



UNICAMP



1150057297



T/UNICAMP F733f

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

FASES ESTACIONÁRIAS REVERSAS BASEADAS EM SÍLICA
TITANIZADA, COM POLI(METILOCTILSILOXANO) IMOBILIZADO
POR DIFERENTES TRATAMENTOS

Autora: Dania Alvarez Fonseca

Orientadora: Profa Dra Carol Hollingworth Collins

**Campinas
Outubro de 2003**

UNIDADE IUR
 Nº CHAMADA 10/11/04
 V _____ EX _____
 TOMBO BCI 10/11/04
 PROC 10/11/04
 C _____ D _____
 PREÇO 11,00
 DATA 03/03/04
 Nº CPD _____

318 10 311203

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

F733f	<p>Fonseca, Dania Alvarez.</p> <p>Fases estacionárias reversas baseadas em sílica titanizada, com poli(metiloctilsiloxano) imobilizado por diferentes tratamentos / Dania Alvarez Fonseca. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.</p> <p style="text-align: center;">Orientador: Carol Hollingworth Collins.</p> <p style="text-align: center;">Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p style="text-align: center;">1. CLAE. 2. Sílica titanizada. 3. Fases estacionárias imobilizadas. I. Collins, Carol Hollingworth. II. Universidade Estadual de Campinas. IV. Título.</p>
-------	--

Dedico esta tese aos meus pais, Ideliza e Basilio, pela preocupação e desejo para que eu atingisse os meus objetivos na vida e principalmente ao meu marido, Humberto, pelo incentivo, apoio constante e a força para enfrentar as dificuldades. Amo muito vocês.

Agradecimentos

- *À profa. Carol H. Collins pelo seu apoio constante tanto profissional, quanto pessoal. Sinto-me privilegiada por você ter sido a minha orientadora. O seu exemplo de convivência e a sua competência me ajudaram muito na minha formação profissional. Graças a você ganhei independência e confiança no trabalho. Muito obrigada.*
- *Ao prof. Kenneth e à profa. Bel pelas sugestões e colaboração.*
- *Às minhas amigas Carla e Zahra, vocês estiveram ao meu lado nos momentos que precisei de uma mão amiga. Obrigada pelos bons momentos compartilhados desde o meu começo no laboratório. A Carla não sei como agradecer o apoio, a paciência e a generosidade nas discussões durante o desenvolvimento da tese, sempre disposta a fazer as correções dos meus trabalhos e da tese. Você é uma grande amiga e muito profissional.*
- *À Rosely, Nilva, Lucia, Sonia, Priscila e Joseane, pela amizade e companherismo.*
- *Aos novos amigos e colegas do laboratório: Lais, Allan, Camila, Cintia, Josimara, Lika, Daniel, Karen, Vanessa, Anizio e Louise, pela agradável convivência.*
- *Ao César, pela ajuda e sugestões.*
- *Ao Marcelo, pela doação dos fármacos.*
- *À Valtinho pela confecção das colunas.*
- *Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelas medidas de XAS.*
- *À UNICAMP e ao Instituto de Química pela oportunidade.*
- *À FAPESP pela bolsa e apoio financeiro.*

À todos aqueles que contribuíram com a realização deste trabalho muito obrigada.

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica:

Mestrado em Química Analítica – Universidade Estadual de Campinas, (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.
Período: Março/99 a Março/2001

Licenciatura em Química - Universidad de la Habana, Cuba.
Período: Setembro/1988 a Setembro/1993

2. Cursos:

“Técnicas Avançadas em HPLC” realizado no período de 18 a 21 de novembro de 2002, Waters, São Paulo.

“Eletroforese Capilar” realizado no dia 6 de novembro de 2002, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas.

“Fundamentos e Aplicações da Espectrometria de Absorção de Raios X” realizado no período de 19 a 30 de Julho de 2002, Laboratório de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas.

“Iniciação ao tratamento de dados EXAFS” realizado no dia 16 de Maio de 2002, Laboratório de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas.

“Cromatografia gaseosa y Cromatografia líquida”. Dezembro/1994 - Julho/1995, Instituto de Investigações de Sanidad Vegetal , La Habana, Cuba.

3. Artigos:

1. **Fonseca, D. A.**, Collins, K. E., Collins, C. H., “Titanized Silica-Based Stationary Phases Prepared with Thermally and Microwave Immobilized Poly(methyloctylsiloxane)” accepted for *Journal of Chromatography A*.
2. **Fonseca, D. A.**, Gutiérrez, H. R., Collins, K. E., Collins, C. H., “A Rapid Method to Evaluate RP-HPLC Column Stability” submitted to *Journal of Chromatography A*.
3. Bottoli, C. B. G.; Chaudhry, Z. F.; **Fonseca, D. A.**; Collins, K. E.; Collins, C. H., “Poly(alkylmethylsiloxanes) Thermally Immobilized on Silica as Stationary Phases for HPLC”, *J. Chromatogr. A* **948** (2002) 121-128.

4. Trabalhos apresentados em Congressos Internacionais: 7

5. Trabalhos apresentados em Congressos Nacionais: 9

6. Bolsas obtidas:

1- Bolsa de Mestrado concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no período de março de 1999 a março de 2001.

2- Bolsa de Doutorado concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), no período de abril de 2001 a outubro de 2003.

FASES ESTACIONÁRIAS REVERSAS BASEADAS EM SÍLICA TITANIZADA, COM POLI(METILOCTILSILOXANO) IMOBILIZADO POR DIFERENTES TRATAMENTOS

Autora: Dania Alvarez Fonseca

Orientadora: Profa Dra Carol Hollingworth Collins

Neste trabalho foram preparadas e avaliadas fases estacionárias utilizando sílica modificada com titânio como suporte e poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) imobilizado na sua superfície, como fase estacionária líquida, com o intuito de obterem fases estáveis e eficientes para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase reversa (FR). As influências da temperatura, do uso de centrifugação, do tempo de reação e da umidade na sílica na quantidade de titânio incorporado na superfície do suporte foram investigados. Os resultados mostraram que baixas temperaturas, a presença de água na sílica e a hidrólise ácida antes da reação com o tetrabutóxido de titânio influenciaram positivamente no aumento da quantidade de titânio incorporado na sílica. Para obter uma alta cobertura dos grupos hidroxilas do suporte, foram utilizados diferentes tratamentos para imobilizar o PMOS na sua superfície. Com o tratamento térmico foi investigado o uso de atmosfera de ar ou de nitrogênio, o tempo de imobilização e diferentes temperaturas. No tratamento por radiação microondas foram avaliadas diferentes potências e tempos. O terceiro tratamento utilizado foi a radiação gama, na qual foram aplicadas doses de 80 e 120 kGy. Os resultados cromatográficos indicaram que a fase estacionária que apresentou melhor desempenho na separação de compostos neutros, básicos e ácidos foi aquela na qual o PMOS foi imobilizado com tratamento térmico em atmosfera de nitrogênio, a 120 °C por 8 h. Esta fase também mostrou maior estabilidade em fase móvel básica que a fase preparada com sílica não modificada com titânio, imobilizada nas mesmas condições.

REVERSED PHASES BASED ON TITANIZED SILICA, WITH POLY(METHYLOCTYLSILOXANE) IMMOBILIZED BY DIFFERENT TREATMENTS

Author: Dania Alvarez Fonseca

Supervisor: Profa Dra Carol Hollingworth Collins

In this work stationary phases using silica modified with titanium (as support) with poly(methyloctylsiloxane) (PMOS) immobilized on its surface (as liquid stationary phase), were prepared and evaluated, with the objective of obtaining stable and efficient stationary phases for use in Reversed Phase (RP) High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The influence of temperature, the use of centrifugation, the reaction time and the humidity of the silica on the amount of titanium incorporated on the support surface were studied. The results show that low temperatures, the presence of the humidity on the silica and the use of acid hydrolysis before the reaction with titanium tetrabutoxide increase of the amount of titanium bonded to the silica. In order to obtain a good covering of the hydroxyl groups, different treatments for immobilizing PMOS onto the support surface were used. In the case of thermal treatment, different immobilization times, temperatures and atmospheres (nitrogen or air) were used. In the treatment by microwave radiation the evaluated parameters were power and time. The third treatment investigated was gamma radiation, in which doses of 80 and 120 kGy were applied. The chromatographic results indicate that the stationary phase with the best performance in the separation of neutral, basic and acidic solutes was that where the PMOS was immobilized by thermal treatment in a nitrogen atmosphere at 120 °C for 8 h. This stationary phase also showed greater stability in basic mobile phase than the stationary phase prepared with silica not modified with titanium and immobilized using the same conditions.

Índice Geral

Índice de Figuras	xviii
Índice de Tabelas	xxiv
1. Introdução	1
1.1. Fases estacionárias reversas convencionais	1
1.2. Fases estacionárias reversas alternativas	5
1.3. Métodos de preparação de óxidos binários	14
1.4. Parâmetros cromatográficos	17
1.5. Estabilidade das fases estacionárias	19
1.6. Espectroscopia de absorção de raios-X	21
1.7. Planejamento experimental	25
2. Objetivos	29
3. Parte experimental	30
3.1. Materiais	30
3.1.1. Reagentes e solventes	30
3.1.2. Suportes cromatográficos e fase líquida	31
3.2. Equipamentos	31
3.3. Otimização das condições de preparação do suporte de sílica titanizada	33
3.3.1. Sílica Rainin	34
3.3.2. Sílica Kromasil	35
3.3.3. Sílica Astrosil	35
3.4. Caracterização físico-química dos suportes cromatográficos	36
3.4.1. Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (FAAS)	37
3.4.2. Fluorescência de Raios-X (FRX)	37
3.4.3. Análise Elementar de Carbono	39
3.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA)	39
3.4.5. Determinação do volume (V_p) e tamanho médio dos poros	39
3.4.6. Espectroscopia de Absorção de Raios-X (XAS)	40
3.4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
3.4.8. Difração de Raios-X (DRX)	40

3.5. Preparação das fases estacionárias	41
3.5.1. Sorção da fase líquida	41
3.5.2. Imobilização das fases estacionárias por tratamento térmico	41
3.5.2.1. Em atmosfera ambiente	41
3.5.2.2. Em atmosfera de nitrogênio	42
3.5.3. Imobilização das fases estacionárias por microondas	42
3.5.4. Imobilização por radiação gama	43
3.5.5. Extração do excesso de PMOS	43
3.6. Caracterização cromatográfica das fases estacionárias	44
3.6.1. Polimento das colunas cromatográficas	44
3.6.2. Enchimento das colunas com as fases estacionárias	45
3.6.2.1. Preparação da suspensão	45
3.6.2.2. Recheio das colunas	45
3.6.3. Condicionamento pós enchimento das colunas	47
3.6.4. Fase móvel	47
3.6.5. Condições cromatográficas	47
3.7. Caracterização físico-química das fases estacionárias após avaliação cromatográfica	48
3.7.1. Análise Elementar	49
3.7.2. Espectroscopia no Infravermelho	49
3.7.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear	50
3.8. Avaliação da estabilidade de fases estacionárias	50
3.9. Análise de misturas complexas	51
4. Resultados e discussão	53
4.1. Otimização das condições de preparação do suporte de sílica titanizada	53
4.1.1. Sílica Rainin	53
4.1.2. Sílica Kromasil	54
4.1.3. Sílica Astrosil	55
4.2. Caracterização físico-química de suportes cromatográficos de sílicas Astrosil nua e titanizadas	57

4.2.1. Caracterização das sílicas por espectrometria de Absorção Atômica por Chama	57
4.2.2. Análise Termogravimétrica (TGA)	58
4.2.3. Análise Elementar e Fluorescência de Raios-X	60
4.2.4. Determinação do volume e diâmetro médio dos poros	61
4.2.5. Espectroscopia de Absorção de Raios-X (XAS)	62
4.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	64
4.2.7. Difração de raios-X	65
4.4. Caracterização das fases estacionárias imobilizadas por tratamento térmico	66
4.4.1. Em atmosfera ambiente	66
4.4.2. Em atmosfera de nitrogênio	72
4.4.2.1. Variando o tempo de imobilização	73
4.4.2.2. Variando a temperatura de imobilização	75
4.4.3. Fases estacionárias preparadas com a sílica Kromasil e PMOS, imobilizadas térmicamente	80
4.5. Caracterização das fases estacionárias imobilizadas por microondas	85
4.5.1. Variando a dose de irradiação	85
4.5.2. Variando o tempo de imobilização	88
4.6. Caracterização das fases estacionárias imobilizadas por radiação gama	93
4.7. Medidas de Ressonância Magnética Nuclear	97
4.8. Avaliação da estabilidade de fases estacionárias imobilizadas	100
4.8.1. Teste em fase móvel básica	100
4.8.2. Teste em fase móvel neutra	103
4.9. Análise de misturas complexas	104
5. Conclusões	108
6. Bibliografia	112

Índice de Figuras

Figura 1. Tipos de espécies químicas presentes na sílica.	2
Figura 2. Reação dos grupos silanóis com reagentes de silanização.	3
Figura 3. Silanóis e compostos básicos nas formas livres e ionizadas com as variações do pH.	5
Figura 4. Esquema da excitação de um elétron pela absorção de um fóton de raios-X.	18
Figura 5. Espectro de absorção de raios-X (XAS) do titânio na forma anatásia.	19
Figura 6. Estrutura de coordenação tetragonal da rutila.	20
Figura 7. Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.	21
Figura 8. Cromatogramas com as medidas relacionadas à determinação da assimetria de picos.	23
Figura 9. Possíveis reações do tetrabutóxido de titânio com a sílica durante a titanização (a) e hidrólise (b).	34
Figura 10. Coluna cromatográfica e suas conexões, a) filtro e anel de alinhamento, b) redutor e c) terminal.	45
Figura 11. Esquema do sistema de enchimento de colunas.	46
Figura 12. Estruturas dos herbicidas e fármacos utilizados nas misturas	
Figura 13. Gráfico normal das estimativas.	57
Figura 14. Curvas termogravimétricas dos suportes de sílica nua (2) e titanizadas em superfície seca (1) e úmida (3).	59

- Figura 15.** Espectros XANES de suportes de sílicas titanizadas e de titânia pura nas formas rutila e anatásia. Sílica_{Cr}-TiO₂ e Sílica_{BU}-TiO₂ foram preparadas com tetracloreto e tetrabutóxido de titânio em condições mais drásticas¹¹ utilizando uma sílica Davisil. Sílica_{seca}-TiO₂ e Sílica_{úmida}-TiO₂ foram as preparadas neste trabalho com sílica Astrosil. 63
- Figura 16.** Transformada de Fourier do espectro EXAFS do suporte de sílica titanizada em superfície úmida. 64
- Figura 17.** Imagens no MEV dos suporte de: a) sílica nua e b) sílica titanizada em superfície úmida, com aumento de 1K. 65
- Figura 18.** Espectros de difração de raios-X da anatásia e das amostras de sílica titanizadas em superfícies seca ou úmida. 66
- Figura 19.** Cromatogramas das fases preparadas com sílica não hidroxilada e imobilizadas em atmosfera ambiente a 120 °C. *Mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 68
- Figura 20.** Cromatograma da fase preparada com sílica hidroxilada e imobilizada em atmosfera ambiente a 120 °C por 24 h. *Mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 68
- Figura 21.** Cromatogramas das fases preparadas com sílica não hidroxilada e imobilizadas em atmosfera ambiente a 120 °C. *Mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 70

- Figura 22.** Cromatograma da fase preparada com sílica hidroxilada e imobilizada em atmosfera ambiente a 120 °C por 24 h. *Mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 70
- Figura 23.** Cromatogramas da fase preparada com sílica hidroxilada não titanizada, imobilizada em atmosfera ambiente a 120 °C por 24 h. Avaliação com a) *mistura 1* e b) *mistura 2*. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 72
- Figura 24.** Cromatogramas das fases imobilizadas a 120 °C em atmosfera de nitrogênio, mudando o tempo de imobilização. *Mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 74
- Figura 25.** Cromatogramas das fases imobilizadas a 120 °C por 4 e 8 horas em atmosfera de nitrogênio. *Mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 75
- Figura 26.** Cromatogramas das fases imobilizadas a diferentes temperaturas por um período de 8 h, em atmosfera de nitrogênio. *Mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 76
- Figura 27.** Curvas termogravimétricas das fases imobilizadas a diferentes temperaturas por um período de 8 h, em atmosfera de nitrogênio. 77
- Figura 28.** Espectros no infravermelho do suporte e das fases imobilizadas nas diferentes temperaturas por um período de 8 h em atmosfera de nitrogênio. 79

- Figura 29.** Cromatogramas das fases preparadas com a sílica Kromasil, imobilizadas em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h, avaliadas com a *mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 81
- Figura 30.** Cromatogramas das fases preparadas com a sílica Kromasil não titanizada, imobilizadas em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h, avaliada com a *mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 81
- Figura 31.** Cromatogramas das fases preparadas com sílica Kromasil hidroxilada e titanizada (H-T), imobilizadas a 120 °C em atmosfera de a) ar ou de b) nitrogênio, avaliadas com a *mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 84
- Figura 32.** Cromatogramas das fases preparadas com sílica Kromasil hidroxilada e titanizada (H-T), imobilizadas a 120 °C em atmosfera de a) ar ou de b) nitrogênio, avaliadas com a *mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 84
- Figura 33.** Cromatogramas das fases submetidas ao tratamento por microondas por um período de 15 minutos, variando a dose de irradiação, com porcentagens de carga de PMOS de 40 %. *Mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 86

- Figura 34.** Cromatogramas das fases submetidas ao tratamento por microondas por um período de 15 minutos, variando a dose de irradiação, com porcentagens de carga de PMOS de 50%. *Mistura 1:* 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 87
- Figura 35.** Cromatogramas das fases imobilizadas por microondas usando uma potência de 520 watts por períodos diferentes. *Mistura 1:* 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 89
- Figura 36.** Cromatogramas das fases imobilizadas por microondas durante 5 e 15 minutos com 520 watts de potência. *Mistura 2:* 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 90
- Figura 37.** Curvas termogravimétricas das fases imobilizadas por microondas variando o tempo de imobilização com potência de 520 watts. 91
- Figura 38.** Espectros obtidos no infravermelho das fases imobilizadas por microondas, variando o tempo de imobilização com potência de 520 watts. 92
- Figura 39.** Cromatogramas das fases imobilizadas por radiação gama, avaliadas com a *mistura 1*. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 95
- Figura 40.** Cromatogramas das fases imobilizadas por radiação gama, avaliadas com a *mistura 2*. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL. 95
- Figura 41.** Curvas termogravimétricas das fases imobilizadas por radiação gama. 96

- Figura 42.** Espectros obtidos no infravermelho das fases imobilizadas por microondas, variando o tempo de imobilização com potência de 520 watts. 97
- Figura 43.** Espectros de RMN de ^{29}Si com a técnica de CP/MAS das fases estacionárias a) irradiada a 80 kGy, b) imobilizada a 120 °C por 8 h e c) irradiada a 520 w por 15 min. 99
- Figura 44.** Estructuras das diferentes espécies presentes nos espectros de RMN ^{29}Si . 100
- Figura 45.** Teste de estabilidade em fase móvel básica de metanol:0,1 mol L⁻¹ de NaHCO₃ /NaOH, pH 10 (50:50 v/v), a 60 °C e vazão de 0,6 mL min⁻¹. 102
- Figura 46.** Teste de estabilidade em fase móvel neutra de metanol:água (70:30 v/v), a temperatura ambiente e vazão de 1,0 ml min⁻¹. As avaliações cromatográficas foram realizadas para o naftaleno a uma vazão de 0,3 mL min⁻¹. 104
- Figura 47.** Separação de herbicidas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (50:50 v/v), a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 5 µl e a detecção: UV em 230 nm. Coluna de 150 x 3,9 mm. 106
- Figura 48.** Separação de fármacos. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol:0,02 mol L⁻¹ K₂HPO₄/KOH, pH 10 (30:70 v/v), vazão de 0,6 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 5 µL e a detecção: UV em 254 nm. Coluna de 150 x 3,9 mm. 107
- Figura 49.** Separação de drogas básicas. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol:0,02 mol L⁻¹ K₂HPO₄/KOH, pH 10 (80:20 v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 30 °C. O volume de injeção foi de 5 µL e a detecção: UV em 254 nm. Coluna de 150 x 3,9 mm. 107

Índice de Tabelas

Tabela 1. Coeficientes de contraste para um fatorial 2^3 .	26
Tabela 2. Características das sílicas.	31
Tabela 3. Parâmetros estudados (fatores) e seus níveis no experimento.	36
Tabela 4. Porcentagens de titânio nas amostras preparadas com sílica Rainin titanizadas a diferentes temperaturas.	53
Tabela 5. Porcentagens de titânio nas amostras preparadas com sílica Kromasil.	54
Tabela 6. Resultados do planejamento fatorial 2^3 .	55
Tabela 7. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 da Tabela 6 e seus erros padrão (em %).	56
Tabela 8. Concentração de metais (ppm) nas sílicas puras obtidas por FAAS.	58
Tabela 9. Perdas de massa obtidas das curvas de TGA dos suportes de sílica Astrosil nua e titanizada em superfícies seca ou úmida.	59
Tabela 10. Porcentagem de carbono e de titânio obtidas nos suportes de sílicas Astrosil nua e titanizadas.	60
Tabela 11. Volume e diâmetro de poro dos suportes de sílica Astrosil nua e titanizadas em superfície úmida ou seca.	61
Tabela 12. Número de coordenação e distância da ligação Ti-O obtidas por EXAFS para os suportes de sílicas titanizadas.	64
Tabela 13. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil titanizada com ou sem prévia hidroxilação, immobilizadas na estufa. Avaliação com a <i>mistura 1</i> .	67
Tabela 14. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil titanizada com ou sem prévia hidroxilação, immobilizadas na estufa. Avaliação com a <i>mistura 2</i> .	69

- Tabela 15.** Parâmetros cromatográficos da fase preparada com sílica hidroxilada não titanizada e PMOS, imobilizada em atmosfera ambiente, avaliada com a *mistura 1*. 71
- Tabela 16.** Parâmetros cromatográficos da fase preparada com sílica hidroxilada não titanizada, imobilizada em atmosfera ambiente, avaliada com a *mistura 2*. 71
- Tabela 17.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada, imobilizadas a 120 °C em diferentes tempos, em atmosfera de nitrogênio. Avaliação com a *mistura 1*. 73
- Tabela 18.** Parâmetros cromatográficos das fases imobilizadas a 120 °C por 4 e 8 h em atmosfera de nitrogênio, avaliadas com a *mistura 2*. 75
- Tabela 19.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada, imobilizadas a diferentes temperaturas durante 8 h, em atmosfera de nitrogênio. Avaliação com a *mistura 1*. 76
- Tabela 20.** Perdas de massa obtidas das curvas de TGA para as fases imobilizadas a diferentes temperaturas durante 8 h, em atmosfera de nitrogênio. 78
- Tabela 21.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Kromasil imobilizadas em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h, avaliadas com a *mistura 1*. 80
- Tabela 22.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Kromasil não titanizada, imobilizadas em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h, avaliadas com a *mistura 2*. 80
- Tabela 23.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Kromasil hidroxilada e titanizada (H-T), imobilizadas a 120 °C em atmosfera de ar ou nitrogênio, avaliadas com a *mistura 1*. 83

- Tabela 24.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Kromasil hidroxilada e titanizada (H-T), imobilizadas a 120 °C em atmosfera de ar ou nitrogênio, avaliadas com a *mistura 2*. 83
- Tabela 25.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada, imobilizadas por microondas, por um período de 15 minutos, variando a dose de irradiação. Avaliação com a *mistura 1*. 86
- Tabela 26.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada, imobilizadas por microondas, usando potência de 520 watts por períodos diferentes. Avaliação com a *mistura 1*. 88
- Tabela 27.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada, imobilizadas por microondas usando potência de 520 watts por 5 e 15 minutos. Avaliação com a *mistura 2*. 90
- Tabela 28.** Perdas de massa obtidas das curvas de TGA para as fases imobilizadas por microondas, variando o tempo de imobilização com potência de 520 watts. 92
- Tabela 29.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada, imobilizadas por radiação gama. Avaliação com a *mistura 1*. 93
- Tabela 30.** Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada, imobilizadas por radiação gama. Avaliação com a *mistura 2*. 94
- Tabela 31.** Perdas de massa obtidas das curvas de TGA para as fases imobilizadas por radiação gama. 96

1. INTRODUÇÃO

Entre as técnicas de separação existentes na atualidade, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ocupa um lugar de destaque, pela sua capacidade de analisar misturas complexas de compostos orgânicos e inorgânicos, compostos iônicos e ionizáveis, e substâncias de baixa a alta massa molar, com boa detectabilidade, sem apresentarem problemas de decomposição térmica ou química, além da possibilidade de automatização.

Em cromatografia a separação dos componentes da amostra ocorre pelas diferenças dos coeficientes de distribuição dos compostos entre a fase estacionária (FE) e a fase móvel (FM). As fases estacionárias mais comumente usadas em CLAE são as fases reversas (FR), as quais apresentam menor polaridade que a fase móvel. Estas fases são compostas de uma fase líquida com características apolares e um suporte cromatográfico, com caráter polar, onde a fase líquida pode encontrar-se formando ligações covalentes com os grupos hidroxilas do suporte (quimicamente ligada)¹⁻³ ou formando uma camada orgânica polimérica que pode estar sorvida⁴⁻⁷ ou imobilizada⁸⁻¹⁶ nos poros e na superfície do suporte.

1.1. Fases estacionárias reversas convencionais

As fases quimicamente ligadas foram introduzidas por Kirkland e colab.¹⁷ na década de 70, permitindo o crescimento explosivo da CLAE. Estas fases geralmente consistem de hidrocarbonetos de cadeias longas, que se tornaram populares por apresentarem uma série de vantagens comparadas às fases utilizadas em Cromatografia Líquida-Líquida Clássica¹⁸. Entre as vantagens pode-se citar a maior estabilidade frente a fases móveis mais agressivas, não sendo necessária a pré-saturação da fase móvel; tempos de retenção mais repetíveis; rápido equilíbrio da coluna, que permite o uso da eluição por gradiente; e amplo campo de aplicação.

A maioria das fases estacionárias são baseadas em suportes de sílica porosa. Isto se deve às características que a sílica apresenta em termos de eficiência, rigidez

e desempenho, além de possibilitar modificações químicas na sua superfície devido à presença de sítios ativos, $\equiv\text{SiOH}$ (silanóis). Estas modificações permitem a preparação de fases estacionárias com diferentes seletividades. Além disso, a sílica apresenta boa reprodutibilidade e é disponível comercialmente numa grande faixa de tamanho de partículas (1-10 μm) e tamanho de poros (60-1000 \AA), com custos moderados ¹⁹. A sua resistência mecânica permite a utilização de fase móvel a altas pressões, produzindo condições de transferência de massa rápidas durante as separações cromatográficas para partículas menores.

As espécies químicas que compõem a sílica são mostradas na Figura 1. Estas consistem de grupos hidroxilas (silanóis livres ou isolados, vicinais ou associados, e geminais), presentes na sua superfície e ligações tipo siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$), formando a matriz da sílica.

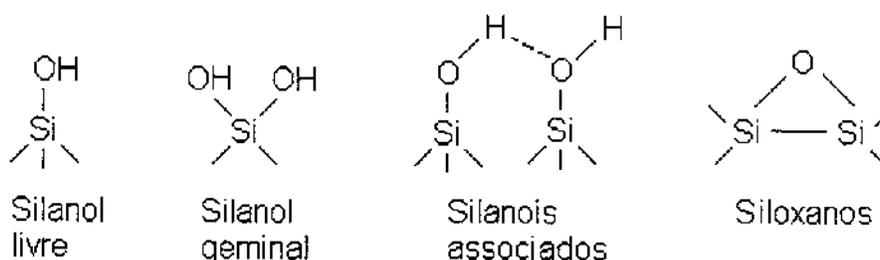


Figura 1. Tipos de espécies químicas presentes na sílica.

A concentração e os tipos de grupos silanóis pode variar de uma sílica para outra, dependendo das condições de preparo. Segundo a literatura ²⁵, a concentração máxima de silanóis na superfície da sílica é de 8 $\mu\text{mol m}^{-2}$, mas algumas mudanças podem ocorrer se a sílica for submetida a diferentes processos, tais como:

- desidratação (ou ativação): a exposição dos silanóis é aumentada pela eliminação da água fisicamente sorvida, usando temperaturas de 25 $^{\circ}\text{C}$ sob vácuo ou de 125 $^{\circ}\text{C}$ em pressão normal ²⁰.
- desidroxilação: ocorre um aumento dos grupos silanóis isolados com o uso de temperaturas de 200 a 400 $^{\circ}\text{C}$. Para temperaturas maiores de 400 $^{\circ}\text{C}$ começa a formação dos grupos siloxanos ²¹.

- reidroxilação: os grupos siloxanos formados durante o processo de desidroxilação podem ser novamente hidroxilados por tratamentos com bases ²¹ ou ácidos ²² diluídos, sempre que não tenham sido usadas temperaturas maiores de 600 °C. O aumento do número de silanóis associados ou ligados por ponte de hidrogênio é favorecido com este processo.

As fases quimicamente ligadas são produzidas através da reação dos grupos silanóis da superfície da sílica com reagentes contendo grupos ativos de cloro ou alcóxido e grupos R, na sua maioria com 8 ou 18 átomos de carbono, formando, desta forma, ligações do tipo siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$), de acordo com a Figura 2.

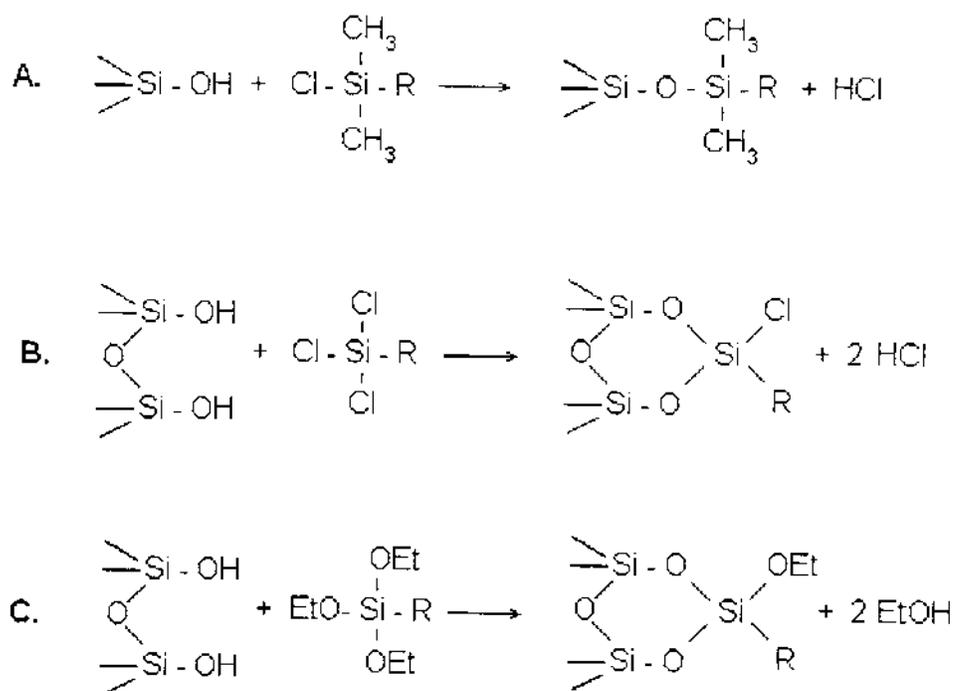


Figura 2. Reação dos grupos silanóis com reagentes de silanização.

O uso de modificadores orgânicos mono-, di- ou trifuncionais na ausência de água, leva à formação de estruturas definidas e monoméricas. De outra forma, o uso de modificadores di- ou trifuncionais na presença de água leva à formação de estruturas poliméricas entrecruzadas. Mesmo com o uso de reagentes monofuncionais (Figura 2a), os quais deveriam reagir com o máximo de grupos silanóis presentes na superfície da sílica, consegue-se geralmente uma reação de no

máximo 50 % destes grupos hidroxilas, devido à impedimentos estéricos. Assim, os grupos que ficaram sem reagir com a fase orgânica, denominados como silanóis residuais, ficam acessíveis para interagir com os analitos durante a separação cromatográfica²³⁻²⁵.

Fases móveis com valores de pH relativamente baixos ($\text{pH} \leq 3$) são muito empregadas para separar compostos básicos devido à:

- maior solubilidade dos solutos,
- ionização completa, sendo menos retidos pela fase estacionária, devido ao maior carácter hidrofílico,
- presença dos silanóis residuais na forma não ionizada (Figura 3a),
- fácil remoção dos reagentes em subseqüentes análises.

Nestas condições, as separações são estáveis e reprodutíveis, fornecendo altas eficiências^{19, 26}. Porém, às vezes, instabilidades do soluto, retenção fraca ou problemas de seletividade impedem o uso deste pH. Além disso, as fases quimicamente ligadas sofrem hidrólise da ligação siloxano quando são usadas com fases móveis ácidas. Nestes casos, são indicadas condições de separação a pH intermediário (pH 4-8) ou mais alto ($\text{pH} \geq 9$). Embora ocorra uma adequada seletividade para compostos ionizáveis em pH intermediário, problemas com o alargamento dos picos e com a reprodutibilidade na retenção podem existir, devido as fortes interações entre os solutos básicos e os silanóis residuais parcialmente ionizados (Figura 3b).

Quando impurezas de metais permanecem na sílica durante a sua síntese (exemplo, ferro e alumínio) são formados fortes sítios ácidos de Brönsted, os quais aumentam a acidez da superfície da sílica, e conseqüentemente, as interações com os solutos básicos. Por este motivo, existe um grande interesse no uso de sílicas altamente puras, com a menor concentração possível de metais.

A operação a pH altos ($\text{pH} \geq 10$) é potencialmente atrativa, porque os compostos básicos podem ser separados como bases neutra (Figura 3c), o que minimiza as interações indesejáveis com os grupos silanóis residuais. Porém, a sílica

começa a solubilizar quando se trabalha em valores de pH maiores que 8, causando perda do suporte cromatográfico e, em casos extremos, colapso do leito da coluna ²⁷.

Solução ácida	$\text{SiOH} + \text{BH}^+$
Solução intermediário	$\text{SiO}^- \text{BH}^-$
Solução básica	$\text{SiO}^- + \text{B}$

Figura 3. Espécies encontradas nas formas neutra e ionizada com as variações do pH.

Uma vez que ocorre a ruptura da ligação siloxano em fases móveis ácidas, ou a dissolução da sílica em fases móveis básicas, o uso das fases quimicamente ligadas fica limitada a uma faixa de pH no intervalo de 2 a 8.

1.2. Fases estacionárias reversas alternativas

Uma coluna com alta eficiência, boa estabilidade e possibilidade de regeneração é o desejo de todo cromatografista. Assim, várias alternativas surgiram para minimizar os problemas das fases estacionárias reversas convencionais, a partir de modificações realizadas na fase líquida e/ou no suporte, assim como no procedimento de adição da fase orgânica na superfície do suporte:

1) a polimerização de uma mistura de cadeias alquilas, curtas (CH_3SiCl_3) e compridas ($\text{CH}_3\text{-Si}(\text{CH}_2)_{17}\text{Cl}_3$) de triclrossilanos nos poros da sílica sob condições anidras. Neste caso, uma monocamada de água adsorvida na superfície do suporte possibilita a polimerização de forma horizontal e restrita à superfície. Com este procedimento consegue-se reduzir a atividade dos silanóis residuais e melhorar a estabilidade hidrolítica das FE. Estas fases apresentam melhor reprodutibilidade sobre as outras fases poliméricas convencionais ²⁸⁻³⁰.

2) a realização de uma segunda reação de silanização com grupos de baixa massa molar como: triclrometilsilanos, trimetilclorossilanos. Este processo, conhecido como capeamento ³¹, reduz o número de silanóis residuais, porém, não evita a hidrólise da ligação siloxano em meios ácidos.

3) o uso de fases monoméricas estéricamente protegidas utilizando agentes silanizantes contendo grupos laterais R' de isopropil ou terbutil, os quais são volumosos e utilizados para proteger as ligações siloxanos da hidrólise em meio ácido ³²⁻³⁴.

4) o emprego de grupos polares (amida, éster, carbamato, uréia) embutidos na cadeia da fase ligada com o intuito de reduzir a atividade dos grupos silanóis ^{25,35-37}.

5) a preparação de FE bidentadas a partir de silanos bifuncionais, os quais melhoram a eficiência e a estabilidade da coluna ³².

