,52	4,05	3,63	5,33
Benzeno – Naftaleno	1,38	1,38	1,40	1,41	1,42	1,39
Naftaleno – Tolueno	1,11	1,10	1,11	1,09	1,07	1,13

Tabela 26. Eficiência (número de pratos) para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PDMS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária					
	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Acetona	2140	1930	1190	2350	2150	1950
Benzonitrila	2490	2460	1680	2435	2530	2400
Benzeno	4040	4080	2610	2517	3800	2830
Naftaleno	3500	3740	2330	2520	-	3040
Tolueno	4220	4280	2650	2680	-	3200

IV.2.3. Testes de estabilidade com fase móvel neutra e fase móvel alcalina pH 8,4

A fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ utilizada nos testes de estabilidade com fase móvel neutra e com fase móvel alcalina (pH 8,4) foi a fase imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas. Inicialmente esta fase foi testada frente a fase móvel neutra metanol:água 7:3 (v/v), a temperatura ambiente. Este teste consistiu em passar 30.000 v_c de fase móvel neutra pela coluna recheada com esta fase estacionária. Os resultados estão mostrados na Figura 52.

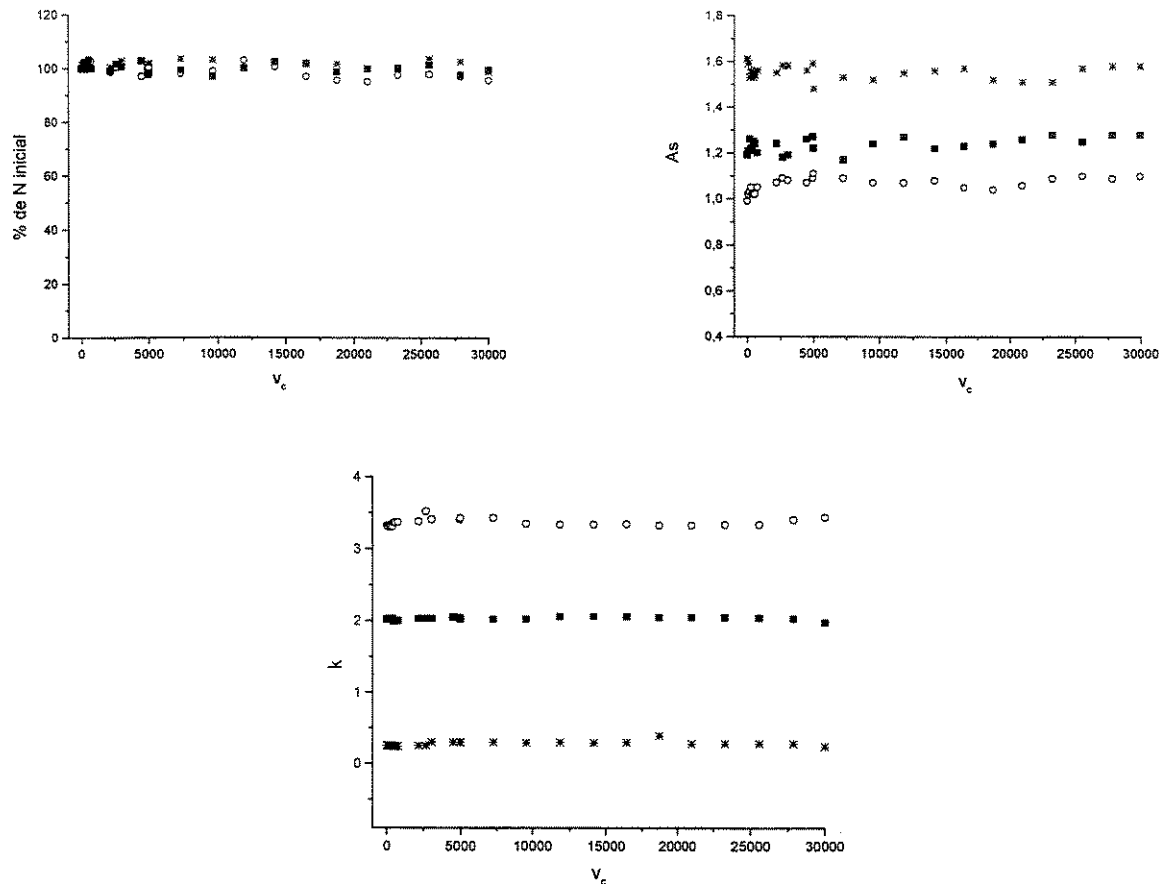


Figura 52. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel neutra passado pela coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas. Compostos da mistura teste: * fenol; ■ N,N-dimetilanilina; e ○ naftaleno.

Pode ser notado pelos gráficos da Figura 52 que após passar 30.000 v_c de fase móvel neutra, não houve alteração significativa dos parâmetros cromatográficos para todos os compostos da mistura teste, comprovando a sua estabilidade nestas condições. Os cromatogramas obtidos antes e após o teste de estabilidade estão mostrados na Figura 53. Como esta fase suportou o teste com fase móvel neutra, ela também foi submetida ao teste móvel alcalina (pH 8,4), a temperatura de 60°C. Os gráficos de parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel alcalina passado pela coluna são mostrados na Figura 54.

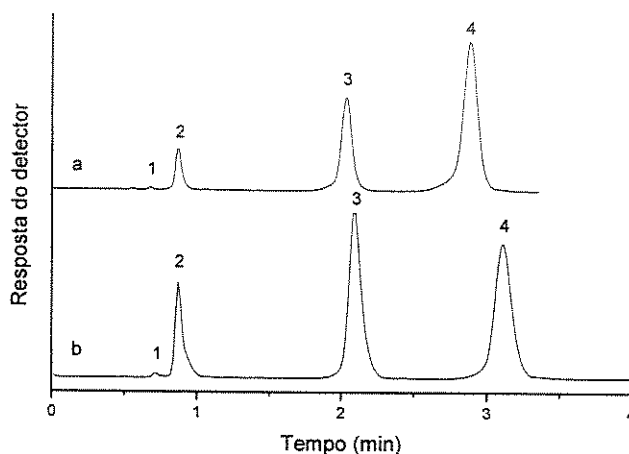


Figura 53. Cromatogramas obtidos da coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas (a) antes e (b) após passar 30.000 v_c de fase móvel neutra pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de 0,5 mL min^{-1} . Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

Pelos gráficos da Figura 54, pode ser notado que ocorreu uma diminuição lenta e gradativa dos parâmetros cromatográficos dos diferentes compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel alcalina passado pela coluna. Apesar da diminuição nos parâmetros cromatográficos com o decorrer do teste, a fase estacionária se mostrou bastante estável frente a esta condição drástica. Os cromatogramas obtidos antes e após o teste de estabilidade com fase móvel alcalina (pH 8,4) estão mostrados na Figura 55.

Novamente, a instabilidade da fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada-extraída está relacionado com a dissolução do suporte de sílica com a passagem de fase móvel alcalina, que neste caso, a porcentagem de carbono passou de 10,5 (antes do teste) para 10,7 após o teste de estabilidade. Como esta fase mostrou sinais de degradação durante este teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4, ela não foi submetida ao teste com fase móvel alcalina pH 10,0 a 60°C.

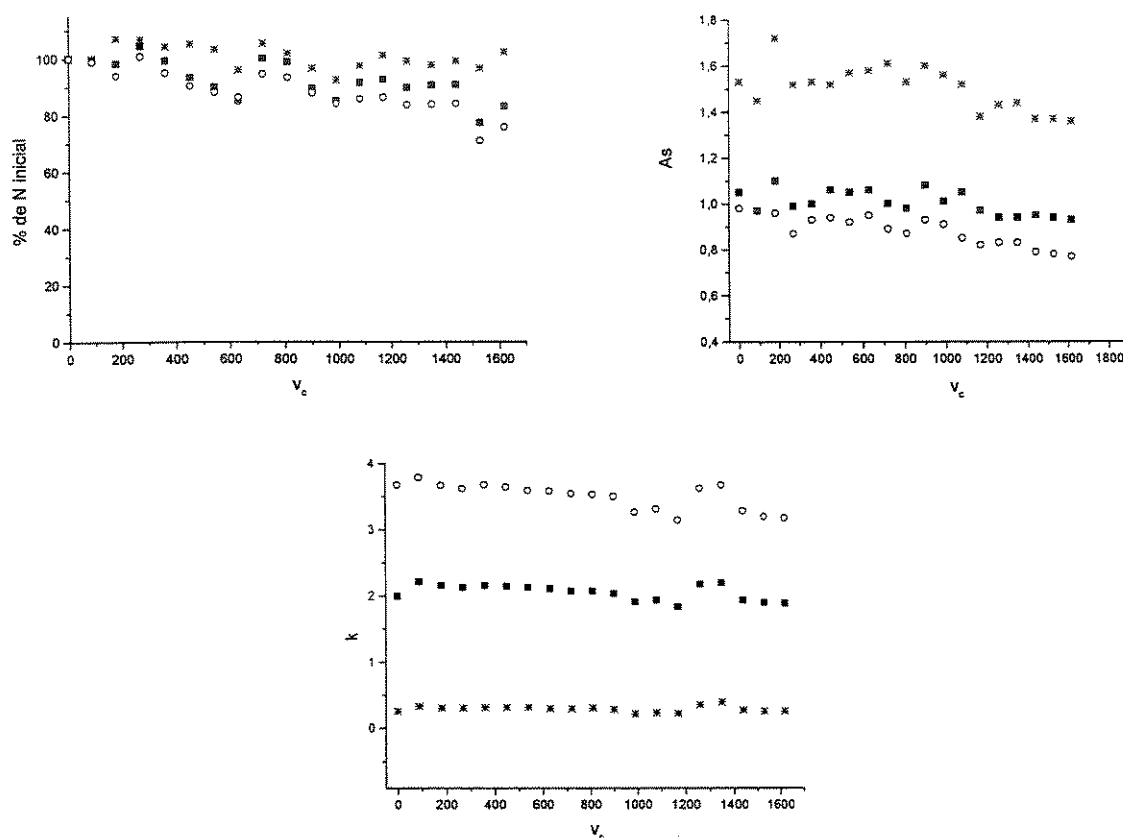


Figura 54. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pela coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas. Compostos da mistura teste: * fenol; ■ N,N-dimetilanilina; e o naftaleno.

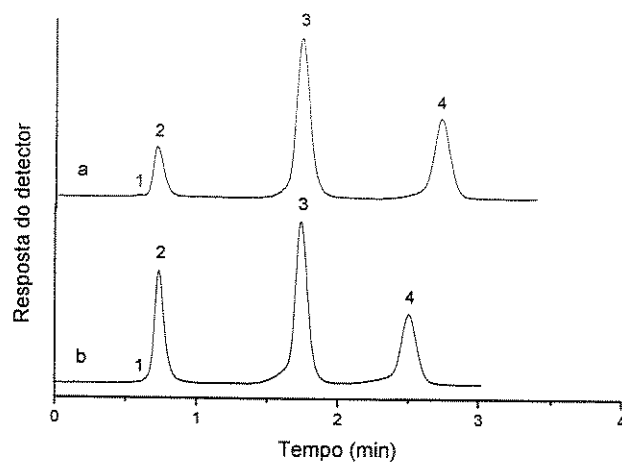


Figura 55. Cromatogramas obtidos da coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas (a) antes e (b) após passar 1.600 v_c de fase móvel alcalina (pH 8,4) pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

IV.3. Fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$

IV.3.1. Avaliação físico-química

IV.3.1.1. Cromatografia de permeação em gel

Como mencionado na parte experimental deste trabalho, o PMTDS passou por um procedimento de purificação antes da preparação da fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ adsorvida. A purificação consistiu em promover a extração dos oligômeros com isopropanol. Foram feitas duas extrações sequenciais e os cromatogramas de GPC do polímero antes e após as extrações estão mostrados na Figura 56.