6) a indução de ligações químicas entre as cadeias do polímero, utilizado como fase orgânica, através da reação com peróxidos, o uso de temperatura, de radiação gama, etc. ^{7,10,11,16,38-41}.

Estas fases estacionárias denominadas de imobilizadas apresentam um maior recobrimento dos sítios ativos do suporte quando comparados com as fases convencionais, quimicamente ligadas. Os polissiloxanos ^{4,5,7-16,39,42-48} (ex. poli(metiloctilsiloxano) e poli(metiloctadecilsiloxano)), os poliestirenos ⁴⁹⁻⁵¹, os polibutadienos ⁵²⁻⁵⁵ e os poliácridatos ^{56,57} são exemplos de fases líquidas poliméricas utilizadas na preparação destas fases.

Diversos fatores relacionados com as características da sílica (geometria, estrutura, forma dos poros) e com a fase orgânica (tamanho da cadeia, estrutura, entrecruzamento das macromoléculas) podem influenciar no processo de imobilização. Os polímeros imobilizados podem formar um filme fino sobre a superfície do suporte, encher totalmente o volume de poro ou existir uma combinação das duas formas ³⁸. Um modelo de distribuição do polímero nos poros da sílica, onde se acredita que o polímero se deposita como "plug" ou gotas estendidas, foi proposto por Collins *et al.* ⁶. Esta distribuição é explicada como resultado do fenômeno de "instabilidade de Raleigh", no qual é energeticamente desfavorável para um líquido atingir uma configuração de camada fina depositada numa grande área superficial, na superfície dos poros da sílica.

Bottoli e colaboradores ⁴⁷ observaram que, em temperatura ambiente, o poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) sorvido nos poros da sílica aumenta sua retenção a medida que aumenta o tempo de repouso entre a preparação da fase estacionária e o enchimento da coluna. Este processo, onde não é utilizado um agente indutor externo, foi chamado de auto-imobilização. As fases mostraram melhores parâmetros cromatográficos para maiores tempos de repouso, uma vez que a camada polimérica formada conseguiu bloquear efetivamente os grupos silanóis da superfície da sílica. Imobilizações feitas durante 2 e 4 h, no mesmo tipo de fase estacionária, utilizando diferentes temperaturas, mostraram que, até 120 °C, é promovida a formação de uma monocamada sobre o suporte, produzindo fases com melhores eficiências ⁴⁶. Entretanto, para temperaturas maiores de 150 °C foram formadas bicamadas, resultando em um decréscimo no desempenho cromatográfico. Fases de sílica com PMOS e poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) imobilizadas termicamente mostraram bons resultados cromatográficos para temperaturas de 80 a 100 °C, sendo que a fase com PMOS também mostrou desempenho cromatográfico adequado a 120 °C ⁴⁸. Ambas as fases mostraram-se estáveis em condições de análise agressivas.

Fases estacionárias formadas por polissiloxanos e sílica foram submetidas a radiação gama ou tratamentos com peróxidos posterior ao tratamento térmico ^{7-10,15}. As fases mostraram boa estabilidade e eficiência sob a maioria das condições de análises usadas. Também, temperaturas altas de 200 a 400 °C foram utilizadas para imobilizar poli(metiloctilsiloxano) na presença de peróxidos, sendo obtidos os melhores resultados a 400 °C, permitindo o seu uso com fases móveis básicas ³⁹. Trabalhos realizados com o uso de radiação gama para a imobilização de polissiloxanos sobre suportes de sílica nua ^{16,58} indicaram que o método permitiu fases cromatograficamente efetivas.

Outro procedimento no qual é utilizada a imobilização é o chamado encapsulamento, que tem sido empregado, na sua maioria, com grupos vinil ^{57,59}. Estes grupos primeiramente são ligados a sílica com posterior imobilização dos monômeros através de um iniciador de radicais livres ou radiação gama. A estabilidade é melhorada com estas fases em pH mais altos e os solutos básicos eluem com picos simétricos. Um procedimento utilizando radiação por microondas foi

desenvolvido mais recente, onde foram obtidas fases imobilizadas com um desempenho cromatográfico adequado ⁶⁰⁻⁶².

7) o uso de suportes diferentes de sílica:

a) partículas híbridas têm sido preparadas a partir de uma mistura de dois organossilanos, um que forma unidades de sílica e o outro de metilsiloxanos ^{63,64}. Como resultado estas partículas contêm unidades de metilsiloxanos tanto na sua estrutura interna como externa e quando reagem com a fase líquida produzem fases ligadas com maior cobertura da superfície e grupos silanóis residuais reduzidos. Este suporte apresenta uma melhora significativa na forma dos picos e estabilidade a pH de 1 a 12.

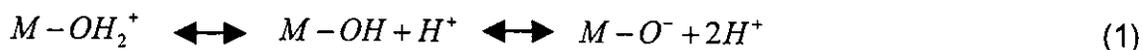
b) polímeros porosos têm sido particularmente úteis como materiais de alto desempenho por sua grande estabilidade térmica, resistência específica e baixa densidade. Na maioria dos casos, as partículas mais utilizadas são de poliestireno (PS) entrecruzado com divinilbenzeno (DVB), por sua aplicação na faixa de pH de 1 a 13 e ausência de cauda nos picos. Porém, estes materiais estão restritos a pressões limitadas. A maioria dos polímeros não possuem a alta estabilidade mecânica da sílica e alguns deles são susceptíveis a inchaços e encolhimento quando é alterado o modificador orgânico da fase móvel ⁶⁵.

c) carbono poroso grafitizado tem sido usado como suporte cromatográfico por sua resistência aos solventes orgânicos. Ele é principalmente usado para separar compostos polares, não polares, catiônicos, não iônicos e isoméricos ^{66,67}, por exemplo, derivados de anilina e várias outras drogas. As características de retenção do suporte de carbono tornam-no excelente candidato à separação de compostos que não são muito bem resolvidos em fase reversa do tipo ligada, além de serem úteis na pré-concentração de solutos a partir de soluções diluídas antes da separação por cromatografia gasosa ou líquida.

Quando comparado com as fases estacionárias convencionais de sílica com octadecildimetilsiloxano (ODS), este suporte permite trabalhar em ampla faixa de pH e temperatura, com melhora da resolução cromatográfica de muitos compostos básicos (exemplo: morfina, e metabólicos) sem apresentar picos com cauda, na faixa de pH entre 8,5 e 11,6^{68, 69}. Porém, fases estacionárias baseadas em carbono possuem menor capacidade de carga de amostra e não são tão eficientes quanto as fases ligadas convencionais⁷⁰. O principal problema destas fases continua sendo a otimização da composição da fase móvel, uma vez que a utilização da escala eluotrópica de solventes não é apropriada para este suporte. Além disso, a sua natureza retentiva elevada requer o uso de fases móveis altamente purificadas.

d) outros óxidos de metais, entre eles, alumina (Al_2O_3), titânia (TiO_2) e zircônia (ZrO_2).

Os óxidos cerâmicos de alumina, zircônia e titânia são os materiais mais promissores como recheios cromatográficos⁷¹⁻⁷⁹, devido às altas estabilidades hidrolíticas em uma faixa mais ampla de pH, em relação a sílica nua, e a suas altas resistências mecânicas. Dependendo do pH do meio, estes óxidos podem apresentar propriedades trocadoras aniônicas em pH ácido ou catiônicas em pH básico, como mostrado na reação 1.



A maior estabilidade do suporte de alumina na faixa de pH de 2-12 permite trabalhar em valores de pH nos quais os compostos básicos não estão ionizados. Estas fases mostram excelente estabilidade mesmo após a passagem de grandes volumes de soluções ácidas e básicas. Cinco grupos hidrofóbicos já foram ligados a alumina: cadeias de octil, octadecil, perfluoralquil, polibutadieno e ciano poliméricas^{42, 80-82}. Os últimos mostraram seletividades similares às observadas em sílicas ciano ligadas, porém foram mais estáveis na faixa de pH 2 a 13. Os recheios de alumina ligados com octadecil mostraram melhor eficiência cromatográfica e estabilidade no

mesmo pH que os suportes poliméricos ⁸³. Deve-se levar em conta que, com os suportes de alumina, não podem ser empregados tampões de fosfato, os quais degradam a sua superfície. Este problema pode ser evitado utilizando-se tampões contendo 4-morfolinopropanosulfonato (MOPS). A alumina tem sido usada como trocador aniônico e catiônico para a separação de ânions inorgânicos, ácidos carboxílicos, aminas, alcalóides e proteínas ⁸⁴.

Resultados similares foram obtidos com a zircônia recoberta com polibutadieno (PBD), sendo avaliada como recheio cromatográfico na separação de vários solutos polares e não polares tais como, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nucleotídeos e proteínas ⁸⁵⁻⁸⁷. Esta fase estacionária apresentou estabilidades térmica e química excelentes, resistindo a condições de pH extremos, no intervalo de pH de 0 a 14 e temperaturas de 100 °C, sem qualquer perda detectável do suporte de zircônia ou da fase polimérica. A fase de zircônia/PBD apresentou características de retenção similares às fases ligadas alquil-sílica ao analisar de pequenos solutos em tampão de fosfato a pH 3. Em fase móvel a pH 5, os solutos ácidos foram fortemente retidos devido a interação com sítios trocadores aniônicos (sítios básicos) da superfície. Estas interações podem ser controladas pela adição de fosfato a fase móvel ⁷².

Diferenças na seletividade cromatográfica na separação de analitos polares e não polares foram observadas quando comparadas às fases estacionárias de zircônia/PS com zircônia/PBD, utilizando uma fase móvel de acetonitrila:água (50:50 v/v) ⁵⁰. Hidrocarbonos aromáticos (naftaleno e antraceno) foram mais retidos que os alquilbenzenos (etil-, butil-, hexil- e octilbenzeno) na fase estacionária de zircônia/PS comparada com a fase de zircônia/PBD, na qual ocorre o contrário. O comportamento da fase preparada com poliestireno deve-se a fortes interações π - π ocorridas entre os grupos fenil dos hidrocarbonos aromáticos e os do PS. No caso da fase de polibutadieno, os alquilbenzenos apresentaram uma maior retenção, devido às fortes interações hidrofóbicas entre os grupos alquilas dos alquilbenzenos e os do PBD. Além disso, a zircônia/PS apresentou maior seletividade na separação de isômeros de compostos fenil substituídos, em relação à fase de zircônia/PBD e às fases convencionais de octadecil e fenil sílica. Analitos polares (triazinas)

apresentaram retenção e seletividade adequadas para uso com a fase de zircônia/PS, mostrando resolução comparável à fase de octadecil sílica (sílica-C₁₈), porém com tempo menor de análise, devido ao menor conteúdo de carbono presente ⁵⁰. Mecanismos de retenção similares aos da fase de sílica foram também obtidos com zircônia ligada a grupos de octadecil ⁸⁸.

Partículas de zircônia modificadas com uma fina camada de carbono na sua superfície e posterior deposição de um pré-polímero de PBD seguido de imobilização com peróxido de dicumila comportaram-se como suportes do tipo fase reversa. Esta fase apresentou uma forte retenção de solutos não polares, com estabilidade alcalina superior aos suportes de fase reversa baseados em sílica e alumina, especialmente de fase ligada. Contudo, apresentou eficiência cromatográfica moderada para solutos como alquilbenzenos, alquil fenil éteres e fenil álcoois e baixa eficiência para solutos como alquil fenonas e nitroaromáticos ⁷⁵.

A zircônia possui grande afinidade pelo fosfato e outros ânions e é convertida de trocador aniônico para catiônico pelo tratamento com solução diluída de fosfato. Esta conversão é reversível através da lavagem da zircônia com solução de hidróxido de sódio concentrado. Portanto, a exposição da zircônia à amostras contendo íons de fluoretos, fosfatos e outros ácidos de Lewis alteram suas propriedades cromatográficas, sendo necessário remover estes ânions da amostra, ou bloquear seus sítios de adsorção. Outro aspecto referente a problemas ocorridos com as colunas baseadas em zircônia é que o dióxido de carbono deve ser rigorosamente excluído, a fim de evitar a sua ligação com o dióxido de zircônio, o qual mudaria as propriedades do suporte durante o seu uso.

A titânia apresenta uma alta seletividade na separação de isômeros devido principalmente à natureza levemente ácida dos grupos Ti-OH presentes em sua superfície. Este suporte apresenta uma alta homogeneidade superficial e a sua capacidade de resistência as lavagens das colunas com NaOH 1 mol L⁻¹ é de interesse especial para CLAE preparativa. A titânia é estável em ácidos e bases, permitindo separações impossíveis em suportes convencionais.

Yu et al. ⁸⁹ avaliaram o comportamento de retenção de solutos iônicos em colunas recheadas com titânia, usando eluentes de ácidos carboxílicos (acético,

fórmico, bórico, oxálico e nítrico). A retenção de ânions (NO_3^- , Cl^-) e cátions inorgânicos (Li^+ , Na^+ , NH_4^+ e K^+) foi estudada, assim como a separação simultânea de ambos. O material mostrou características de troca iônica muito dependente do pH e do tipo de eluente.

Tani e Suzuki ⁹⁰ reportaram a influência da titânia nua (fase normal) e modificada com octadecil trietóxissilano (fase reversa) na retenção de alguns solutos. Em fase normal a titânia mostrou propriedades básicas com forte retenção do fenol (analito ácido) e picos sem caudas na eluição da piridina (analito básico) utilizando fase móvel metanol:hexano (1:99 v/v). Uma diminuição na retenção do fenol foi obtida quando utilizou a fase de titânia modificada. Compostos iônicos (aniônicos e catiônicos), ácido benzóico e benzilamina (básico) foram analisados utilizando como fase móvel 80 % de metanol e solução tampão de ácido acético/ acetato de sódio, na faixa de pH de 3 a 8. Nestas condições, tanto a titânia pura quanto a modificada apresentaram uma diminuição no tempo de retenção do composto aniônico e do ácido com o aumento do pH, mostrando propriedades de troca aniônica. Na fase de titânia modificada, a benzilamina apresentou uma maior retenção que na fase de titânia pura, com o aumento do pH, o que pode ser devido a interações hidrofóbicas com os grupos octadecil.

O comportamento cromatográfico de uma fase de titânia ligada com octadecil também foi estudado na separação de solutos básicos e hidrocarbonetos poliaromáticos ⁹¹. Esta fase estacionária apresentou poucos grupos hidroxilas residuais (Ti-OH), como observado pelos valores de assimetria obtidos para os compostos básicos de anilinas e fenilaminas, usando a fase móvel não tamponada de acetonitrila:água (25:75 v/v).

Winkler e Marmé ⁹² compararam cromatograficamente a titânia, a sílica, a alumina e a zircônia na separação de compostos básicos em fase móvel de n-heptano:2-propanol (99,5:0,5 v/v). Derivados de anilina foram bem separados com picos simétricos, quando foi utilizada a titânia. Entretanto, a separação destes O uso de eluição por gradiente permitiu separar uma parte dos compostos da mistura quando foi utilizada a alumina, enquanto na sílica e na zircônia não foi possível a separação devido a forte adsorção dos compostos. A titânia também mostrou-se

seletiva na separação de diferentes isômeros de reagentes básicos (cloroanilina, flumetrina, endosulfan), apresentando picos simétricos.

Pursch et al.⁹³ avaliaram a separação de isômeros de carotenóides em materiais de zircônia, titânia e sílica modificados com triclorossilanos C₃₀. Uma menor eficiência e simetria dos picos foram obtidos com estas fases, comparadas às fases monoméricas C₁₈. Porém, as fases C₃₀ são superiores às fases C₁₈ na separação de isômeros de carotenóides (β -caroteno e zeaxantina). As melhores seletividades na separação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e carotenóides foram apresentadas pela titânia e zircônia.

e) suportes de óxidos binários.

A titânia apresenta grande interesse como catalisador, porém a sua baixa área superficial é uma desvantagem para aplicações catalíticas. Isto motivou os pesquisadores a buscarem em novos procedimentos de síntese para obtenção da titânia com área superficial maior, e este objetivo foi alcançado a partir da mistura deste com outro óxido, como por exemplo, a sílica. Esta alternativa está sendo utilizada para fins catalíticos, porém cromatograficamente ainda não é muito explorada. Outros óxidos como zircônia, magnésia e alumina também estão sendo modificados, na sua maioria com sílica.

Suportes cromatográficos foram preparados no LabCrom (Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida) do Instituto de Química, da UNICAMP, utilizando sílica modificada com átomos de Ti^{11, 12} ou Zr^{13, 14} e poli(metiloctilsiloxano), como fase líquida. O polímero foi depositado nos suportes e imobilizado nas suas superfícies por radiação gama. Estas fases estacionárias mostraram-se estáveis frente às fases móveis neutra e básica, além de adequadas para a análise de compostos básicos. Outras fases com sílica titanizada também foram preparadas, neste caso com polibutadieno, e imobilizadas por radiação microondas, mostrando bom desempenho cromatográfico na análise de misturas de variadas polaridades⁶¹.

Recentemente, foram desenvolvidas partículas com dupla camada, onde são simultaneamente utilizadas duas fases estacionárias (sílica/polietileno e

titânia/polietileno) ⁹⁴. Com esta fase estacionária foi possível separar uma mistura contendo compostos básicos e ácidos usando como fase móvel acetonitrila:0,1 mol L⁻¹ NaClO₄/HClO₄ (15:75 v/v) a pH 5.

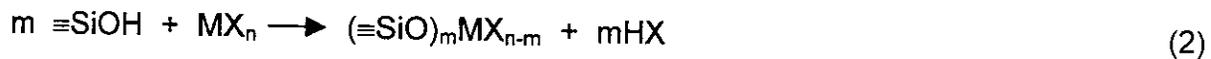
Compósitos de céria e zircônia porosa foram modificadas com ácido alquilfosfônico para uso em fase reversa ⁹⁵. As propriedades cromatográficas foram avaliadas com compostos neutros, básicos e ácidos em ampla faixa de composição de fase móvel e pH. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos foram bem separados e suas eluições estiveram em concordância com aquelas reportadas utilizando colunas de fase reversa baseadas em sílica. O mesmo foi observado com os solutos básicos a pH 10. Compostos ácidos mostraram uma forte interação com a fase estacionária em fase móvel de metanol:solução de ácido acético/NaCl, pH 2 (30:70 v/v). Esta interação foi reduzida na presença de agentes competidores tais como: acetato, sulfato e oxalato. O ácido hidroxibenzoico foi adsorvido irreversivelmente na fase estacionária ainda na presença de oxalato, possivelmente devido à formação de um quelato.

Um material mesoporoso de aluminossilicato, MCM-41 (alumina/silica), foi comparado cromatograficamente, em fase normal, com sílica, alumina, titânia e zircônia ⁹⁶. A alumina, a zircônia e a titânia mostraram tempos de retenção (t_R) curtos e picos simétricos na análise de compostos básicos (anilinas e piridinas), ocorrendo o oposto na separação de compostos ácidos (derivados de fenóis). Já a sílica apresentou picos pobremente resolvidos com longos t_R na análise de compostos básicos. O MCM-41 mostrou t_R comparáveis aos obtidos na sílica, porém, com picos simétricos (similares aos obtidos com alumina, zircônia e titânia). Para compostos ácidos a sílica e o MCM-41 mostraram boa separação com valores de fator de retenção e simetria de picos similares.

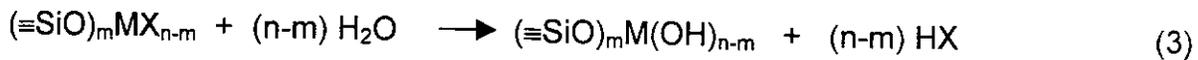
1.3. Métodos de preparação de óxidos binários

Sistemas de óxidos binários contendo titânio ou zircônio misturados com sílica são considerados particularmente interessantes para fins catalíticos. O mecanismo de

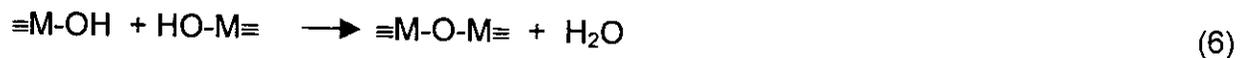
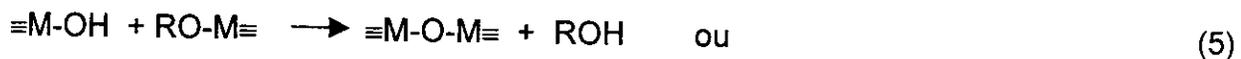
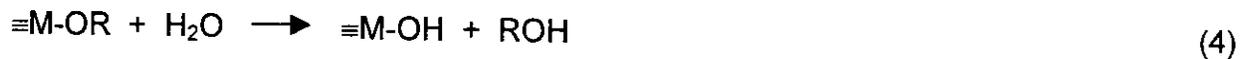
síntese baseia-se, em linhas gerais, na reação dos grupos silanóis presentes na superfície da sílica com um composto do metal ativo (MX_n) (reação 2) e posterior hidrólise dos grupos $(\equiv\text{SiO})_m\text{MX}_{n-m}$ (reação 3). Com esta reação se espera que o óxido metálico forme uma monocamada que recobra completamente a superfície da sílica.



onde M = Ti ou Zr, X = Cl ou OR



A titânia e a sílica podem encontrar-se fisicamente misturadas ou quimicamente ligadas formando ligações covalentes $\equiv\text{Ti-O-Si}\equiv$. Sabe-se que as condições utilizadas na síntese determinam as características morfológicas, tais como a homogeneidade, tamanho e distribuição de poros do produto formado. A técnica sol-gel é amplamente utilizada na preparação de óxidos binários de $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$, onde átomos de titânio podem estar presentes na matriz da sílica⁹⁷⁻¹⁰¹. Este método consiste de uma etapa de hidrólise que fornece os grupos $\equiv\text{M-OH}$ (reação 4) e posteriores reações de condensação de precursores organometálicos formando os grupos $\equiv\text{M-O-M}\equiv$ (reações 5 e 6).



Observou-se que o rearranjo de filmes sol-gel pode ser acelerado em atmosfera úmida (vapor de água)¹⁰² Imai et al.¹⁰³ descreveram uma técnica alternativa usando irradiação UV e vapor de água para a densificação e/ou cristalização de sílica sol-gel, titânia e titânia/sílica a temperaturas relativamente baixas.

O grau de homogeneidade no óxido está associado com a quantidade relativa de ligações $\equiv\text{Ti-O-Si}\equiv$. A medida que estas ligações são mais efetivamente formadas o óxido será mais homogêneo. Estes óxidos são obtidos em geral com baixo conteúdo de titânio (concentração máxima menor que 15 %). Para altos conteúdos de titânio são formados cristais de TiO_2 , como uma fase separada, demonstrando que a sílica não pode acomodar todos os átomos de titânio em sua estrutura acima de um determinado limite ¹⁰⁴.

O método de “*flame aerosol*” também tem sido utilizado para sintetizar estes tipos de óxidos binários. Para isto, um fluxo de argônio contendo hexametildissiloxano evaporado e tetraisopropóxido de titânio é arrastado numa chama de difusão de metano/oxigênio. Após a condensação são formadas nanopartículas de Si/Ti com alta dispersão de titânia. O melhor desempenho catalítico foi obtido com partículas contendo de 1 a 3,2 % de titânio ¹⁰⁵.

Outros métodos de preparo de óxidos binários têm sido utilizados, nos quais a interação do titânio com a sílica limita-se à superfície. Entre eles, destacam-se os métodos de impregnação, deposição por vapor químico e precipitação.

Castillo et al. ^{106, 107} estudaram a deposição de titânia em sílica de área superficial alta por meio de impregnação, precipitação e enxerto com tetracloreto ou tetraisopropóxido de titânio, obtendo-se melhor dispersão de titânia na superfície com o uso da impregnação. Já o enxerto com o alcóxido de titânio permitiu uma melhor dispersão interna da titânia na sílica. Fu e Qutubuddin ¹⁰⁸ sintetizaram nanopartículas de sílica cobertas com titânia usando uma microemulsão não iônica de água em óleo.

Com a técnica de deposição por vapor químico (CVD), os sólidos obtidos podem ou não apresentar estrutura uniforme e isto depende do substrato, da composição de cobertura e das condições de síntese. Nestas condições, as moléculas do TiCl_4 interagem efetivamente com os grupos hidroxilas da superfície da sílica através de reações repetitivas e subsequente hidrólise das ligações residuais de $\equiv\text{Ti-Cl}$ a diferentes temperaturas (200 e 600 °C). Reações do TiCl_4 ocorrem não só com os grupos $\equiv\text{Si-OH}$ residuais como também com os $\equiv\text{Ti-OH}$, devido à repetições sucessivas das etapas ¹⁰⁹.

A reação química dos correspondentes cloretos de Zr e Ti com o suporte de sílica e posterior hidrólise em atmosfera de argônio foi estudada por Kubota et al.^{110,111}. O suporte de sílica modificado pelo zircônio manteve suas características originais, tais como: rigidez, diâmetro de poros, área de superfície com uma maior estabilidade frente a agentes oxidantes, como por exemplo, na separação de crômio (VI) por sistema de injeção em fluxo, o qual requer operações multicíclicas, sem qualquer perda de zircônio.¹¹¹

1.4. Parâmetros cromatográficos

Para avaliar o desempenho cromatográfico da fase estacionária é calculada uma série de parâmetros a partir de valores obtidos no cromatograma. Os símbolos são definidos nas Figuras 7 e 8. Todas as medidas são em unidades de tempo.

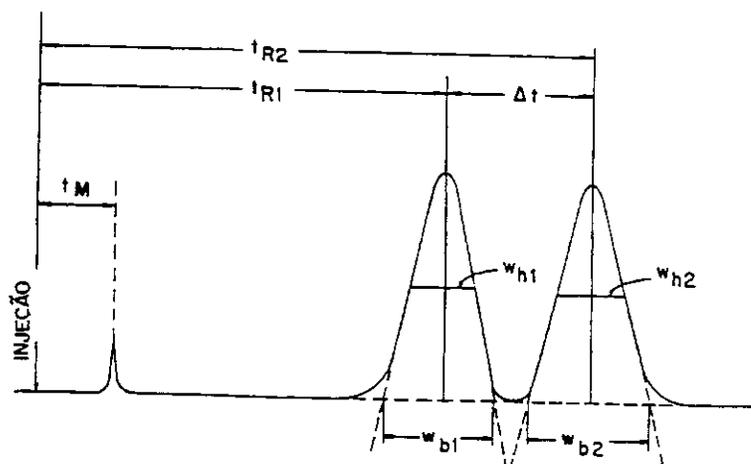


Figura 7. Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.

O fator de retenção (k) diz respeito à retenção de um soluto na coluna, determinado pela razão dos tempos que as suas moléculas ficam retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna na fase móvel.

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

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 quanto tempo as moléculas do soluto estão na fase móvel é utilizado o tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária (t_M).

Os valores ideais de k devem variar entre 2 e 10, pois valores de k menores de 2 implicam em pouca interação do soluto com a fase estacionária. Valores de k maiores de 10 significam uma forte interação do soluto com a fase estacionária, provocando um longo tempo de análise ²⁷.

A resolução entre picos (R_s) refere-se à separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada pela equação.

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,77 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right)$$

Onde: t_{R1} e t_{R2} = tempo de retenção de dois picos adjacentes

w_{b1} e w_{b2} = largura dos picos na base

w_{h1} e w_{h2} = largura dos picos a meia altura

Valores de R_s de 1,5 são considerados ideais, indicando uma boa separação entre os picos.

A eficiência da coluna cromatográfica é avaliada através do número de pratos, N . O número de pratos representa as etapas de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de etapas de equilíbrio em uma coluna, melhor a separação. Na prática, o número de pratos é uma medida do alargamento do pico. Este parâmetro é calculado por:

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

Para comparar colunas de comprimentos diferentes, a eficiência é expressa em termos de números de pratos por metro (N/m), calculado através da divisão do número de pratos da coluna pelo seu comprimento em metros.

O outro parâmetro calculado é o fator de assimetria do pico (A_s), a 10 % da sua altura ($A_s = b/a$) (Figura 8). O valor de A_s deve estar no intervalo de 0,9 a 1,2, mas valores de 0,8 até 1,6 também são admitidos ¹⁷.

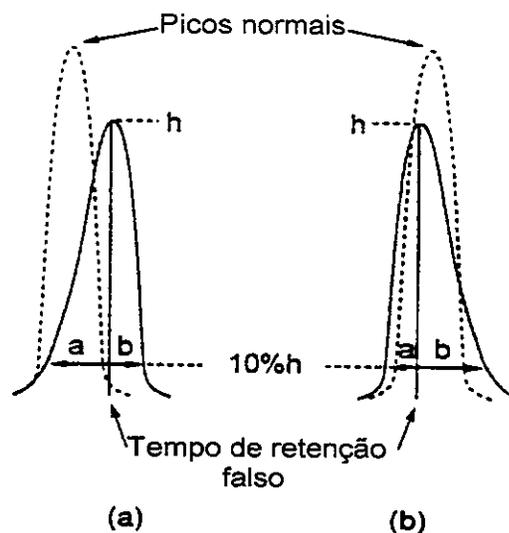


Figura 8. Cromatogramas com as medidas relacionadas à determinação da assimetria de picos. h = altura do pico.

1.5. Estabilidade das fases estacionárias

O uso de recheios estáveis permite que as características da coluna permaneçam inalteradas o maior tempo possível, reduzindo assim a frequência de substituição da mesma, mantendo a reprodutibilidade nas análises. Com as fases

reversas convencionais, o primeiro sinal de degradação da coluna é o decréscimo no fator de retenção (k)⁵⁷. No entanto, em colunas mais estáveis, em soluções básicas, k permanece constante, ainda que estejam ocorrendo solubilizações da sílica. E, neste caso, o tempo de vida das colunas também é limitado, pois, após um certo tempo, dependendo das condições de análise, a eficiência começa a ser prejudicada. Desta forma, a perda da eficiência é o melhor indicativo da deterioração da coluna, em testes realizados em meios básicos do que as medidas do k ¹¹². Assim, o tempo de vida de uma coluna é definido como a quantidade de volumes de coluna passados através da coluna cromatográfica antes de iniciar um decréscimo significativo da eficiência.

A estabilidade das colunas convencionais baseadas em sílica, depende do tipo e pureza do suporte de sílica e da natureza da fase ligada, além das condições de análise como: pH da fase móvel, temperatura, tipo e concentração do tampão e modificador orgânico utilizados na fase móvel.

Kirkland e colaboradores¹¹³⁻¹¹⁷ definiram a influência destes fatores na dissolução da sílica em valores de pH intermediários e altos. Eles comprovaram que a solubilidade da sílica, geralmente, é maior quando são usadas fases móveis tamponadas em metanol, comparadas com as preparadas em acetonitrila. No entanto, isto não aconteceu para certos tipos de fases estacionárias, como as fases monoméricas estericamente protegidas, que mostraram solubilidades similares em ambos os solventes. A influência da natureza da fase ligada foi estudada comparando fases monoméricas de dimetil-C18 e de diisopropil-C8¹¹⁸. Neste estudo foi observado que as fases estericamente protegidas foram mais rapidamente degradadas em soluções básicas, contrariamente ao que acontece em pH ácidos. Ligantes com grupos maiores também inibiram o ataque da superfície da sílica por soluções tampões agressivas, a altos e baixos pH^{32,119}.

Sílicas xerogel e solgel foram comparadas, sendo que as do tipo xerogel dissolveram mais rapidamente devido a maior área superficial e volume de poros. Sílicas que contêm elementos contaminantes de metais na sua estrutura (tipo A) mostraram menor solubilidade que as sílicas altamente purificadas (tipo B)¹¹⁴.

Colunas baseadas em sílica apresentaram diferentes solubilidades, dependendo do tipo de ânion e cátion presente no tampão utilizado. No caso dos ânions, tampões de carbonato e fosfato degradaram estas colunas mais rapidamente que os tampões de borato e glicina. No caso dos cátions, a solubilidade da sílica foi diminuindo na seguinte direção: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$. Alguns resultados indicam que o uso de tampões de lítio pode reduzir a dissolução do suporte de sílica e, assim, melhorar a estabilidade da coluna em meios básicos ¹¹⁹. Além disso, verifica-se que altas concentrações de tampão ($> 0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e elevadas temperaturas ($> 40 \text{ }^\circ\text{C}$) influenciam fortemente na degradação da coluna.

Variados métodos têm sido empregados para testar a estabilidade de fases ligadas utilizando diversas condições de análise, não existindo um procedimento geral estabelecido ^{30, 113-117, 120}. Estes procedimentos consomem grandes volumes de fase móvel e precisam de longos tempos de análise, devido à disponibilidade de fases estacionárias cada vez mais resistentes ao ataque de fases móveis alcalinas. Assim, foi desenvolvido um método usando condições drásticas de análise ¹¹², o qual permite estudar a estabilidade de colunas de fase reversa de forma mais rápida e com menos gasto de solvente. Este método consiste, principalmente, no uso de fase móvel contendo alta concentração de bicarbonato de sódio e temperatura de $60 \text{ }^\circ\text{C}$.

1.6. Espectroscopia de absorção de raios-X

A técnica de espectroscopia de absorção de raios-X (XAS) está sendo muito utilizada na caracterização de amostras contendo átomos metálicos, entre eles o dióxido de titânio (TiO_2), com o intuito de obter informações em relação à geometria de coordenação do átomo do metal na matriz da sílica. Neste experimento a amostra é irradiada com uma luz monocromática de raios X, onde a energia é continuamente “detuned” e o coeficiente de absorção linear, μ , é registrado como uma função de energia. Este coeficiente é calculado a partir da razão de intensidade da luz incidente (I_0) e a transmitida (I), como expressado pela lei de Beer,

$$A = \mu(t) = \ln\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

onde t representa a espessura da amostra (cm) e A a absorvância

Para a realização deste experimento é utilizada luz síncrotron devido à necessidade de uma fonte de raios-X intensa. Pois deve atravessar a amostra para que a absorção seja medida. A luz síncrotron é uma radiação eletromagnética produzida por elétrons de alta energia num acelerador de partículas. A radiação emitida fornece fluxos de raios-X de 5 ou mais ordens de magnitude acima das fontes de raios-X convencionais e proporciona uma alta relação sinal-ruído em um tempo razoável (de 30 a 40 minutos por espectro). Além disso, fornece amplo espectro de energia, luz polarizada no plano do anel de armazenamento, etc.

O princípio da espectroscopia de absorção de raios-X consiste na excitação de elétrons localizados nos níveis K (camada 1s) ou L (camadas 2s ou 2p) do átomo de interesse, através da absorção de um fóton, como observado na Figura 4.

Quando a energia do fóton incidente é menor que a energia de ligação, E_0 , ocorrem transições eletrônicas para os orbitais vazios mais próximos. As transições para estes estados contribuem com a parte do espectro de absorção que compreende a região de pré-borda (Figura 5).

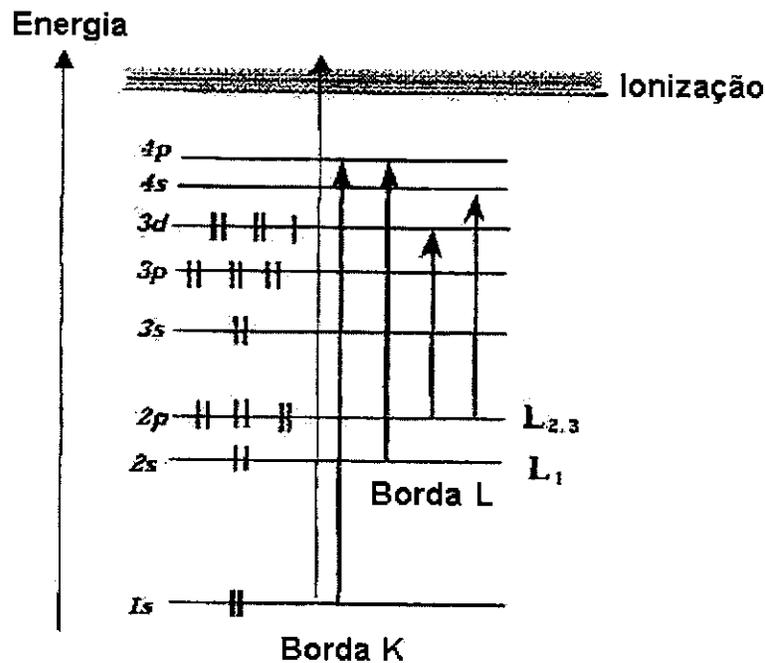


Figura 4. Esquema da excitação de um elétron pela absorção de um fóton de raios-X ¹²¹.