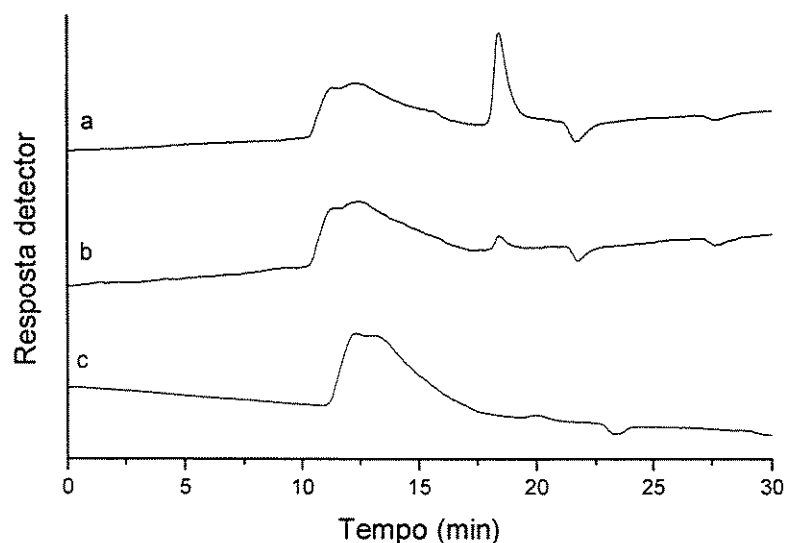


Figura 56. Cromatogramas de GPC de: (a) PMTDS antes da extração; (b) PMTDS após a primeira extração com isopropanol; e (c) PMTDS após a segunda extração com isopropanol.

Após a primeira etapa de extração ainda restava uma pequena quantidade de oligômeros no PMTDS (Figura 56b), mas após a segunda etapa de extração não

sobrou quase nada dos oligômeros (Figura 56c). A fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ adsorvida foi produzida a partir do PMTDS purificado.

Os cromatogramas dos polímeros extraídos das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas e o PMTDS puro estão mostrados na Figura 57.

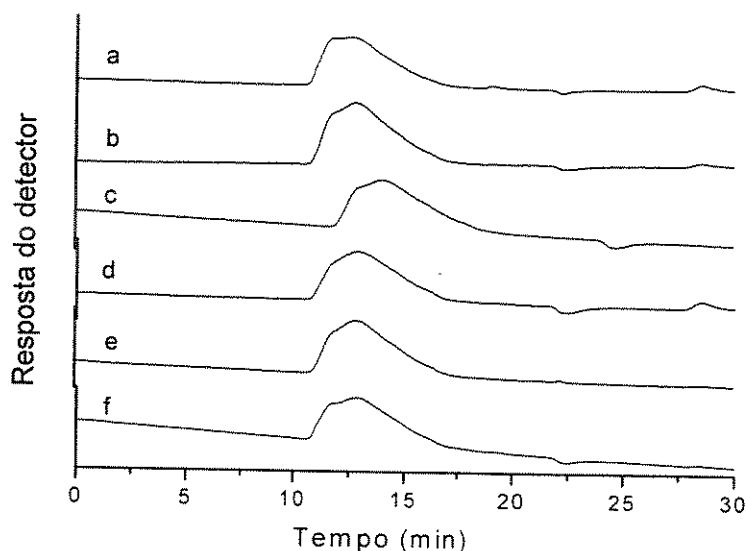


Figura 57. Cromatogramas de GPC de: a) PMTDS puro; e PMTDS extraídos das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ .

Pode ser notado que os polímeros extraídos das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ após a etapa de imobilização apresentaram o mesmo perfil do PMTDS puro (sem tratamento nenhum), indicando que não sofreram alterações estruturais durante o procedimento de imobilização.

IV.3.1.2. Porcentagem de carbono e área superficial

Após a etapa de imobilização e extração do excesso de PMTDS, as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ também foram submetidas à análise elementar e medida da área superficial (Tabela 27). Como citado para as fases baseadas em PMOS e PDMS, a porcentagem de carga e a massa específica das fases foram obtidas a partir da porcentagem de carbono das fases estacionárias ($\%C_{\text{FE}}$), através das equações abaixo:

$$\% \text{ de carga} = (m_{\text{PMTDS}} / m_{\text{FE}}) \times 100$$

$$m_{\text{especifica}} = m_{\text{PMTDS}} / m_{\text{SiO}_2} = \%C_{\text{FE}} / (70 - \%C_{\text{FE}})$$

onde:

m_{FE} = massa de fase estacionária; m_{SiO_2} = massa de sílica; $m_{\text{especifica}}$ = massa específica, $m_{\text{PMTDS}} = \%C_{\text{FE}} / 70$; e 70 = constante, considerando que 70% da massa total do PMTDS é carbono.

Tabela 27. Porcentagem de carbono, porcentagem de carga, massa específica e área superficial das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas após a extração do excesso do PMTDS e da fase estacionária não imobilizada sem extração do excesso de PMTDS.

Fase estacionária	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ	não-imob.
% C	18,4 ± 0,5	20,6 ± 0,5	24,1 ± 0,5	18,2 ± 0,5	20,6 ± 0,5	36,6 ± 0,5
% carga	26 ± 2	30 ± 2	35 ± 2	26 ± 2	30 ± 2	52 ± 2
$m_{\text{especifica}}$ ($\text{g}_{\text{PMTDS}}/\text{g}_{\text{SiO}_2}$)	0,35 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,43 ± 0,02	1,08 ± 0,02
Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	97	78	47	86	77	0,2

Como ocorreu para as fases baseadas em PDMS, com as fases baseadas em PMTDS não houve uma grande diferença na porcentagem de carga das fases

estacionárias obtidas pelos diferentes procedimentos de imobilização. A diferença de carga entre o processo mais eficaz do menos eficaz foi de apenas 6,0%. Além disso, alguns procedimentos promoveram recobrimentos similares a outros. O processo mais eficaz de imobilização foi o que utilizou aquecimento a 80°C/30 horas + microondas, que reteve 66% de todo polímero inicial da fase estacionária de partida (sem imobilização e extração, com 52% de carga), enquanto a auto-imobilização + microondas conseguiu reter 50% de todo polímero.

Como pode ser notado na Figura 58, a área superficial diminuiu linearmente com o aumento da porcentagem de carga das fases.

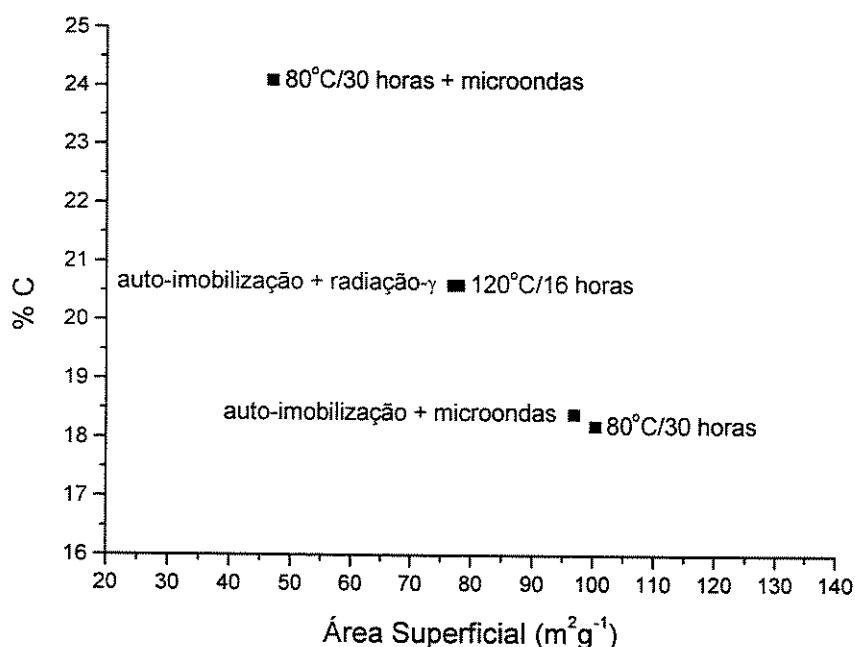


Figura 58. Porcentagem de carbono em função da área superficial das fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas.

IV.3.1.3. Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas do PMTDS antes e após a extração com isopropanol estão mostradas na Figura 59. Após a extração dos oligômeros, o PMTDS

se mostrou mais estável termicamente, sendo que começou a degradar após aproximadamente 200°C (Figura 59a) e antes da purificação o polímero já começava a degradar próximo de 50°C (Figura 59b).

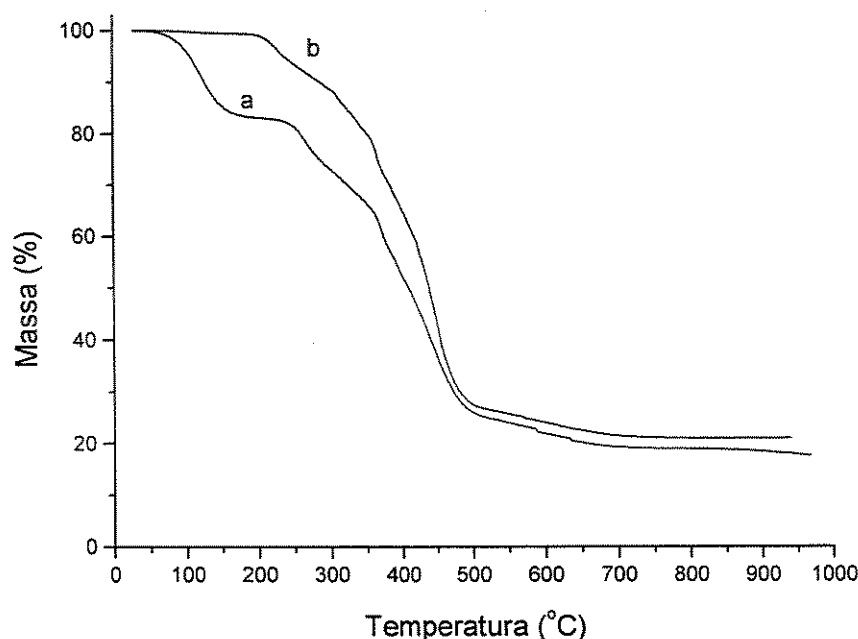


Figura 59. Curvas termogravimétricas de: (a) PMTDS antes da extração dos oligômeros e (b) após a extração dos oligômeros.

As curvas termogravimétricas da sílica nua e das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas e não imobilizada estão mostradas na Figura 60. A curva da sílica nua (Figura 60a) indica somente a perda de água adsorvida na faixa de temperatura estudada. Para as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas o ponto de maior perda de massa ocorreu entre 200 a 240°C e está relacionado com a degradação térmica do polímero. As fases estacionárias baseadas no PMTDS se mostraram mais instáveis termicamente do que as fases baseadas nos polímeros PDMS e PMOS, cujas fases estacionárias tiveram a perda de massa mais acentuada próximo de 370 e 215°C, respectivamente. Isto mostra que a estabilidade térmica dos polissiloxanos diminui com o aumento da cadeia alifática do polímero.

A perda de massa para todas as fases estacionárias na faixa de temperatura estudada está mostrada na Tabela 28. Como ocorrido para as fases baseadas em PMOS e PDMS, as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ com maior porcentagem de carregamento apresentaram maior perda de massa. Assim, as fases imobilizadas por aquecimento a $80^\circ\text{C}/30\text{h}$ + microondas e não imobilizada (Figura 60d e g) apresentaram a maior perda de massa e a fase estacionária imobilizada por auto-imobilização + microondas a menor perda (Figura 60e).

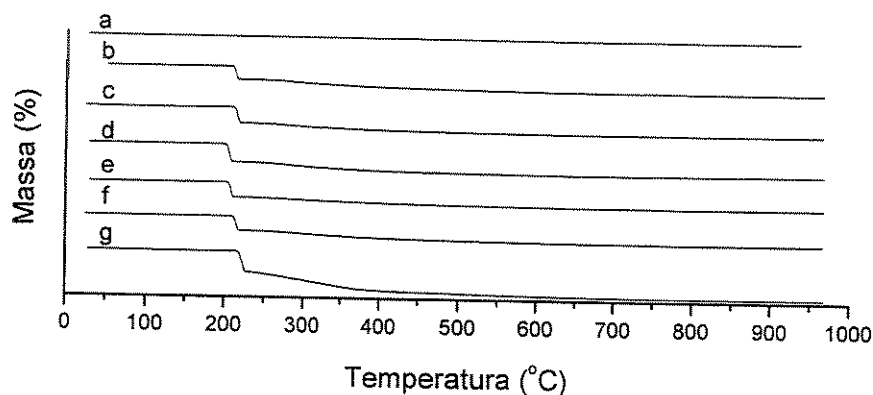


Figura 60. Curvas termogravimétricas de: (a) sílica nua; fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por: (b) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (c) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (d) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (e) auto-imobilização + irradiação com microondas; (f) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ ; e (g) fase estacionária não imobilizada.

Tabela 28. Porcentagem de perda de massa durante a análise termogravimétrica de 25°C a 950°C das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas e não imobilizada.