Se a energia do fóton incidente é a suficiente para arrancar os elétrons localizados nos níveis internos, então o coeficiente de absorção aumenta drasticamente, observando-se um salto no espectro de absorção, denominado borda de absorção. A energia onde ocorre a absorção depende da energia de ligação dos elétrons ao átomo, sendo uma característica de cada elemento químico. Quando a energia do fóton é maior que a energia de ligação, o fotoelétron é emitido com uma energia cinética, ocorrendo transições para o estado contínuo. Para sistemas condensados (estado sólido ou líquido), após a borda de absorção são observadas oscilações no coeficiente de absorção, que são o resultado de interferências entre a função de onda do fotoelétron e o retroespalhamento dessa função de onda pelos átomos vizinhos ao átomo absorvedor.

Como se observa na Figura 5, o espectro de XAS é dividido em duas regiões: 1) Região de XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure), que compreende a parte de menores energias no espectro de absorção (até 50 eV acima da borda de absorção) e 2) Região de EXAFS (Extended X-ray Adsorption Fine Structure), que compreende a faixa de 50 a 1000 eV acima da borda de absorção.

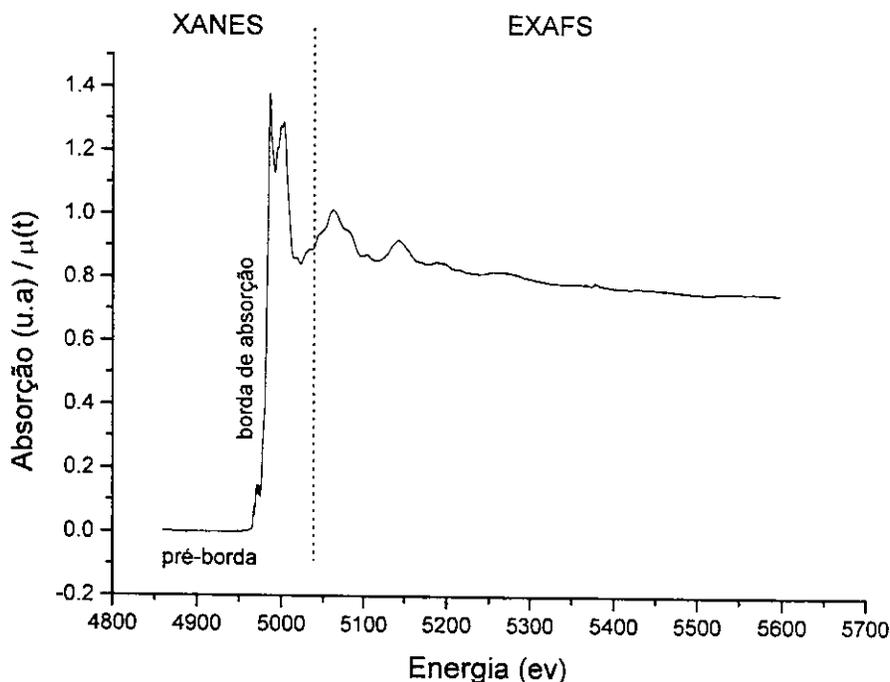


Figura 5. Espectro de absorção de raios-X (XAS) do titânio na forma anatásia.

Através da região de XANES podem ser obtidas informações em relação à geometria de coordenação do titânio. Através de cálculos computacionais feitos a partir da região de EXAFS (está relacionada a distribuição radial dos átomos na amostra) são obtidos os valores de distância da ligação dos átomos vizinhos ao átomo central (através da frequência de oscilação) e o número de coordenação do átomo central (através da amplitude da oscilação).

A titânia tem estrutura cristalina, podendo-se encontrar em três formas diferentes: brookite, anatásia e rutila, sendo que somente as duas últimas têm valor comercial. A forma anatásia é mais estável em temperaturas abaixo de 800 °C, acima

deste valor ela se transforma em rutila. Tamanhos de poro médio de 60, 100 e 300 Å indicam a presença da forma anatásia. Poros maiores com 2000 Å são característicos da rutila. Ambos, rutila e anatásia, têm estruturas tetragonais, onde cada átomo de titânio encontra-se coordenado com 6 átomos de oxigênio e cada átomo de oxigênio com 3 átomos de titânio, formando um octaédro TiO_6 (Figura 6). A rutila contém 6 átomos por cela unitária, enquanto a anatásia contém 12 átomos.

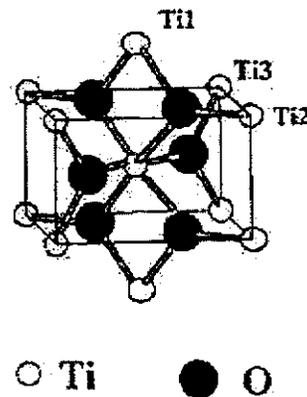


Figura 6. Estrutura de coordenação tetragonal da rutila ¹²¹.

1.7. Planejamento experimental

A essência do planejamento experimental consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação desejada. O uso do planejamento fatorial permite avaliar quantitativamente a influência dos fatores de interesse sobre as respostas procuradas, bem como as possíveis interações entre estes fatores. Para fazer um planejamento fatorial completo, devem-se realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Para k fatores (variáveis controladas pelo experimentador) um planejamento completo de dois níveis exige a realização de 2^k ensaios diferentes, sendo por isso chamado de planejamento fatorial 2^k . No caso do planejamento fatorial 2^3 serão necessários 8 ensaios.

A Tabela 1 mostra um exemplo de como são colocados os coeficientes de contraste para um fatorial 2^3 , a partir da matriz de planejamento, onde os sinais se

alternam, sempre começando com o nível (-). Para a primeira coluna os sinais são - + - + ..., na segunda coluna coloca-se - - + +e finalmente quatro sinais negativas e quatro positivas são colocadas na terceira coluna ¹²².

Os sinais para calcular as interações de dois fatores **12**, **13**, **23** e de três fatores **123** são obtidos multiplicando os sinais das correspondentes colunas, pertencentes aos fatores principais. Com todos esses sinais são calculados os efeitos, incluindo a coluna de sinais positivas para o cálculo da média. Através do planejamento experimental não existem informações ociosas, pois tanto os efeitos principais quanto os de interação são calculados utilizando-se todas as respostas obtidas experimentalmente.

Tabela 1. Coeficientes de contraste para um fatorial 2³.

Ensaio	1	2	3	Respostas
1	-	-	-	y ₁
2	+	-	-	y ₂
3	-	+	-	y ₃
4	+	+	-	y ₄
5	-	-	+	y ₅
6	+	-	+	y ₆
7	-	+	+	y ₇
8	+	+	+	y ₈

Os ensaios feitos em duplicata permitem obter uma estimativa do erro experimental associado à determinação de uma resposta individual e, portanto, decidir, de acordo com a extensão do erro, se existem ou não efeitos estatisticamente significativos dos fatores sobre a resposta. Quando o efeito de uma variável depende do nível de outra, diz-se que as duas variáveis interagem e pode-se calcular esse efeito de interação entre elas.

Para obter as estimativas do erro primeiramente calcula-se a **estimativa da variância** para cada observação individual, S^2 , dada por ¹²²:

$$S^2 = \frac{\sum (y_i - y)^2}{n-1}$$

Onde: y_i = medida (ou resposta), y = média das respostas, n = número de respostas

Seguidamente pode-se calcular a **estimativa conjunta da variância**, tomando-se a média ponderada de todas as estimativas.

$$Sp^2 = \frac{(v_1 S_1^2 + v_2 S_2^2 + \dots + v_n S_n^2)}{(v_1 + v_2 + \dots + v_n)}$$

Onde: $v_i = n_i - 1$ = número de graus de liberdade de S_i^2 , a estimativa da variância do i -enésimo ensaio.

A raiz quadrada de Sp^2 fornece a estimativa do desvio padrão global, S , isto é, a **estimativa do desvio experimental** das respostas.

$$S = (Sp^2)^{1/2}$$

Para verificar se os efeitos calculados são significativamente diferentes de zero, pode-se empregar o teste t , de Student, o qual possui valores tabelados, considerando o nível de 95% de confiança com 8 graus de liberdade ($\sum v_i$)¹²². Para isto, é necessário calcular o erro padrão de um efeito, através da raiz quadrada da variância de um efeito, ou seja:

A variância de um efeito ---- $V_{efeito} = (1/4)Sp^2$

O erro padrão de um efeito ---- $S_{efeito} = (V_{efeito})^{1/2}$

Os efeitos cujas estimativas forem superiores em valor absoluto ao produto do erro padrão de um efeito pelo ponto de distribuição de Student, $(S_{efeito} \times t_v)$ serão estatisticamente significativos. Deve-se ter em conta que o valor de v corresponde à somatória do número de graus de liberdade para cada ensaio ($\sum v_i$).

2. OBJETIVOS

Este trabalho visa o estudo do comportamento cromatográfico e da estabilidade frente à fases móveis neutra e básica de fases estacionárias baseadas em sílica titanizada, preparadas com poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) imobilizado por diferentes vias: térmica, radiação microondas e radiação gama.

Para atingir este objetivo, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Modificação química da superfície da sílica a partir de tetrabutóxido de titânio.
- Sorção do polímero na superfície do suporte e posterior imobilização pelos diferentes tratamentos: térmico, radiação microondas e radiação gama.
- Avaliação do suporte de sílica titanizada e das fases estacionárias imobilizadas através de testes físicos e químicos, tais como: fluorescência de raios-X, diâmetro médio e volume específico dos poros, espectroscopia de absorção de raios-X, microscopia eletrônica de varredura, análise elementar, difração de raios-X, espectroscopia de absorção atômica por chama, espectroscopia no infravermelho, análise termogravimétrica e espectrometria de ressonância magnética nuclear.
- Avaliação do desempenho cromatográfico das fases estacionárias preparadas pelas diferentes vias de imobilização através do uso de misturas padrões.
- Avaliação da estabilidade das melhores fases estacionárias em meios neutro e básico.
- Aplicação da melhor fase estacionária na análise de misturas complexas.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes e solventes

- Água deionizada, sistema Milli-Q plus, Millipore
- Ácido nítrico p.a., Quimex
- Acenafteno 99 %, Aldrich
- Acetona p.a., Merck
- Benzeno p.a., Synth
- Benzonitrila p.a., Riedel - de Haën
- Bicarbonato de sódio, Fisher Scientific
- Clorofórmio p.a., Mallinckrodt
- Diclorometano p.a., Merck
- Fenol 99 %, Aldrich
- Hidróxido de sódio, Nuclear
- Hexano grau HPLC, Tedia
- Isopropanol p.a., Mallinckrodt
- Metanol grau HPLC, Mallinckrodt
- Naftaleno p.a., Carlo Erba
- N,N-Dimetilanilina 98 %, Fluka
- Óxido de titânio p.a., Aldrich
- Tetrabutóxido de titânio p.a., Aldrich
- Tolueno p.a., Merck.
- Uracil 98 %, Aldrich

3.1.2. Suportes cromatográficos e fase líquida

As características das diferentes sílicas utilizadas neste trabalho são mostradas na Tabela 2, de acordo com os dados fornecidos pelos fabricantes. Todas as sílicas apresentam formas de partículas esféricas com tamanho médio de 5 μm .

Tabela 2. Características das sílicas (dados do fabricante).

Especificações	Tipos de sílicas		
	Rainin (Varian)	Kromasil (Akzo Nobel)	Astrosil (Stellar Phases, Inc.)
Área superficial específica S_{BET} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	195	330	350
Volume de poro (mL g^{-1})	-	0,9	0,9
Diâmetro médio de poros (Å)	100	110	108

Fase estacionária líquida: poli(metiloctilsiloxano), PMOS, United Chemical Technologies, Inc., Lote N^o 145-041. Viscosidade 600 a 1000 centistokes a 25 °C, densidade de 0,91 g cm^{-3} , massa molar por peso médio (Mw) de 6200 daltons (dados do fabricante).

3.2. Equipamentos

- Agitador Vórtex, Phoenix, modelo AP 56
- Agitador Roto-Torque, Cole-Parmer Instrument Company, modelo 7637-01
- Agitador Magnético, Corning, modelo PC-351
- Analisador Termogravimétrico, TA Instruments, modelo TGA-2050
- Analisador Elementar, Perkin Elmer, modelo 2400
- Balança Analítica, Fisher Scientific, modelo A-250, precisão de 0,0001 mg
- Banho Termostático, Ética, modelo 520
- Bomba de enchimento de colunas, Haskel, com faixa de pressão disponível

até 50000 psi (344,8 MPa), modelo N° 51769

- Centrífuga, Fisher Scientific, modelo 225
- Cromatógrafo a líquido utilizado para avaliação das colunas constituído de:
 - uma bomba de alta pressão, do tipo pistão cabeça dupla, Waters, modelo 510
 - detector UV/Vis, de comprimento de onda variável, Shimadzu, modelo 10A
 - Injetor, Rheodyne, com alça de amostragem de 10 µL, modelo 7725i
 - Sistema de aquisição de dados: microcomputador do tipo PC, Pentium II 400 MHz, com software de aquisição e tratamento de dados cromatográficos Chrom Perfect for Windows, versão 3.52 e Report Write Plus, versão Justice Innovations.
- Cromatógrafo a líquido utilizado para realização dos testes de estabilidade constituído de:
 - sistema de desgaseificação em linha com bomba de vácuo, Alltech
 - bomba de alta pressão, do tipo pistão cabeça dupla, Shimadzu, modelo LC-10AD
 - detector espectrofotométrico de absorção de UV/Vis, com comprimento de onda fixo de 254 nm, Shimadzu, modelo SPD-10A
 - Auto injetor, amostrador programado de 5 µL, Shimadzu, modelo SIL-10A
 - Sistema de aquisição de dados: microcomputador do tipo Pentium III, 700 MHz, com software de sistema de tratamento de dados cromatográficos, Shimadzu, Class VP
 - Forno para coluna, Shimadzu, modelo CTO-10AS
 - Controlador de sistema, Shimadzu, SCL-10A
- Estufa a vácuo, Yamato, ADP-21
- Espectrômetro de Difração de Raios X, Shimadzu, modelo XRD-6000
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear, Varian, modelo INOVA, 100 MHz
- Espectrômetro de Fluorescência de Raios X, Shimadzu, modelo EDX-700, energia 4,5 keV, fonte de ródio
- Espectrômetro de Infravermelho, Perkin Elmer, modelo FT-IR 1600

- Espectrômetro de Absorção de Raios-X duro com luz Síncrotron (DB-04), faixa de energia de 2,5 a 24 keV, LNLS
- Forno, EDG, modelo 10P-S, equipada com sistema para fluxo de nitrogênio
- Forno de microondas doméstico com prato giratório, Electrolux, frequência de 2450 MHz e potência de saída de 900 W, modelo ME27
- Geladeira, General Electric
- Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL, modelo JSM-T300
- Porosímetro, Micromeritics, modelo ASAP 2010
- pH metro, Digimed, modelo DC21
- Sistema de purificação de água Milli - Q Plus, Millipore
- Ultra som, Thornton, modelo T14

3.3. Otimização das condições de preparação do suporte de sílica titanizada

Uma vez que o método de preparação de óxidos binários utilizado em um trabalho anterior ¹²³ provocou rachaduras na superfície das partículas de sílica modificada com zircônio ¹¹², foi desenvolvido um novo procedimento, utilizando condições de preparo menos drásticas.

Em linhas gerais, este procedimento consistiu na reação dos grupos silanóis da sílica com o tetrabutóxido de titânio a diferentes temperaturas, tempos de reação e uso ou não de centrifugação. Os primeiros testes foram feitos com as sílicas Rainin e Kromasil, por serem as disponíveis no momento. Com a chegada da sílica Astrosil, e baseado nos resultados obtidos com as sílicas anteriores, foi realizado um planejamento fatorial 2³ para definir as melhores condições de preparo, que permitiram uma maior deposição de titânio na superfície da sílica. Um esquema das reações que ocorrem durante a titanização e hidrólise do suporte cromatográfico é mostrado na Figura 9.

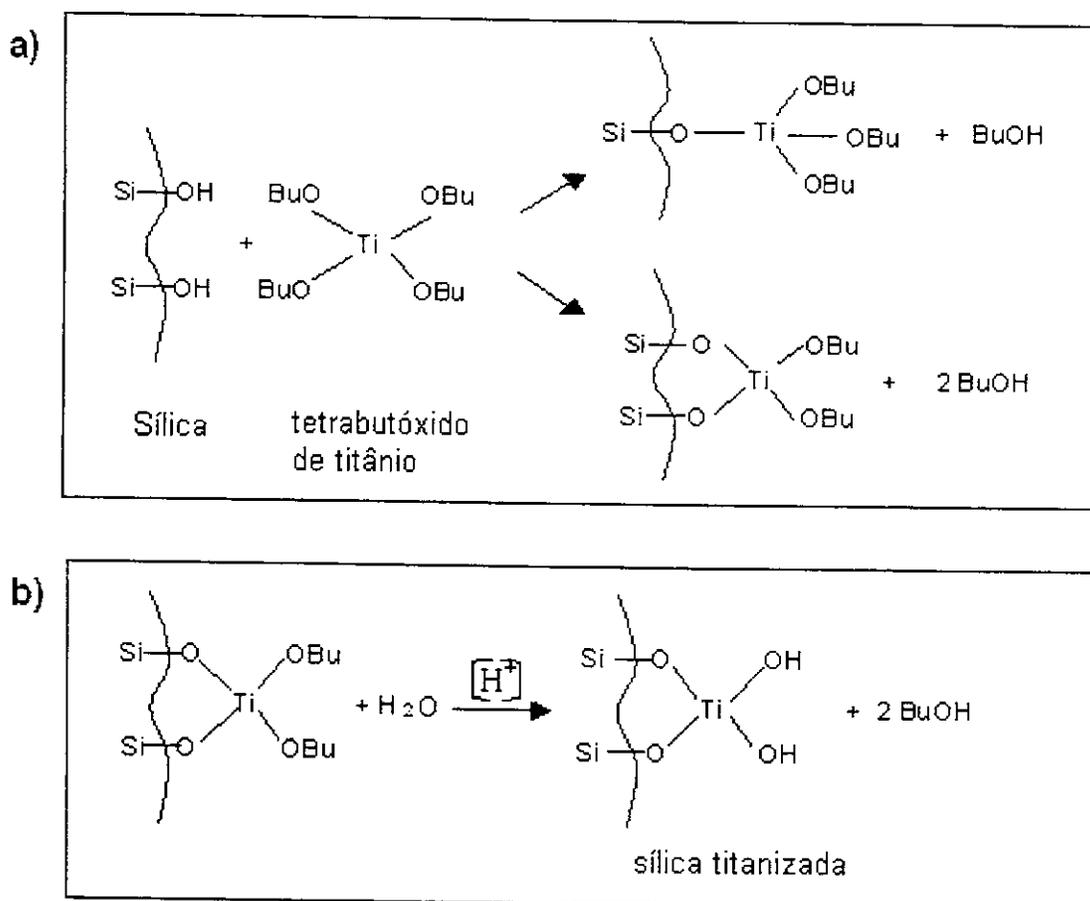


Figura 9. Possíveis reações do tetrabutóxido de titânio com a sílica durante a titanização (a) e hidrólise (b).

3.3.1. Sílica Rainin

A sílica primeiramente foi ativada a 120 °C por uma noite, para remover a água fisicamente adsorvida. Em seguida, foi colocada no dessecador até alcançar temperatura ambiente para pesar porções de 1 g em vários frascos de vidro. Posteriormente, preparou-se uma solução de $\text{Ti}(\text{BuO})_4$ 1,0 mol L^{-1} em tolueno e adicionaram-se 1,5 mL da solução em cada frasco. A mistura foi agitada por alguns segundos em agitador de tubos (Vórtex) e centrifugada por 10 minutos, a fim de remover bolhas de ar dentro dos poros da sílica. Depois, os frascos foram colocados

no ultrassom por 10 min, também para eliminar bolhas de ar e, assim, garantir uma melhor interação do reagente com os silanóis presentes na superfície da sílica.

Diferentes temperaturas de reação foram utilizadas: -8 °C (frasco colocado em vasilha com gelo, dentro da geladeira na temperatura mínima, sendo a temperatura medida dentro do frasco de reação), 2 °C (frasco colocado em geladeira), 19 °C (frasco deixado à temperatura ambiente), 40 °C (frasco colocado em banho de água aquecida). Todos os frascos foram deixados em cada uma das temperaturas por um período de 16 h. Testes realizados a temperatura ambiente também foram agitados continuamente durante 7 e 20 h, respectivamente. Transcorrido o tempo determinado, o sólido foi lavado 3 vezes com tolueno, para arrastar o excesso de $\text{Ti}(\text{BuO})_4$ e deixado na capela até evaporar o solvente, com posterior hidrólise dos grupos butóxidos resultantes na superfície da sílica. Para a hidrólise adicionou-se ao sólido uma solução de ácido nítrico $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e deixou-se em agitação em Rotatorque durante duas horas. Em seguida, o sólido foi lavado 3 vezes com água deionizada seco a 110 °C por uma noite.

3.3.2. Sílica Kromasil

A modificação da sílica Kromasil foi realizada utilizando a mesma metodologia do item anterior, com a diferença que em alguns casos não foi usada a centrifugação. As temperaturas utilizadas foram 2 °C (temperatura da geladeira) e 25 °C (temperatura ambiente) e o tempo foi de 21 h.

3.3.3. Sílica Astrosil

Esta sílica foi a mais utilizada neste trabalho, sendo feito um estudo mais rigoroso das condições de titanização, através do uso do planejamento fatorial. Neste caso, foram preparadas várias amostras de sílica titanizada, onde as variáveis estudadas foram a presença ou não de água na sílica, o tempo de reação (8 e 16 h) e o uso ou não de centrifugação. Para o estudo da sílica sem a presença de água, esta

foi aquecida a 120 °C durante 16 h (ativação). Por outro lado, para garantir que a sílica tivesse 50 % de umidade na sua superfície, esta foi colocada durante 61 h em sistema de vidro fechado, contendo nitrato de cálcio em água (hidratação).

Nas lavagens realizadas após a etapa de titanização, além do tolueno, foram também empregados o isopropanol e a água. Como a última lavagem da sílica titanizada foi com a água, não foi preciso esperar para evaporar o solvente, procedendo-se em seguida a etapa da hidrólise. Todos os ensaios foram feitos na temperatura de 2 °C e em duplicatas para determinar a estimativa do erro experimental. A Tabela 3 mostra a matriz do planejamento fatorial com os respectivos fatores e seu níveis.

Tabela 3. Parâmetros estudados (fatores) e seus níveis no experimento.

Fatores	Níveis	
	(-)	(+)
(1) umidade na sílica	não	sim
(2) uso de centrifugação	não	sim
(3) tempo de reação (horas)	8	16

Após escolhidas as melhores condições de preparo foi adicionada mais uma etapa (hidrólise ácida) antes de proceder a titanização, com o intuito de reduzir possíveis contaminantes presentes na sílica, incorporados na estrutura durante a sua síntese²². Para isto, a sílica nua Astrosil foi tratada com ácido nítrico 0,01 mol L⁻¹, em refluxo, por um período de 4 horas. Depois, foram feitas sucessivas lavagens com água deionizada (até alcançar pH neutro), metanol, isopropanol e hexano sob vácuo, usando um filtro de membrana grau de porosidade No. 4.

3.4. Caracterização físico-química dos suportes cromatográficos

As diferentes sílicas (Rainin, Kromasil e Astrosil) nas suas formas puras foram analisadas por espectrometria de absorção atômica por chama para conhecer o grau

de pureza em função da concentração de metais. No caso das sílicas titanizadas foi utilizada a técnica de fluorescência de raios-X para determinar a quantidade de titânio presente nas mesmas. As sílicas Astrosil nua e titanizadas em superfície ativada ou hidratada foram também caracterizadas por análise elementar, análise termogravimétrica, determinação do volume e diâmetro médio dos poros, espectroscopia de absorção de raios-X (realizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, SP), microscopia eletrônica de varredura e difração de raios-X.

3.4.1. Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (FAAS)

Os teores de metais presentes nas diferentes sílicas puras foram determinados pela técnica de espectrometria de absorção atômica por chama. A quantidade de 1,0000 g de amostra foi pesada em cadinho de politetrafluoroetileno (PTFE), para posterior realização da fluorização (a quente), utilizando ácido nítrico 1:1 e ácido fluorídrico 40 %. A solução foi levada à secura e a amostra retomada em ácido clorídrico (a quente) e avolumada com água destilada em balão volumétrico de 50 mL. As medidas foram feitas contra padrões e brancos dos reagentes, obtidos nas mesmas condições das amostras. Estas análises foram realizadas, gentilmente, pelo Prof. José Salvador Barone, no Laboratório Puriquímica em São Paulo.

3.4.2. Fluorescência de Raios-X (FRX)

Através da técnica de fluorescência de raios-X é avaliada a extensão da modificação da superfície da sílica com o metal titânio, pela quantidade presente na sua superfície. A curva analítica foi obtida a partir da pesagem de 0,3000 g de massa total de sílica com titânia, variando a concentração da titânia numa faixa de concentração de 1 a 10 %.

Com os valores de porcentagem de titânio obtidos foi calculada a quantidade de grupos silanóis ligados por átomo de titânio, supondo a formação de uma monocamada na superfície da sílica, onde os átomos de titânio encontram-se ligados a dois grupos silanóis. Para isto foram determinados os valores de porcentagem de dióxido de titânio utilizando a equação 7. Com este valor e a porcentagem de sílica, foi obtida a massa de titânia por grama de sílica (equação 9).

$$\% TiO_2 = \frac{\% Ti \times M(TiO_2)}{M(Ti)} \quad (7)$$

$$\% SiO_2 = 100 \% - \% TiO_2 \quad (8)$$

$$m(TiO_2) = \frac{\% TiO_2}{\% SiO_2} \quad (9)$$

onde M é a massa molar de TiO₂ e Ti, m(TiO₂) é a massa de TiO₂.

Posteriormente, foi calculado o número de micromoles de titânio por grama de sílica, através da equação 10, e, com este valor e o da área superficial da sílica, foram obtidos os valores de μmol de titânio por m² de sílica. Os valores de área superficial utilizados para os cálculos foram aqueles obtidos experimentalmente, sendo 188 m² g⁻¹ para a Rainin, 306 m² g⁻¹ para a Kromasil e 261 m² g⁻¹ para a Astrosil.

$$n = \frac{m(TiO_2)}{MM(TiO_2) \times 10^{-6}} \quad (10)$$

$$\alpha = \frac{n}{S_{BET}SiO_2} \quad (11)$$

Finalmente, foi calculado o número de grupos OH (silanóis) ligados por átomo de titânio, supondo uma concentração máxima de silanóis na superfície da sílica igual a $7,64 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ²⁰.

$$\frac{OH}{Ti} = \frac{7,64 \mu\text{mol}/\text{m}^2}{\alpha} \quad (12)$$

3.4.3. Análise Elementar de Carbono

Esta técnica tem como objetivo avaliar o teor de resíduo de carbono nos suportes de sílica nua e titanizadas. O método empregado utiliza a combustão para converter o carbono em CO₂, que é então medido em função da sua condutividade térmica.

3.4.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica permite medir algumas variações de propriedades físicas como calor e massa, e fornecer informações sobre a estabilidade térmica dos materiais. Para isso, foi utilizado um analisador termogravimétrico onde, por meio de uma microbalança, obtém-se a porcentagem de perda de massa da amostra em função do aumento da temperatura. As análises foram realizadas sob atmosfera de argônio, com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, no intervalo de 10 a 1000 $^\circ\text{C}$.

3.4.5. Determinação do volume (Vp) e tamanho médio dos poros

A porosimetria baseia-se nas medidas de sorção de nitrogênio nos suportes, as quais são quantificadas através das isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a $-195,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Previamente, as amostras são desgaseificadas a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, sob vácuo de aproximadamente 15 MPa (10^{-4} torr). O volume de poro total foi avaliado pela conversão do volume de nitrogênio adsorvido na pressão relativa de 0,995 para o

volume do adsorbato líquido. O tamanho médio dos poros foi determinado a partir do volume total de poro e área de superfície S_{BET} ($4 V_p / S_{\text{BET}}$).

3.4.6. Espectroscopia de Absorção de Raios-X (XAS)

As medidas de espectroscopia de absorção de raios-X foram realizadas na linha de luz XAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Campinas, São Paulo. A amostra foi preparada na forma de membrana com uma massa máxima de 20 mg. Após trituração em almofariz de ágata e pesagem da amostra, adicionaram-se 5 mL de álcool isopropílico e deixou-se homogenizar em ultra-som por 5 min. A solução foi filtrada, usando bomba de vácuo e uma membrana de nylon, resultando em uma camada fina da amostra sobre a membrana.

Os espectros de XAS foram coletados no modo transmissão, na energia de absorção correspondente à borda K do titânio (4967 eV). Os espectros de XANES foram processados para se obter a absorvância normalizada e o tratamento dos dados da região de EXAFS foram realizados por um procedimento padrão de redução de dados usando o programa WINXAS, versão 2.33 (Thorsten Ressler).

3.4.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Esta técnica foi utilizada para observar a forma e a distribuição do tamanho das partículas dos suportes. A preparação da amostra consistiu em recobri-la com uma fina camada de ouro (100 Å), onde o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo.

3.4.8. Difração de Raios-X (DRX)

Um difractômetro com radiação de Cu ($\lambda = 1.5405 \text{ \AA}$) foi utilizado para realizar as medidas de difração de raios-X. O registro das bandas de difração foi feito na faixa de 5000 a 50000 deg, usando uma voltagem de 40 kV e uma corrente de 30 mA. Com

estas medidas é possível avaliar se os suportes de sílica titanizada apresentam cristais de titânia em sua superfície.

3.5. Preparação das fases estacionárias

3.5.1. Sorção da fase líquida

A preparação das fases estacionárias foi feita através do método de evaporação do solvente, com o contato de massas apropriadas do suporte e do polissiloxano ¹²⁴, onde uma determinada quantidade de PMOS foi dissolvida em diclorometano, de maneira a obter uma solução com 10 % de PMOS. O suporte foi adicionado nesta solução, com prévia ativação por aquecimento a 120 °C por 24 h. A sílica Astrosil hidroxilada e titanizada por 8 h a 2 °C com superfície hidratada, foi utilizada como suporte para a preparação da maioria das fases estacionárias. Alguns poucos ensaios foram realizados com suportes de sílica Kromasil. Uma vez misturados o suporte e o PMOS, agitou-se a suspensão manualmente por alguns minutos e, a seguir, o béquer contendo a mistura ficou em repouso, tampado, por três horas. Ao final, o solvente foi evaporado na capela, ficando a fase líquida sorvida na superfície do suporte. A porcentagem de carga de PMOS sobre o suporte foi, em geral, de 50 %.

3.5.2. Imobilização das fases estacionárias por tratamento térmico

3.5.2.1. Em atmosfera ambiente

Os testes iniciais de imobilização das fases estacionárias em atmosfera ambiente foram feitos com fases preparadas com sílicas Astrosil titanizadas, sem o

tratamento prévio de hidroxilação. Para isto, porções de fases sorvidas foram colocadas em béqueres e deixadas na estufa por períodos de 8 e 24 horas a 120 °C.

Para estudar o efeito do tratamento ácido na sílica sobre os parâmetros cromatográficos, preparou-se outra fase com sílica hidroxilada. O tratamento térmico foi feito a 120 °C por 24 h. Uma outra fase contendo sílica hidroxilada, porém sem a etapa de titanização, também foi imobilizada nestas condições.

3.5.2.2. Em atmosfera de nitrogênio

Porções da fase sorvida foram colocadas em tubo de aço inox (150 mm x 10 mm) e este colocado dentro do forno EDG. Simultaneamente, passou-se um fluxo contínuo de nitrogênio através da fase estacionária. Neste estudo foram avaliadas as influências do tempo (4, 8, 16 e 24 horas, utilizando uma temperatura de 120 °C) e da temperatura de imobilização (100, 120, 140 e 220 °C por um período de 8 horas).

Fases estacionárias com sílica Kromasil também foram preparadas e imobilizadas em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h. Neste caso, comparou-se o comportamento cromatográfico das fases preparadas a partir de sílicas hidroxiladas e não hidroxiladas, com ou sem titânio, resultando num total de quatro combinações diferentes, ou seja: 1) sílica não hidroxilada e não titanizada; 2) sílica hidroxilada e não titanizada; 3) sílica não hidroxilada e titanizada; 4) sílica hidroxilada e titanizada. Também foi avaliada uma fase contendo sílica hidroxilada e titanizada imobilizada na mesma temperatura (120 °C), porém com um tempo maior (24 h).

3.5.3. Imobilização das fases estacionárias por radiação microondas

Frascos de politetrafluoretileno (PTFE) contendo fases sorvidas de sílica Astrosil foram colocados dentro do forno de microondas, na borda do prato giratório, por ser o lugar de maior incidência das microondas. Diferentes potências (452, 520 e 586 watts por um período de 15 minutos) foram usadas tanto em fases preparadas

com 50 % e com 40 % de carga de PMOS. Outros testes alterando o tempo de imobilização (5, 15 e 30 minutos, utilizando uma potência de 520 watts) foram realizados. Também foi avaliada uma fase preparada sem prévia ativação da sílica antes da adição do PMOS e imobilizada por 30 minutos.

Em todos os casos, a cada 2 minutos a fase era retirada do forno de microondas e misturada com um bastão de vidro para homogeneização e esfriamento da fase. A não realização desta etapa implica em uma rápida degradação do polímero. Para determinar a potência real do equipamento e para verificar a existência de uma relação linear entre os valores de unidades arbitrárias do equipamento e a potência absorvida, a calibração do forno de microondas foi realizado por Moraes ⁶¹. Para isto, foram feitas medidas da temperatura de 1000 mL de água deionizada contidos em um béquer de vidro antes e após aquecimentos em diferentes potências durante 120 s. A água aquecida foi sempre substituída por água a temperatura ambiente entre cada determinação.

3.5.4. Imobilização das fases estacionárias por radiação gama

Ampôlas de vidro contendo porções de fases sorvidas de sílica Astrosil foram seladas em condições ambientais e irradiadas na Companhia Brasileira de Esterilização, São Paulo, através de uma fonte de cobalto-60, em duas doses de radiação, 80 e 120 kGy.

3.5.5. Extração do excesso de PMOS

Após cada imobilização, extraiu-se o PMOS não imobilizado da fase estacionária. Segundo trabalhos anteriores feitos no LabCrom, foi obtida uma melhora acentuada nos parâmetros cromatográficos de diferentes fases estacionárias quando era realizada esta etapa de extração antes do enchimento da coluna. Primeiramente, era utilizado o método de extração por Soxhlet, no qual, o solvente diclorometano extraía o PMOS não imobilizado do suporte, sob refluxo durante 6 horas a 40 °C ¹²⁴,

¹²⁵. Procedimentos mais rápidos e tão eficientes quanto a extração por Soxhlet foram, posteriormente, desenvolvidos, como a passagem de hexano, através de uma bomba cromatográfica, na vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ por 4 h, em temperatura ambiente, ou a extração consecutiva com clorofórmio e metanol, sendo que, para este último procedimento, foram obtidas maiores eficiências cromatográficas ¹²⁶. Este último processo de extração foi o utilizado neste trabalho, o qual foi realizado utilizando o mesmo tubo de aço empregado durante a imobilização térmica. O procedimento consistiu na passagem de 120 mL de clorofórmio e, a seguir, 120 mL de metanol, a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ em temperatura ambiente. Após a extração, a fase estacionária foi retirada do tubo e o solvente removido através da evaporação em temperatura ambiente.

3.6. Caracterização cromatográfica das fases estacionárias

3.6.1. Polimento das colunas cromatográficas

O corpo das colunas cromatográficas foi confeccionado na oficina mecânica do Instituto de Química da UNICAMP, com tubos de aço inoxidável 316. A superfície interna do corpo da coluna foi polida, através da passagem no interior do tubo, de uma haste metálica, envolta com lã de aço e pasta de polimento, acoplada a uma furadeira. Após o polimento, estes tubos foram lavados com ácido nítrico 50 %, água, detergente, acetona e metanol, com o objetivo de deixar a superfície interna livre de impurezas. Colunas com a superfície interna bem polida contribuem para enchimentos mais eficientes e melhor desempenho cromatográfico ¹²⁷. Colunas de 60 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno, dotados com filtros e conexões, como indicado na Figura 10, foram utilizadas durante todo o trabalho. Somente foi utilizada uma coluna de 150 mm de comprimento, na última parte do trabalho, para a análise de misturas complexas.

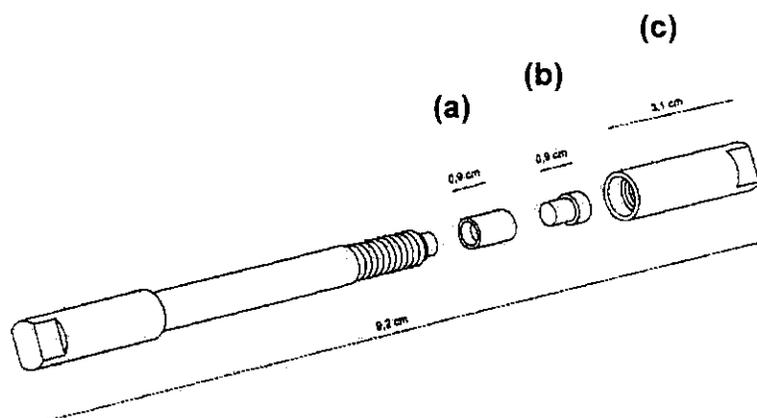


Figura 10. Coluna cromatográfica e suas conexões, a) filtro e anel de alinhamento, b) redutor e c) terminal.

3.6.2. Enchimento das colunas com as fases estacionárias

3.6.2.1. Preparação da suspensão

A concentração da suspensão utilizada para o enchimento das colunas foi de 10 % (m/v) em clorofórmio. Esta concentração é apropriada para evitar o risco da formação de aglomerados e a sedimentação das partículas¹²⁸. Assim, de acordo com o volume da coluna, uma quantidade adequada de fase estacionária foi pesada num tubo de ensaio, ao qual foi adicionado o clorofórmio como solvente de suspensão. A suspensão foi mantida sob agitação constante durante ~14 horas no agitador Rototorque⁵⁸.

3.6.2.2. Recheio das colunas

As colunas cromatográficas foram recheadas utilizando o sistema mostrado na Figura 11, que consiste de um cilindro de nitrogênio, uma bomba de enchimento Haskel, com faixa de pressão de 6,9 a 344,8 MPa (1000 a 50000 psi), um reservatório de suspensão de 32 mL e a coluna. O método baseia-se na passagem do solvente

propulsor (metanol), a alta pressão, para deslocar a suspensão do reservatório de suspensão até a coluna.

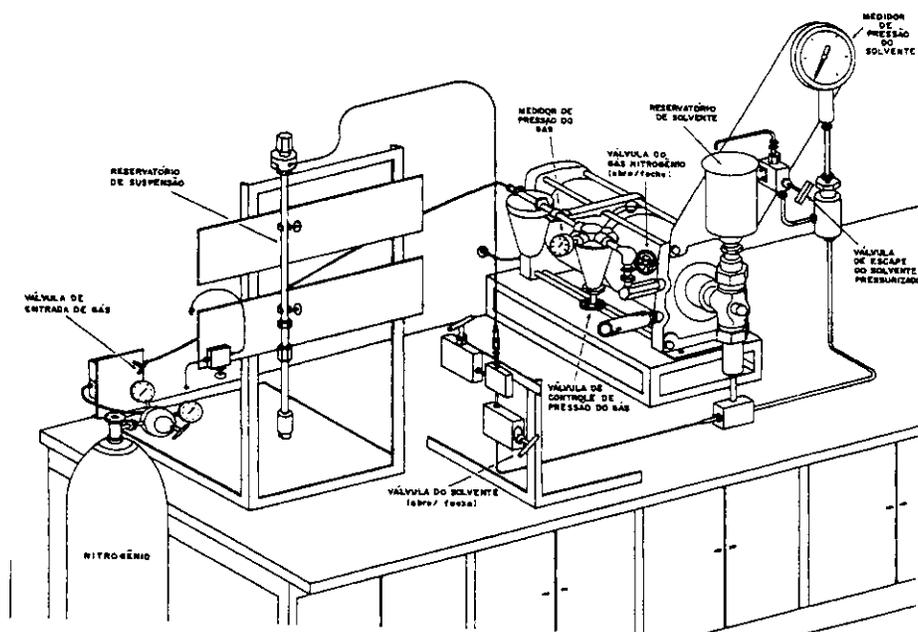


Figura 11. Esquema do sistema de enchimento de colunas.

Para realização do enchimento, a coluna é conectada ao reservatório da suspensão, sendo previamente colocados na sua parte inferior o filtro, o anel de alinhamento, o redutor e o terminal, para evitar a saída da fase estacionária. A suspensão é rapidamente transferida para o reservatório de suspensão, sendo adicionado clorofórmio até preencher todo o volume do reservatório. Em seguida, é colocada a tampa que fecha o reservatório de suspensão. Uma vez fixada a pressão de 5000 psi (34,5 MPa), abre-se a válvula de saída do solvente, sendo somente fechada após passagem de 80 mL de metanol, recolhidos em uma proveta colocada após a saída da coluna. A seguir, a coluna fica em repouso por uns 20 minutos para despressurizar o sistema. Por último, a coluna é desconectada do reservatório, e na extremidade ligada ao reservatório, colocando-se as respectivas conexões, fechando-se as duas extremidades com tampas de "PEEK" para evitar a evaporação do solvente dentro da coluna. Duas a três colunas diferentes foram recheadas para cada fase estacionária preparada.

3.6.3. Condicionamento pós-enchimento das colunas

Após o enchimento da coluna, é preciso fazer seu condicionamento 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.

Quando é feito o condicionamento, a coluna não deve estar acoplada ao detector, para evitar que partículas provenientes da coluna possam obstruir a tubulação de entrada ou saída do detector ou a cela de detecção. Este condicionamento foi feito por um período de 3 horas, no mínimo, a uma vazão de 0,3 mL min⁻¹, utilizando como fase móvel metanol:água (70:30 v/v).

3.6.4. Fase móvel

Os solventes utilizados para preparar a fase móvel podem conter possíveis impurezas residuais que irão provocar entupimentos nos capilares, danificar as bombas e afetar o desempenho da coluna. Para evitar estes problemas, antes de preparar a fase móvel, os solventes foram filtrados com uma membrana de Nylon de 0,45 µm de porosidade. Outro fator que pode prejudicar o processo cromatográfico são as bolhas de ar presentes na fase móvel, por isso ela foi desgaseificada em ultra-som sob vácuo, antes de ser colocada no reservatório da fase móvel.

3.6.5. Condições cromatográficas

Neste trabalho foram utilizadas duas misturas testes para a avaliação das fases estacionárias:

Mistura 1: uracil, acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno.

Mistura 2: uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno.

A mistura 1 tem por objetivo avaliar o comportamento da coluna com compostos neutros de polaridades diferentes e a mistura 2 com compostos de caráter ácido (fenol), básico (N,N-dimetilanilina) e neutros (naftaleno e acenafteno). O uracil foi utilizado para medir o tempo de retenção de um composto não retido, t_M . Os compostos das misturas foram dissolvidos em fase móvel metanol:água (70:30 v/v) e mantidos em geladeira. O volume de amostra injetado foi de 10 μL e a detecção foi feita por UV em 254 nm. A fase móvel utilizada para todos os testes consistiu da mistura metanol:água (70:30 v/v) e a vazão de 0,3 mL min^{-1} .

O naftaleno (mistura 1) e o acenafteno (mistura 2) foram os compostos escolhidos para calcular a eficiência cromatográfica, por serem muito utilizados para este fim na literatura ¹⁹, devido às suas características neutras e bastante apolares. O tempo de retenção de compostos neutros está relacionado com a quantidade de fase estacionária orgânica presente, e portanto com as suas propriedades hidrofóbicas.

A resolução foi determinada pela separação dos picos tolueno-naftaleno na mistura 1 e N,N-dimetilanilina-naftaleno na mistura 2. A assimetria (A_s) foi avaliada para o naftaleno (mistura 1) e fenol, N,N-dimetilanilina e acenafteno (mistura 2) a fim de verificar a presença ou não de silanóis residuais (pela N,N-dimetilanilina) ou grupos residuais básicos (fenol).

Os cálculos dos parâmetros cromatográficos foram obtidos através do software "Report Write Plus", contido no sistema de aquisição de dados cromatográficos "Chrom Perfect" (Justice Inovations). Para avaliação do comportamento cromatográfico foram feitas de duas a três injeções em cada coluna recheada.

3.7. Caracterização físico-química das fases estacionárias após avaliação cromatográfica

Com o objetivo de obterem informações a respeito da proporção de PMOS imobilizado nas diferentes fases estacionárias e o grau de cobertura dos grupos hidroxilas pela camada polimérica foram feitas caracterizações das FE após o seu uso cromatográfico, utilizando as técnicas de análise elementar, espectroscopia no

infravermelho e análise termogravimétrica. As fases otimizadas em cada tratamento também foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear para avaliar as possíveis interações entre o PMOS e o suporte.

3.7.1. Análise Elementar

Com os valores de porcentagem de carbono obtidos nas medidas de análise elementar foi calculada a espessura da camada orgânica (τ) através da equação 13

126

$$\tau = - \left(\frac{\sqrt{d^2 - Fd^2} - d}{2} \right) \quad (13)$$

onde: d = diâmetro de poro da sílica (nm),

$$F = \frac{\bar{m}_{PMOSretido}}{\bar{m}_{PMOSporoscheios}} \quad (14)$$

$$\bar{m}_{PMOSretido} = \frac{\% C}{62 - \% C} \quad (15)$$

sendo que 62 % representa a massa do PMOS referente ao carbono.

O $\bar{m}_{PMOSporoscheios}$ é obtido do volume de poro específico, v_p , da sílica e, a densidade, ρ , do polímero:

$$\bar{m}_{PMOSporoscheios} = v_{p_{SiO_2}} (mL/g) \times \rho_{PMOS} (g/mL) \quad (16)$$

3.7.2. Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho do suporte de sílica titanizada e das fases estacionárias foram obtidos sob a forma de pastilhas em brometo de potássio, no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . Através da presença de bandas características, o grau de recobrimento dos grupos silanóis pelo PMOS e a incorporação do polímero no suporte foram avaliados qualitativamente.

3.7.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear

Os espectros de ^{29}Si por ressonância magnética nuclear com polarização cruzada segundo rotação em ângulo mágico foram obtidos com um rotor de zircônia em uma velocidade de rotação de 100 MHz, com um tempo de contato de polarização cruzada de 5 ms e um intervalo de pulso de 2 s.

3.8. Avaliação da estabilidade de fases estacionárias

As fases estacionárias que apresentaram melhores desempenhos em cada um dos tratamentos de imobilização foram avaliadas em fase móvel básica e comparadas com uma fase preparada com sílica não titanizada. Este procedimento serviu para avaliar a incorporação do titânio na sílica e verificar se os tratamentos usados para imobilizar o polímero na sua superfície forneceram fases estáveis. As condições de avaliação utilizadas foram drásticas^{112,129}, uma vez que os teste convencionais são muito demorados e consomem muito solvente. Assim, o teste utilizado indica de maneira mais rápida qual das fases apresenta maior estabilidade. A fase móvel utilizada consistiu na mistura de metanol:solução básica (50:50 v/v) a 0,6 mL min^{-1} e temperatura de 60 °C. A solução básica foi preparada com 0,1 mol L^{-1} de NaHCO_3 com o pH ajustado a 10 com 1,0 mol L^{-1} de NaOH . As avaliações cromatográficas foram realizadas nas mesmas condições de fase móvel, vazão e temperatura, sendo

feitas injeções da mistura 1 a cada 15 minutos. O teste foi concluído com a total degradação da coluna.

Uma coluna preparada com fase estacionária imobilizada a 120 °C por 8 h em atmosfera de nitrogênio foi testada em fase móvel neutra metanol:água (70:30 v/v) em temperatura ambiente, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹. As avaliações cromatográficas foram realizadas com a vazão reduzida para 0,3 mL min⁻¹. Por serem condições menos drásticas, as avaliações foram feitas em intervalos maiores que no teste em meio básico. O teste foi concluído após a passagem de 37000 volumes de coluna (V_c). Os valores de V_c foram calculados pela equação 17.

$$V_c = \pi \cdot r^2 \cdot L \quad (17)$$

onde: r = raio da coluna (mm) e L= comprimento da coluna (mm).

Os valores de eficiência (N/m), assimetria (As) e fator de retenção (k) para o pico do naftaleno foram monitoriados durante a realização dos testes.

3.9. Análise de misturas complexas

Colunas de 150 e 250 mm de comprimento são as tipicamente comercializadas, por permitirem melhor resolução dos compostos. Porém, durante o trabalho de preparação e avaliação da qualidade das fases estacionárias foram usadas colunas de comprimentos menores (60 mm), com o intuito de economizar sílica, a qual tem um custo elevado. Mas, para a análise de misturas complexas, que normalmente não são separados em colunas menores, foi utilizada uma coluna de 150 mm de comprimento. Esta coluna foi recheada com uma fase estacionária de sílica Astrosil com PMOS imobilizado a 120 °C por 8 h, em atmosfera de nitrogênio. As estruturas dos compostos analisados são mostradas na Figura 12. As misturas e as condições de análise utilizadas são mostradas a seguir:

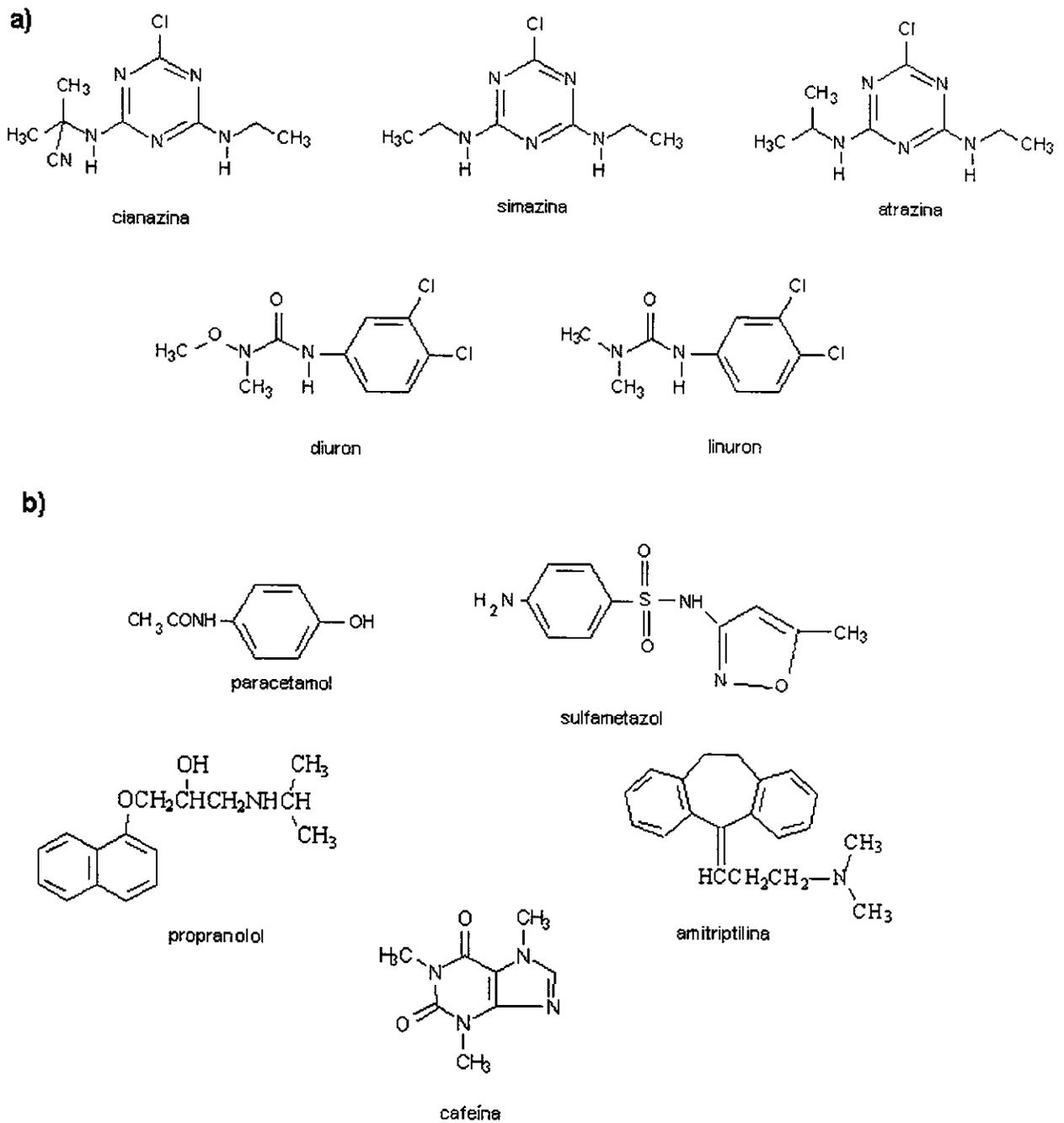


Figura 12. Estruturas dos herbicidas (a) e fármacos (b) utilizados na avaliação da aplicação das fases estacionárias.

Mistura de herbicidas:

Foram avaliados 5 herbicidas (cianazina, simazina, atrazina, diuron e linuron) (Figura 12 a) utilizando como fase móvel metanol:água (50:50 v/v) na vazão de 0,6 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C, volume de injeção de 5 µL, no comprimento de onda de 230 nm.

Mistura de fármacos:

Diferentes compostos básicos (sulfametazol, paracetamol, cafeína, propranolol e amitriptilina) (Figura 12 b), foram analisados em fase móvel básica composta de metanol:0,02 mol L⁻¹ K₂HPO₄/KOH, pH 10, no comprimento de onda de 254 nm e volume de injeção de 5 µL.

- a) sulfametazol, paracetamol e cafeína foram separados usando uma proporção de metanol:solução tampão (30:70 v/v), a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹.
- b) O propranolol e a amitriptilina foram separados em temperatura de 30 °C, vazão de 1,0 mL min⁻¹, com a proporção metanol:solução tampão (80:20 v/v).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização das condições de preparação do suporte de sílica titanizada

4.1.1. Sílica Rainin

A Tabela 4 mostra os resultados da porcentagem de titânio (obtidas por FRX) incorporado na superfície da sílica Rainin com o uso de diferentes temperaturas de reação.

Tabela 4. Porcentagens de titânio nas amostras preparadas com sílica Rainin titanizadas a diferentes temperaturas.

Ensaio	Temperatura (°C)	% Ti		$\mu\text{mol Ti} / \text{m}^2$	OH / Ti ^a
1, 2	40	3,03	3,01	3,40	2,2
3	19	3,21	-	3,64	2,0
4	19 (com agitação x 7 h)	3,34	-	3,79	1,9
5	19 (com agitação x 20 h)	3,45	-	3,92	1,9
6, 7	2	3,33	3,37	3,80	1,9
8, 9	-8	3,35	3,34	3,80	1,9

a: $(\mu\text{mol OH} / \text{m}^2) / (\mu\text{mol Ti} / \text{m}^2)$

Levando-se em conta a área superficial desta sílica, a quantidade teórica de titânio necessária para reagir com o máximo de silanóis disponíveis na superfície é de 3,37 %. Portanto, os resultados que mais se aproximam deste valor são os obtidos em temperaturas mais baixas (2 e -8 °C), sendo que, em temperatura ambiente, a quantidade de titânio depositado na sílica aumenta quando é utilizada a agitação. Supondo a formação de uma monocamada de titânia na superfície da sílica, os valores de OH/Ti sugerem que cada átomo de titânio encontra-se ligado a dois grupos silanóis.

4.1.2. Sílica Kromasil

Os resultados da porcentagem de titânio na superfície da sílica Kromasil são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Porcentagens de titânio nas amostras preparadas com sílica Kromasil.

Ensaio	Temperatura (°C)	Uso de centrifugação	% Ti	$\mu\text{mol Ti} / \text{m}^2$	OH / Ti ^a
1	2	Sim	6,21	4,39	1,6
2	2	Não	6,65	4,74	1,5
3	25	Sim	6,25	4,42	1,6
4	25	Não	6,02	4,24	1,7

a: $(\mu\text{mol OH} / \text{m}^2) / (\mu\text{mol Ti} / \text{m}^2)$

A sílica Kromasil apresenta maior área superficial que a sílica Rainin. Por isso, a porcentagem de titânio teoricamente necessária para formar uma monocamada na superfície da sílica é maior (5,49 %). No entanto, os valores de titânio obtidos, seguindo este procedimento, foram superiores ao valor esperado. Isto pode ser devido à presença de um maior número de silanóis na superfície da sílica. É importante esclarecer que a concentração máxima de silanóis na superfície é de $8 \mu\text{mol m}^{-2}$, conforme relata a literatura ²⁵. Entretanto, existe uma grande discussão e controvérsias sobre este valor. Assim, utilizou-se $7,64 \mu\text{mol m}^{-2}$, que representa uma média dos valores obtidos em diferentes sílicas, pois podem ocorrer variações deste valor de uma sílica para outra, dependendo de suas características estruturais.

Os resultados mostrados na Tabela 5 indicam valores de porcentagens de titânio similares quando é utilizada a centrifugação para ambas as temperaturas. Porém, quando não é feita esta etapa, observam-se resultados discordantes, e este parâmetro é novamente avaliado no item a seguir. Nesta sílica, segundo os valores de OH/Ti, cada átomo de titânio pode estar ligado a um ou dois grupos silanóis.

4.1.3. Sílica Astrosil

Baseado nos resultados anteriores, foi fixada a temperatura de 2 °C nos ensaios com a sílica Astrosil e o uso ou não de centrifugação foi novamente avaliado. Além disto, foram avaliados o tempo de reação e a influência da umidade na sílica no processo de titanização. Na Tabela 6 aparecem os valores de % Ti, assim como as médias e variâncias obtidas nas amostras preparadas seguindo o planejamento fatorial 2³.

Pode-se observar que os maiores valores foram os obtidos nas amostras onde o fator principal 1 esteve no nível superior (+), ou seja, quando a sílica foi umedecida antes da adição do reagente de tetrabutóxido de titânio. Para esta sílica, a quantidade teórica de titânio necessária para formar uma monocamada na superfície é de 5,78 %.

Tabela 6. Resultados do planejamento fatorial 2³ da titanização com a sílica Astrosil ^a.

Ensaio	(1)	(2)	(3)	% Ti		Média	S ²
I	-	-	-	7,81	7,79	7,80	0,00026
II	+	-	-	8,42	8,35	8,39	0,00231
III	-	+	-	7,79	7,83	7,81	0,00054
IV	+	+	-	8,37	8,49	8,43	0,00720
V	-	-	+	7,81	7,74	7,77	0,00259
VI	+	-	+	8,49	8,46	8,48	0,00048
VII	-	+	+	7,74	7,60	7,67	0,00994
VIII	+	+	+	8,48	8,54	8,51	0,00174

^a condições na tabela 3

Estimativa conjunta da variância:

$$S_p^2 = v_1 S_1^2 + v_2 S_2^2 + \dots + v_m S_m^2 / (v_1 + v_2 + \dots + v_m) = 0,0251 / 8 = 0,0031$$

Variância de um efeito:

$$V_{\text{efeito}} = V(y_+ - y_-) = V(y_+) + V(y_-) = (S_p^2 / 8) + (S_p^2 / 8) = S_p^2 / 4 = 0,0063$$

Erro padrão de um efeito:

$$S_{\text{efeito}} = (V_{\text{efeito}})^{1/2} = 0,0792$$

A partir dos efeitos calculados, mostrados na Tabela 7, consideram-se estatisticamente significativos aqueles efeitos cujas estimativas obtidas no experimento forem superiores em valor absoluto ao produto do erro padrão (S_{efeito}) com o ponto da distribuição de Student com 8 graus de liberdade (t_8) a 95 % de confiança (valor tabelado= 2,306).

Neste caso: $t_8 \times S_{\text{efeito}} \rightarrow 2,306 \times 0,0792 = 0,1826$. Portanto, pode-se dizer que o efeito principal 1 (umidade na sílica) constitui o único efeito que verdadeiramente influencia no aumento da quantidade de titânio.

Tabela 7. Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^3 da Tabela 6 e seus erros padrão (em %).

	Estimativa \pm erro padrão
Média	5,1075 \pm 0,0396
Efeitos principais	
(1)	0,6900 \pm 0,0792
(2)	-0,0050 \pm 0,0792
(3)	0,0000 \pm 0,0792
Efeitos de interação de dois fatores	
(1)(2)	0,0400 \pm 0,0792
(1)(3)	0,0850 \pm 0,0792
(2)(3)	-0,0300 \pm 0,0792
Efeitos de interação de três fatores	
(1)(2)(3)	0,0250 \pm 0,0792

O mesmo resultado pode ser visualizado no gráfico normal das estimativas (Figura 13), onde o efeito principal 1 encontra-se distante do zero do eixo X.

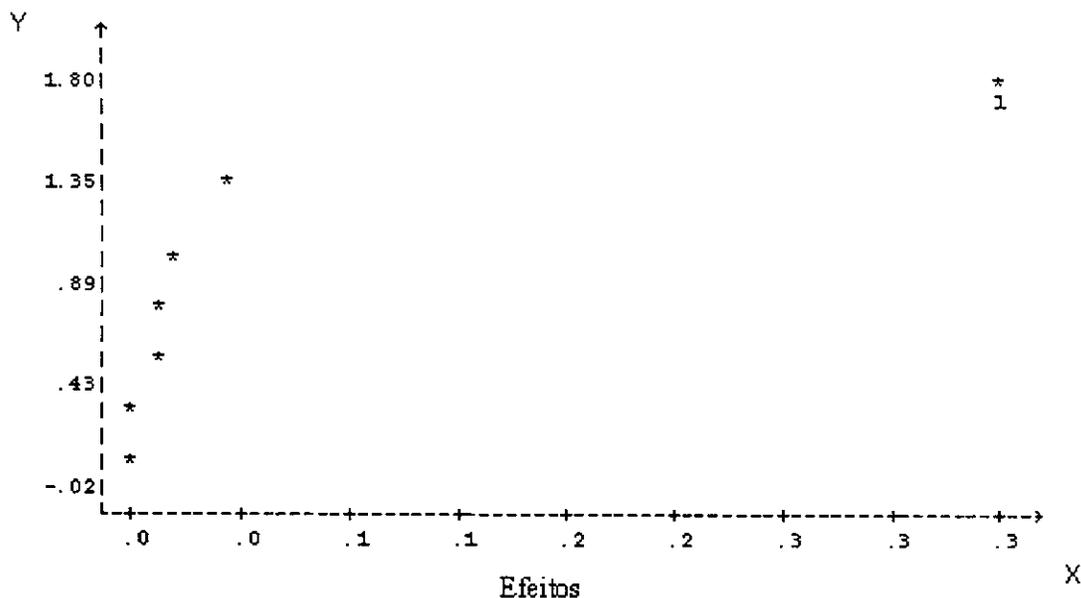


Figura 13. Gráfico normal das estimativas.

4.2. Caracterização físico-química de suportes cromatográficos de sílicas Astrosil nua e titanizadas

4.2.1. Caracterização das sílicas por Espectrometria de Absorção Atômica por Chama

Os resultados do conteúdo de metais presentes nas sílicas puras são mostrados na Tabela 8. Segundo estes valores pode-se dizer que o grau de pureza da sílica Astrosil foi maior que o da Kromasil e da Rainin, sendo que esta última apresentou uma quantidade bem maior de maiores resíduos de metais, provenientes do processo de fabricação.

Tabela 8. Concentração de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) nas sílicas puras obtidas por FAAS.

Elemento	Rainin	Kromasil	Astrosil
Li	<1	<2	<2
Na	109	20	9
Mg	8,8	16	4,5
Al	140	12	4,5
K	21	<2	<2
Ti	26	<2	<2
Cr	<1	<2	<2
Mn	<1	<2	<2
Fe	102	12	9
Co	<1	<2	<2
Ni	<1	<2	<2
Cu	<1	<2	<2
Zn	<1	<2	<2
Cd	-	<2	<2
Sn	-	<2	<2
Pb	-	<2	<2

- = não determinado

4.2.2. Análise Termogravimétrica (TGA)

A Figura 14 e a Tabela 9 mostram as % de perda de massa de suportes de sílicas nua e após titanização em superfície ativada (seca) ou hidratada (úmida).

Em linhas gerais, quando os materiais foram submetidos ao aquecimento, sofreram uma perda de massa inicial que é atribuída ao processo de eliminação de água fisicamente adsorvida, o que explica a maior perda de massa ocorrida na sílica que foi titanizada com a superfície úmida. Em temperaturas mais altas, entre 150 e 600 °C, as perdas de massa são atribuídas à água quimicamente adsorvida e à desidroxilação dos grupos silanóis e, possivelmente, grupos titanóis, dando origem a formação dos grupos M-O-M (M = Si ou Ti).

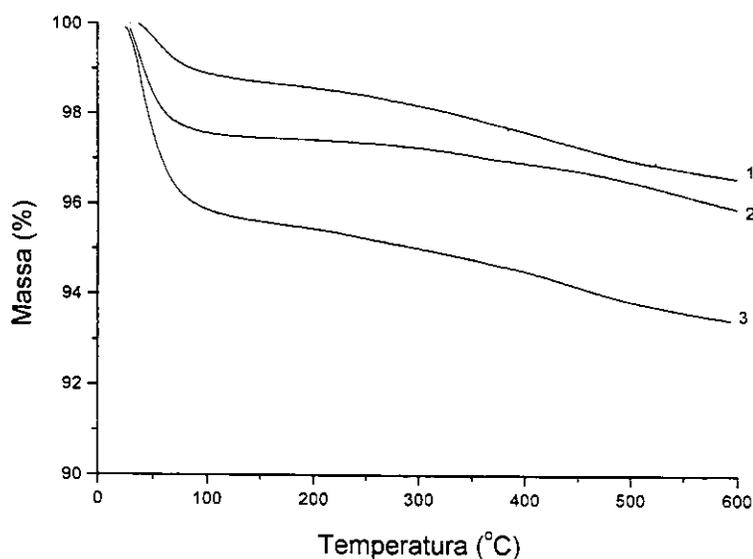


Figura 14. Curvas termogravimétricas dos suportes de sílica nua (2) e titanizadas em superfície seca (1) e úmida (3).

Tabela 9. Perdas de massa obtidas das curvas de TGA dos suportes de sílica Astrosil nua e titanizada em superfícies seca ou úmida.

Tipo de suporte	% de perda de massa	
	25 a 150 °C	150 a 600 °C
Sílica nua seca	2,4	2,6
Sílica seca titanizada	1,4	3,1
Sílica úmida titanizada	4,5	2,1

Apesar das sílicas nua e titanizada em superfície seca serem previamente ativadas, observa-se que a sílica nua apresentou uma perda de massa um pouco maior. Isto pode ser devido ao fato que a sílica nua adsorve água do ambiente com facilidade. Entretanto, com a incorporação de titânio na sua superfície resultou na exposição de um menor número de grupos silanóis capazes de se ligarem à água por pontes de hidrogênio.

4.2.3. Análise Elementar e Fluorescência de Raios-X

Os valores de porcentagem de carbono e de titânio obtidos nos suportes de sílicas nua e titanizadas, através das técnicas de análise elementar e de fluorescência de raios-X, podem ser vistos na Tabela 10. Também foram analisadas sílicas hidroxiladas e titanizadas em superfícies úmidas.

Segundo os resultados da Tabela 10, a sílica nua apresenta alta porcentagem de carbono, provavelmente, devido a presença de material orgânico que não foi eliminado durante a sua síntese, e por isso houve, a necessidade de adicionar a etapa de hidroxilação. No caso das sílicas titanizadas, valores de carbono maiores que 1 podem ser devido à impurezas da sílica ou a presença de butóxido não hidrolisado.

Tabela 10. Porcentagem de carbono e de titânio obtidas nos suportes de sílicas Astrosil nua e titanizadas.

Suporte	Temperatura de titanização (°C)	% C	% Ti	$\mu\text{mol Ti} / \text{m}^2$	OH / Ti ^a
SiO ₂ nua	-	3,7	-	-	-
SiO ₂ seca / TiO ₂	2	1,6	7,8	5,34	1,06
SiO ₂ úmida / TiO ₂	2	1,1	8,4	5,82	0,98
SiO ₂ hidroxilada	-	0,7	-	-	-
SiO ₂ hidrox/úmida / TiO ₂	2	0,6	8,9	6,26	0,91
SiO ₂ hidrox/úmida / TiO ₂	40	0,9	8,4	5,82	0,98

a: $(\mu\text{mol OH} / \text{m}^2) / (\mu\text{mol Ti} / \text{m}^2)$

Como se observa na Tabela 10, houve uma redução na porcentagem de carbono quando a sílica foi modificada, sendo mais acentuada quando foram submetidas à hidrólise ácida (hidroxilação), o que indica que foram arrastadas possíveis impurezas orgânicas que poderiam ser introduzidas na superfície durante a sua síntese. As sílicas hidroxiladas após titanização mantiveram valores baixos de % C, mostrando uma hidrólise efetiva dos grupos butóxidos que não reagiram.

Os resultados de Fluorescência de Raios-X, como discutido no item 4.1.3, indicam que a titanização sobre sílica úmida aumenta a quantidade de titânio na superfície do suporte em relação à reação com a sílica seca. Além disso, temperaturas menores favorecem uma maior deposição de titânio, que pode ser visto nos valores de % Ti obtidos nas sílicas hidroxiladas e posteriormente titanizadas em superfície úmida, usando temperaturas de 2 e 40 °C. Assim, pode-se notar que a hidroxilação também aparece como um parâmetro positivo na obtenção de maiores valores de titânio, uma vez que, através deste processo, um maior número de silanóis livres ficam expostos para participar da reação. Os valores obtidos de OH/Ti indicam que a ligação dos átomos de titânio ocorre com um grupo silanol.

4.2.4. Determinação do volume e diâmetro médio dos poros

As medidas do volume e diâmetro médio dos poros dos suportes de sílicas nua e titanizadas podem ser vistas na Tabela 11.

Tabela 11. Volume e diâmetro de poro dos suportes de sílica Astrosil nua e titanizadas em superfície úmida ou seca.

Suporte	Volume total de poro (mL g⁻¹)	diâmetro médio de poro (Å)
SiO ₂ nua	0,9	132
SiO ₂ seca / TiO ₂	0,8	121
SiO ₂ úmida / TiO ₂	0,8	113

Os resultados indicam que houve uma diminuição tanto no volume quanto no diâmetro de poro quando a sílica nua foi modificada. Isto é explicado pela reação do reagente de titanização com os silanóis da superfície dos poros da sílica, que reduziu o acesso do nitrogênio nos poros durante as medidas. Também se observa que as duas sílicas titanizadas apresentam o mesmo valor de volume de poro, entretanto, o diâmetro de poro mostra-se menor para o suporte titanizado com a sílica úmida. Isto

pode ser devido à maior quantidade de titânio presente no suporte, como visto na Tabela 10.

4.2.5. Espectroscopia de Absorção de Raios-X (XAS)

Através dos espectros de absorção obtidos por XAS foram feitas as análises de XANES e de EXAFS. Suportes de sílicas titanizadas em trabalhos anteriores feitos no LabCrom (com tetrabutóxido e tetracloreto de titânio), utilizando condições mais drásticas de síntese¹¹, foram também incluídos para comparação.

A titânia pura pode ser encontrada principalmente nas formas cristalinas anatasia (porosa, 5-15 μm) ou rutila (não porosa, 1-2 μm) e apresentam simetria octaédrica¹³⁰, a qual é observada pela posição dos três picos na pré-borda de absorção K do titânio (A_1 , A_2 e A_3), como visto na Figura 15. Verificou-se um pequeno deslocamento do pico A_2 para menores energias nos espectros das 4 amostras de sílicas titanizadas, quando comparados com os das titânias puras, indicando que os átomos de titânio apresentam uma geometria diferente. Os espectros de XANES das amostras de sílicas titanizadas mostram comportamentos similares entre si, o que faz supor que a geometria do titânio depositado foi a mesma, independente do método de síntese.

Através da análise dos dados do espectro EXAFS foram obtidos os parâmetros estruturais pelas filtragens das funções de fase e amplitude experimentais utilizando titânia pura, tipo anatasia, como composto de referência. Com a transformada de Fourier foram identificadas as contribuições de cada cela, sendo estudado o primeiro nível que corresponde à ligação Ti-O (Figura 16).