Fase estacionária	$80^\circ\text{C}/30\text{h}$	$120^\circ\text{C}/16\text{h}$	$80^\circ\text{C}/30\text{h}$ + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + Rad- γ	não-imob.
Perda de massa (%) (25 – 950°C)	21,8	23,0	26,1	21,4	23,7	41,9
% carga	26	30	35	26	30	52

IV.3.1.4. Espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas estão mostrados na Figura 61.

Como nos espectros das fases baseadas em PMOS e PDMS, as bandas largas entre 3000 a 3800 cm^{-1} são atribuídas aos diferentes grupos silanóis, que neste caso se mostraram pouco intensas. A baixa intensidade destas bandas talvez esteja relacionada com o maior caráter hidrofóbico das fases baseadas no PMTDS, que proporciona uma pequena quantidade de água adsorvida, que também absorvem nesta região. As bandas em aproximadamente 2850 a 2950 cm^{-1} são características de estiramento das ligações CH_2 e CH_3 e as bandas em aproximadamente 1100 cm^{-1} estão relacionadas aos grupos siloxanos.

A banda característica dos grupos silanóis (próxima de 975 cm^{-1}) apresentou baixa intensidade para todas as fases imobilizadas-extraídas.

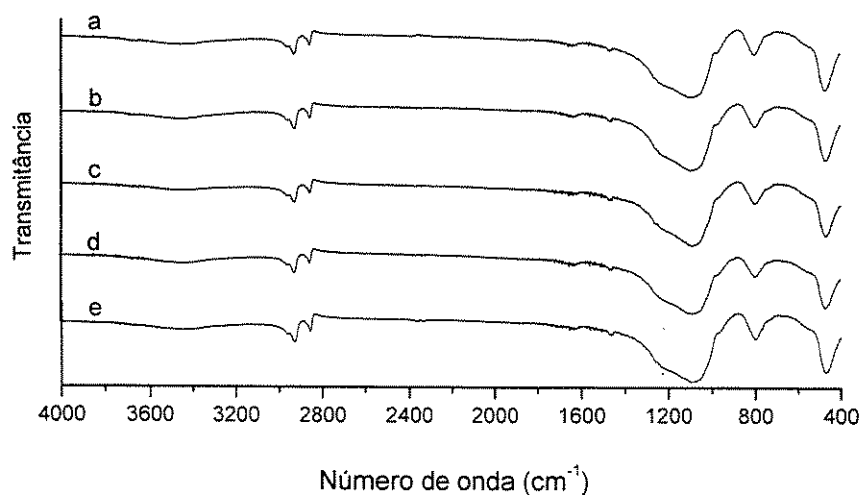


Figura 61. Espectros no infravermelho das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (d) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (e) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ .

IV.3.2. Avaliação cromatográfica

IV.3.2.1. Mistura teste com compostos ácido, básico e neutros

As fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas também foram testadas cromatograficamente utilizando uma mistura teste composta de uracila, fenol (ácido), N,N-dimetilanilina (básico), etilbenzeno (neutro), naftaleno (neutro) e acenafteno (neutro). Os cromatogramas obtidos com as diferentes fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas estão mostrados na Figura 62.

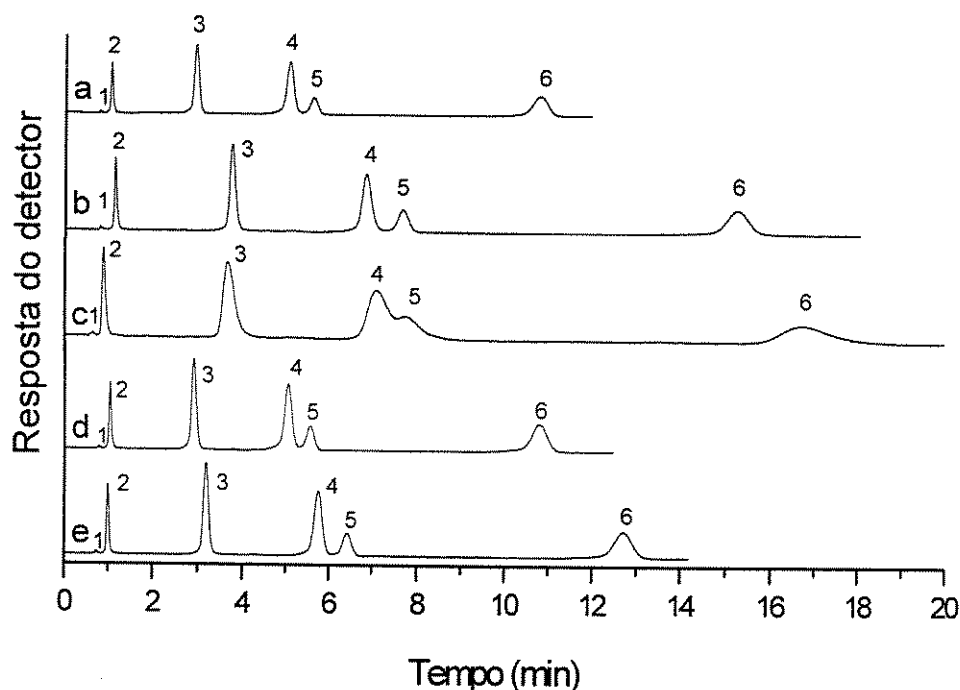


Figura 62. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (d) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (e) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ . Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

Todas as colunas mostraram boa separação dos compostos da mistura teste, exceto a coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas + microondas, que não separou o pico do etilbenzeno do naftaleno. As colunas recheadas com as fases estacionárias com maior carga polimérica apresentaram separações mais demoradas (próximas de 15 minutos) pois, além do carregamento, o tamanho da cadeia alifática também favorece a retenção dos compostos apolares. Os parâmetros cromatográficos dos picos dos compostos da mistura teste (fator de retenção, fator de assimetria, eficiência, resolução e fator de separação) são mostrados nas Tabelas 29 a 33.

Tabela 29. Fator de retenção dos compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Colunas: 50 x 4 mm; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária				
	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Fenol	0,33	0,41	0,40	0,34	0,38
N,N-DMA	2,76	3,69	4,83	2,78	3,43
Naftaleno	5,50	7,56	10,25	5,56	7,00
Etilbenzeno	6,21	8,59	11,30	6,23	7,94
Acenafteno	12,86	18,05	25,57	14,14	16,67

Mais uma vez, os diferentes valores encontrados para o fator de retenção (Tabela 29) mostram que as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas também apresentaram diferentes separações em função do grau de recobrimento polimérico promovido por cada procedimento de imobilização (Tabela 27).

Os valores do fator de assimetria (Tabela 30) mostram que todas as fases promoveram cromatogramas com picos bastante simétricos ($As < 1,5$), exceto a coluna

recheada com a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas + microondas que mostrou picos menos simétrico ($As > 1,5$).

Tabela 30. Fator de assimetria para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária				
	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Fenol	1,42	1,47	1,64	1,37	1,40
N,N-DMA	0,94	1,12	1,75	1,01	1,04
Naftaleno	0,98	1,08	1,53	0,94	0,96
Etilbenzeno	1,17	0,98	0,98	0,94	0,98
Acenafteno	1,13	0,95	1,60	1,11	1,14

Tabela 31. Resolução entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária				
	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	Auto-imob. + rad-γ
Fenol- N,N-DMA	13,57	15,36	9,00	13,09	13,97
N,N-DMA- Naftaleno	8,65	9,72	5,35	8,73	9,05
Naftaleno- Etilbenzeno	1,72	1,95	0,71	1,65	1,82
Etilbenzeno- Acenafteno	10,62	11,43	5,76	10,75	10,99

A resolução e o fator de separação (Tabelas 31 e 32) mostram que os picos foram muito bem separados para todas as colunas, embora para a coluna imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas + microondas tenha mostrado pior resolução devido a baixa eficiência obtida para a coluna recheada com esta fase estacionária (Tabela 33).

Tabela 32. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

composto	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Fenol- N,N-DMA	8,36	9,00	12,08	8,18	9,03
N,N-DMA- Naftaleno	1,99	2,05	2,12	2,00	2,04
Naftaleno- Etilbenzeno	1,13	1,14	1,10	1,12	1,13
Etilbenzeno- Acenafteno	2,07	2,10	2,26	2,27	2,10

Tabela 33. Eficiência (número de pratos) para os compostos ácido, básico e neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

	Fase estacionária				
Composto	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Fenol	2110	1950	560	1900	1610
N,N-DMA	3790	3910	960	3610	3430
Naftaleno	4480	4720	1220	4560	4270
Etilbenzeno	4520	4710	870	4630	4240
Acenafteno	4470	4790	1030	4420	4570

A curva de eficiência (calculada para o pico do acenafteno) versus vazão da fase móvel para a coluna recheada com a fase estacionária imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ é mostrada na Figura 63. A vazão ótima para esta coluna foi de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.

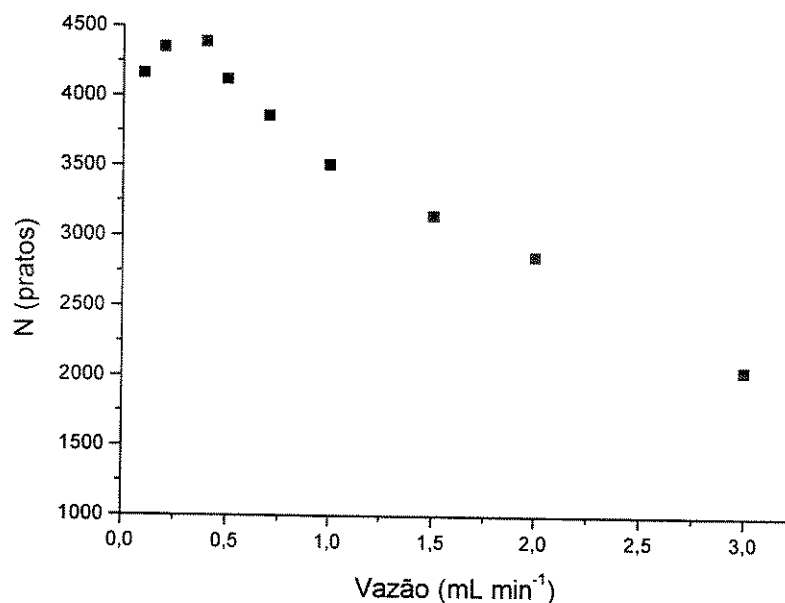


Figura 63. Curva de eficiência (calculada para o pico do acenafteno) em função da vazão de fase móvel para a coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ . Condições: coluna: $50 \times 4 \text{ mm}$, fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v).

IV.3.2.2. Mistura teste com compostos neutros

Os compostos neutros com diferentes polaridades utilizados na mistura teste foram: uracila, acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. Os cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas estão mostrados na Figura 64.

Todas as colunas mostraram cromatogramas com os picos bastante separados. Os parâmetros cromatográficos (fator de retenção, fator de assimetria, resolução, fator de separação e eficiência) obtidos a partir dos cromatogramas dos compostos da mistura teste com compostos neutros estão mostrados nas Tabelas 34 a 38.

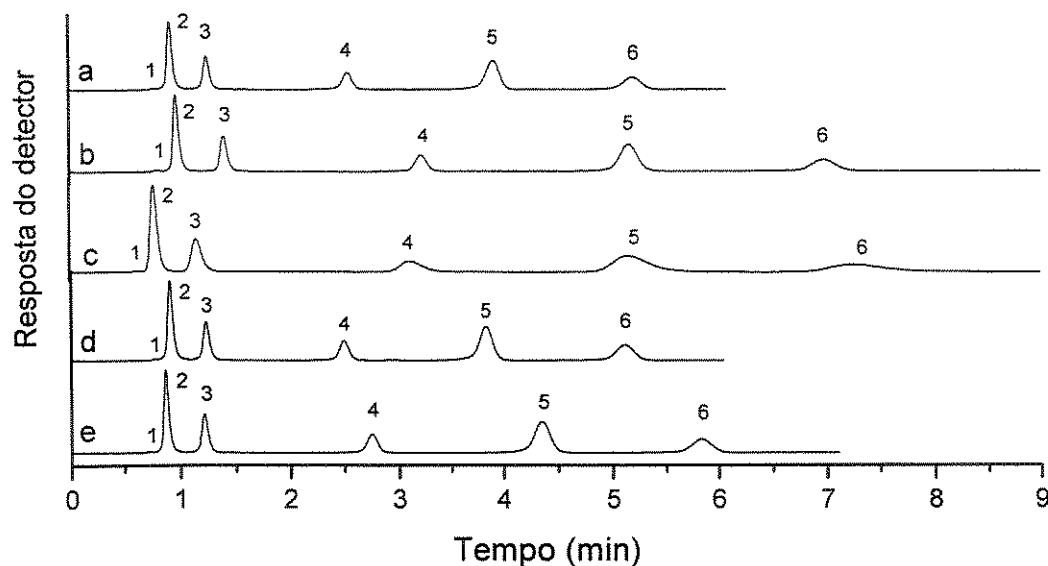


Figura 64. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por: (a) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas; (b) aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) aquecimento a $80^\circ\text{C}/30$ horas + irradiação com microondas; (d) auto-imobilização + irradiação com microondas; e (e) auto-imobilização + irradiação com radiação- γ . Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-acetona, 3-benzonitrila, 4-benzeno, 5-tolueno e 6-naftaleno.