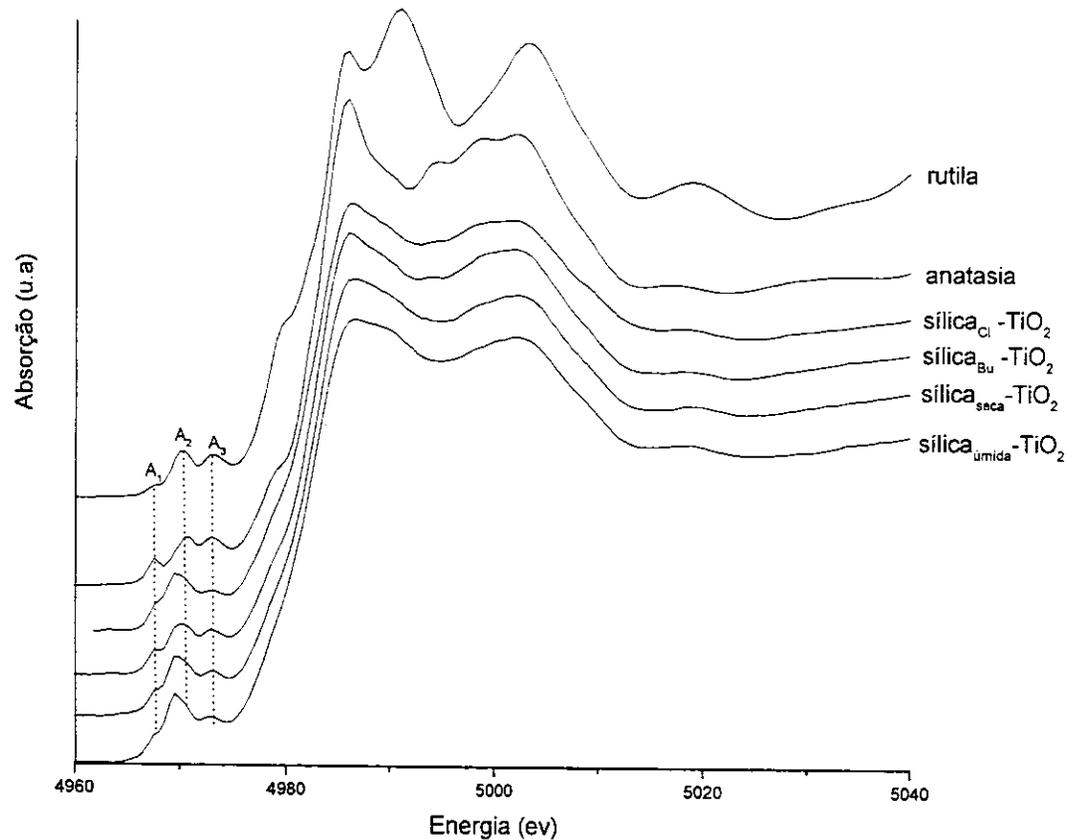


Figura 15 Espectros XANES de suportes de sílicas titanizadas e de titânia pura nas formas rutila e anatásia. Sílica_{Cl}-TiO₂ e Sílica_{Bu}-TiO₂ foram preparadas com tetracloreto e tetrabutóxido de titânio em condições mais drásticas ¹¹ utilizando uma sílica Davisil. Sílica_{seca}-TiO₂ e Sílica_{úmida}-TiO₂ foram as preparadas neste trabalho com sílica Astrosil.

Como pode ser visto na Tabela 12, os resultados de EXAFS indicam que o titânio pode ter sido incorporado no suporte de sílica na forma tetra-coordenada. Na literatura tem sido reportado que, para concentrações de titânio menores de 15 % em massa, este apresenta uma estrutura tetra-coordenada. Já em concentrações maiores, começa-se a formar cristais de titânia, ocorrendo a transição de titânio tetraédrico para octaédrico ¹⁰⁴.

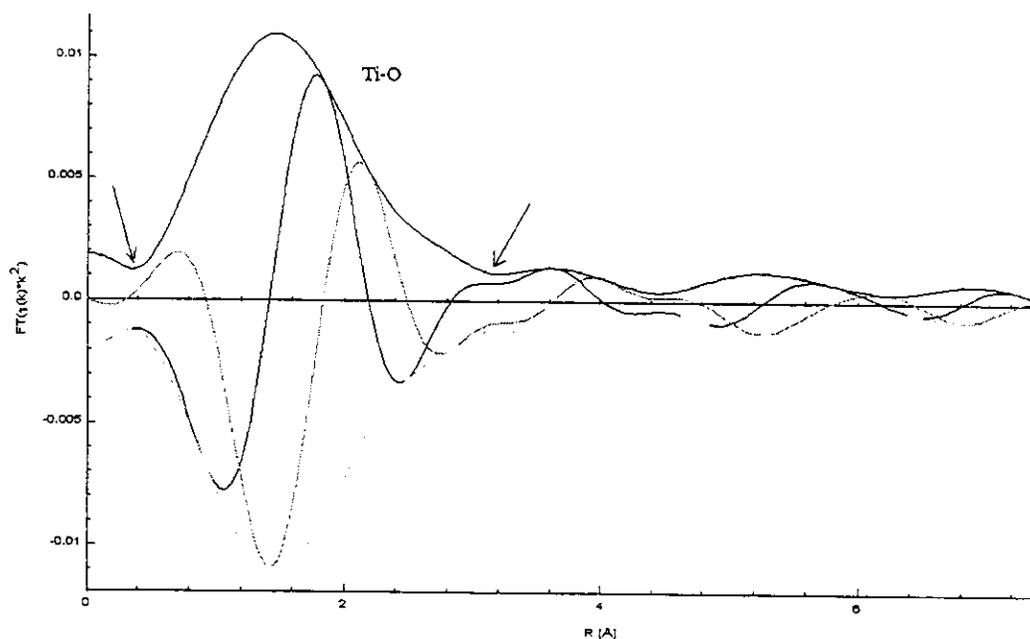


Figura 16. Transformada de Fourier do espectro EXAFS do suporte de sílica titanizada em superfície úmida.

Tabela 12. Número de coordenação e distância da ligação Ti-O obtidas por EXAFS para os suportes de sílicas titanizadas.

Suporte	Número de coordenação (N)	Distância da ligação Ti-O (R) / (Å)
SiO ₂ seca / TiO ₂	4	1,95
SiO ₂ úmida / TiO ₂	4	1,96
SiO ₂ Bu / TiO ₂	5	1,95
SiO ₂ cl / TiO ₂	5	1,96

4.2.6. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na Figura 17 estão apresentadas as imagens adquiridas das sílicas Astrosil nua e modificada com titânio em superfície úmida. Pode-se notar que as partículas têm forma esférica e, como mostrado nas medidas aleatórias de tamanho, as partículas apresentam uma dispersão que varia de 4 a 7 μm . Após titanização, a sílica

aparentemente não mostrou diferenças na forma nem no tamanho de partícula. Porém, sabe-se que ocorreram mudanças dentro dos poros do suporte.

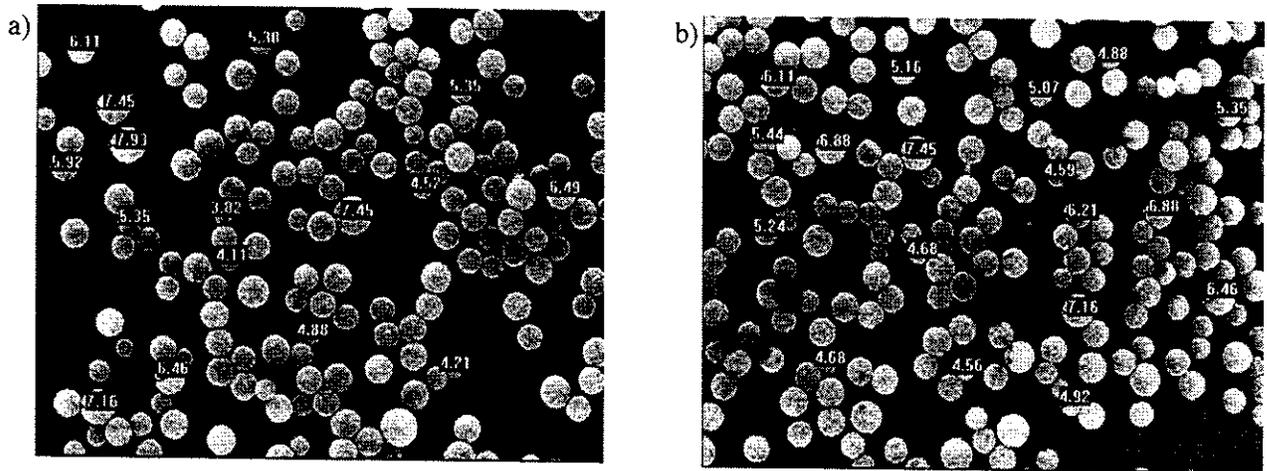


Figura 17. Imagens no MEV dos suporte de: a) sílica nua e b) sílica titanizada em superfície úmida, com aumento de 1K.

4.2.7. Difração de raios-X

Os difractogramas de difração de raios-X das amostras de titânia na forma anatásia e das sílicas titanizadas em superfícies seca ou úmida, são mostrados na Figura 18.

A titânia é cristalina, e, por isso, no difractograma de difração de raios-X, aparecem picos bem resolvidos e estreitos (Figura 18 c). Quando são comparados os espectros obtidos das sílicas modificadas com o de anatásia, observa-se uma banda larga, característica de estrutura amorfa. Assim, pode-se dizer que o titânio incorporado na sílica não formou cristais de titânia, indicando a ocorrência de outros tipos de ligações.

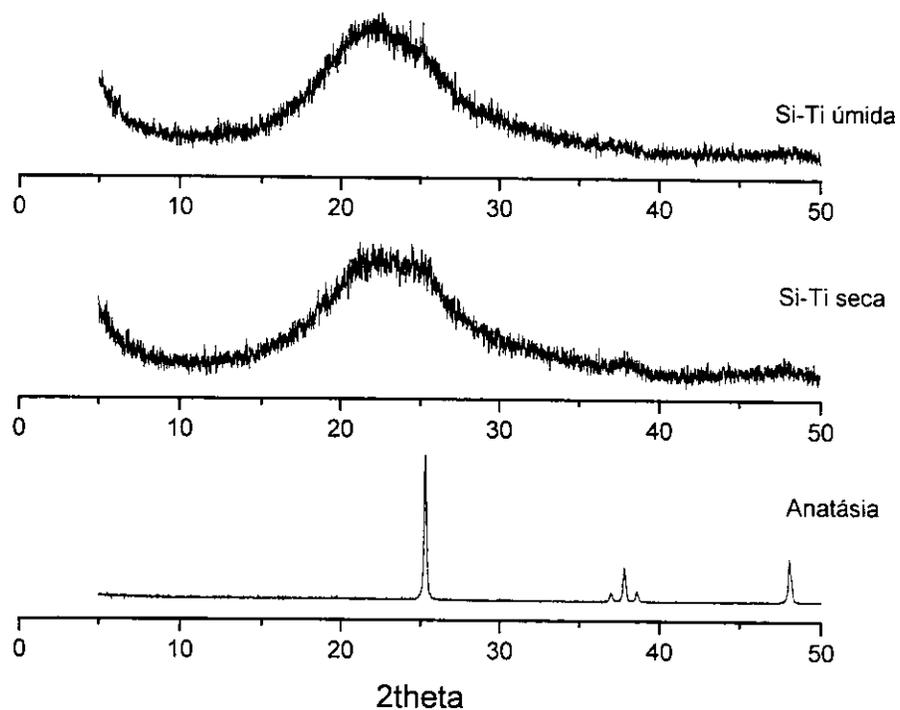


Figura 18. Difractogramas de difração de raios-X da anatásia e das amostras de sílica titanizadas em superfícies seca ou úmida.

4.4. Caracterização das fases estacionárias imobilizadas por tratamento térmico

4.4.1. Em atmosfera ambiente

Os parâmetros cromatográficos das fases estacionárias preparadas com sílica Astrosil titanizada, com ou sem prévia hidroxilação, e imobilizadas na estufa na presença de ar, são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil titanizada com ou sem prévia hidroxilação, imobilizadas em atmosfera ambiente. Avaliação com a *mistura 1*. Média de duas colunas.

Tratamento Térmico	Hidroxilação	Eficiência (N/m) ^a	Assimetria (As) ^a	Fator de Retenção (k) ^a	Resolução (Rs) ^b	% C	τ (nm)
120 °C x 8 h	não	52.000	1,0	3,0	2,4	11,3	0,8
120 °C x 24 h	não	21.700	0,8	4,3	1,6	17,9	1,5
120 °C x 24 h	sim	54.400	1,5	4,3	2,5	18,2	1,6

^a pico do naftaleno, ^b par tolueno-naftaleno

Nota-se na Tabela 13 que a fase preparada com a sílica não hidroxilada, imobilizada a 120 °C por 8 h, mostrou melhores resultados cromatográficos do que a fase tratada termicamente por mais tempo. Quando a fase foi imobilizada por 24 h houve uma perda na eficiência da coluna e uma diminuição no valor de assimetria. Isto é devido à formação de uma camada polimérica com maior conteúdo de PMOS, a qual provoca uma velocidade de transferência de massa analito-fase estacionária mais lenta. Esta maior quantidade de PMOS é constatada pelo aumento no fator de retenção do pico do naftaleno e pelo valor de % de carbono. Entretanto, a fase preparada com sílica hidroxilada nas mesmas condições de imobilização apresentou um aumento na eficiência e melhor resolução ($R_s > 1,5$), apesar da espessura da camada polimérica ser quase igual à fase preparada com sílica não hidroxilada. Isto pode ser devido ao processo de hidroxilação que deixa mais sítios ativos disponíveis para interagir com o polissiloxano, o que pode ter contribuído para uma distribuição mais uniforme da camada polimérica na superfície do suporte. Porém, a eficiência desta última fase ainda é baixa para uma fase estacionária preparada com sílica de tamanho de partícula de 5 μm . A literatura indica, para tais partículas, valores de eficiência a partir de 70.000 pratos/m¹⁹. Os cromatogramas das fases imobilizadas, avaliadas com a mistura 1, podem ser vistos nas Figuras 19 e 20.

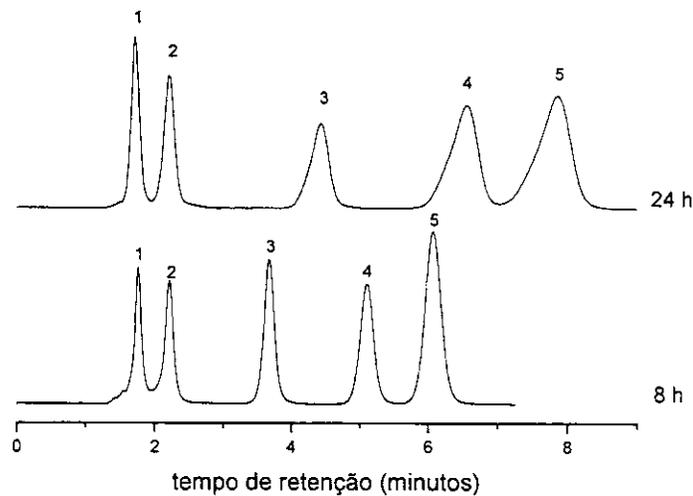


Figura 19. Cromatogramas das fases preparadas com sílica *Astrosil não hidroxilada* e PMOS, imobilizadas em atmosfera ambiente a 120 °C. *Mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

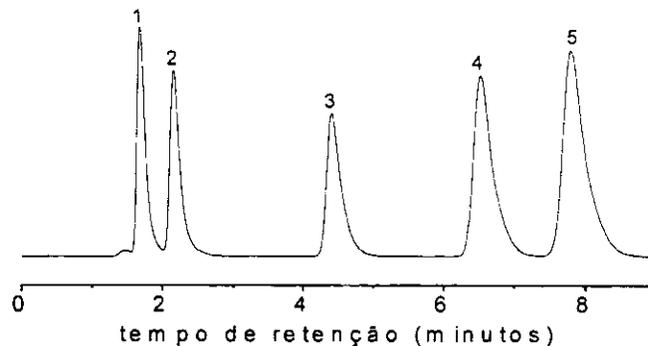


Figura 20. Cromatograma da fase preparada com sílica *Astrosil hidroxilada* e PMOS, imobilizada em atmosfera ambiente a 120 °C por 24 h. *Mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

Tabela 14. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil titanizada com ou sem hidroxilação prévia e PMOS, immobilizadas em atmosfera ambiente a 120 °C. Avaliação com a *mistura 2*. Média de duas colunas.

Tempo	Hidroxilação	Eficiência (N/m)		Assimetria (As) ^a				Fator de retenção (k) ^b	Resolução (Rs) ^c
		naftaleno	acenafteno	1	2	3	4		
8 h	não	76.200	78.100	1,3	3,1	1,0	0,9	2,9	4,2
24 h	não	22.000	20.200	1,0	2,4	0,8	0,8	4,2	3,4
24 h	sim	54.400	66.500	1,5	2,5	1,5	1,3	4,3	1,2

^a 1=fenol, 2= N,N-dimetilanilina, 3= naftaleno e 4= acenafteno.

^b pico do naftaleno

^c par naftaleno-N,N-dimetilanilina

Uma alta assimetria foi observada para o pico da N,N-dimetilanilina nas três fases ($As > 1,6$), sendo maior com 8 h de imobilização, provavelmente devido à formação da camada polimérica menos espessa (Tabela 14). Estes resultados indicam que as condições de imobilização utilizadas não conseguiram cobrir eficientemente os grupos hidroxilas residuais da superfície do suporte, os quais interagiram com facilidade com o composto básico.

Os cromatogramas das Figuras 20 e 21 mostram que a N,N-dimetilanilina apresentou um pico deformado e com muita cauda nas três fases. Na fase não hidroxilada, imobilizada durante 24 h observa-se uma ligeira cauda frontal nos picos pertencentes aos compostos neutros mais hidrofóbicos, que pode ser devido a problemas do enchimento.

Nota-se também que o pico da N,N-dimetilanilina eluiu mais próximo ao pico do naftaleno na fase imobilizada por 24 h com sílica hidroxilada, comparada com a sílica não hidroxilada, indicando que ocorreram interações ligeiramente menores com esta fase estacionária. Assim, nos testes a seguir, os suportes de sílica foram hidroxilados antes da reação de titanização.

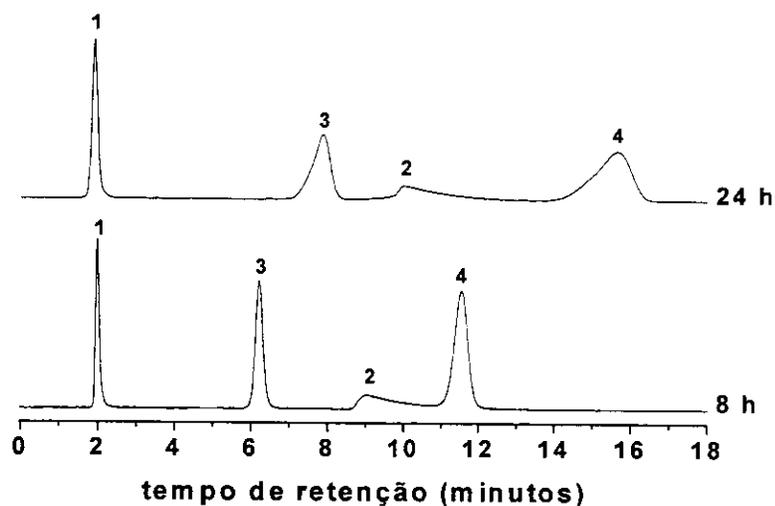


Figura 21. Cromatogramas das fases preparadas com sílica *Astrosil não hidroxilada* e PMOS, imobilizadas em atmosfera ambiente a 120 °C. *Mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteño. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

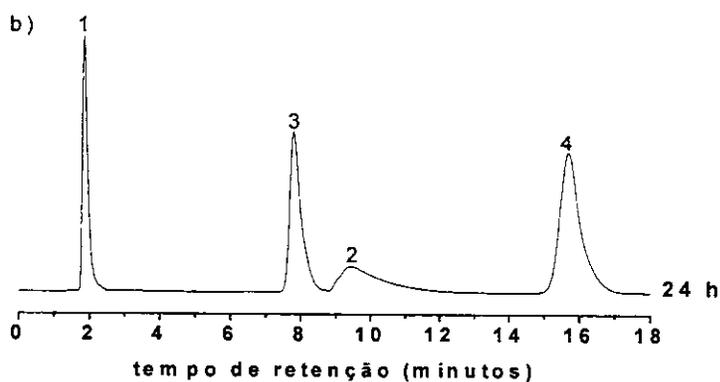


Figura 22. Cromatograma da fase preparada com sílica *Astrosil hidroxilada* e PMOS, imobilizada em atmosfera ambiente a 120 °C por 24 h. *Mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteño. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

Estudos de imobilização feitos com tratamento térmico em atmosfera ambiente, utilizando sílicas com características diferentes, foram realizados anteriormente no LabCrom. Os resultados mostraram que o tipo de sílica influencia bastante no comportamento cromatográfico de solutos básicos quando a fase orgânica é imobilizada em atmosfera ambiente. Sílicas nuas do tipo Kromasil (5 μm) e Davisil (10 μm), sorvidas com PMOS e posteriormente imobilizadas a 100 °C, apresentaram propriedades adequadas na separação de solutos básicos, com picos simétricos ⁴⁶. Porém, a sílica Rainin (5 μm) mostrou um comportamento similar ao encontrado com a sílica Astrosil (5 μm) utilizada neste trabalho. Como explicação, foi sugerida a existência de uma grande quantidade de silanóis livres na superfície da sílica ou um alto teor de metais em sua estrutura, que aumentam a acidez da superfície.

Com o intuito de saber se a alta retenção do composto básico deve-se às características da sílica nua ou à modificação feita na sua superfície (incorporação do titânio), foi avaliada uma fase estacionária preparada com sílica nua hidroxilada, imobilizada na estufa a 120 °C por 24 h. Os resultados são mostrados nas Tabelas 15 e 16 e na Figura 23.

Tabela 15. Parâmetros cromatográficos da fase preparada com sílica Astrosil hidroxilada não titanizada e PMOS, imobilizada em atmosfera ambiente, avaliada com a mistura 1. Média de duas colunas.

Tratamento térmico	Eficiência (N/m) ^a	Assimetria (As) ^a	Fator de retenção (k) ^a	Resolução (Rs) ^b	% C	τ (nm)
120 °C x 24 h	55.700	0,8	7,5	2,8	24,5	3,0

^a pico do naftaleno, ^b: par tolueno-naftaleno

Tabela 16. Parâmetros cromatográficos da fase preparada com sílica Astrosil hidroxilada não titanizada e PMOS, imobilizada em atmosfera ambiente, avaliada com a mistura 2. Media de duas colunas.

Tratamento térmico	Eficiência (N/m)		Assimetria (As) ^a				Fator de retenção (k) ^b	Resolução (Rs) ^c
	naftaleno	acenafteno	1	2	3	4		
120 °C x 24 h	57.300	59.300	1,3	0,9	0,6	0,7	7,5	4,2

^a 1=fenol, 2= N,N-dimetilanilina, 3= naftaleno e 4= acenafteno.

^b pico do naftaleno

^c par N,N-dimetilanilina-naftaleno

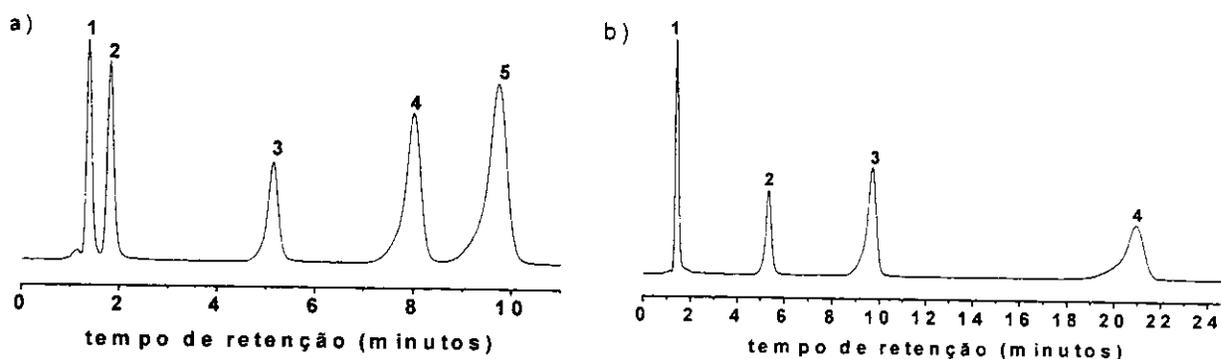


Figura 23. Cromatogramas da fase preparada com sílica *Astrosil hidroxilada não titanizada* e PMOS, imobilizada em atmosfera ambiente a 120 °C por 24 h. Avaliação com a) *mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno e b) *mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

A fase estacionária contendo a sílica nua mostrou um comportamento cromatográfico similar à fase preparada com sílica titanizada, imobilizada nas mesmas condições, quando avaliada com a mistura de compostos neutros. Entretanto, com a mistura 2 observaram-se diferenças na forma do pico da N,N-dimetilanilina que, neste caso, não apresentou cauda, além de ter eluído antes do pico do naftaleno, como esperado. Isto indica que com a incorporação do titânio no suporte, houve um aumento da acidez da superfície da sílica, provocando alta retenção do composto básico. Porém, os valores de eficiência obtidos para esta fase ainda foram baixos.

Como o objetivo do trabalho era preparar fases estacionárias mais estáveis em pH extremos que aquelas baseadas em sílica nua e com alta eficiência, optou-se por investigar métodos de imobilização mais eficientes.

4.4.2. Em atmosfera de nitrogênio

Uma vez que as fases de sílica titanizada, imobilizadas em atmosfera ambiente não foram adequadas para avaliar compostos básicos, foi utilizada atmosfera inerte, através do uso de um forno com um sistema que permite a passagem contínua de nitrogênio através da fase estacionária. O suporte utilizado nos próximos testes são de sílica hidroxilada.

4.4.2.1. Variando o tempo de imobilização

Na Tabela 17 são apresentados os parâmetros cromatográficos, e na Figura 24, os cromatogramas das fases imobilizadas a 120 °C, variando o tempo de imobilização.

Tabela 17. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizadas a 120 °C em diferentes tempos, em atmosfera de nitrogênio. Avaliação com a mistura 1.

Tempo (horas)	Eficiência (N/m) ^a	Assimetria (As) ^a	Fator de retenção (k) ^a	Resolução (Rs) ^b	% C	Espessura da camada / τ (nm)
4	68.000	1,0	3,8	2,9	13,1	1,0
8	73.000	1,1	3,5	2,6	12,1	0,9
16	45.000	1,8	3,6	2,1	12,3	0,9
24	61.300	1,2	3,3	2,7	11,5	0,8

^a pico do naftaleno, ^b par tolueno-naftaleno

Nota-se na Tabela 17 que as fases imobilizadas durante 4 e 8 horas apresentaram os melhores parâmetros cromatográficos, mostrando maiores valores

de eficiência que as fases imobilizadas durante 16 e 24 h. Nas fases imobilizadas em atmosfera de ar, com sílica não hidroxilada, o uso de um tempo maior que 8 h também não melhorou a qualidade da coluna.

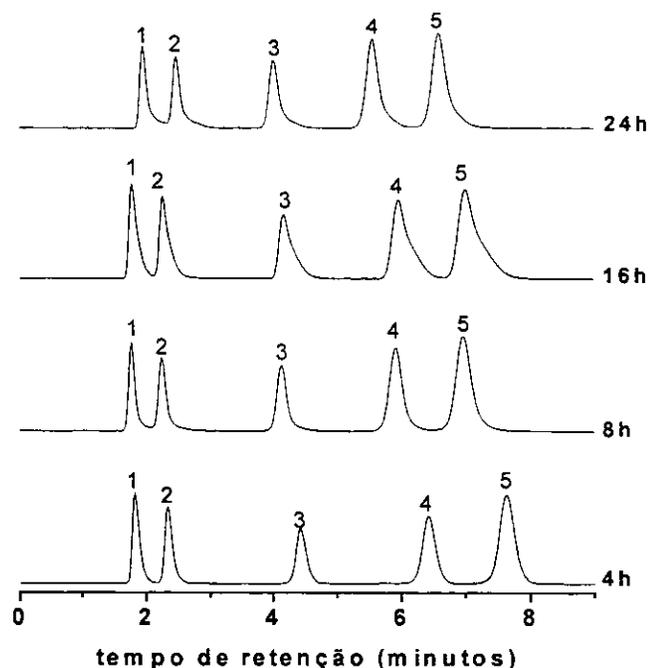


Figura 24. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada, imobilizadas a 120 °C em atmosfera de nitrogênio, com diferentes tempos de imobilização. *Mistura 1:* 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

Avaliações feitas nas fases imobilizadas durante 4 e 8 horas com a mistura 2 podem ser vistas na Tabela 18 e na Figura 25. Quando estes cromatogramas são comparados com os das fases imobilizadas em atmosfera ambiente (Figuras 21 e 22) observa-se que o pico da N,N-dimetilanilina saiu com menor tempo de retenção que o naftaleno e com valores de assimetria em torno da faixa de valores aceitáveis. Além disso, notam-se diferenças na forma do pico, sendo menos assimétrico com a fase com 8 h de imobilização. Isto indica que, em atmosfera de nitrogênio houve uma melhora significativa na qualidade da fase estacionária, reduzindo as interações indesejáveis do composto básico com os grupos hidroxilas residuais.

Tabela 18. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada, titanizada e PMOS, imobilizadas a 120 °C por 4 e 8 h em atmosfera de nitrogênio, avaliadas com a *mistura 2*. Média de duas colunas.

Tratamento Térmico	Eficiência (N/m)		Assimetria (As) ^a				Fator de retenção (k) ^b	Resolução (Rs) ^c
	Naftaleno	Acenafteno	1	2	3	4		
120°C x 4 h	65.400	77.100	1,2	1,8	1,0	0,9	3,8	4,4
120°C x 8 h	67.100	83.000	1,2	1,6	1,1	1,0	3,2	4,0

^a 1=fenol, 2=N,N-dimetilanilina, 3= naftaleno e 4= acenafteno.

^b pico do naftaleno

^c par N,N-dimetilanilina-naftaleno

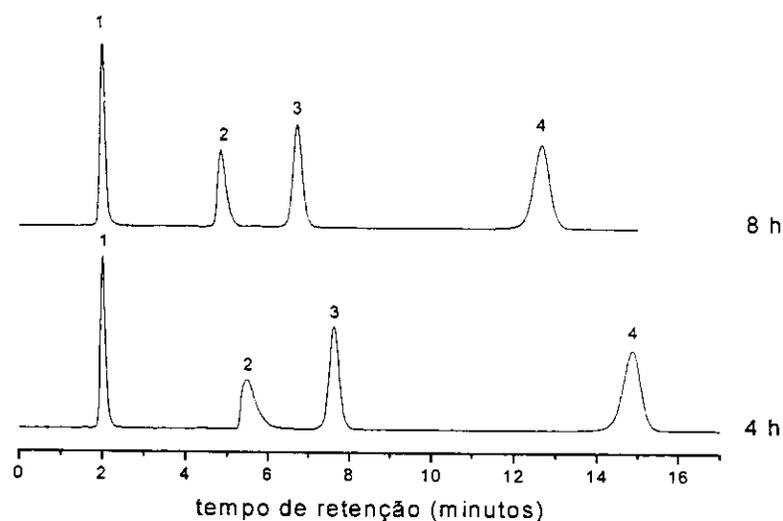


Figura 25. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada, titanizada e PMOS, imobilizadas a 120 °C por 4 e 8 horas em atmosfera de nitrogênio. *Mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

4.4.2.2. Variando a temperatura de imobilização

Os resultados cromatográficos obtidos com as colunas recheadas com as fases imobilizadas em diferentes temperaturas por um período de 8 h são mostrados na Tabela 19 e na Figura 26.

Tabela 19. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizadas a diferentes temperaturas durante 8 h, em atmosfera de nitrogênio. Avaliação com a *mistura 1*. Média de duas colunas.

Temperatura (°C)	Eficiência (N/m) ^a	Assimetria (As) ^a	Fator de retenção (k) ^a	Resolução (Rs) ^b	% C	Espessura da camada / τ (nm)
100	39.200	1,1	1,9	1,2	5,6	0,3
120	73.000	1,1	3,5	2,6	12,1	0,9
140	59.300	1,2	3,7	1,9	12,6	0,9
220	43.000	0,4	8,8	3,5	23,5	2,7

^a pico do naftaleno, ^b par tolueno-naftaleno

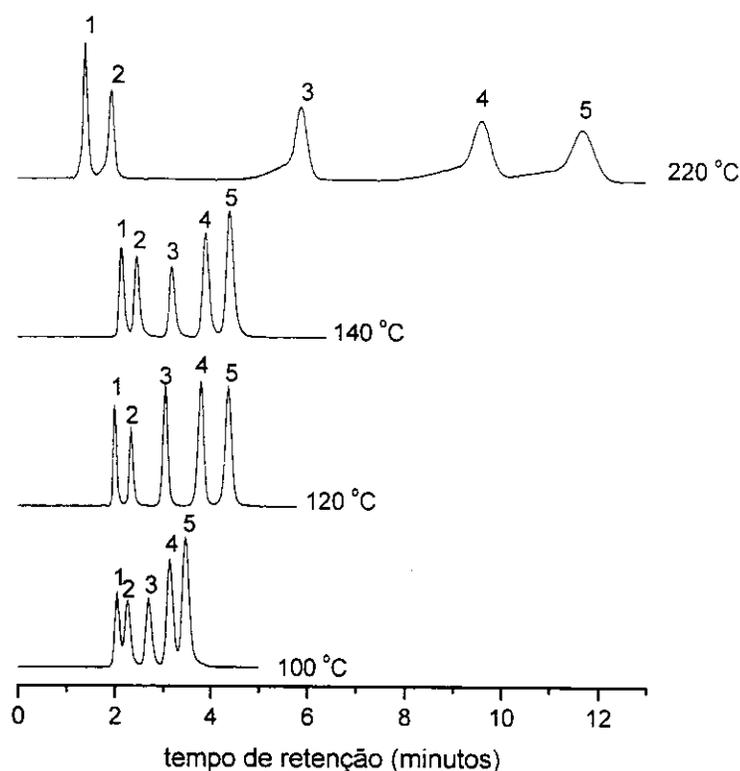


Figura 26 Cromatogramas das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada, titanizada e PMOS, imobilizadas a diferentes temperaturas por um período de 8 h, em atmosfera de nitrogênio. *Mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 μ L.

É possível perceber que a fase imobilizada a 120 °C por 8 h continua apresentando os melhores valores nos parâmetros cromatográficos, seguida da fase imobilizada a 140 °C. As fases nas quais foram utilizadas temperaturas de 100 e 220 °C apresentaram valores de eficiência próximos, apesar das diferenças nos outros parâmetros cromatográficos. A falta de resolução dos compostos da mistura 1 ($R_s < 1,5$) na fase imobilizada a 100 °C deve-se à formação de uma camada polimérica insuficiente, impedindo uma adequada interação dos solutos com a fase estacionária. Isto é confirmado pelos valores de % C e espessura da camada polimérica. Em contrapartida, a fase imobilizada a 220 °C apresentou maior retenção do naftaleno como resultado da formação de uma camada polimérica mais espessa.

Porções destas fases, recuperadas após avaliação cromatográfica, foram submetidas à análise termogravimétrica. Os termogramas obtidos são mostrados na Figura 27 e os valores de % de perdas de massa apresentados na Tabela 20.

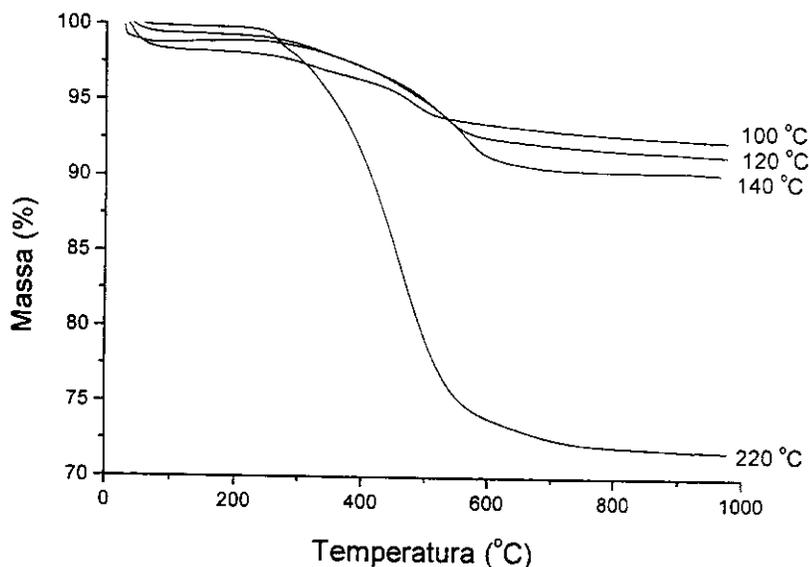


Figura 27. Curvas termogravimétricas das fases imobilizadas a diferentes temperaturas por um período de 8 h, em atmosfera de nitrogênio.