Tabela 34. Fator de retenção dos compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas. Colunas: $50 \times 4 \text{ mm}$; fase móvel: metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Composto	Fase estacionária				
	$80^\circ\text{C}/30\text{h}$	$120^\circ\text{C}/16\text{h}$	$80^\circ\text{C}/30\text{h}$ + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad- γ
Acetona	0,18	0,21	0,22	0,17	0,21
Benzonitrila	0,59	0,74	0,83	0,60	0,68
Benzeno	2,24	3,01	3,94	2,23	2,82
Tolueno	4,01	5,45	7,19	3,97	5,04
Naftaleno	5,67	7,73	10,52	5,63	7,10

Novamente, o fator de retenção (Tabela 34) foi dependente do recobrimento polimérico resultante de cada procedimento de imobilização.

Todas as fases proporcionaram cromatogramas com o pico da acetona com $A_s > 1,5$. Para os demais compostos apenas a fase imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas + microondas não mostrou picos simétricos (Tabela 35).

A resolução entre os picos adjacentes (Tabela 36) variou de acordo com a eficiência das fases imobilizadas. Assim, a fase imobilizada por aquecimento a 120°C/16 horas apresentou maior resolução entre os picos e a fase imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas + microondas mostrou a menor resolução. O fator de separação entre picos adjacentes (Tabela 37) variou muito pouco para a maioria das fases estacionárias, mostrando um valor significativamente maior para a fase com maior recobrimento polimérico (imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas + microondas).

A eficiência das colunas obtidas a partir dos diferentes compostos desta mistura teste também variou bastante (Tabela 38).

Tabela 35. Fator de assimetria para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária				
	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Acetona	1,57	1,71	1,83	1,62	1,53
Benzonitrila	1,28	1,47	1,61	1,34	1,37
Benzeno	0,97	1,10	1,73	1,01	1,03
Tolueno	0,98	1,01	1,61	1,01	0,96
Naftaleno	1,01	0,99	1,63	0,99	1,01

Tabela 36. Resolução entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

Composto	Fase estacionária				
	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Acetona – Benzonitrila	3,62	4,33	2,76	3,53	3,76
Benzonitrila - Benzeno	10,01	11,88	7,18	9,79	11,03
Benzeno – Tolueno	6,92	7,77	4,19	6,86	7,25
Tolueno – Naftaleno	4,66	5,12	2,79	4,73	4,73

Tabela 37. Fator de separação entre picos adjacentes para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: 0,5 mL min⁻¹.

composto	Fase estacionária				
	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + rad-γ
Acetona – Benzonitrila	3,28	3,52	3,77	3,53	3,24
Benzonitrila - Benzeno	3,80	4,07	4,75	3,72	4,15
Benzeno – Tolueno	1,79	1,81	1,82	1,78	1,79
Tolueno – Naftaleno	1,41	1,42	1,46	1,42	1,41

Tabela 38. Eficiência (número de pratos) para os compostos neutros da mistura teste para as colunas recheadas com as fase estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas-extraídas. Coluna: 50 x 4 mm; fase móvel metanol:água 7:3 (v/v); vazão: $0,5 \text{ mL min}^{-1}$.

Composto	Fase estacionária				
	80°C/30h	120°C/16h	80°C/30h + microondas	auto-imob. + microondas	auto-imob. + Rad- γ
Acetona	2020	1930	810	1900	1760
Benzonitrila	2550	2600	770	2410	2280
Benzeno	3950	4220	1060	3900	3830
Tolueno	4320	4600	1180	4320	4250
Naftaleno	4340	4630	1020	4360	4190

IV.3.3. Testes de estabilidade com fase móvel neutra e fase móvel alcalina pH 8,4

A fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ utilizada nos testes de estabilidade com fase móvel neutra e com fase móvel alcalina (pH 8,4) foi a imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ . Esta fase foi escolhida devido a sua disponibilidade e ao seu bom desempenho nos testes cromatográficos. Inicialmente esta fase foi testada frente a fase móvel neutra metanol:água 7/3 (v/v), a temperatura ambiente. Este teste consistiu em passar 30.000 v_c desta fase móvel pela coluna recheada com esta fase estacionária. Os resultados estão mostrados na Figura 65.

A coluna recheada com a fase imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ se mostrou estável frente a este teste, pois não houve alteração significativa dos parâmetros cromatográficos para todos os compostos da mistura teste após passar 30.000 v_c da fase móvel neutra (Figura 65). Os cromatogramas obtidos antes e após o teste de estabilidade estão mostrados na Figura 66. Assim, esta fase também foi submetida ao teste com fase móvel alcalina (pH 8,4) a temperatura de 60°C. Os

gráficos de parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel alcalina passado pela coluna são mostrados na Figura 67.

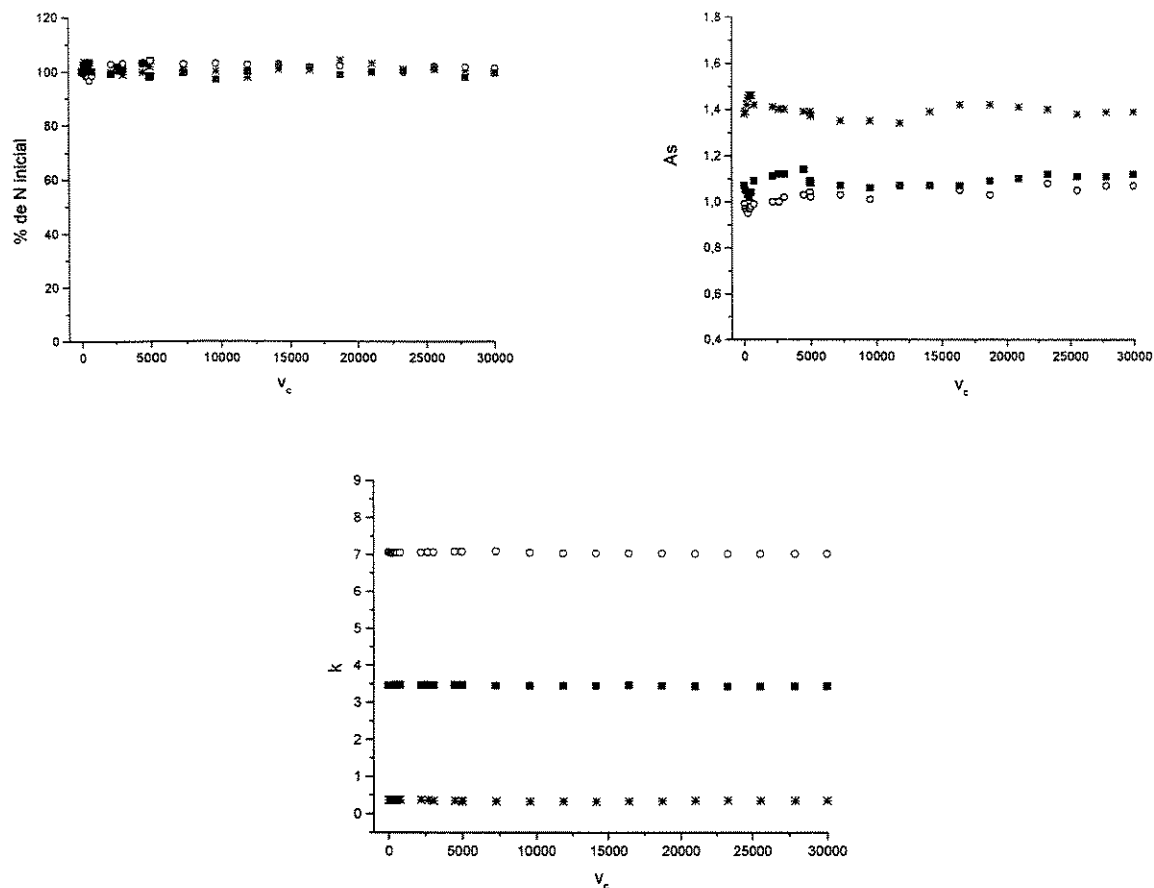


Figura 65. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel neutra passado pela coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ . Compostos da mistura teste: * fenol; ■ N,N-dimetilanilina; e o naftaleno.

Pelos gráficos da Figura 67, pode ser notado que a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada-extraída se mostrou bastante instável frente a fase móvel alcalina pH 8,4, sendo que a eficiência caiu rapidamente desde o início do teste. O fator

de assimetria variou para o pico do fenol desde o início, mas somente depois de 1.200 v_c passou a variar para os outros dois compostos. O fator de retenção se manteve constante até aproximadamente 1.300 v_c e depois não foi possível obter mais este parâmetro, pois apareceu uma cauda frontal no pico do fenol que tornou impossível identificar o pico do uracila e consequentemente determinar o tempo de retenção do composto não retido pela coluna (t_M) e o fator de retenção dos compostos da mistura teste (k). Os cromatogramas obtidos antes e após o teste de estabilidade estão mostrados na Figura 68.

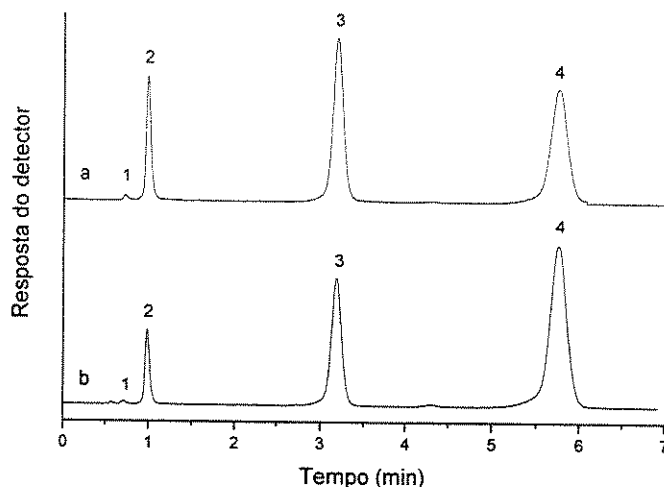


Figura 66. Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ (a) antes e (b) após passar 30.000 v_c de fase móvel neutra pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de 0,5 mL min^{-1} . Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

Novamente, a instabilidade das fases estacionárias imobilizadas está relacionado com a dissolução do suporte de sílica com a passagem de fase móvel alcalina (pH 8,4), que neste caso, a porcentagem de carbono passou de 20,6 (antes do teste) para 21,7 após o teste de estabilidade. Como esta fase mostrou se mostrou bastante instável ao

teste de estabilidade com fase móvel alcalina pH 8,4, ela também não foi submetida ao teste com fase móvel alcalina pH 10,0 a 60°C.

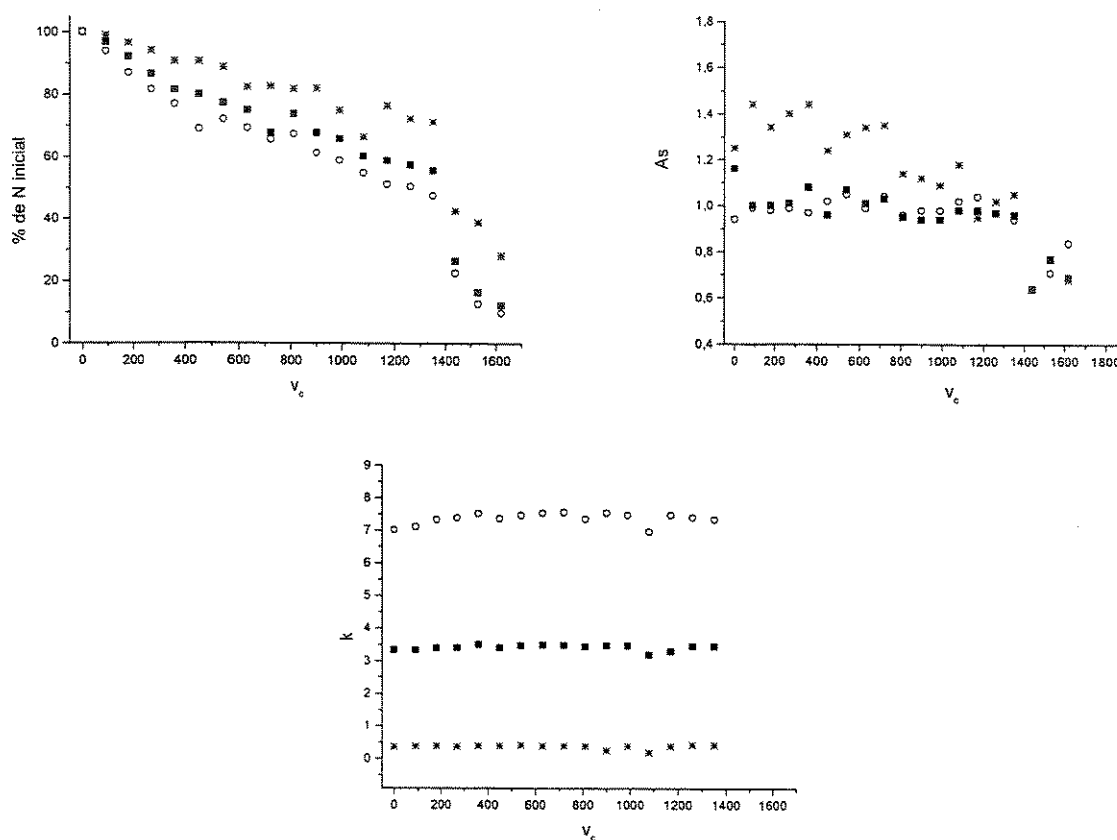


Figura 67. Parâmetros cromatográficos para os compostos da mistura teste em função do volume de fase móvel alcalina (pH 8,4) passado pela coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ . Compostos da mistura teste: * fenol; ■ N,N-dimetilanilina; e o naftaleno.

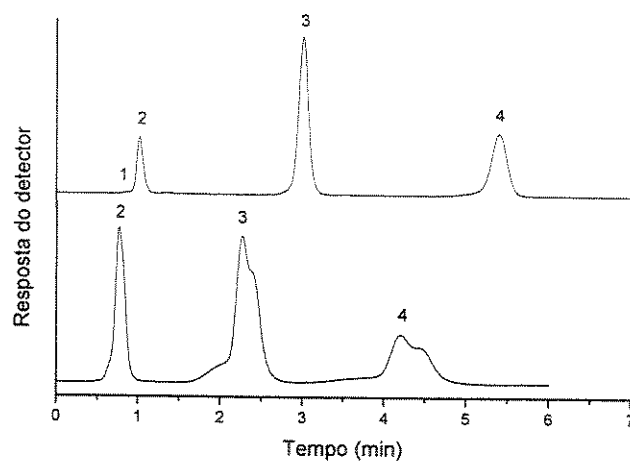


Figura 68. Cromatogramas obtidos com a coluna recheada com a fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ (a) antes e (b) após passar 1.600 v_c de fase móvel alcalina pH 8,4 pela coluna. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina e 4-naftaleno.

IV.4. Comparação entre as fases estacionárias baseadas em diferentes polímeros imobilizados

Para mostrar as diferenças entre as fases estacionárias imobilizadas-extraídas com diferentes polímeros, na Figura 69 estão apresentados os cromatogramas das colunas recheadas com as fases estacionárias obtidas pelo mesmo processo de imobilização (aquecimento a 120°C/16 horas).

A Figura 69 mostra que as fases estacionárias SiO₂(PMTDS) e SiO₂(PMOS) apresentaram separações bastante similares, apesar da fase estacionária SiO₂(PMOS) ter apresentado 10% a mais de recobrimento polimérico. Isto se deve ao tamanho da cadeia lateral dos polímeros, ou seja, é necessário uma fase com maior quantidade de polímero contendo grupos C8 para promover uma separação similar a uma fase com menor quantidade de polímero contendo grupos C14. As diferenças entre a porcentagem de carga promovida nas fases estacionárias com diferentes polímeros se deve as diferentes propriedades de cada polímero, como viscosidade, massa molar, tamanho da cadeia lateral e outros. O fator de separação distinto entre os picos separados pode ser confirmado pelos resultados apresentados na Tabela 39. Nesta seção, o parâmetro cromatográfico utilizado como critério de comparação entre as fases estacionárias baseadas em diferentes polímeros foi o fator de separação, pois é um parâmetro que não depende da forma do pico nos cromatogramas que é muito influenciada pelas variáveis de enchimento da coluna.

Na Figura 70 são mostrados os cromatogramas das colunas recheadas com as fases estacionárias imobilizadas com diferentes polissiloxanos, mas com % de carga similares. As fases escolhidas para esta comparação foram: SiO₂(PDMS) imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas, SiO₂(PMOS) imobilizada por aquecimento a 120°C/4 horas e SiO₂(PMTDS) imobilizada por aquecimento a 80°C/30 horas. Os fatores de separação entre os picos separados para cada fase são mostrados na Tabela 40.

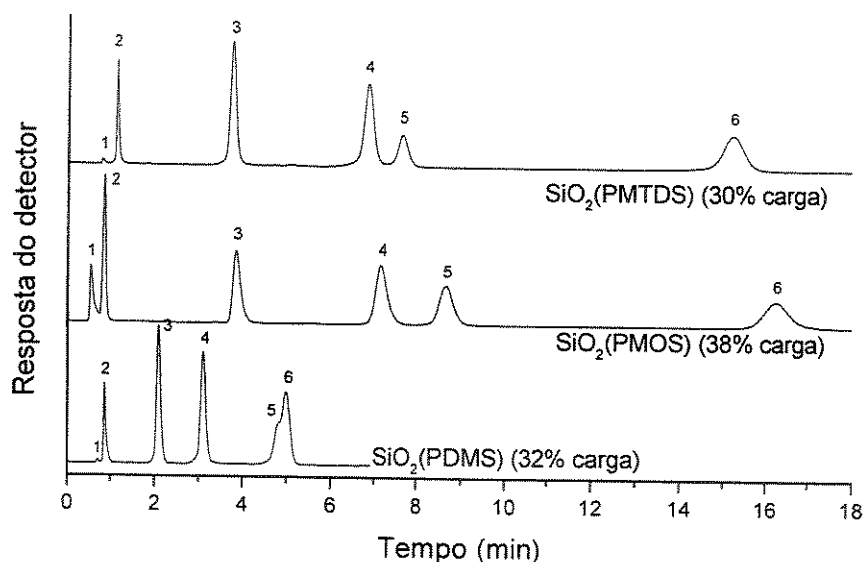


Figura 69. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

Tabela 39. Fator de separação para os picos separados no cromatograma das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizadas por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas.

	Fator de separação			
	Fenol - N,N-Dimetilanilina	N,N-Dimetilanilina - Naftaleno	Naftaleno - Etilbenzeno	Etilbenzeno - Acenafteno
$\text{SiO}_2(\text{PDMS})$	9,07	1,76	1,71	1,04
$\text{SiO}_2(\text{PMOS})$	11,03	2,00	1,23	1,93
$\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$	8,97	2,04	1,13	2,10

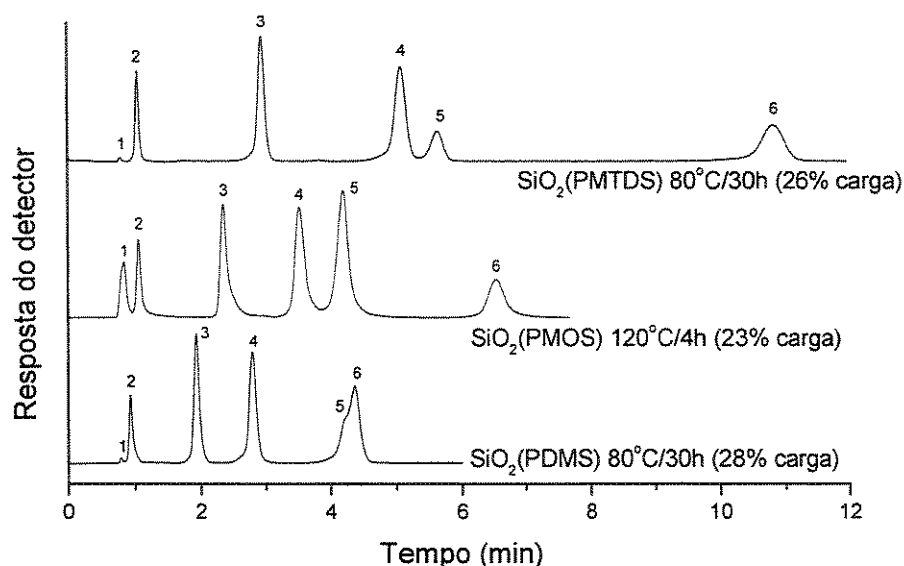


Figura 70. Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ com porcentagem de cargas similares. Condições: fase móvel metanol:água 7:3 (v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção: 254 nm. Compostos injetados: 1-uracila, 2-fenol, 3-N,N-dimetilanilina, 4-naftaleno, 5-etilbenzeno e 6-acenafteno.

Tabela 40. Fator de separação para os picos separados nos cromatogramas das fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ com porcentagem de carga similares.

	Fator de separação			
	Fenol - N,N-Dimetilanilina	N,N-Dimetilanilina - Naftaleno	Naftaleno - Etilbenzeno	Etilbenzeno - Acenafteno
$\text{SiO}_2(\text{PDMS})$	7,60	1,75	1,72	1,04
$\text{SiO}_2(\text{PMOS})$	6,91	1,77	1,25	1,70
$\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$	8,31	1,99	1,13	2,07

Apesar das fases estacionárias não terem exatamente a mesma porcentagem de carga, pode ser notado que os diferentes polímeros proporcionaram separações distintas para as respectivas fases, o que pode ser confirmado pelo fator de separação dos picos (Tabela 40). Como esperado, a retenção da maioria dos compostos aumentou com o tamanho da cadeia alifática lateral de cada polímero.

Se considerarmos a hidrofobicidade como sendo $(k_{\text{acenafteno}} + k_{\text{naftaleno}})/2$ e a atividade silanofílica $(k_{\text{N,N-dimetilanilina}}/k_{\text{acenafteno}})$, pode-se notar que para as fases com cargas similares, ocorre um aumento da hidrofobicidade e uma diminuição da atividade silanofílica em função do aumento do número de carbonos nas cadeias laterais do polissiloxano imobilizado na fase estacionária (Figura 71).

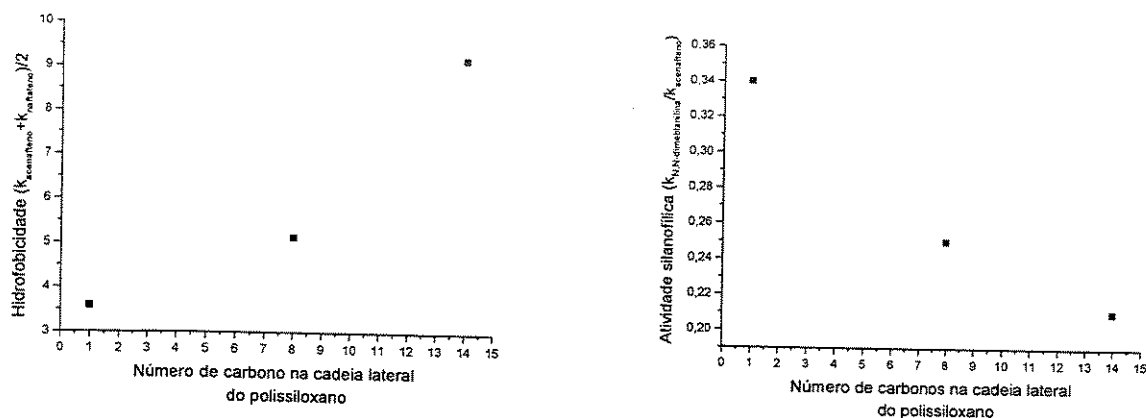


Figura 71. Hidrofobicidade e atividade silanofílica em função do número de carbonos nas cadeias laterais dos polissiloxanos imobilizados na fase estacionária.

Também é mostrada na Tabela 41 a porcentagem de carbono das fases estacionárias baseadas em diferentes polímeros imobilizados por diferentes tratamentos térmicos.