A perda de massa nas fases estacionárias está relacionada com a quantidade de PMOS retido na sílica. Assim, observa-se que a medida que aumenta a temperatura de imobilização ocorre um aumento na % de perda de massa. Isto

sustenta a explicação anterior, obtida dos resultados cromatográficos e dos valores de % C, de que a fase imobilizada a 220°C contém uma quantidade maior de polímero imobilizado sobre a superfície da sílica.

Tabela 20. Perdas de massa obtidas das curvas de TGA para as fases imobilizadas a diferentes temperaturas durante 8 h, em atmosfera de nitrogênio.

Temperatura (°C)	% de perda de massa de 25 a 1000 °C
100	7,7
120	8,7
140	9,3
220	28,7

Na Figura 28 podem ser vistos os espectros no infravermelho do suporte e das fases imobilizadas nas diferentes temperaturas. A banda na região de 1090 cm^{-1} atribui-se ao estiramento das ligações siloxano que formam a matriz da sílica. Em torno de 2929 cm^{-1} aparecem as bandas características do grupo metila pertencentes ao PMOS. Esta banda foi aumentando de intensidade com o aumento da quantidade de PMOS imobilizado. Na região de 3440 cm^{-1} observa-se a banda proveniente de vibrações dos grupos hidroxilas ligados por pontes de hidrogênio à água fisicamente adsorvida e dos grupos hidroxilas geminais. A banda situada em torno de 970 cm^{-1} corresponde aos silanóis livres presentes na superfície da sílica. Nos espectros correspondentes das fases imobilizadas, foi observado que a intensidade da banda em 970 cm^{-1} diminui conforme são utilizadas temperaturas maiores, sugerindo um maior recobrimento destes grupos ativos.

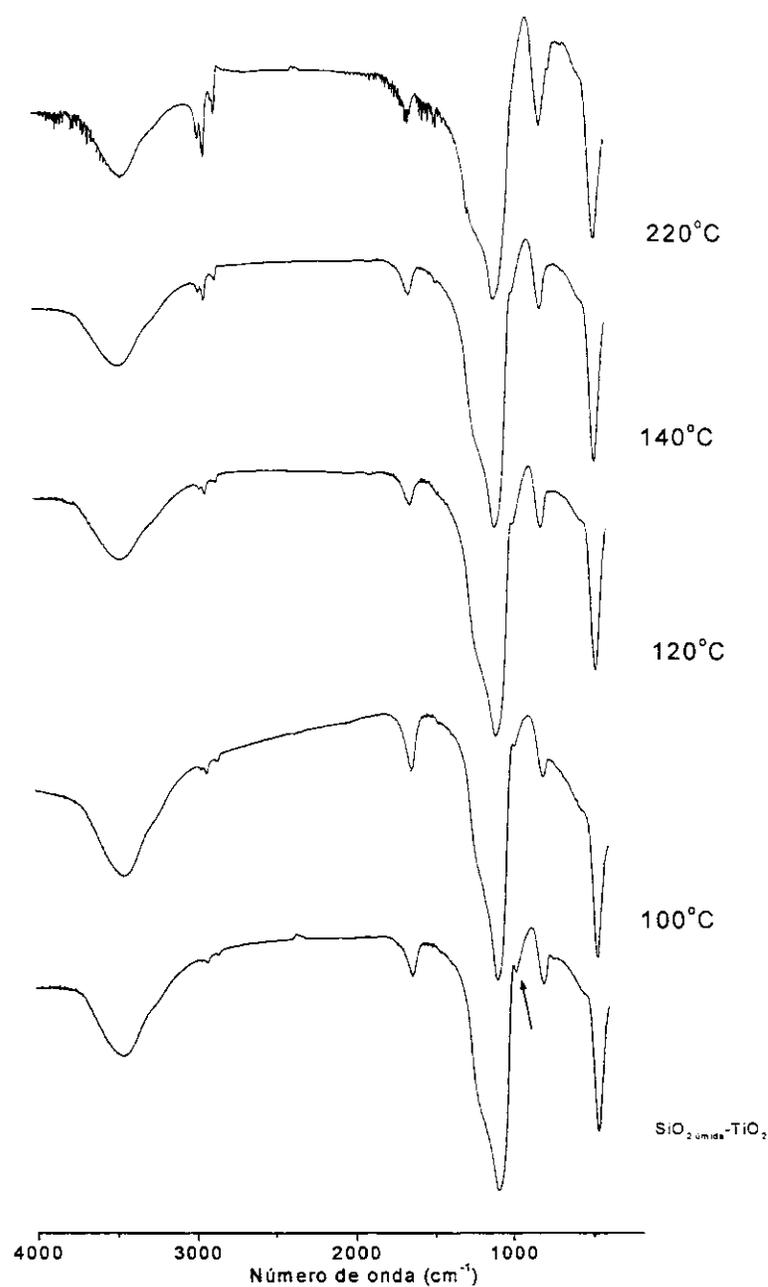


Figura 28. Espectros no infravermelho do suporte de sílica Astrosil titanizada e das fases imobilizadas nas diferentes temperaturas por um período de 8 h em atmosfera de nitrogênio.

4.4.3. Fases estacionárias preparadas com a sílica Kromasil e PMOS, imobilizadas térmicamente

Foram preparadas fases estacionárias usando a sílica Kromasil como suporte e com as condições da sílica de partida alteradas. Isto foi feito com o intuito de avaliar a influência da modificação da sílica com o titânio e da realização da etapa de hidroxilação no desempenho cromatográfico. Os resultados da imobilização do PMOS a 120 °C por 8 h, em atmosfera de nitrogênio podem ser vistos nas Tabelas 21 e 22 e nas Figuras 29 e 30.

Tabela 21. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Kromasil e PMOS, imobilizadas em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h, avaliadas com a mistura 1. Media de duas colunas.

Tratamento na sílica	Eficiência (N/m) ^a	Assimetria (As) ^a	Fator de retenção (k) ^a	Resolução (Rs) ^b	% C	τ (nm)
SH-ST ^c	73.400	0,9	13	4,9	16,3	1,4
H-ST ^d	41.200	0,8	5,5	3,0	10,7	0,7
SH-T ^e	26.100	1,2	2,3	1,6	5,5	0,3
H-T ^f	32.100	1,2	2,5	1,7	5,8	0,3

^a pico do naftaleno, ^b par tolueno-naftaleno

^c sem hidroxilar-sem titanizar, ^d hidroxilada-sem titanizar

^e sem hidroxilar-titanizada, ^f hidroxilada-titanizada

Como observado na Tabela 21, as fases preparadas com sílica não titanizada apresentaram melhor desempenho cromatográfico, principalmente quando não foi realizada a hidrólise ácida na sílica. No caso das fases com sílica modificada a hidroxilação proporcionou uma pequena melhora na eficiência, como também foi observado nas fases preparadas com a sílica Astrosil.

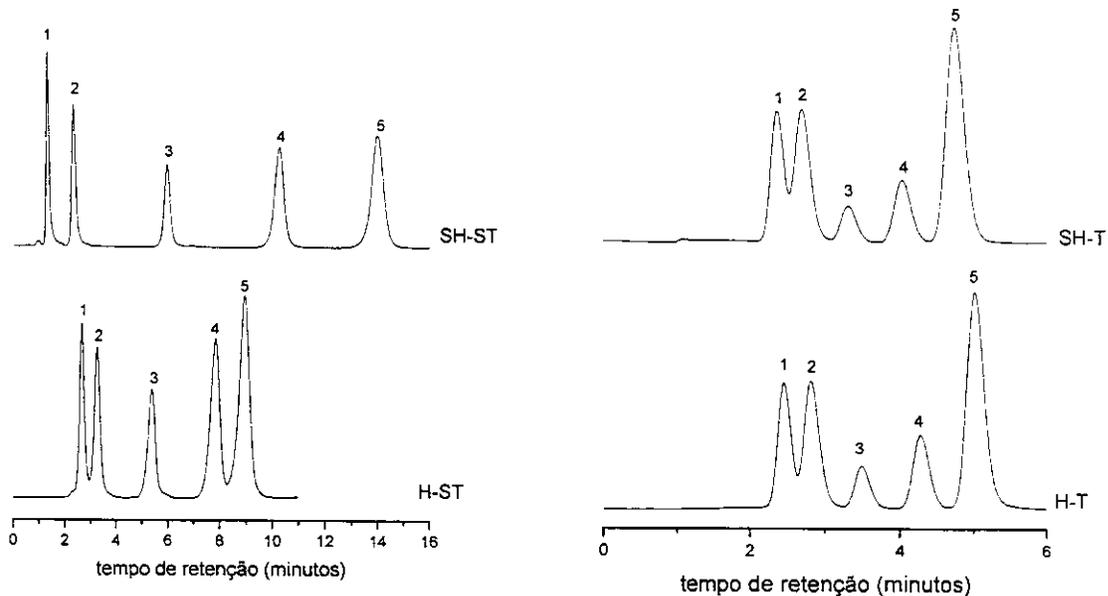


Figura 29. Cromatogramas das fases preparadas com a sílica Kromasil hidroxilada (H) e sem hidroxilar (SH), com (T) ou sem (ST) titanizar e PMOS, immobilizadas em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h, avaliadas com a *mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

As fases sem a presença de titânio também foram avaliadas com a mistura 2 (Tabela 22 e Figura 30) e observou-se que, para ambos os casos, a eluição da N,N-dimetilanilina coincide com o comportamento típico de uma cobertura eficiente dos grupos hidroxilas residuais, apresentando picos com bons valores de assimetria e tempo de retenção menor ao do pico do naftaleno.

Tabela 22. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Kromasil não titanizada e PMOS, immobilizadas em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h, avaliadas com a *mistura 2*. Media de duas colunas.

Tratamento na sílica	Eficiência (N/m) naftaleno	Assimetria (As) ^a				Fator de retenção (k) ^b	Resolução (Rs) ^c
		1	2	3	4		
SH-ST ^d	76.900	1,3	1,0	0,9	0,9	13,6	5,1
H-ST ^e	45.000	1,1	0,9	0,9	0,8	4,7	3,7

^a 1=fenol, 2= N,N-dimetilanilina, 3= naftaleno e 4= acenafteno

^b pico do naftaleno, ^c par N,N-dimetilanilina-naftaleno,

^d sem hidroxilar-sem titanizar, ^e hidroxilada-sem titanizar

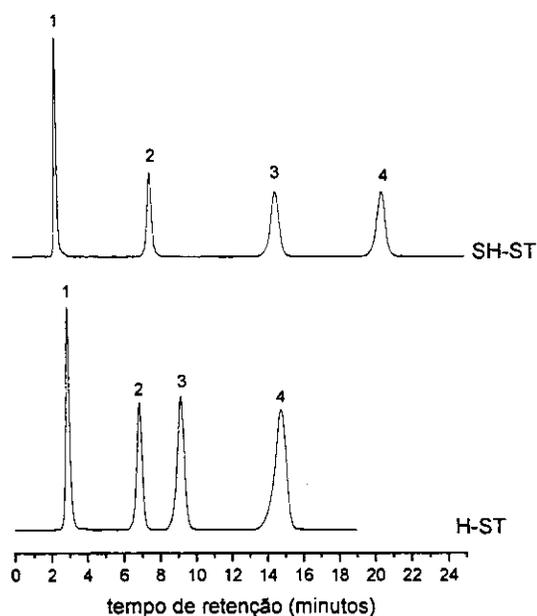


Figura 29. Cromatogramas das fases preparadas com a sílica Kromasil hidroxilada (H) e não hidroxilada (SH), não titanizada (ST) e PMOS, immobilizadas em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h, avaliada com a *mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

Pelo fato de não alcançar bons resultados com a fase preparada com a sílica Kromasil hidroxilada e titanizada, com as condições otimizadas para a sílica Astrosil, foram feitos outros ensaios mudando o tempo e a atmosfera de immobilização. Assim, foram testadas mais duas fases, uma immobilizada também em atmosfera de

nitrogênio, porém por um período de 24 h e outra mantendo o tempo de 8 h, mas usando atmosfera ambiente. Os resultados são mostrados nas Tabelas 23 e 24 e nas Figuras 31 e 32.

Como pode ser observado, também foram obtidas fases estacionárias eficientes a partir da sílica Kromasil (H-T), com o uso da atmosfera de nitrogênio, porém, um maior tempo de imobilização foi requerido. Nestas condições, conseguiu-se uma adequada assimetria e retenção dos picos do composto básico, indicando uma alta cobertura do suporte pela fase líquida.

Tabela 23. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Kromasil hidroxilada e titanizada (H-T) e PMOS, imobilizadas a 120 °C em atmosfera de ar ou nitrogênio, avaliadas com a *mistura 1*. Média de duas colunas.

Condições de imobilização	Eficiência (N/m) ^a	Assimetria (As) ^a	Fator de retenção (k) ^a	Resolução (Rs) ^b	% C	τ (nm)
24 h em atmosfera de nitrogênio	71.400	0,9	7,6	2,5	12,7	0,9
8 h em atmosfera de ar	64.900	1,0	7,5	3,5	12,5	0,9

^a pico do naftaleno, ^b par tolueno-naftaleno

Tabela 24. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Kromasil hidroxilada e titanizada (H-T) e PMOS, imobilizadas a 120 °C em atmosfera de ar ou nitrogênio, avaliadas com a *mistura 2*. Média de duas colunas.

Condições de imobilização	Eficiência (N/m)		Assimetria (As) ^a				Fator de retenção (k) ^b	Resolução (Rs) ^c
	naftaleno	acenafteno	1	2	3	4		
24 h em atmosfera de nitrogênio	69.758	76.156	1,2	1,5	0,9	0,8	7,5	3,4
8 h em atmosfera de ar	61.700	77.284	1,2	2,2	1,0	0,9	6,9	1,0

^a 1=fenol, 2= N,N-dimetilanilina, 3= naftaleno e 4= acenafteno

^b pico do naftaleno

^c par N,N-dimetilanilina-naftaleno

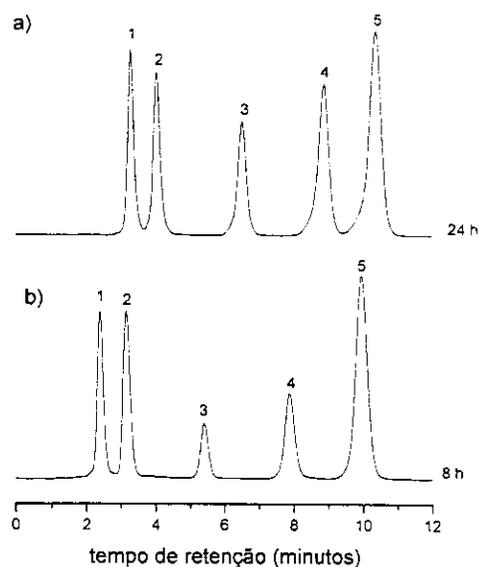


Figura 30. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Kromasil hidroxilada e titanizada (H-T) e PMOS, immobilizadas a 120 °C em atmosfera de a) nitrogênio ou de b) ar, avaliadas com a *mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

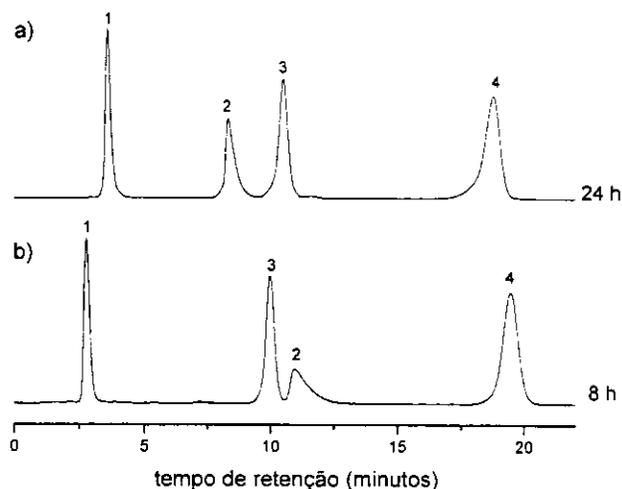


Figura 31. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Kromasil hidroxilada e titanizada (H-T) e PMOS, immobilizadas a 120 °C em atmosfera de a) nitrogênio ou de b) ar, avaliadas com a *mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteño. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

Quando foi usada como meio de imobilização a atmosfera ambiente, também observou-se uma melhora na eficiência da coluna, comparada com a fase imobilizada em atmosfera de nitrogênio, utilizando o mesmo tempo de imobilização (Tabela 21). Porém, quando a mistura 2 foi analisada, observou-se o mesmo comportamento, de alta retenção e assimetria do pico da N,N-dimetilanilina (Figura 32 b), como mostrado na fase preparada com sílica Astrosil titanizada, imobilizada neste tipo de atmosfera (Figura 22).

Comparando os resultados obtidos com ambos os tipos de sílicas, Astrosil e Kromasil, utilizando o tratamento térmico, pode-se concluir que a imobilização das cadeias poliméricas não ocorre de maneira uniforme em presença de ar, pois grupos hidroxilas permanecem expostos e interagem fortemente com solutos básicos, principalmente quando a sílica tem titânio na sua estrutura, devido à maior acidez dos grupos titanóis. Os tratamentos realizados em atmosfera de nitrogênio indicam melhores coberturas da superfície do suporte modificado, sendo que a melhor condição de imobilização dependerá das propriedades da sílica. Assim, foi observado para a sílica Astrosil que períodos de 8 h são suficientes para conseguir fases eficientes, entretanto, com a sílica Kromasil é necessário um maior tempo de imobilização para chegar a resultados cromatográficos similares.

4.5. Caracterização das fases estacionárias imobilizadas por microondas

4.5.1. Variando a dose de irradiação

Os parâmetros cromatográficos obtidos com as fases submetidas ao tratamento por microondas por um período de 15 minutos, variando a dose de irradiação, podem ser vistos na Tabela 25. Também foram comparadas fases preparadas com menor quantidade de PMOS. Segundo estudos anteriores no LabCrom, realizados com fases preparadas com sílica nua Spherisorb (5 μ m) e PMOS, as melhores condições de imobilização utilizando microondas foram obtidas com 40% de carga de PMOS⁶⁰.

Tabela 25. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada, imobilizadas por microondas, por um período de 15 minutos, variando a dose de irradiação. Avaliação com a *mistura 1*. Média de duas colunas.

Dose de radiação (watts)	%PMOS	Eficiência (N/m) ^a	Assimetria (As) ^a	Fator de retenção (k) ^a	Resolução (Rs) ^b	% C	τ (nm)
520	40	37.200	1,4	2,2	1,5	5,6	0,3
586	40	34.500	1,3	2,2	1,4	6,4	0,4
452	50	45.200	0,9	2,6	1,5	7,0	0,4
520	50	60.300	1,1	3,0	2,3	12,8	0,9
586	50	32.800	1,2	2,3	1,1	5,3	0,3

^a pico do naftaleno, ^b par tolueno-naftaleno

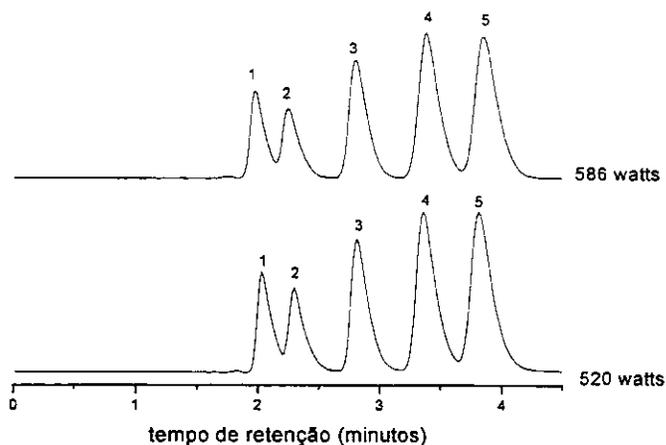


Figura 33. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, submetidas ao tratamento por microondas por um período de 15 minutos, variando a dose de irradiação, com porcentagens de carga de PMOS de 40 %. *Mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 μ L.

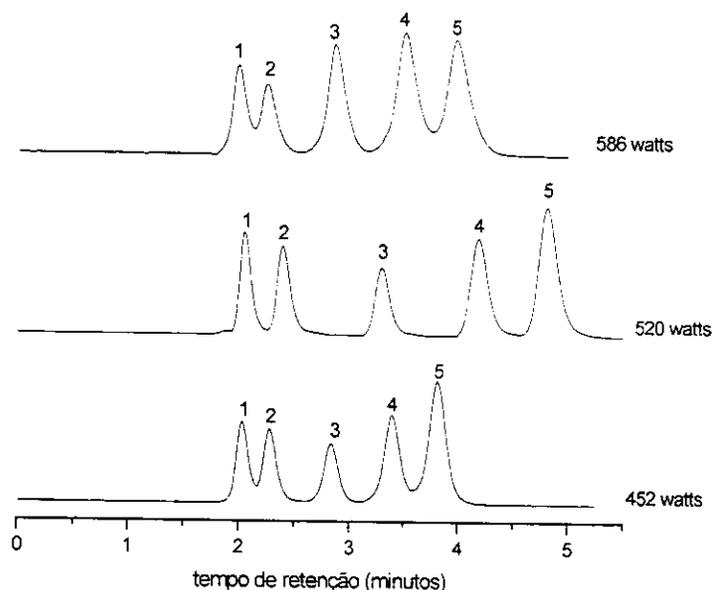


Figura 34. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, submetidas ao tratamento por microondas por um período de 15 minutos, variando a dose de irradiação, com porcentagens de carga de PMOS de 50%. **Mistura 1:** 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

Nota-se, na Tabela 25, que nas fases preparadas com 40 % de carga de PMOS, os parâmetros cromatográficos foram similares para ambas as potências (520 e 586 watts), as quais mostraram baixas eficiências. Quando foi usada uma maior quantidade de polímero (50 %) na preparação da fase estacionária, observou-se uma melhora nos parâmetros cromatográficos, principalmente com a potência de 520 watts. Neste caso, a quantidade de PMOS que ficou imobilizado foi bem maior. Para a potência de 586 watts foram obtidos os menores valores de eficiência, para ambas as porcentagens de carga polimérica, que pode ser resultado da degradação do polímero, favorecida nesta potência. As Figuras 33 e 34 mostram os cromatogramas destes testes.

4.5.2. Variando o tempo de imobilização

A Tabela 26 e a Figura 35 mostram os resultados cromatográficos obtidos com as fases preparadas com 50 % de carga de PMOS e imobilizadas usando uma potência de 520 watts por períodos diferentes. Um teste com sílica não ativada antes da deposição do PMOS foi realizado para comparação.

Tabela 26. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizadas por microondas, usando potência de 520 watts por períodos diferentes. Avaliação com a mistura 1. Média de duas colunas.

Tempo (minutos)	Eficiência (N/m) ^a	Assimetria (As) ^a	Fator de retenção (k) ^a	Resolução (Rs) ^b	% C	τ (nm)
5	59.100	1,0	4,1	2,4	12,1	0,9
15	60.300	1,1	3,0	2,3	11,8	0,9
30	48.400	1,0	1,9	1,4	5,2	0,3
30 (SiO ₂ sem ativar)	38.100	1,3	1,8	1,1	4,3	0,3

^a: pico do naftaleno, ^b: par tolueno-naftaleno

Observa-se que períodos curtos de 5 e 15 minutos são suficientes para alcançar os melhores valores de eficiência por radiação microondas. Períodos maiores diminuem a retenção dos compostos da mistura, com a conseqüente perda de resolução e diminuição da eficiência. A fase preparada com sílica não ativada apresentou os piores resultados, que pode ser pelo fato que as moléculas de água contribuem para acentuar a rotação dipolar do microondas, promovendo um aquecimento maior e, portanto, maior degradação do polímero. Nesta fase uma quantidade muito pequena de PMOS ficou imobilizada, segundo os valores de % C e espessura da camada.

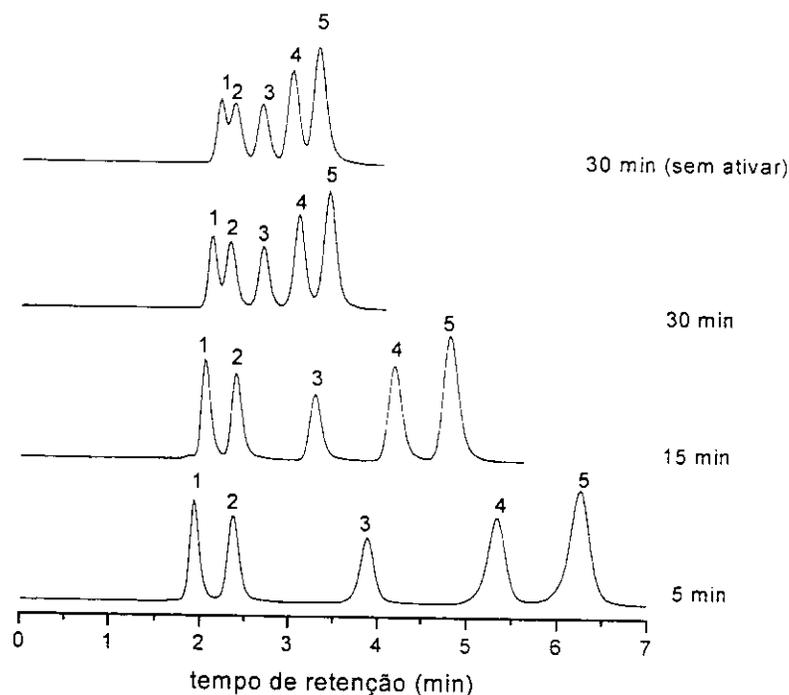


Figura 35. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, immobilizadas por microondas usando uma potência de 520 watts por períodos diferentes. Mistura 1: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

Avaliações feitas com a mistura 2 nas fases immobilizadas durante 5 e 15 minutos podem ser vistas na Tabela 27. Nota-se que o pico da N,N-dimetilanilina apresenta uma assimetria ligeiramente menor quando é feita a imobilização por 15 minutos, porém, este valor é ainda alto, o qual impede o uso eficiente desta fase na separação de solutos básicos.

Comparando estas fases (Figura 36) com a fase immobilizada a 120 °C por 8 h em atmosfera de nitrogênio (Figura 25), observa-se que o pico da N,N-dimetilanilina também apresentou um tempo de retenção menor que o naftaleno. Isto indica que a imobilização por microondas também consegue uma cobertura maior dos hidroxilas residuais que a imobilização por tratamento térmico em atmosfera ambiente (Figura

22). Porém, o tratamento térmico em atmosfera de nitrogênio mostrou-se mais eficiente.

Tabela 27. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizadas por microondas usando potência de 520 watts por 5 e 15 minutos. Avaliação com a *mistura 2*. Média de duas colunas.

Tempo (minutos)	Eficiência (N/m)		Assimetria (As) ^a				Fator de retenção (k) ^b	Resolução (Rs) ^c
	Naftaleno	Acenafteno	1	2	3	4		
5	57.200	64.500	1,3	2,1	0,9	0,8	4,1	2,3
15	55.600	72.600	1,4	2,0	1,2	1,0	3,1	1,8

^a 1=fenol, 2= N,N-dimetilanilina, 3= naftaleno e 4= acenafteno

^b pico do naftaleno, ^c: par N,N-dimetilanilina-naftaleno

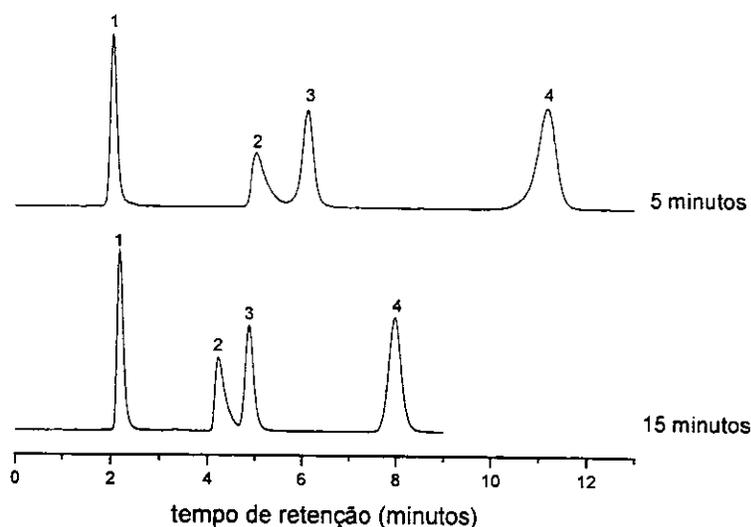


Figura 36. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizadas por microondas durante 5 e 15 minutos com 520 watts de potência. *Mistura 2*: 1- 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (70:30 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

As diferenças nas perdas de massa das fases imobilizadas por microondas, variando o tempo de imobilização, aparecem na Figura 37.

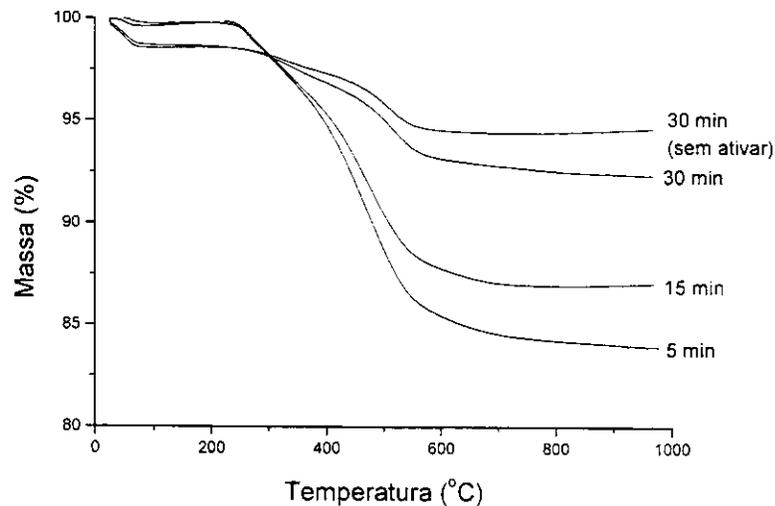


Figura 37. Curvas termogravimétricas das fases imobilizadas por microondas variando o tempo de imobilização com potência de 520 watts.

Observa-se que, conforme é aumentado o tempo de imobilização, a % de perda de massa diminui, indicando a formação de camadas poliméricas mais finas, o que explica os menores valores de retenção dos compostos da mistura teste. A menor quantidade de PMOS presente nas fases imobilizadas por períodos maiores, deve-se à lixiviação, durante a etapa de extração, do polímero que é degradado durante o tratamento de imobilização. Os valores de perda de massa são apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Perdas de massa obtidas das curvas de TGA para as fases imobilizadas por microondas, variando o tempo de imobilização com potência de 520 watts.

Tempo (minutos)	% de perda de massa de 25 a 1000 °C
5	16,3
15	13,0
30	7,5
30 (sem ativar)	4,4

Os espectros obtidos no infravermelho podem ser vistos na Figura 38.

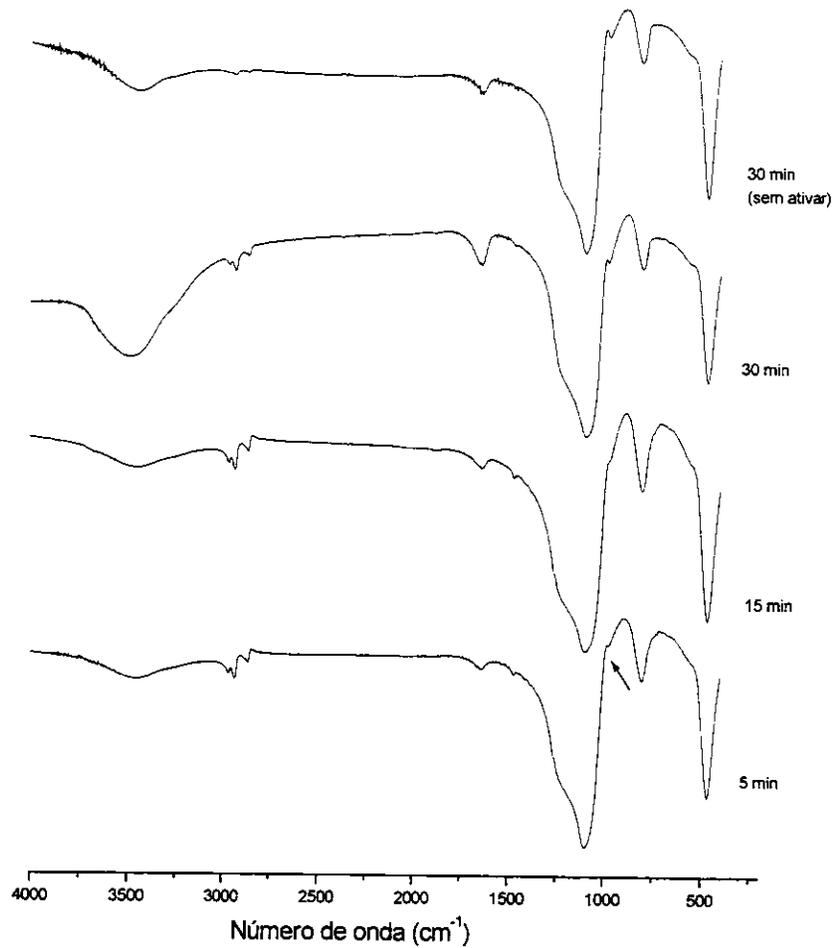


Figura 38. Espectros obtidos no infravermelho das fases imobilizadas por microondas, variando o tempo de imobilização com potência de 520 watts.

Observa-se que a intensidade da banda dos silanóis livres é diminuída a medida que são utilizados períodos menores de imobilização. Além disso, nota-se uma maior intensidade das bandas características do grupo metila pertencentes ao PMOS. Isto está relacionado com os resultados de % C e análise termogravimétrica, os quais indicam a presença de uma maior quantidade de PMOS retido na sílica quando são utilizados tempos menores de imobilização.

4.6. Caracterização das fases estacionárias imobilizadas por radiação gama

Os parâmetros cromatográficos das fases estacionárias imobilizadas por radiação gama, avaliadas com as duas misturas padrões, são mostrados nas Tabelas 29 e 30. Os cromatogramas relacionados são mostrados nas Figuras 39 e 40.

Tabela 29. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizadas por radiação gama. Avaliação com a mistura 1. Média de duas colunas.

Dose de radiação (kGy)	Eficiência (N/m) ^a	Assimetria (As) ^a	Fator de retenção (k) ^a	Resolução (Rs) ^b	% C	τ (nm)
80	32.500	1,0	11,5	3,2	13,4	1,0
120	28.300	1,2	12,1	3,0	14,5	1,1

^a pico do naftaleno, ^b par tolueno-naftaleno

Tabela 30. Parâmetros cromatográficos das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizadas por radiação gama. Avaliação com a mistura 2. Média de duas colunas.

Dose de Radiação (kGy)	Eficiência (N/m)		Assimetria (As) ^a				Fator de retenção (k) ^b	Resolução (Rs) ^c
	Naftaleno	Acenafteno	1	2	3	4		
80	57.300	67.900	1,2	2,2	1,1	1,0	11,5	2,1
120	40.400	48.400	1,2	2,0	1,3	1,2	11,9	3,5

^a 1=fenol, 2=N,N-dimetilanilina, 3=naftaleno e 4= acenafteno

^b pico do naftaleno

^c par N,N-dimetilanilina-naftaleno

Na Tabela 29 observa-se que a fase imobilizada a 80 kGy apresenta uma eficiência maior que a fase imobilizada a 120 kGy, porém ambos os valores são muito baixos, o que pode ser devido à falta de uma distribuição homogênea do polissiloxano sobre a superfície do suporte. Por outro lado, os resultados que aparecem na tabela 30 mostram que os sítios ativos são cobertos quando usado este método de imobilização, comparado com o tratamento térmico em presença de ar. Isto pode ser visto através do tempo de retenção da N,N-dimetilanilina, onde menores interações deste composto com os grupos ácidos do suporte permitiu a sua eluição em um tempo menor que o naftaleno (Figura 40). No entanto, os valores de assimetria para este composto encontram-se fora da faixa aceitável, indicando a presença de grupos hidroxilas residuais, provavelmente pela não uniformidade das cadeias poliméricas entrecruzadas ao longo da superfície do suporte.