Estes resultados indicam que a imobilização polimérica por tratamento térmico é uma função do tempo e da temperatura. Quanto maior o tempo e a temperatura de imobilização, maior é a quantidade de polímero imobilizado na fase estacionária. Na fase baseada no polímero PDMS, que possui maior estabilidade térmica, foi possível obter um maior recobrimento polimérico utilizando temperatura mais elevada e menor

tempo de imobilização. Para a fase estacionária baseada em PMOS a melhor condição encontrada foi utilizar maior tempo de imobilização e menor temperatura, sendo que a 220°C o polímero degradou. Já para a fase baseada em PMTDS nem foi tentado temperaturas acima de 200°C pois o polímero é ainda menos estável que o PMOS e, neste caso, a melhor condição também foi de 120°C/16 horas. Talvez seja possível encontrar melhores condições de temperatura e tempo capazes de levar a um maior recobrimento polimérico do que as citadas neste trabalho, mas este não foi o nosso objetivo, sendo que as condições utilizadas aqui foram baseadas em resultados obtidos em outros trabalhos em andamento no LABCROM.

Tabela 41. Porcentagem de carbono das fases estacionárias baseadas em diferentes polímeros imobilizadas por tratamento térmico.

	SiO ₂ (PDMS)			SiO ₂ (PMOS)			SiO ₂ (PMTDS)	
Tratamento Térmico	80°C/30h	120°C/16h	240°C/4h	120°C/4h	120°C/16h	220°C/4h	80°C/30h	120°C/16h
%C	9,1	10,5	11,9	14,5	23,3	21,0	18,4	20,6

IV.5. Aplicações das fases estacionárias imobilizadas

Após a caracterização físico-química e cromatográfica, escolheu-se uma fase estacionária imobilizada-extraída baseada em cada polímero e estas foram utilizadas para rechear colunas de 125 x 4 mm e empregadas na separação de pesticidas de naturezas variadas utilizando uma fase móvel ácida (pH 3,75) e uma fase móvel alcalina (pH 10). Como critério de comparação também foram submetidas ao mesmo teste duas colunas comerciais com fase estacionária quimicamente ligada. As colunas escolhidas foram: para o teste com fase móvel alcalina utilizou-se a Purospher C18 5 µm (Merck, 125 x 3 mm) e para o teste com fase móvel ácida utilizou-se a Novapack C18 4 µm (Waters, 150 x 3,9 mm).

IV.5.1. Separação de pesticidas utilizando fase móvel alcalina (pH 10)

A mistura de pesticidas utilizada nesta avaliação foi composta de atrazina, simazina, ametrina, diuron e carbendazin e as colunas utilizadas foram recheadas com as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ , e também a coluna comercial Purospher C18 $5\mu\text{m}$ (Merck). Os cromatogramas estão mostrados na Figura 72. Os picos foram identificados com base nos seus respectivos tempos de retenção e espectros de absorção no UV, sendo que estes experimentos foram realizados em cromatógrafo contendo detector com arranjo de diodos. O espectro de cada pesticida é mostrado na Figura 73.

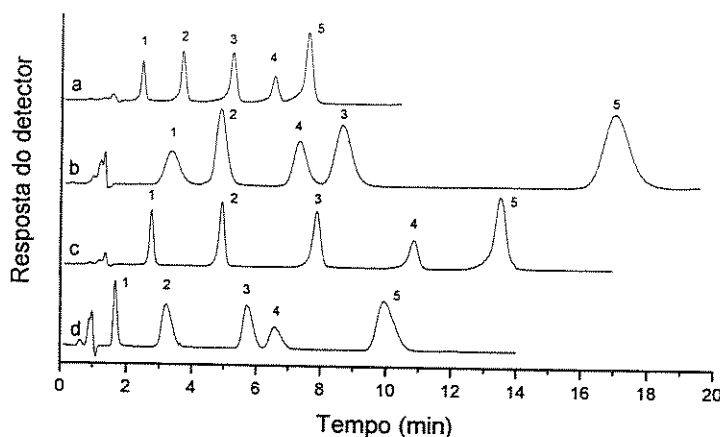


Figura 72. Separação dos compostos da mistura de pesticidas utilizando as colunas recheadas com: (a) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (b) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ ; e (d) coluna Purospher C18 $5\mu\text{m}$ (Merck). Condições: fase móvel acetonitrila:água 35:65 (v/v) pH 10, vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. Detecção com arranjo de diodos a 235 nm. Compostos injetados: 1-carbendazin, 2-simazina, 3-atrazina, 4-diuron e 5-ametrina.

Todas as fases apresentaram boas separações entre os picos dos pesticidas estudados nos cromatogramas, destacando a fase estacionária baseada no polímero PDMS que separou todos os compostos em menos de 8 minutos (Figura 72a). A coluna recheada com a fase estacionária baseada no polímero PMOS mostrou uma separação em aproximadamente 18 minutos e também mostrou uma inversão de retenção entre os picos atrazina e diuron quando comparada com as demais colunas. Isto está relacionado com o sua alta porcentagem de carga polimérica e também devido a sua seletividade diferenciada.

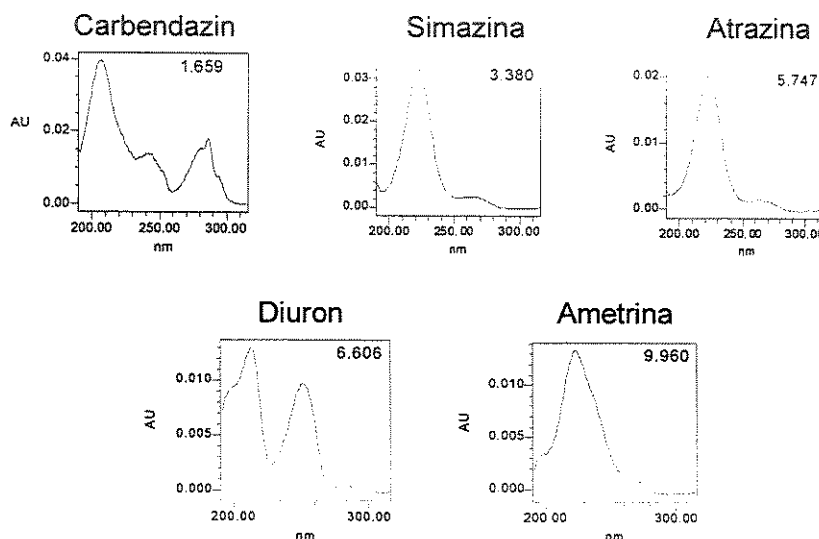


Figura 73. Espectros de absorção no UV dos pesticidas separados pelas diferentes colunas utilizando fase móvel alcalina (pH 10).

IV.5.2. Separação de pesticidas utilizando fase móvel ácida (pH 3,75)

A mistura de pesticidas utilizada nesta avaliação foi composta de bentazona, cianazina, simazina, atrazina, diuron e linuron e as colunas utilizadas foram recheadas com as mesmas fases estacionárias utilizadas na aplicação com fase móvel alcalina ($\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas, $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização +

radiação- γ) e também a coluna comercial Novapak C18, 4 μm (Waters). Os cromatogramas estão mostrados na Figura 74. Os picos também foram identificados com base nos seus tempos de retenção e espectros de absorção no UV (Figura 75).

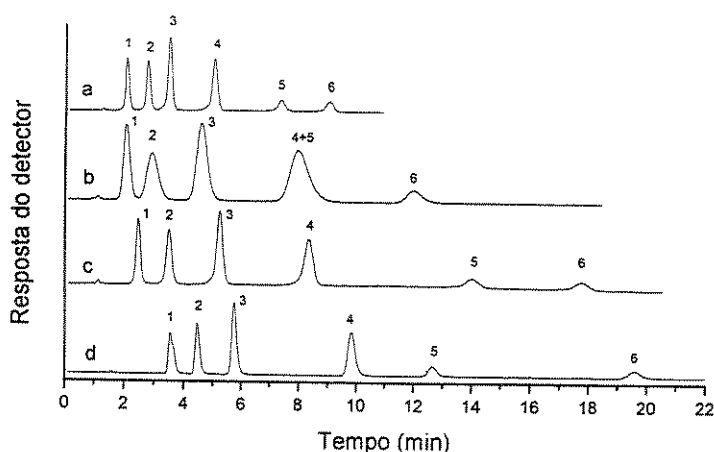


Figura 74. Separação dos compostos da mistura de pesticidas utilizando as colunas recheadas com: (a) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ imobilizada por aquecimento a $240^\circ\text{C}/4$ horas; (b) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizada por aquecimento a $120^\circ\text{C}/16$ horas; (c) fase estacionária $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ imobilizada por auto-imobilização + radiação- γ ; e (d) coluna Novapak C18 $4\mu\text{m}$ (Waters). Condições: fase móvel metanol:água 1:1 (v/v) pH 3,75, vazão de $0,8\text{ mL min}^{-1}$. Detecção com arranjo de diodos a 230 nm. Compostos injetados: 1-bentazona, 2-cianazina, 3-simazina, 4-atrazina, 5-diuron e 6-linuron.

Neste caso, a coluna recheada com a fase estacionária baseada em PMOS não foi capaz de separar todos os compostos da mistura teste, saindo no mesmo tempo de retenção a atrazina e o diuron. As demais colunas foram eficientes na separação, e mais uma vez, destacando a coluna recheada com a fase estacionária baseada em PDMS que separou os seis compostos da mistura teste em menos de 10 minutos.

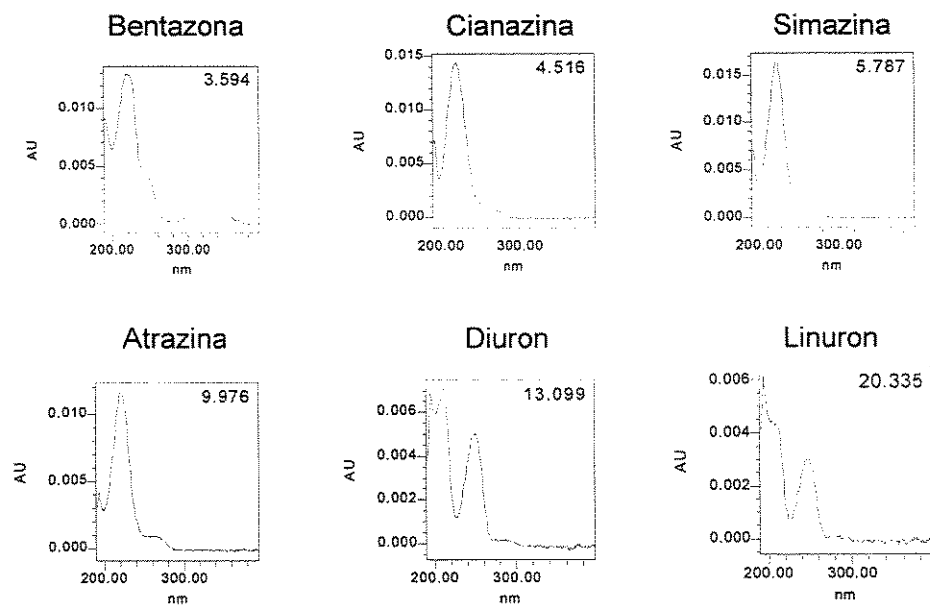


Figura 75. Espectros de absorção no UV dos pesticidas separados pelas diferentes colunas utilizando fase móvel ácida (pH 3,75).

V. Conclusões

As fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, obtidas pelos diferentes procedimentos de imobilização, apresentaram propriedades físico-químicas e cromatográficas distintas em função do grau de recobrimento polimérico. As fases imobilizadas por tratamento térmico mostraram maior recobrimento polimérico. O processo de imobilização por aquecimento a $220^\circ\text{C}/4$ horas promoveu a degradação do polissiloxano e, assim, esta fase não se mostrou apropriada para fins cromatográficos. Os resultados obtidos nas análises por ressonância magnética nuclear evidenciaram que alguns processos de imobilização levam a formação de ligações químicas entre o PMOS e o suporte de sílica. Todas as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$ imobilizadas-extraídas podem ser utilizadas com fase móvel neutra, mas em condições drásticas (pH e temperatura elevados), só a fase estacionária imobilizada por aquecimento a 120°C por 16 horas se mostrou promissora.

Assim como as fases estacionárias $\text{SiO}_2(\text{PMOS})$, as fases $\text{SiO}_2(\text{PDMS})$ e $\text{SiO}_2(\text{PMTDS})$ obtidas pelos diferentes procedimentos de imobilização também apresentam propriedades físico-químicas e cromatográficas distintas em função do grau de recobrimento polimérico, embora nestes casos os diferentes processos não tenham promovido muita diferença no grau de recobrimento de cada fase. Os testes de estabilidade feitos em uma das fases de cada polímero também mostraram que estas fases são muito estáveis frente a fase móvel neutra. Para o teste com fase móvel alcalina pH 8,4, a fase baseada no PDMS se mostrou mais estável que a fase baseada em PMTDS, que apresentou uma degradação rápida.

Comparando-se as fases estacionárias com diferentes polímeros, mas com porcentagem de carga similares, ficou evidente que as cadeias laterais dos polímeros promovem seletividades distintas para compostos ácidos, básicos e neutros e ainda controlam as propriedades como hidrofobicidade e atividade silanofílica das fases estacionárias.

O grau de separação e a retenção dos compostos da mistura teste podem ser controlados variando-se a porcentagem de carga do polímero.

De um modo geral, as seletividades variadas obtidas com as fases estacionárias baseadas em um mesmo polímero foram resultado da porcentagem de carga promovido por um dado processo de imobilização e não pela forma de imobilização. Assim, pode se esperar que o uso da imobilização térmica pode substituir os demais processos, variando-se o tempo e a temperatura de imobilização.

A porcentagem de carga resultante de um dado procedimento de imobilização é dependente do tipo do polímero a ser imobilizado.

A estabilidade térmica das fases estacionárias também é dependente do polímero imobilizado, sendo que foi mostrado que, para os polissiloxanos com cadeia linear, quanto maior a cadeia lateral do polímero menor é a sua estabilidade térmica.

Foram mostradas duas aplicações das fases estacionárias obtidas neste trabalho em condições drásticas de pH, as quais se mostraram eficientes na separação das misturas de pesticidas.

Os testes de estabilidade com condições drásticas de fase móvel utilizados neste trabalho se mostraram de grande utilidade para o estudo acelerado e comparativo das diferentes fases obtidas, sendo que, além de ser mais rápido, utiliza uma quantidade bem menor de fase móvel.

Apesar da tentativa de se obter uma sílica com melhores propriedades cromatográficas após o tratamento ácido, os resultados mostraram que o procedimento utilizado não levou a nenhuma alteração estrutural desejada. Talvez isto esteja relacionado com a alta estabilidade da sílica utilizada (Kromasil).

Sumarizando, as fases estacionárias obtidas se mostraram muito eficientes para utilização em cromatografia líquida na separação de compostos de variadas naturezas e polaridades e também em condições de análise utilizando fase móvel ácida e básica, tendo desempenho igual ou até superior às fases estacionárias comerciais utilizadas neste trabalho. As principais vantagens destas fases estão relacionadas com a facilidade e custo da preparação e também o maior recobrimento dos grupos silanóis do suporte de sílica que as tornam bastante eficientes na separação de compostos básicos.

VI. Perspectivas futuras

Para mostrar a aplicabilidade e o potencial das fases estacionárias reversas obtidas neste trabalho, seria necessário complementar os resultados obtidos com:

- um estudo da repetitividade do procedimento de obtenção das fases baseadas em diferentes polímeros;
- a realização de experimentos de estabilidade com fases móveis ácidas e alcalinas que simulem a utilização real de fases estacionárias reversas; e
- a avaliação das colunas recheadas com as fases estacionárias obtidas em condições reais de análise quantitativa.

VII. Bibliografia

1. Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Glajch, J. C.; "Practical HPLC Method Development", 2nd ed., Wiley, New York, 1997.
2. Halasz, I.; Horváth, C. G.; Anal. Chem. 1964, 36, 1178.
3. Kirkland, J. J.; Anal. Chem. 1968, 40, 391.
4. Kirkland, J. J.; J. Chromatogr. Sci. 1972, 10, 593.
5. Berthod, A.; J. Chromatogr. A 1991, 549, 1.
6. Nahum, A.; Horváth, C.; J. Chromatogr. 1981, 203, 53.
7. Nawrocki, J.; J. Chromatogr. A 1997, 779, 29.
8. Unger, K. K.; Porous silica: its properties and use as support in column liquid chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1979.
9. Scott, R. P. W.; Silica gel and bonded phases: their products, properties and use in liquid chromatography, Wiley, Chichester, 1993.
10. Kirkland, J. J.; Dilks, J. C. H.; Henderson, J. W.; LC-GC 1993, 11, 290.
11. Kirkland, J. J.; van Straten, M. A.; J. Chromatogr. A 1995, 691, 3.
12. Kirkland, J. J.; J. Chromatogr. Sci. 1996, 34, 309.
13. Kirkland, J. J.; Henderson, J. W.; DeStefano, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A.; J. Chromatogr. A 1997, 762, 97.
14. McCalley, D. V.; J. Chromatogr. A 1996, 738, 169.
15. Majors, R. E.; LC-GC 2000, 18, 586.
16. Kurganov, A.; Davankov, V.; Isajeva, T.; Unger, K. K.; Eisenbeiss, F.; J. Chromatogr. A 1994, 660, 97.
17. Pesek, J. J.; Tang, V. H.; Chromatographia 1994, 39, 649.
18. Pesek, J. J.; Sandoval, J. E.; Su, M.; J. Chromatogr. 1993, 630, 95.
19. Trüdinger, U.; Müller, G.; Unger, K. K.; J. Chromatogr. 1990, 535, 111.
20. Yu, J.; El Rassi, Z.; J. Chromatogr. 1993, 631, 91.
21. Yu, J.; El Rassi, Z.; J. Liq. Chromatogr. 1993, 16, 2931.
22. Wirth, H. J.; Eriksson, K. O.; Holt, P.; Aguilar, M.; Hearn, M. T. W.; J. Chromatogr. 1993, 646, 129.
23. Murayama, K.; Nakamura, H.; Takahashi, K.; Yoshida, A.; Anal. Sci. 1994, 10, 815.
24. Nobuhara, K.; Kato, M.; Nakamura, M.; Takami, M.; Kaneko, S.; J. Chromatogr. A 1995, 704, 45.
25. Melo, L. F. C.; Jardim, I. C. S. F.; J. Chromatogr. A 1999, 845, 423.
26. Melo, L. F. C.; Collins, C. H.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; J. Chromatogr. A 2000, 869, 129.
27. Silva, R. B.; Collins, C. H.; J. Chromatogr. A 1999, 845, 417.
28. Silva, R. B.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; J. Chromatogr. A 2000, 869, 137.
29. Silva, R. B.; Gushikem, Y.; Collins, C. H.; J. Sep. Sci. 2001, 24, 49.
30. Neue, U. D.; Walter, T. H.; Alden, B. A.; Jiang, Z.; Fisk, R. P.; Cook, J. T.; Glose, K. H.; Carmody, J. L.; Grassi, J. M.; Cheng, Y. F.; Lu, Z.; Crowley, R. J.; Am. Lab. 1999 (November), 31, 36.
31. Cheng, Y. F.; Walter, T. H.; Lu, Z.; Iraneta, P.; Alden, B. A.; Gendreau, C.; Grassi, J. M.; Carmody, J. L.; O'Gara, J. E.; Fisk, R. P.; LC-GC 2000, 18, 1162.

32. Majors, R. E.; LC-GC Special Issue on Current Issues in HPLC Technology, May 1997, S8.
33. Vansant, E. F.; Van Der Voort D.; Vrancken C.; Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface, Elsevier, New York, 1995.
34. Van der Voort, P.; Vansant, E. F.; J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 1996, 19, 2723.
35. Abel, E. W.; Polland, F. W.; Uden, P. C.; Nickless, G. D.; J. Chromatogr. 1966, 22, 23.
36. Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Sandoval, J. E.; Williamsen, E. J.; J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 1996, 19, 2843.
37. Tani, K.; Suzuki, Y.; J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 1996, 19, 3037.
38. Tani, K.; Suzuki, Y.; J. Chromatogr. A 1996, 722, 129.
39. Sander, L. C.; Wise, S. A.; Anal. Chem. 1995, 67, 3284.
40. Sander, L. C.; Pursch, M.; Wise S. A.; Anal. Chem. 1999, 71, 4821.
41. Engelhardt, H.; Orth, P.; J. Liq. Chromatogr. 1987, 10, 1999.
42. Scott, R. P. W.; Simpson, C. F.; J. Chromatogr. Sci. 1992, 30, 59.
43. Sander, L. C.; Wise, S. A.; Crit. Rev. Anal. Chem. 1987, 18, 299.
44. Majors, R. E.; LC-GC 1994, 12, 508.
45. Sudo, A.; Wada, T; J. Chromatogr. A 1998, 813, 239.
46. Kirkland, J. J.; Glajch, J. L.; Farlee, R. D.; Anal. Chem. 1989, 61, 2.
47. O'Gara, J. E.; Alden, B. A.; Walter, T. H.; Petersen, J. S.; Niederlaender, C. L.; Neue, U. D.; Anal. Chem. 1995, 67, 3908.
48. Czajkowska, T.; Jaroniec, M.; J Chromatogr. A. 1997, 762, 147.
49. Kirkland, J. J.; Henderson, J. W.; Martosella, J. D.; Bidlingmeyer, B. A.; Vasta-Russel, J.; Adams, Jr. J. B.; LC-GC 1999, 17, 634.
50. Buszewski, B.; Gadzala-Kopciuch, R. M.; Markuszewski, M.; Kaliszan, R.; Anal. Chem. 1997, 69, 3277.
51. Silva, C. R; Jardim, I. C. S. F.; Airoidi, C.; J. Chromatogr. A 2001, 913, 65.
52. Majors, R. E.; LC-GC 1998, 16, 228.
53. Czajkowska, T.; Jaroniec, M.; J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 1996, 19, 2829.
54. Tani, K.; Suzuki, Y.; J. Chromatogr. A 1996, 722, 129.
55. Tani, K.; Suzuki, Y.; J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 1996, 19, 3037.
56. Pesek, J. J.; Matyska, M.T.; Ramakrishnan, J.; Chromatographia 1997, 44, 538.
57. Murayama, K.; Nakamura, H.; Takahashi, K.; Yoshida, A.; Anal.Sci. 1994, 10, 815.
58. Kurganov, A.; Trüding, U.; Isaeva, T.; Unger, K.; Chromatographia 1996, 42, 217.
59. Bell, C. M.; Sander, L. C.; Fetzer, J. C.; Wise, S. A.; J. Chromatogr. A 1996, 753, 37.
60. Wirth, M. J.; Fatunmbi, H.O.; Anal. Chem. 1992, 64, 2783.
61. Wirth, M. J.; Fatunmbi, H. O.; J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 1996, 19, 2799.
62. Fairbank, R. W. P.; Wirth, M. J.; J. Chromatogr. A 1999, 830, 285.
63. Akapo, S. O.; Fatunmbi, H. O.; LC-GC 1999, 17, 334.
64. Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Ramakrishnan, J.; Chromatographia 1997, 44, 538.
65. Pesek, J. J.; Tang, V. H.; Chromatographia 1994, 39, 649.
66. Schomburg, G.; Trends Anal. Chem. 1991, 10, 163.
67. Schomburg, G.; Deege, A.; Köhler, J.; Bien-Vogelsang, U.; J. Chromatogr. 1983, 282, 27.
68. Bien-Vogelsang, U.; Deege, A.; Figge, H.; Köhler, J.; Schomburg, G.; Chromatographia 1984, 19, 170.