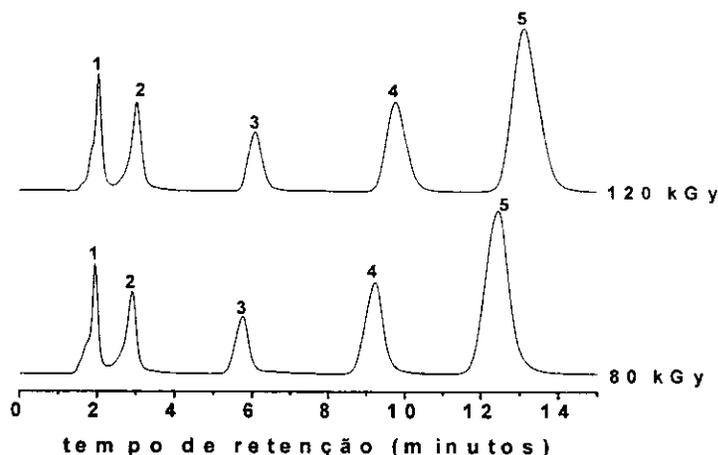


Figura 39. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizadas por radiação gama, avaliadas com a *mistura 1*: 1-acetona, 2-benzonitrila, 3-benzeno, 4-tolueno e 5-naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (60:40 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

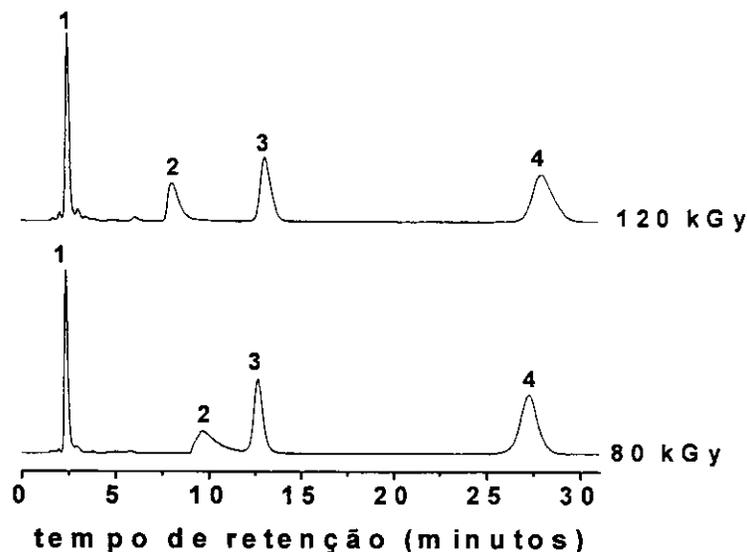


Figura 40. Cromatogramas das fases preparadas com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizadas por radiação gama, avaliadas com a *mistura 2*: 1-fenol, 2-N,N-dimetilanilina, 3-naftaleno e 4-acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel: MeOH:H₂O (60:40 v/v), vazão: 0,3 mL min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 µL.

As medidas termogravimétricas (Figura 41 e Tabela 31) e de infravermelho (Figura 42) feitas nestas fases indicaram a presença de uma grande quantidade de polímero. Entretanto, os resultados cromatográficos evidenciaram a não uniformidade desta camada polimérica.

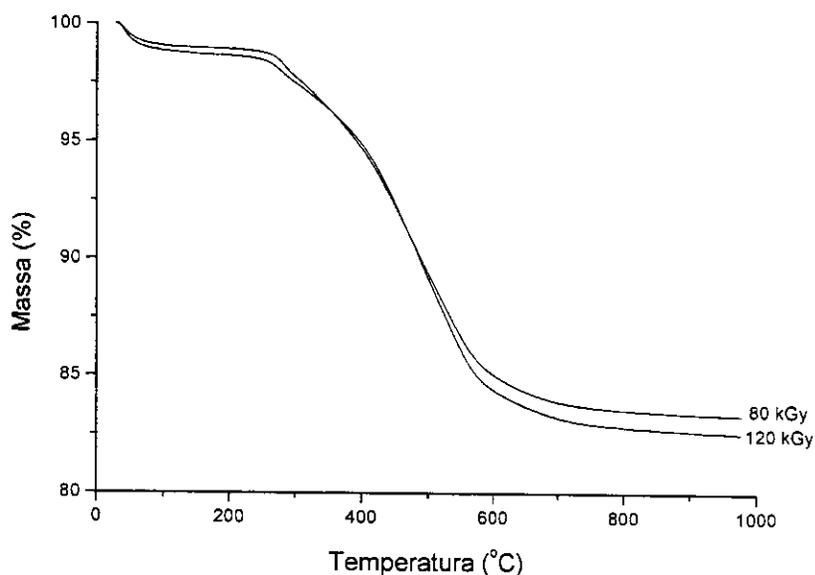


Figura 40. Curvas termogravimétricas das fases de sílica Astrosil hidrosilada e titanizada immobilizadas por radiação gama.

Tabela 31. Perdas de massa obtidas das curvas de TGA para as fases de sílica Astrosil hidrosilada e titanizada immobilizadas por radiação gama.

Dose de radiação (kGy)	% de perda de massa de 25 a 1000 °C
80	16,8
120	17,7

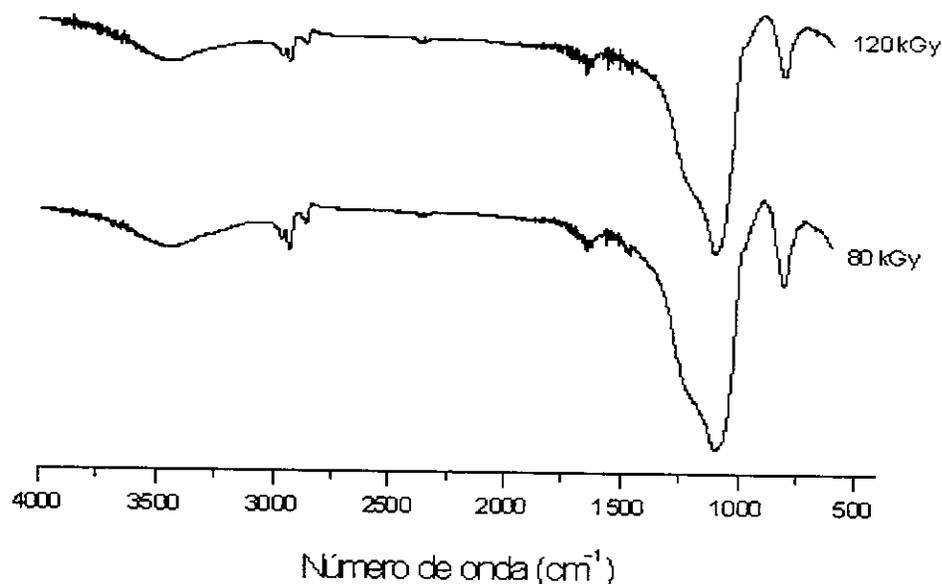
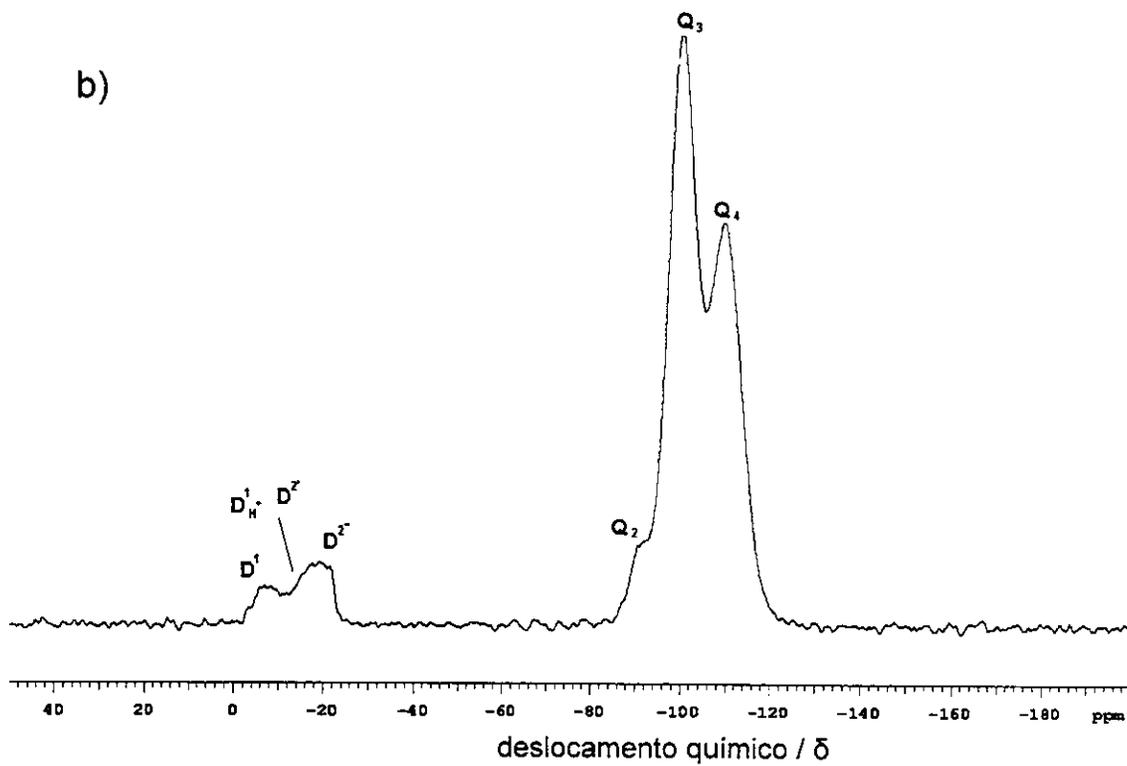
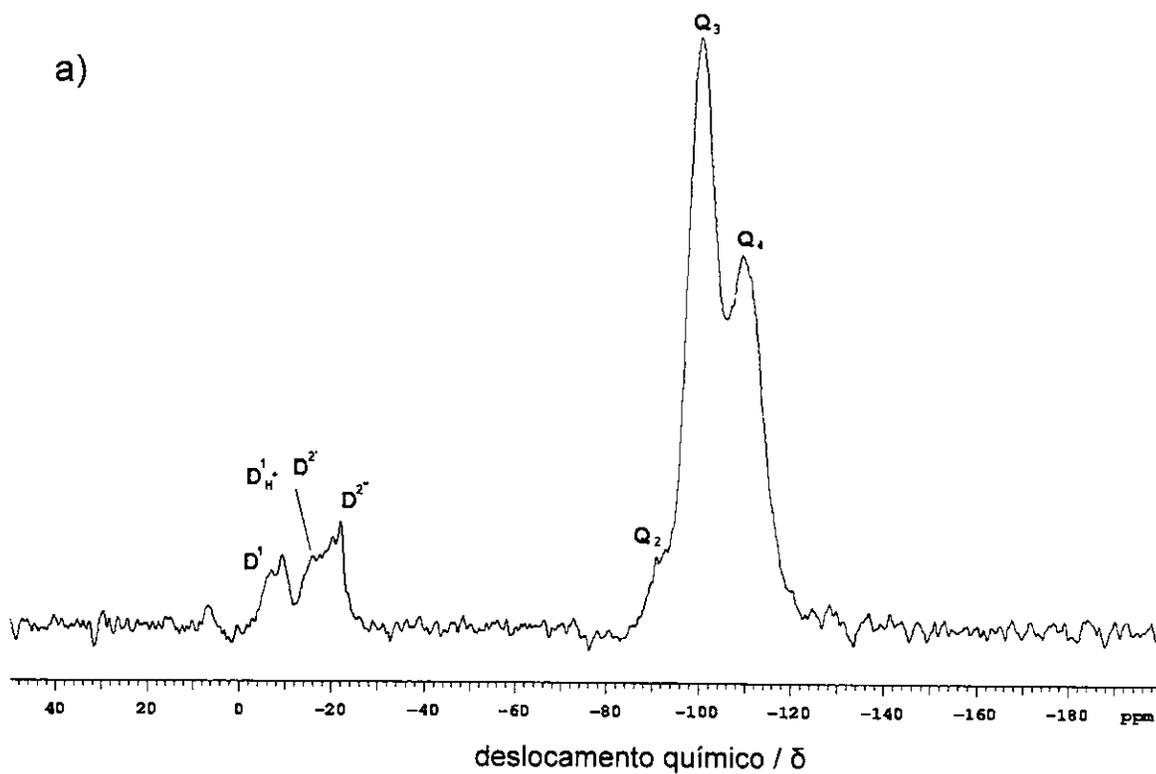


Figura 42. Espectros obtidos no infravermelho das fases de sílica Astrosil hidrosilada e titanizada immobilizadas por radiação gama, variando a dose de radiação.

4.7. Medidas de Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ²⁹Si CP/MAS NMR das melhores fases estacionárias obtidas nos diferentes tratamentos de imobilização são mostrados na Figura 43. Os sinais pertencentes ao suporte de sílica aparecem na região de -90 a -110 ppm, onde os silanóis geminais (Q²) são detectados em -92 ppm, os silanóis livres (Q³) em -101 ppm e os siloxanos (Q⁴) em -110 ppm. Observam-se nas três fases estacionárias uma população similar de silanóis livres em relação aos silanóis geminais e siloxanos. Comparada com a SiO₂ não houve um aumento na quantidade de SiOH livres porque nos silanóis germinais o tifônio reage com um grupo OH, restando outro grupo hidroxila.



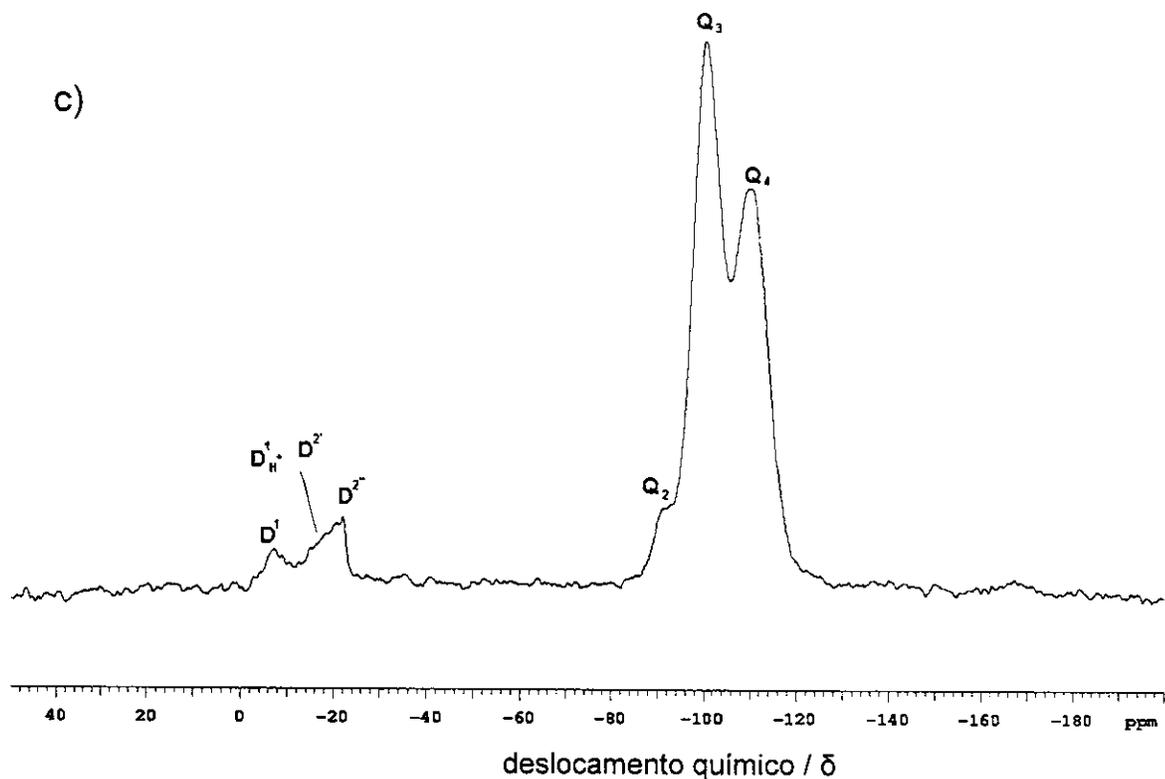


Figura 43. Espectros de RMN de ^{29}Si com a técnica de CP/MAS das fases estacionarias a) irradiada a 80 kGy, b) imobilizada a 120 °C por 8 h e c) irradiada a 520 w por 15 min.

A -22ppm observam-se o sinal de ressonância dos grupos $\text{D}^{2'}$ do PMOS puro. Possíveis rupturas de algumas das ligações $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ das cadeias do PMOS devido aos tratamentos de imobilização. São observados em -20ppm ($\text{D}^{1_{\text{H}}}$) e -9ppm (D^1). O deslocamento químico de -20,6 ppm ($\text{D}^{2'}$) pode ser atribuído à formação de "loops" das cadeias do polímero ¹³¹. Como pode ser observado, algumas das cadeias do polímero estão somente fisicamente adsorvidas ($\text{D}^{2''}$), enquanto outras estão quimicamente ligadas ($\text{D}^{2'}$). As estruturas são mostradas na Figura 44.

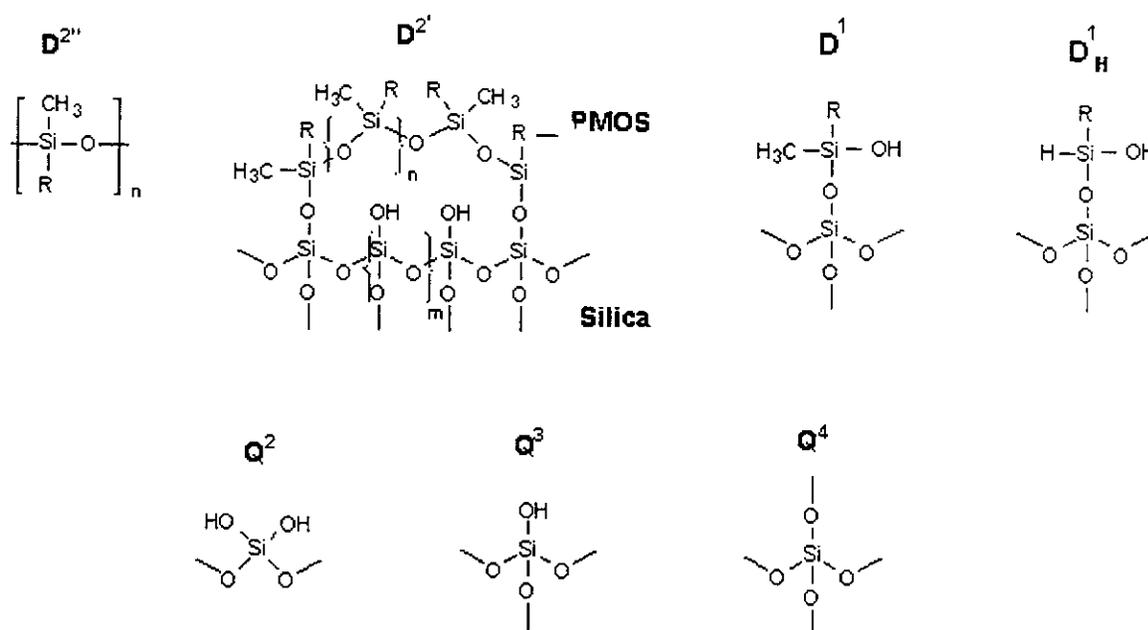


Figura 44. Estruturas das diferentes espécies presentes nos espectros de RMN ²⁹ Si.

4.8. Avaliação da estabilidade de fases estacionárias immobilizadas

4.8.1. Testes em fase móvel básica

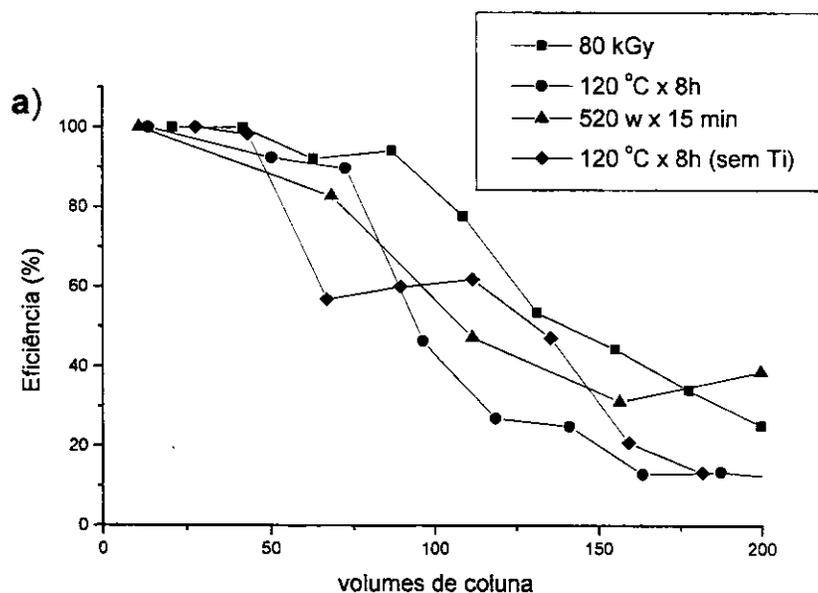
As melhores fases de sílica Astrosil titanizadas, com PMOS, immobilizado pelos tratamentos térmico, radiação microondas e radiação gama, foram testadas em relação à estabilidade em fase móvel a pH 10. Condições drásticas e fatores que incrementam a dissolução da sílica, como altas temperaturas e concentração de NaHCO₃, foram utilizados para acelerar o teste. Assim, é possível obter rapidamente informações a respeito da estabilidade das fases e posteriormente testar a fase de interesse em condições de rotina. Uma fase de sílica não titanizada com PMOS immobilizado a 120 °C por 8 h em atmosfera de nitrogênio, também foi testada nestas condições drásticas para comparação.

Na Figura 45 observa-se que as fases de sílica titanizada immobilizadas por tratamento térmico e por microondas apresentaram quedas em eficiência similares após a passagem de ~ 70 volumes de coluna, independentes do método de

imobilização. No caso da fase imobilizada por radiação gama, a estabilidade foi um pouco maior, devido à camada polimérica formada ser mais espessa. A queda abrupta na eficiência indica que ocorreram mudanças no leito cromatográfico devido à dissolução da sílica. Em geral, as fases apresentaram um pequeno aumento na assimetria com a queda na eficiência, sendo mais acentuada na fase imobilizada por microondas. Os valores do fator de retenção diminuíram com o aumento da quantidade de fase móvel básica percorrida através da coluna, sugerindo possíveis perdas de fase líquida, provavelmente sorvida, com a dissolução da sílica.

Assim, pode-se dizer que as fases de sílica titanizadas apresentaram diferenças cromatográficas, devido à diferenças na distribuição da camada polimérica na superfície do suporte, porém, em termos de estabilidade, todas conseguiram proteger, de forma similar, o suporte da dissolução.

Com a fase preparada com a sílica não titanizada ocorreu uma queda de eficiência, após passagem da metade da quantidade de fase móvel requerida pelas fases com sílica titanizada. Isto indica que com a incorporação do titânio à sílica torna-se mais protegida em termos de dissolução, permitindo o seu uso por um período maior.



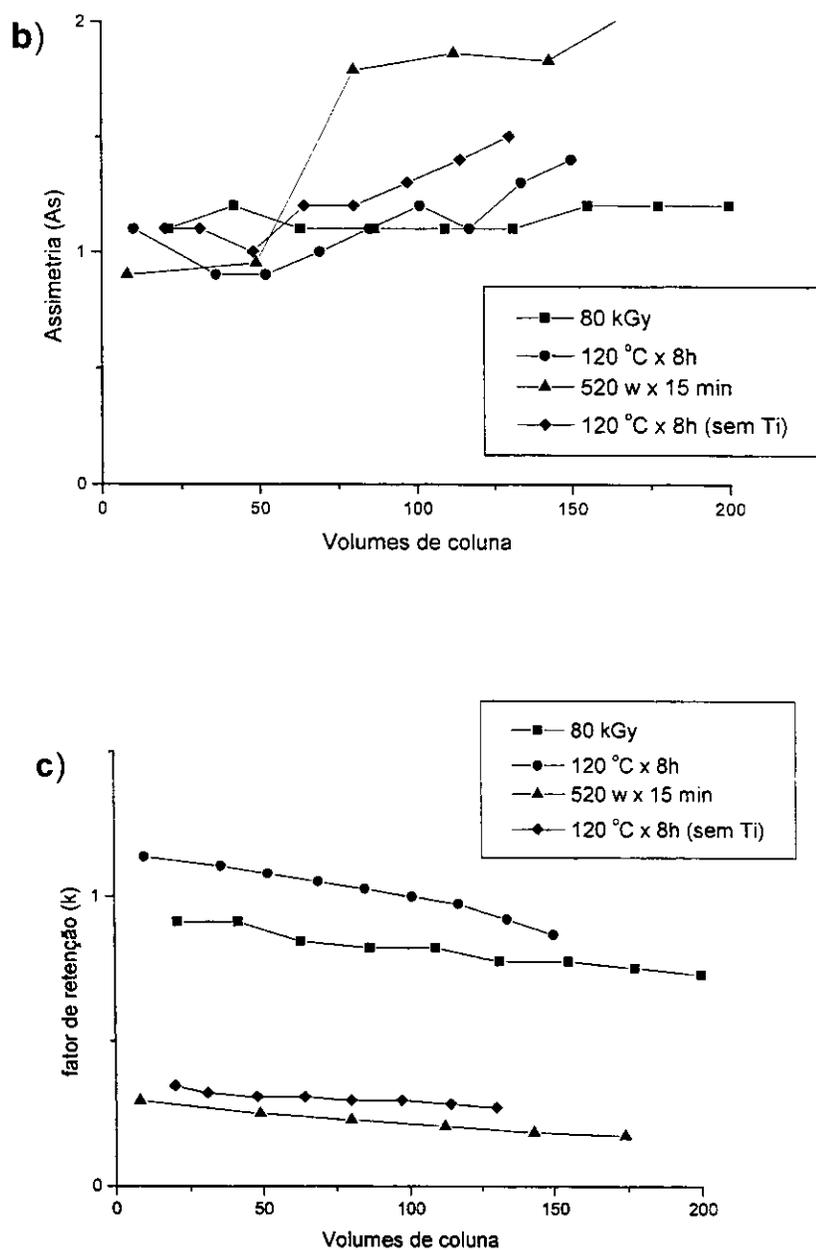
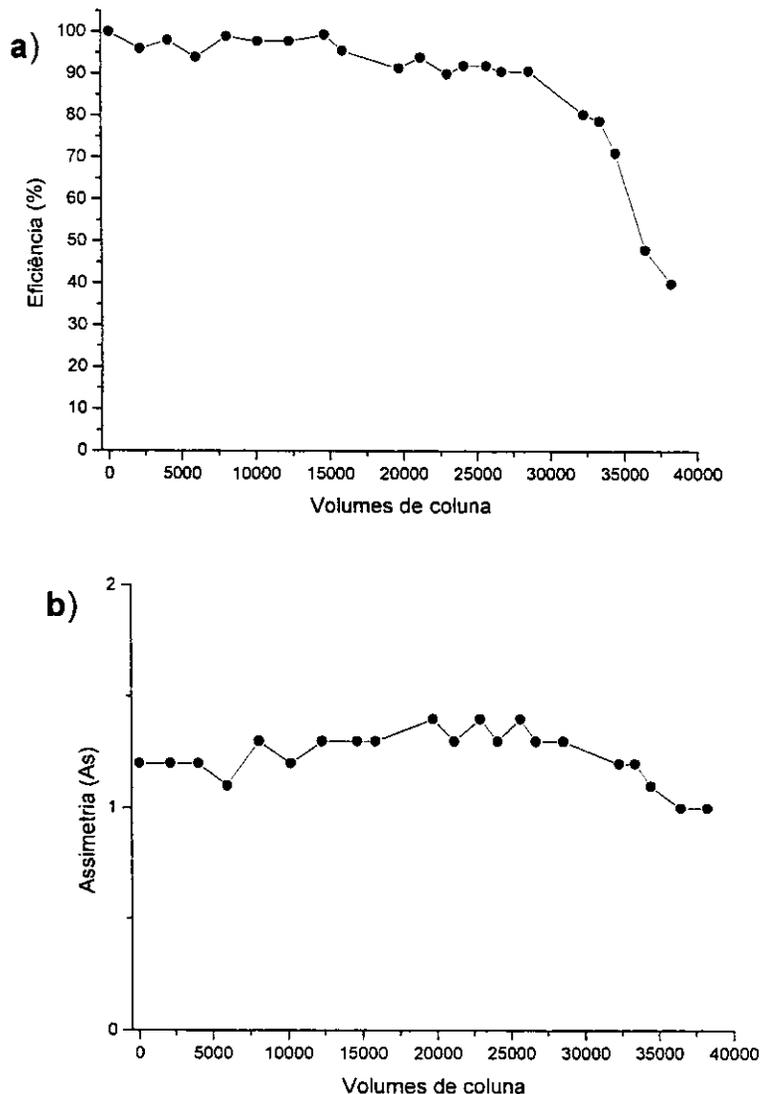


Figura 45. Teste de estabilidade (a) eficiência, (b) assimetria e (c) fator de retenção em fase móvel básica de metanol:0,1 mol L⁻¹ de NaHCO₃/NaOH, pH 10 (50:50 v/v), a 60 °C e vazão de 0,6 mL min⁻¹. Avaliações feitas para o naftaleno.

4.8.2. Teste em fase móvel neutra

Uma fase estacionária preparada com sílica titanizada, imobilizada por tratamento térmico em atmosfera de nitrogênio a 120 °C por 8 h, foi também testada em fase móvel neutra e temperatura ambiente. Nestas condições, é possível conhecer a estabilidade da fase estacionária após o uso contínuo em condições de rotina^{114,115}. Como mostrado na Figura 46, esta fase suporta a passagem de até 28000 Vc (20000 mL de fase móvel neutra), ou seja, um uso contínuo de 42 dias úteis, a 8 h de trabalho por dia, com boas propriedades cromatográficas. Nestas condições a fase apresentou variações muito pequenas quanto aos valores de assimetria e fator de retenção.



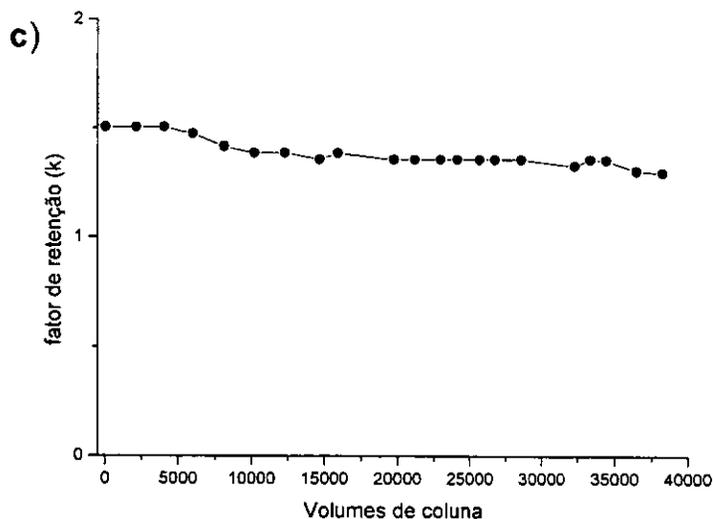


Figura 46. Teste de estabilidade da fase preparada com sílica Astrosil hidroxilada e titanizada e PMOS, imobilizada a 120 °C por 8h, em fase móvel neutra de metanol:água (70:30 v/v), a temperatura ambiente e vazão de 1,0 mL min⁻¹. As avaliações cromatográficas foram realizadas para o naftaleno a uma vazão de 0,3 mL min⁻¹. (a) eficiência, (b) assimetria e (c) fator de retenção .

4.9. Análise de misturas complexas

A separação de misturas mais complexas foi realizada numa coluna de 150 x 3,9 mm, recheada com a fase estacionária preparada com a sílica Astrosil titanizada e PMOS imobilizado por tratamento térmico a 120 °C por 8 h em atmosfera de nitrogênio.

Analisando o cromatograma da Figura 47, pode-se perceber que a fase apresentou interações adequadas com os solutos, permitindo a separação dos herbicidas em fase neutra, com boa resolução.

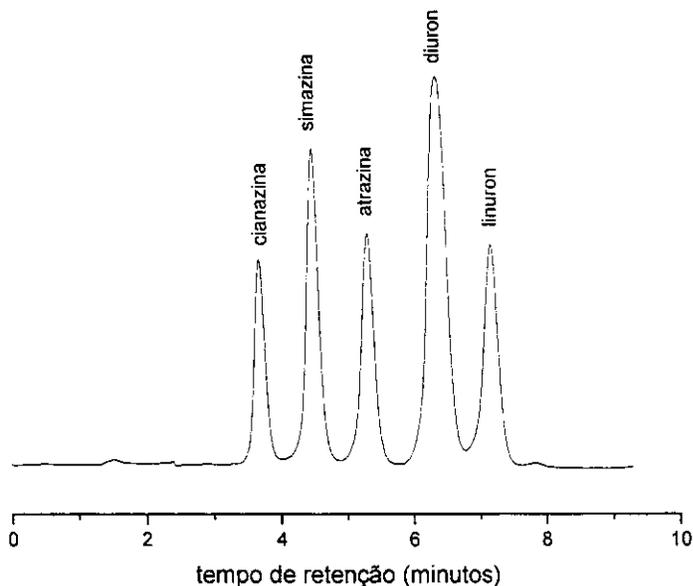


Figura 47. Separação dos herbicidas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (50:50 v/v), a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 5 µL e a detecção: UV, 230 nm. Coluna de 150 x 3,9 mm.

Para mostrar a aplicabilidade desta fase estacionária na análise de compostos em fase móvel básica, foi realizada a separação de alguns fármacos, como mostrado nas Figuras 48 e 49. Espera-se que em pH 10, apesar dos silanóis residuais encontrarem-se ionizados, o propranolol e a amitriptilina, os quais apresentam valores de pKa maiores que 9, estejam na sua forma livre, minimizando assim as interações indesejáveis com os grupos hidroxilas. Porém, nas condições utilizadas na separação do sulfametazol, paracetamol e cafeína (Figura 48), o propranolol e a amitriptilina ficaram retidos, possivelmente devido à interações hidrofóbicas. Para conseguir a eluição satisfatória destes compostos foi necessário aumentar a força cromatográfica da fase móvel, através do incremento da quantidade de solvente orgânico. Também, aumentou-se a vazão e a temperatura para conseguir um tempo de análise menor. Durante as análises em pH básico, a coluna comportou-se de uma maneira estável,

permitindo uma boa separação dos compostos e mostrando a potencialidade desta fase estacionária para uso em CLAE no modo fase reversa.

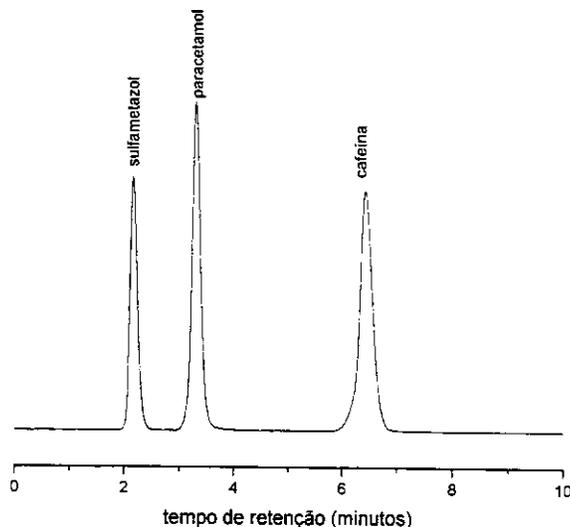


Figura 48. Separação de fármacos. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol:0,02 mol L⁻¹ K₂HPO₄/KOH, pH 10 (30:70 v/v), vazão de 0,6 mL min⁻¹. O volume de injeção foi de 5 µL e a detecção: UV, 254 nm. Coluna de 150 x 3,9 mm.