69. Hansen, M.; Unger, K. K.; Trends Anal. Chem. 1992, 11, 368.
70. Petro, M.; Berek, D.; Chromatographia 1993, 37, 561.
71. Mao, Y.; Fung, B.M.; J. Chromatogr. A 1997, 790, 9.
72. Nyholm, L. M.; Markides, K. E.; J. Chromatogr. A 1998, 813, 11.
73. Collins, K. E.; Sá A. L. A.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Chromatographia 2001, 53, 661.
74. Figge, H.; Deege, A.; Köhler, J.; Schomburg, G.; J. Chromatogr. 1986, 351, 393.
75. Lecourtier, J.; Audebert, R.; Ouivovon, C.; J. Liq. Chromatogr. 1978, 1, 367.
76. Nasal, A.; Haber, P.; Kaliszan, R.; Forgács, E.; Cserhádi, T.; Chromatographia 1996, 43, 484.
77. Forgács, E.; Cserhádi, T.; J. Chromatogr. A 1998, 797, 33.
78. Hanson, M.; Unger, K. K.; Schomburg, G.; J. Chromatogr. 1990, 517, 269.
79. Haky, J. E.; Rayham, A.; Dunn, B. M.; J. Chromatogr. 1991, 541, 303.
80. Garbow, J. R.; Asrar, J.; Hardiman, C. J.; Chem. Mater. 1993, 5, 869.
81. Hanggi, D. A.; Marks, N. R.; LC-GC 1993, 11, 128.
82. Li, J.; Carr, P. W.; Anal. Chem. 1996, 68, 2857.
83. Li, J.; Carr, P.W.; Anal. Chem. Acta 1996, 334, 239.
84. Li, J.; Carr, P.W.; Anal. Chem. 1997, 69, 2202.
85. Reeder, D. H.; Li, J.; Carr, P.W.; Flickinger, M. C.; McCormick, V.; J. Chromatogr. A 1997, 760, 71.
86. Li, J.; Reeder, D. H.; McCormick, A. V.; Carr, P. W.; J. Chromatogr. A 1997, 791, 45.
87. Lopes, N. P.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; J. Chromatogr. A 2004, 1030, 225.
88. Lopes, N. P.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; J. Chromatogr. A 2004, 1030, 231.
89. Kurganov, A.; Trüdinger, U.; Isaeva, T.; Unger, K. K.; Chromatographia 1996, 42, 217.
90. Zhao, J.; Carr, P. W.; Anal. Chem. 2000, 72, 302.
91. Schomburg, G.; Köhler, J.; Figge, H.; Deege, A.; Bien-Vogelsang, U.; Chromatographia 1984, 18, 265.
92. Bottoli, C. B. G.; Chaudhry, Z. F.; Fonseca, D. A.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; J. Chromatogr. A 2002, 948, 121.
93. Anazawa, T. A.; Jardim, I.C.S.F.; J. Liq. Chromatogr. 1994, 17, 1265.
94. Collins, K. E.; Granja, M. L. M. M.; Pereira Filho, R. G.; Anazawa, T. A.; Jardim, I.C.S.F.; Chromatographia 1997, 45, 99.
95. Anazawa, T. A.; Carraro, F.; Collins, K. E.; Jardim, I.C.S.F.; J. Chromatogr. A 1995, 697, 159.
96. Anazawa, T. A.; Jardim, I.C.S.F.; J. Liq. Chromatogr. 1998, 21, 645.
97. Silva, M. C. H.; Jardim, I. C. S. F.; J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 1998, 21, 2447.
98. Jardim, I. C. S. F.; Collins, K. E.; Anazawa, T. A.; J. Chromatogr. A 1999, 849, 299.
99. Hanson, M.; Kurganov, A.; Unger, K. K.; Davankov, V. A.; J. Chromatogr. 1993, 656, 369.
100. Castells, C. B.; Carr, P. W.; Anal. Chem. 1999, 71, 3013.
101. Zhao, J.; Carr, P. W.; Anal. Chem. 1999, 71, 5217.
102. Li, J.; Reeder, D. H.; McCormick, A. V.; Carr, P. W.; J. Chromatogr. A 1997, 791, 45.
103. Sun, L.; McCormick, A. V.; Carr, P. W.; J. Chromatogr. A 1994, 658, 465.
104. Crini, G.; Morcellet, M.; J. Chromatogr. Sci. 1996, 34, 477.

105. Crini, G.; Morcellet, M.; J. Chromatogr. Sci. 1996, 34, 485.
106. Crini, G.; Lekchiri, Y.; Janus, L.; Morcellet, M.; Morin, N.; Chromatographia 1999, 50, 661.
107. Collins, K. E.; Bottoli, C. B. G.; Vigna, C. R. M.; Bachmann, S.; Albert, K.; Collins, C. H.; J. Chromatogr. A 2004, 43, 1020.
108. Bachmann, S.; Melo, L. F. C.; Silva, R. B.; Anazawa, T. A.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; Albert, K.; Chem. Mater. 2001, 13, 1874.
109. Kirkland, J. J.; LC-GC Current Issues in HPLC Technology, May 1997, S46.
110. Kurganov, A.; Puchkova, Y.; Davankov, V.; Eisenbeiss, F.; J. Chromatogr. A 1994, 663, 163.
111. Kataev, A. D.; Saburov, V. V.; Reznikova, O. A.; Kapustin, D. V.; Zubov, V. P.; J. Chromatogr. A 1994, 660, 131.
112. Terrien, I.; Achard, M. F.; Félix, G.; Hardouin, F.; J. Chromatogr. A 1998, 810, 19.
113. Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Williamsen, E. J.; Tam, R.; Chromatographia 1995, 41, 301.
114. Delaurent, C.; Tomao, V.; Siouffi, A. M.; Chromatographia 1997, 45, 355.
115. Kanda, T.; Kutsuna, H.; Ohtsu, Y.; Yamagushi, M.; J. Chromatogr. A 1994, 672, 51.
116. Kanda, T.; Shirota O.; Ohtsu, Y.; Yamagushi, M.; J. Chromatogr. A, 1996, 722, 115.
117. Nyholm, L. M.; Markides, K. E.; J. Chromatogr. A 1998, 813, 11.
118. Köhler, J.; Chromatographia, 1986, 21, 573.
119. Ohmacht, R.; Kele, M.; Matus, Z.; Chromatographia, 1989, 28, 19.
120. Cresswell, S. L.; Haswell, S. J.; J. Chem. Educ., 2001, 78, 900.
121. Kingston, H. M.; Jessie, L. B.; "Introduction to Microwave Sample Preparation", ACS Professional Reference Book, Washington D.C., 1998.
122. Nóbrega, J. A.; Costa, L. M.; Santos, D. M.; Analytica, 1 (nº 1) 2002, 32.
123. Kapor, M. A.; "Preparação de Fases Estacionárias SiO₂(PMOS), Sorvidas e Imobilizadas por Microondas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
124. Moraes, L. S. R.; "Preparação de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a Partir de Sílica Titanizada e Polibutadieno" Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2003.
125. Swallow, A. J.; "Radiation Chemistry - An Introduction", Longman, London, 1973.
126. Mano, E. B.; "Introdução a Polímeros", Edgard Blücher, São Paulo, 1985.
127. Petrach Systems Silanes & Silicones, catálogo, 1989.
128. Guiochon, G.; Katti, A.; Chromatographia 1987, 24, 1919.
129. Verzele, M.; De Coninck, M.; Vindevogel, J.; Dewaele, C.; J. Chromatogr. 1988, 450, 47.
130. Little, J. W.; Cotton, R. L.; Pendergast, J. A.; McDonald P. D.; J. Chromatogr. 1976, 126, 439.
131. Godbille, E.; Devaux, P.; J. Chromatogr. 1976, 122, 317.
132. T. Wang, R. A. Hartwick, N. T. Miller, D. C. Shelly, J. Chromatogr. 1990, 523, 23.
133. Gentilucci, T. J.; Silvakoff, S. I.; Cox, G. B.; Stearns, S. D.; Hutchinson, M. W.; J. Chromatogr. 1989, 461, 63.
134. Cassidy, R.; Le Gay, D.; Frei, R. W.; Anal. Chem. 1974, 46, 340.
135. Kirkland, J.; Chromatographia 1975, 10, 661.

136. Kirkland, J.; *J. Chromatogr. Sci.* 1972, 10, 593.
137. Asshauer, J.; Halasz, I.; *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 139.
138. Verzele, M.; *J. Chromatogr.* 1984, 295, 81.
139. Zimina, T. M.; Smith, R. M.; Myers, P.; King, B. W.; *Chromatographia* 1995, 40, 662.
140. Bristow, P. A.; Brittain, P. N.; Riley, C. M.; Williamson, B. F.; *J. Chromatogr.* 1997, 131, 57.
141. Shelly, D. C. ; Antonucci, V. L.; Edkins, T. J.; Dalton, T. J.; *J. Chromatogr.* 1989, 458, 267.
142. Vissers, J. P. C.; Claessens, H. A.; Laven, J.; Cramers, C. A.; *Anal. Chem.* 1995, 67, 2103.
143. Verzele, M.; Dewaele, C.; *LC-GC* 1986, 4, 614.
144. Karapetyan, S. A.; Yakushina, L. M.; Vasijarov, G. G.; Brazhnikov, V. V.; *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 1983, 6, 440.
145. Guiochon, G.; Drumm, E.; Cherrak, D.; *J. Chromatogr. A* 1999, 835, 41.
146. Guan-Sajonz, H.; Guiochon, G.; *J. Chromatogr. A* 1996, 743, 247.
147. Yuan, Q. S.; Rosenfeld, A.; Root, T. W.; Klingenberg, D. J.; Lightfoot, E. N.; *J. Chromatogr. A* 1999, 831, 149.
148. Farkas, T.; Speniak, M. J.; Guiochon, G.; *J. Chromatogr. A* 1996, 740, 169.
149. Issaq, H. J.; Janini, G. M.; Schultz, N.; Marzo, L.; Beesley, T. E.; *J. Liq. Chromatogr.* 1988, 11, 3335.
150. Stanley, B. J.; Foster, C. R.; Guiochon, G.; *J. Chromatogr. A* 1997, 761, 41.
151. Majors, R. E.; *LC-GC*, 2000, 18, 1214.
152. Fonseca, D. A.; "Desenvolvimento de Um Novo Procedimento de Avaliação da Estabilidade de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", *Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.*
153. Engelhardt, H.; Löw, H. Eberhardt, W.; Mauß, M.; *Chromatographia* 1989, 27, 535.
154. Claessens, H. A.; Van Straten, M. A.; Kirkland, J. J.; *J. Chromatogr. A* 1996, 728, 259.
155. Verstraeten, W.; de Zeeuw, J.; Crombeen, J.; Vonk, N.; *Am. Lab.* 2000 (October), 32, 20.
156. Collins, K. E.; Franchon, A. C.; Jardim, I. C. S. F.; Radovanovic, E.; Gonçalves, M. C.; *LC-GC* 2000, 18, 106.
157. Köhler, J.; Chase, D. B.; Farlee, R. D.; Veja, A. J.; Kirkland, J. J.; *J. Chromatogr.* 1986, 352, 275.
158. Köhler, J.; Kirkland, J. J.; *J. Chromatogr.* 1987, 385, 125.
159. Nawrocki, J.; *Chromatographia* 1991, 31, 177.
160. Nawrocki, J.; *Chromatographia* 1991, 31, 193.
161. Unger, K. K.; Lork, B.; Pfeiderer, K.; Albert, E.; Bayer, J.; *J. Chromatogr.* , 1991, 556, 395.
162. Barret, D. A.; Brown, V. A.; Watson, R. C.; Davies, M. C.; Shaw, P. N.; Ritchie, H. J.; *J. Chromatogr. A* 2001, 905, 69.
163. Nawrocki, J.; *J. Chromatogr.* 1987, 384, 315.
164. Busewski, B.; *Chromatographia* 1992, 34, 573.
165. Nawrocki, J.; Moir, D. L.; Szezepaniak, W.; *Chromatographia* 1989, 28, 143.

166. Chaudhry Z. F. e Collins C. H. Desenvolvimento de Misturas Teste Padrões para Avaliação de Fases Estacionárias de Fase Reversa para CLAE. 24º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 2001, QA-104.
167. Anazawa, T. A., "Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionárias Reversas, tipo C8, para CLAE", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 1996.
168. Collins, C. H.; Braga, G. L. Pierina, S. B.; "Introdução a Métodos Cromatográficos", 4ª ed., Editora da Unicamp, Campinas, 1990.
169. Melo, L. F. C.; "Desenvolvimento de Metodologias e de Novos Materiais para Determinação Multirresíduo de Pesticidas em Uva e Tomate por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2003.
170. Pinto, G. M. F.; "Desenvolvimento de Metodologias para Determinação de Multirresíduos de Herbicidas e seus Metabólitos em Água e em Solo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2002.
171. Carraher, C. E. J.; J. Macromol. Sci. 1982, A17, 1293.
172. Hetem, M. J. J.; De Haan, J. W.; Claessens, H. A.; Cramers, C. A.; J. Chromatogr., 1991, 540, 53.
173. Tonhi, E.; Bachman, S.; Albert, K.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; J. Chromatogr. A 2002, 948, 97.
174. Neue, U. D.; Serowik, E.; Iraneta, P.; Alden, B. A.; Walter, T. H.; J. Chromatogr. A 1999, 849, 87.
175. Galusko, S.V.; Chromatographia 1993, 36, 39.
176. Kirkland, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A.; J. Chromatogr. A 1998, 797, 111.