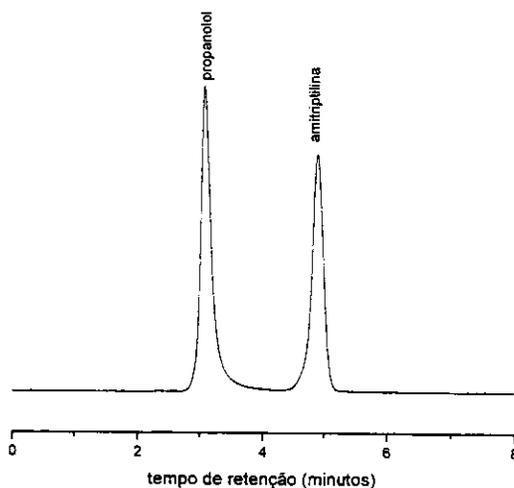


Figura 49. Separação de drogas básicas. Condições cromatográficas: Fase móvel metanol:0,02 mol L⁻¹ K₂HPO₄/KOH, pH 10 (80:20 v/v), vazão de 1,0 mL min⁻¹, temperatura de 30 °C. O volume de injeção foi de 5 µL e a detecção: UV, 254 nm. Coluna de 150 x 3,9 mm.

5. CONCLUSÕES

As diferentes sílicas utilizadas apresentaram comportamentos similares quanto à razão de titânio incorporado na sílica em relação à área superficial, com o uso de diferentes temperaturas. Os testes mostraram que baixas temperaturas são indicadas para reagir o máximo de silanóis disponíveis na sílica com o reagente de titanização. Através da realização do planejamento fatorial 2^3 , feito com a sílica Astrosil, foi possível chegar à conclusão que o fator da umidade na sílica exerce uma função determinante nos resultados, enquanto a centrifugação e o tempo de reação não são estatisticamente significativos. A concentração residual de metais presentes nas sílicas nuas indica que fases preparadas com sílica Astrosil e Kromasil, com maior grau de pureza, fornecem colunas cromatográficas mais eficientes.

Os resultados obtidos das medidas de fluorescência de raios-X, de espectroscopia de absorção de raios-X, de volume e diâmetro de poro, realizados nos suportes de sílicas Astrosil nua e titanizadas, confirmaram a presença do titânio no suporte, sendo que a sua incorporação na sílica foi mais favorecida com a preparação em baixas temperaturas e com o uso de suportes de sílica previamente hidroxilados e superfícies hidratadas. Os valores da razão OH/Ti, calculados para esta sílica, sugerem que os átomos de titânio estão ligados a um grupo silanol. Os resultados da espectroscopia de absorção de raios-X indicaram que a reação do tetrabutóxido de titânio com os silanóis livres da sílica produziu a incorporação do titânio na sua superfície na forma tetra-coordenada. Isto está correlacionado com as estruturas amorfas observadas nos espectros de difração de raios-X.

As avaliações cromatográficas feitas nas diferentes fases estacionárias preparadas com a sílica Astrosil titanizada e imobilizadas por tratamento térmico, radiação microondas e radiação gama mostraram que:

- *tratamento térmico*

A atmosfera de imobilização utilizada durante o tratamento térmico exerce uma função importante na forma de distribuição da camada polimérica formada na superfície do suporte modificado. Os resultados indicaram a presença de grupos

hidroxilas não cobertos pela fase orgânica, quando utilizada a atmosfera ambiente. Já em atmosfera de nitrogênio, o comportamento silanofílico da fase estacionária, medido através da retenção e a forma do pico da N,N-dimetilanilina, mostrou uma menor retenção do analito básico e picos mais simétricos, devido à menor interação com os grupos hidroxilas presentes na superfície da sílica, como resultado de uma maior cobertura da superfície do suporte.

Os testes realizados com as fases preparadas com o tratamento ácido prévio indicaram uma melhora na distribuição da camada polimérica, que pode estar associado à retirada de impurezas da superfície da sílica e, conseqüentemente, à presença de um maior número de grupos hidroxilas dispostos a interagir com o polímero.

A fase estacionária preparada com a sílica não titanizada apresentou menores interações do compostos básico com os grupos hidroxilas, mesmo utilizando atmosfera ambiente, mostrando que os grupos titanóis incorporados na sílica aumentaram a acidez da sua superfície.

No tratamento térmico em atmosfera de nitrogênio foram avaliados vários tempos e temperaturas de imobilização com o intuito de obter uma melhor cobertura da superfície do suporte e fases mais eficientes. Os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou 120 °C e 8 h de imobilização. As medidas de análise elementar, análise termogravimétrica e espectroscopia no infravermelho realizadas mostraram um aumento na quantidade de PMOS imobilizado com o aumento da temperatura.

Fases estacionárias de sílica Kromasil também foram preparadas com PMOS imobilizado termicamente, sendo novamente avaliadas a influência da hidroxilação e da titanização no desempenho cromatográfico da fase. Neste caso, observou-se também melhores resultados com as sílicas não titanizadas. As sílicas titanizadas não mostraram bom desempenho cromatográfico no tempo de imobilização utilizado, que foi o ótimo conseguido com as fases de sílica Astrosil (8h). Porém, tempos de 24 h forneceram fases com qualidade similar às fases obtidas com sílica Astrosil imobilizados durante 8 h, para ambas as misturas. Estes resultados indicam que as melhores condições de imobilização obtidas para uma determinada sílica, não são

necessariamente as melhores condições para outros tipos de sílicas. Assim, dependendo da característica da sílica e da natureza do polímero, estas condições podem variar, sendo necessário um estudo rigoroso de todos os parâmetros de preparação para cada tipo de fase estacionária a ser estudada. O tratamento ácido feito nas sílicas modificadas também contribuíram para uma melhora nos parâmetros cromatográficos, como já foi visto com a sílica Astrosil. Entretanto, na sílica nua este tratamento piorou a qualidade da fase estacionária. A fase preparada com sílica Kromasil hidroxilada e titanizada imobilizada por 8 h em atmosfera ambiente apresentou melhor comportamento cromatográfico que aquela preparada utilizando atmosfera de nitrogênio, devido à formação de uma camada polimérica mais espessa. Porém, interações fortes com o composto básico aconteceram nestas condições, como também foi observado com a fase preparada com a sílica Astrosil.

- *radiação microondas*

Diferentes doses de radiação e tempos de imobilização foram utilizados nos tratamentos de imobilização por radiação microondas. Nestas condições, foram obtidas fases com comportamento silanofílico similar às fases imobilizadas por tratamento térmico em atmosfera de nitrogênio, porém, os valores dos parâmetros cromatográficos foram inferiores. As fases estacionárias que apresentaram as melhores propriedades cromatográficas, usando este método de imobilização, foram as preparadas com 50 % de carga de PMOS e submetidas a 5 e 15 minutos de radiação microondas, com uma potência de 520 watts. A imobilização por microondas permitiu a obtenção de fases com desempenho cromatográfico adequado na separação dos compostos da mistura 1, porém, não se mostrou efetiva na análise de compostos básicos.

- *radiação gama*

As fases preparadas usando a radiação gama mostraram picos bem resolvidos, porém com baixos valores de eficiência. O comportamento destas fases frente ao composto básico foi similar aos das fases imobilizadas por microondas, onde alguns

grupos hidroxilas residuais interagiram com a amostra, resultando em picos com cauda.

Assim, concluiu-se que fases estacionárias preparadas com a sílica Astrosil, previamente hidroxilada e titanizada, mostraram qualidade excelente do recheio quando foram imobilizadas a 120 °C durante 8 h em atmosfera de nitrogênio.

Medidas de RMN ^{29}Si CP/MAS, realizadas com as melhores fases obtidas pelos três tratamentos, mostraram as bandas características tanto das cadeias do PMOS puro, quanto das cadeias ligadas entre si e ligadas com a sílica, o que mostra que, independentemente do tratamento de imobilização utilizado, o polímero encontra-se em ambas as formas, física e quimicamente ligado ao suporte.

Os testes de estabilidade realizados em pH 10 e condições agressivas mostraram que as fases estacionárias de sílica titanizada, imobilizadas pelos diferentes tratamentos protegem de forma similar a superfície do suporte modificado. Além disso, estas fases apresentam maior estabilidade em meio básico que a fase preparada com sílica não titanizada, indicando que o titânio protege a sílica da dissolução, aumentando o tempo de vida útil da coluna. O teste de estabilidade realizado em fase móvel neutra mostrou que a fase imobilizada por tratamento térmico a 120 °C por 8 h em atmosfera de nitrogênio pode ser usada de forma contínua por um período de aproximadamente 2 meses e meio, mostrando bom desempenho cromatográfico.

Separações de misturas complexas, entre elas, de herbicidas e fármacos, foram possíveis com o uso da fase imobilizada por tratamento térmico, em pH neutro e básico. Isto mostra a potencialidade de uso desta fase estacionária na análise de compostos que não se separam, na faixa de pH permitido ($2 < \text{pH} < 8$), utilizando as fases preparadas com sílica nua.

5. Bibliografia

1. Buszewski, B., Jezierska, M., Welniak, M., Berek, D., "Survey and Trends in the Preparation of Chemically Bonded Silica Phases for Liquid Chromatographic Analysis", *J. High Resolut. Chromatogr.*, **21** (1998) 267.
2. Scott, R. P. W., "Silica Gel and Bonded Phases. Their Production, Properties and Uses in LC", Wiley, New York, 1993.
3. Van Der Voort, P., vanSant, E. F., "Silylation of the Silica Surface: a Review", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **19** (1996) 2723.
4. Anazawa, T. A., Jardim, I.C.S.F., "Polymethyloctylsiloxane Adsorbed on Porous Silica as a Packing Material for Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatogr.*, **17** (1994) 1265.
5. Anazawa, T.A., Carraro, F., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., "Stability of High-Performance Liquid Chromatography Columns Packed with C₁ and C₈ Polysiloxanes Sorbed into Porous Silica Particles", *J. Chromatogr.*, **697** (1995) 159.
6. Collins, K. E., Granja, M. L. M., Pereira Filho, R. G., Anazawa, T. A., Jardim, I. C. S. F., "The Spacial Distribution of Poly(methyloctylsiloxane) Deposited by Solvent Evaporation in the Pores of HPLC Silica Particles", *Chromatographia*, **45** (1997) 99.
7. Schomburg, G., Decke, A., Köhler, J., Bien-Vogelsang, U., "Immobilization of Stationary Liquids in Reversed and Normal-Phase Liquid Chromatography. Production and Testing of Materials for Bonded-Phase Chromatography", *J. Chromatogr.*, **282** (1983) 27.
8. Bien-Vogelsang, U., Deege, G., Figge, H., Köhler, J., Schomburg, G., "Syntheses of Stationary Phases for Reversed-Phase LC Using Silanization and Polymer Coating", *Chromatographia*, **19** (1984) 170.
9. Figge, H., Deege, A., Köhler, J., Schomburg, G., "Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography. Coatings of Silica by Polymers of Various Polarities", *J. Chromatogr.*, **351** (1986) 393.
10. Schomburg, G., Köhler, J., Figge, H., Deege A., Bien - Vogelsang U., "Immobilization of Stationary Liquids on Silica Particles by γ -Radiation", *Chromatographia*, **18** (1984) 25.
11. Silva, R. B., Collins, C. H., "Chromatographic Evaluation of Radiation Immobilized Poly(methyloctylsiloxane) on Titanium-Grafted Silica", *J. Chromatogr. A*, **845** (1999) 417.
12. Silva, R. B., Collins., K. E, Collins, C. H., "Effects in High Performance Liquid Chromatography of a High pH in the Mobile Phase on Poly(methyloctylsiloxane) Imobilized by γ -Radiation on Titanium-Grafited Silica", *J. Chromatogr. A*, **869** (2000) 136.
13. Melo, L. F. C., Jardim, I.C.S.F., "Development of C-8 Stationary Phases Immobilized by Gamma Radiation on Zirconized Silica for High Performance Liquid Chromatography Applications", *J. Chromatogr. A*, **845** (1999) 423.
14. Melo, L. F. C., Collins, C. H., Collins, K. E., Jardim, I.C.S.F., "Stability of High Performance Liquid Chromatography Columns Packed with

- Poly(methyloctylsiloxane) Sorbed and Radiation Immobilized onto Porous Silica and Zirconized Silica", *J. Chromatogr. A*, **869** (2000) 129.
15. Hetem, M. J. J., De Haan, J. W., Claessens, H. A., Cramers, C. A., Deege, A., Schomburg, G., "Characterization and Stability of Silanized and Polymer-Coated Octadecyl Reversed Phases", *J. Chromatogr.*, **540** (1991) 53.
 16. da Silva, M. C. H., Jardim, I. C. S. F., "Preparation of a C18 Stationary Phase Immobilized by Gamma Radiation for Use in High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **21** (1998) 2447.
 17. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2^a edição, John Wiley and Sons, New York, 1979.
 18. Barth, H. G., Barber, W. E., Lochmüller, C. H., Majors, R. E., Regnier, F. E., "Column Liquid-Chromatography", *Anal. Chem.*, **58** (1986) 211 R.
 19. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L., "Practical HPLC Method Development", 2^a edição, John Wiley and Sons, New York, 1997.
 20. Zhuravlev, L. T., "The Surface Chemistry of Amorphous Silica. Zhuravlev Model", *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **173** (2000) 1.
 21. Nawrocki, J., "Silica Surface Controversies, Strong Adsorption Sites, their Blockage and Removal. Part 1", *Chromatographia*, **31** (1991) 193.
 22. Unger, K. K., Lork, K. D., Pfleiderer, B., Albert, K., Bayer, E., "Impact of Acidic/Hydrothermal Treatment on Pore Structural and Chromatographic Properties of Porous Silica", *J. Chromatogr.*, **556** (1991) 395.
 23. Berthod, A., "Silica: Backbone Material of Liquid Chromatographic Column Packings", *J. Chromatogr.*, **549** (1991) 1.
 24. Nahum, A., Horváth, C., "Surface Silanols in Silica Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases I – Dual Retention Mechanism in Reversed-phase Chromatography", *J. Chromatogr.*, **203** (1981) 53.
 25. Nawrocki, J., "The Silanol Group and its Role in Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **779** (1997) 29.
 26. Stadalius, M. A., Berus, J. S., Snyder, L. R., "Reversed-phase HPLC of Basic Samples", *LC-GC*, **6** (1988) 494.
 27. Poole, C. F., Poole, S. K., "Chromatography Today", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991.
 28. Fairbank, R. W. P; Wirth, M. J; "Role of Surface-Adsorbed Water in the Horizontal Polymerization of Trichlorosilanes", *J. Chromatogr. A*, **830** (1999) 285.
 29. Akapo, S. O., Fatunmbi H., "The Performance of Mixed Horizontally Polymerized Phases Versus Conventional C18 Silica Columns for Reversed-Phase HPLC", *LC-GC*, **17** (1999) 334.
 30. Li, L., Carr, P. W., Evans, J. F., "Studies of Retention and Stability of a Horizontally Polymerized Bonded Phase for Reversed Phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **868** (2000) 153.
 31. Heinemann, G., Köhler, J., Schomburg, G., "New Polymer Coated Anion-Exchange HPLC-Phases. Immobilization of Poly(2,3 N-hidroxyethylenediamino)butadiene on Silica and Alumina", *Chromatographia*, **23** (1987) 435.

32. Kirkland, J. J., Glajch, J. L., Farlee, R. D., "Synthesis and Characterization of Highly Stable Bonded Phases for High Performance Liquid Chromatography Column Packings", *Anal. Chem.*, 61 (1989) 2.
33. Glajch, J. L., Kirkland, J. J., "Sterically Protected, Mono-functional-silane Bonded-phase Columns for High-Performance Liquid Chromatography", *LC-GC*, 8 (1990) 140.
34. Sagliano, N., Floyd, J. R., Hortwick, R. A., "Studies on the Stabilization of Reversed Phases for Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 443 (1988) 155.
35. O'Gara, J. E., Alsen, B. A., Petersen, J. S., Niederlander, C. L., Neue, U. D., "Simple Preparation of C8 HPLC Stationary Phase with an Internal Polar Functional Group", *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3809.
36. O'Gara, J. E., Walsh, D.P., Alden, B., Casellini, P., Walter, T. H., "Systematic Study of Chromatographic Behavior vs Alkyl Chain Length for HPLC Bonded Phases Containing an Embedded Carbamate Group", *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2992.
37. Silva, C. R., Jardim I. C. S. F., Airoidi, C., "New Generation of Sterically Protected C-18 Stationary Phases Containing Embedded Urea Groups for Use in High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 127.
38. Petro, M., Berek, D., "Polymers Immobilized on Silica Gels as Stationary Phases for Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 37 (1993) 549.
39. Ohman, R., Kele, M., Matus, Z., "Polymer Coated Stationary Phases for Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 28 (1989) 19.
40. Ohtsu, Y., Shiojuna, Y., Okumura, T., Koyama, J-I, Nakamura, K., Nakata, O., Kimata, K., Tanaka, N., "Performance of Polymer-Coated Silica C18 Packing Materials Prepared from High Purity Silica Gel. Suppression of Undesirable Secondary Retention Processes", *J. Chromatogr.*, 481 (1989) 147.
41. Jardim, I. C. S. F., Collins, K. E., Anazawa, T. A., "Radiation Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) on Silica for Use in HPLC: a Uniform Layer Model", *J. Chromatogr. A*, 849 (1999) 299.
42. Mao, Y., Fung, B. M., "Use of Alumina with an Anchored Polymer Coating as Packing Material for Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A.*, 790 (1997) 9.
43. Schomburg, G., "Polymer Coating of Surface in Column Liquid-Chromatography and Capillary Electrophoresis", *Trends Anal. Chem.*, 10 (1991) 163.
44. Nyholm, L. M., Markides, K. E., "Column Preparation for Reversed-Phase High-Temperature Open Tubular Column Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 813 (1998) 11.
45. Anazawa, T. A., Jardim, I. C. S. F., "The Chromatographic Behavior of Coated Stationary Phases with Different Silicas", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 21 (1998) 645.
46. Collins, K. E., Sá, A. L. A., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., "Thermal Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) in the Pores of Chromatographic Silica", *Chromatographia*, 53 (2001) 661.

47. Bottoli, C. B. G., Collins, K. E., Collins, C. H., "Chromatography Evaluation of Self-Immobilized Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **987** (2003) 87.
48. Bottoli, C. B. G., Chaudhry, Z. F., Fonseca, D. A., Collins, K. E., Collins, C. H., "Poly(alkylmethylsiloxanes) Thermally Immobilized on Silica as Stationary Phases for HPLC", *J. Chromatogr. A*, **948** (2002) 121.
49. Kurganov, A., Davankov, V., Isajeva, T., Unger, K., Eisenbeiss, F., "Characterization of Covalently Bonded and Adsorbed Polymer Coatings on Silica, Alumina and Zirconia by Means of Physico-Chemical and Chromatographic Methods", *J. Chromatogr. A*, **660** (1994) 97.
50. Zhao, J. H.; Carr, P. W.; "A Comparative Study of the Chromatographic Selectivity of Polystyrene-Coated on Macroporous Silica Gel", *Anal. Chem.*, **72** (2000) 302
51. Kurganov, A., Trüdinger, U., Isajeva, T., Unger, K., "Native and Modified Alumina, Titania e Zirconia in Normal and Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **42** (1996) 217.
52. Hanson, M., Unger, K. K., Schomburg, G., "Non-porous Polybutadiene-Coated Silicas as Stationary Phases in Reversed-Phase Chromatography", *J. Chromatogr.*, **517** (1990) 269.
53. Hanson, M., Eray. B., Unger, K., Neimarkk, A. V., Schmid, J., Albert, K., Bayer, E., "A Model for Polybutadiene Coatings on Porous Silica", *Chromatographia*, **35** (1993) 403.
54. Lopes, N. P., Collins, K. E., Jardim, I. C. S. F "Preparation of a Polibutadiene Stationary Phase Immobilized by Gamma Radiation for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **987** (2003) 77.
55. Li, J., Reeder, D. H., McCormick, A. V., Carr, P. W., "Factors Influencing Polybutadiene Deposition Within Porous Chromatographic Zirconia", *J. Chromatogr. A*, **791** (1997) 45.
56. Okamoto, Y., Honda, S., Okamoto, I., Yuki, H., Murata, S., Noyoro, R., Takaya, H., "Novel Parking Material for Optical Resolution: (+)-Poly(triphenylmethylmethacrylate) Coated on Macroporous Silica Gel", *J. Am. Chem. Soc.*, **103** (1981) 6071.
57. Engelhardt, H., Löw, H., Eberhardt, W., Mauß, M., "Polymer Encapsulated Stationary Phases: Advantages, Properties and Selectivities", *Chromatographia*, **27** (1989) 535.
58. Anazawa, T. A., "Imobilização por Radiação Gama de Fase Estacionária Líquida Sobre Suportes de Sílica para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 1992.
59. Jiang, S. X., Yang, R. Q., Chen, L. R., "Polysiloxane-Encapsulated Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **44** (1997) 263.
60. 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, 2001.

61. Morais, L. "Preparação de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a Partir de Silica Titanizada e Polibutadieno, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2003.
62. Tonhi, E. Collins, K. E., Collins, C. H., "High-Performance Liquid Chromatographic Stationary Phases Based on Poli(methyloctylsiloxane) Immobilized on Silica II. Chromatographic Evaluation", *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 109.
63. Cheng, Y-F., Walter, T. H., Lu, Z.; Iraneta, p., Alden, B. A., Gendreau, C., Neue, U. D., Grassi, J. M., Carmody, J. L., O'Gara, J. R., Fisk, R. P., "Hybrid Organic-Inorganic Particle Technology: Breaking Through Traditional Barriers of HPLC Separations", *LC-GC*, 18 (2000) 1162.
64. Neue, U. D., Walter, T. H., Alden, B.A., Jiang, Z., Fisk, R. P., Cook, J. T., Glase, K.M., Carmody, J. L., Grassi, J. M., Cheng, Y, -F., Lu, Z., Cromley, R., "Use of High-Performance LC Packing from pH 1 to 12", *J. Am. Lab.*, 31 (22) (1999) 36.
65. Dawkins, J. W., "Chromatographic Characteristics of Polymer-Based High-Performance Liquid Chromatography Packings", *J. Chromatogr.*, 352 (1986) 157.
66. Viron, C., André, P., Dreux, M., Lafosse, M., "Evaluation of Porous Graphitic Carbon as Stationary Phase for the Analysis of Fatty Acid Methyl Esters by Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 49 (1999) 137.
67. Kriz, J., Adamcova, E. Knox, J. H., Hora, J. J., "Characterization of Adsorbents by High-Performance Liquid Chromatography Using Aromatic Hydrocarbons. Porous Graphite and its Comparison with Silica Gel, Alumina, Octadecylsilica and Phenylsilica", *J. Chromatogr. A*, 663 (1994) 151.
68. Tarbin, J. A., Shearer, G. J., "Improved High-Performance Liquid-Chromatographic Procedure for the Determination of Lasalocid in Chicken Tissues and Egg Using Polymeric and Porous Graphitic Carbon Columns", *J. Chromatogr.*, 579 (1992) 177.
69. Kitahata, S., Hara, K., Fujita, K., Nakano, H., Kuwahara, N., Koizumi, K., "Acceptor Specificity of Cyclodextrin Glycosyltransferase from *Bacillus-Stearothermophilus* and Synthesis of Alpha-D-Glucosyl O-Beta-D-galactosyl-(1-4)-Beta-D- Glucoside", *Biotechnol. Biochem.*, 56 (1992) 1386.
70. Herón, S., Tchaplá, A., "Role of the Solvent in RPLC-Influence of the Nature of Organic Modifiers of the Mobile Phase in Nonaqueous Reverse-Phase Liquid-Chromatography", *Analisis*, 21 (1993) 393.
71. Jaroniec, C. P., Jaroniec, M., Kruck, M., "Comparative Studies of Structural and Surface Properties of Porous Inorganic Oxides Used in Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A.*, 797 (1998) 93.
72. Rigney, M. P., Funkenbusch, E. F., Carr, P. W., "Physical and Chemical Characterization of Microporous Zirconia", *J. Chromatogr.*, 499 (1990) 291.
73. Trüding, U., Müller, G., Unger, K.K., "Porous Zirconia and Titania as Packing Materials for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 535 (1990) 111.

74. Rigney, M.P., Weber, T.P., Carr, P.W., "Preparation and Evaluation of Polymer-Coated Zirconia Reversed-Phase Chromatographic Support", *J. Chromatogr.*, 484 (1989) 273.
75. Weber, T.P., Carr, P.W., Funkenbusch, E. F., "Evaluation of a Zirconia-Based Carbon-Polymer Composite Reversed-Phase Chromatographic Support", *J. Chromatogr.*, 519 (1990) 31.
76. Yu, J., El Rassi, Z., "Reversed-Phase Liquid Chromatography of Dansyl Aminoacids with Microspherical Octadecyl-Silica and Octadecyl-Zirconia Bonded Stationary Phases", *J. Liq. Chromatogr.*, 16 (1993) 2931.
77. Schafer, W.A., Carr, P.W., Funkenbusch, E.F., Parson, K.A., "Physical and Chemical Characterization of Porous Phosphate-Modified Zirconia Substrate", *J. Chromatogr.*, 587 (1991) 137.
78. Kawahara, M., Nakamura, H., Nakajima, T., "Titania and Zirconia: Possible new Ceramics Microparticulates for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 515 (1990) 149.
79. Elestad, O.H., Blindheim, V., "Reaction of Titanium Tetrachloride with Silica Gel Surfaces", *J. Mol. Catal.*, 33 (1985) 275.
80. Pesek, J. J., Sandoval, J. E., Su, M., "New Alumina-based Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography. Synthesis by Olefin Hydrosilation on a Silicon Hydride-Modified Alumina Intermediate", *J. Chromatogr.*, 630 (1993) 95.
81. Haky, J. E., Raghani, A., Dunn, B. M., "Comparison of Polybutadiene-Coated Alumina and Octadecyl-Bonded Silica for Separations of Proteins and Peptides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 541 (1991) 303.
82. Haky, J. E., Blauvelt, T. M., Wieserman, I. F., "Perfluorooctyl and Perfluorobutyl bonded Alumina Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatography", *J. Liq. Chromatogr.*, 19 (1996) 307.
83. Haky, J. E., Raghani, A., Dunn, B. M., Wieserman, I. F., "Evaluation of Octadecyl-Bonded Alumina for Separations of Proteins and Peptides by Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatography", *Chromatographia*, 32 (1991) 49.
84. Laurent, C. L., Billiet, H. A., de Galan, L., "On the Use of Alumina in HPLC with Aqueous Mobile Phases at Extreme pH", *Chromatographia*, 17 (1983) 253.
85. McNeff, J. A., Carr, P.W., "Synthesis and Use of Quaternized Polyethylenimine-Coated Zirconia for High-Performance Anion-Exchange Chromatography", *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3886.
86. Hu, J., Carr, P.W., "Synthesis and Characterization of New Zirconia-Based Polymeric Cation-Exchange Stationary Phases for High-Performance Chromatography", *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1934.
87. Wirth, H.J., Erikson, K. O., Holt, P., Aguilar, M., Hearn, M. T. W., "High-Performance Liquid Chromatography of Amino Acids, Peptides and Proteins. CXXIX. Ceramics-Based Particles as Chemically Stable Chromatographic Supports", *J. Chromatogr.*, 646 (1993) 129.

88. Yu, J.; El Rassi, Z.; "Reversed-Phase Liquid Chromatography with Microspherical Octadecyl-Zirconia Bonded Stationary Phase", *J. Chromatogr.*, **631** (1993) 91.
89. Yu, J. C., Qu, F., Lin, J., Lam, H., Chen, Z., "Ion Chromatographic Separation of Anions and Cations on a Titania Packed Column", *J. Liq. Chromatogr. Rel Technol.*, **24** (2001) 367.
90. Tani, K., Suzuki, Y., "Influence of Titania Matrix on Retention Behavior in Reversed-Phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A.*, **722** (1996) 129.
91. Pesek, J. J., Matyska, M. T., Ramakishnan., "Synthesis and Characterization of Titania Based Stationary Phases Using the Silanization/Hydrosilation Method", *Chromatographia*, **44** (1997) 538.
92. Winkler, J., Marmé, S. J., "Titania as a Sorbed in Normal-phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **888** (2000) 51.
93. Pursch, M., Vanderhart, D. L., Sander, L. C., Gu, L., Nguyen, T., Wise, S. A., Gajewski, D. A., "C₃₀ Self-Assembled Monolayers on Silica, Titania and Zirconia: HPLC Performance, Atomic Force Microscopy, Ellipsometry, and NMR Studies of Molecular Dynamics and Uniformity of Coverage", *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 6997.
94. Honda, F., Honda, H., Koishi, M., Matsuno, T., "Double-layered Composite Particles as a Complex Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **775** (1997) 13.
95. Hu, Y. L., Feng, Y. Q., Da, S. L., "Chromatographic Evaluation of Alkylphosphonic Acid-Modified Ceria-Zirconia in Reversed-Phase HPLC", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **24** (2001) 957.
96. Grün, M., Kurganov, A. A., Schacht, S., Schrieth, F., Unger, K.K., "Comparison of an Ordered Mesoporous Aluminosilicate, Silica, Alumina, Titania and Zirconia in Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **740** (1996) 1.
97. Zheng, J. Y., Pang, J. B., Qiu, K. Y., Wei, Y., "Synthesis and Characterization of Mesoporous Titania and Silica-Titania Materials by Urea Templated Sol-Gel Reactions", *Micropor. Mesopor. Mater.*, **49** (2001) 189.
98. Gisler, A., Muller, C. A., Schneider, M., Mallat, T., Baiker, A., "Titania-Silica Epoxidation Catalysts Modified by Mono and Bidentate Organic Functional Groups", *Top. Catal.*, **15** (2001) 247.
99. Mariscal, R., Lopez – Granados, M., Fierro, J. L. G., Sotelo, J. L., Martos, C., VanGuiken, R., "Morphology and Surface Properties of Titania-Silica Hydrophobic Xerogels", *Langmuir*, **16** (2000) 9460.
100. Holland, M. A., Pickup, A. M., Mountjoy, G., Tsang, E. S. C., Wallidge, G. W., Newport, R. J., Smith, M. E., "Synthesis, Characterisation and Performance of (TiO₂)_{0.18}(SiO₂)_{0.82} Xerogel Catalysts", *J. Mater. Chem.*, **10** (2000) 2495.
101. Retuert, J., Quijada, R., Fuenzalida, V. M., "Titania Coatings on High and Low Surface Area Spherical Silica Particles by a Sol-gel Method", *J. Mater. Chem.*, **10** (2000) 2818.
102. Imai, H., Morimoto, H., Tominaga, A., Hirashima, H., "Structural Changes in Sol-Gel Derived SiO₂ and TiO₃ films by Exposure to Water Vapor", *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, **10** (1997) 45.

103. Imai, H., Hirashima, H., Awazu, K., "Alternative Modification Methods for Sol-Gel Coatings of Silica, Titania and Silica-Titania Using Ultraviolet Irradiation and Water Vapor", *Thin Solid Films*, **351** (1999) 91.
104. Gao, X., Wachs, I. E., "Titania-Silica as Catalysts: Molecular Structural Characteristics and Physico-Chemical Properties", *Catal. Today*, **51** (1999) 233.
105. Stark, W. J., Pratsinis, S.E., Baiker, A., "Flame Made Titania/Silica Epoxidation Catalysts", *J. Catal.*, **203** (2001) 516.
106. Castillo, R., Koch, B., Ruiz, P., Delmos, B., "Influence of Preparation Methods on the Texture and Structure of Titania Supported on Silica", *J. Mater. Chem.*, **4** (1994) 903.
107. Castillo, R., Koch, B., Ruiz, P., Delmos, B., "Influence of the Amount of Titania on the Texture and Structure of Titania Supported on Silica", *J. Catal.*, **161** (1996) 524.
108. Fu, X., Qutubuddin, S., "Synthesis of Titania-Coated Silica Nanoparticles Using a Nonionic Water-in Oil Microemulsion", *Colloids Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **179** (2001) 65.
109. Lebeda, R., Gun'ko, V.M., Marcianik, M., Malygin, A. A., Makin, A. A, Grzegorzczak, W., Trznadel, B.J., Pakhlov, E.M., Voronic, E.F., "Structure of Chemical Vapor Deposition Titania/Silica Gel", *J. Colloids Interf. Sci.*, **218** (1999) 23.
110. Kubota, L. T., Gushikem, Y., de Castro, S., Moreira, J. C., "Preparation and Characterization of Titanium (IV) Oxide Grafted onto Silica on a Silica Gel Surface", *Colloids Surf.*, **57** (1991) 11.
111. Peixoto, C. R. M, Kubota, L. T, Gushiken, Y., "Use of ruthenium-(ethylenedinitrito)-tetraacetic acid monohydrate ion immobilized on zirconium(IV) Oxide coated silica gel surface as an amperometric sensor for oxygen in water", *Analytical Proceedings*, **117** (1992) 1029.
112. 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, 2001.
113. Kirkland, J. J., van Straten, M. A., Claessens, H. A., "High pH Mobile Phase Effects on Silica-Based Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Columns", *J. Chromatogr. A*, **691** (1995) 3.
114. Claessens, H. A., Van Straten, M. A., Kirkland, J. J., "Effects of Buffers on Silica-Based Column Stability in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **728** (1996) 259.
115. Kirkland, J. J., Henderson, J. W., Destefano, J. J., Van Straten, M. A., Claessens, H. A., "Stability of Silica-Based, Endcapped Columns with pH 7 and 11 Mobile Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **762** (1997) 97.
116. Kirkland, J. J., "The Use of Porous Silica-Based Column Packing in HPLC Method Development", *LC-GC Special Issue on Current Issues in HPLC Technology*, May 1997, S46.

117. Kirkland, J. J., Henderson, J. M., "Reversed-phase HPLC Selectivity and Retention Characteristics of Conformationally Different Bonded Alkyl Stationary Phases"; *J. Chromatogr. Sci.*, 32 (1994) 473.
118. Hetem, M. J. J., de Haan, J. W., Claessens, H. A., van de Vem, L. J. M., Cramers, C. A., "Influence of Alkyl Chain Length on the Stability of n-Alkyl-modified Reversed Phases. 1. Chromatographic and Physical Analysis", *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2288.
119. Kirkland, J. J., "Stability of Silica-Based, Monofunctional C18 Bonded-Phase Column Packing for HPLC at High pH", *J. Chromatogr. Sci.*; 34 (1996) 309.
120. Verstraeten, W., de Zeeuw, J., Cromben, J., Vonk, N., "Next-Generation Universal Columns for RPLC", *Am. Lab.*, 32 (20) (2000) 20.
121. Wu, Z. Y., Ouvrard, G., Gressier, P., Natoli, C. R., "Ti and O Edges for Titanium Oxides by Multiple Scattering Calculations; Comparison to XAS and EELS Spectra", *Phys. Rev. B.*, 55 (1997) 10382.
122. Neto, B. B., Scarminio, I. S., Bruns, R. E., "Como Fazer Experimentos. Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria", Editora da UNICAMP, Campinas, 2001.
123. Pinto, G. M. F., Collins, K. E., Jardim, I. C. S. F., "C-18 Stationary phases sorbed on zirconized silica for use in HPLC", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 25 (2) (2002) 205.
124. Anazawa, T. A., "Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionárias Reversas, tipo C₈ para CLAE", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 1996.
125. Silva, R. B., "Preparação de Fases Estacionárias para CLAE a partir de Poli(metiloctilsiloxano) sobre a Sílica Titanizada", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
126. Bottoli, C. B. G., "Sorção, Imobilização e Extração de Polissiloxanos em Sílicas Porosas para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2002.
127. Collins, K. E., Franchon, A. C., Jardim, I. C. S. F., Radovanovic, E., Gonçalves, M. C., "The Effects of Inner Surface Roughness of Microbore Column Blanks on Column Performance", *LC-GC*, 18 (2000) 106.
128. Majors, R. E., "Slurry Packing Microparticulate Columns", *LC-GC*, 2 (1984) 502.
129. Fonseca, D. A., Gutiérrez, H. R., Collins, K. E., Collins, C. H. "A Rapid Method to Evaluate RP-HPLC Column Stability" submitted to *Journal of Chromatography A*.
130. Garbassi, F., Balducci, L., "Preparation and Characterization of Spherical TiO₂-SiO₂ Particles", *Micropor. Mesopor. Mater.*, 47 (2001) 51.
131. 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., "Synthesis and Solid-State NMR Investigations of Radiation-Immobilized Polysiloxanes on Bare, Titanium-Grafted, and Zirconium-Grafted Silica", *Chem. Mater.*, 13 (2001) 1874.