



**UNICAMP
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

Dissertação de Mestrado

***Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
por Imobilização Térmica do Poli (2-fenilpropil) metilsiloxano sobre Sílica***

Marcelo Vinícius Felizatti Delmonde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

LABCROM Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida

Campinas - SP

2011

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

D382f	<p>Delmonde, Marcelo Vinícius Felizatti. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa por imobilização térmica do poli (2-fenilpropil) metilsiloxano sobre sílica / Marcelo Vinícius Felizatti Delmonde. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.</p> <p>Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Fase estacionária. 3. Sílica. 4. Polissiloxano. I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	---

Título em inglês: Stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography using thermal immobilization of poly (phenylpropyl) methylsiloxane onto silica

Palavras-chaves em inglês: High-performance liquid chromatography, Stationary phase, Silica, Polysiloxane

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (orientadora), Profa. Dra. Susanne Rath (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Anizio Marcio de Faria (FACIP/UFU)

Data de defesa: 01/03/2011

*Aos meus pais, Cleide e Emílio,
à minha irmã Andréa, à Paulinha
e ao meu amigo Flávio.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em especial, a professora Isabel Jardim, por me possibilitar a busca de uma formação consistente, pela sua paciência e por ter elucidado, durante as suas excelentes aulas, o cálculo através de “Balanço de massas”. À professora Carol Collins, pelo seu exemplo diário de vivacidade. Às alunas do professor Anizio: Fabi e Maurinha, pelos momentos tão agradáveis que elas me proporcionaram através de suas simpatia e alegria. Pelo convívio não menos agradável, pelas discussões e por sua contribuição a este trabalho, gostaria de agradecer à grande companheira de laboratório, Milena. Aos colegas: Camila, Lou, Marisa, Gi, Karen, Marcel, Carla, Elias e Fernanda. Ao meu amigo e irmão Flávio, pelo apoio em todos os momentos durante o período em que ele esteve aqui em Campinas. À FAPESP e ao CAPES, pelo apoio financeiro e à bolsa concedida, respectivamente.

Por fim, agradeço a todos os funcionários da Unicamp.

Muito Obrigado

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica

- Licenciatura em Química pela Uniararas – Fundação Hermínio Ometto, 12/2010.
- Bacharelado em Química pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Instituto de Química, Campus de Araraquara, 01/2006.

Trabalhos Apresentados em Congressos

- Nova fase estacionária de poli (2-fenilpropil) metilsiloxano imobilizado termicamente sobre sílica, Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins (SiMCRO), 10/2010.
- Avaliação de polissiloxanos imobilizados sobre sílica com potencial aplicação no desenvolvimento de fases estacionárias, 15º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) 10/2009.
- Compostos de cobre (II) com pseudo-haletos. Síntese de compostos binucleares contendo ligantes nitrogenados, 17º CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 11/2005.

Formação Complementar

- Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, desenvolvendo atividades de pesquisa em Química Inorgânica, 2005.
- Presidente do Diretório Acadêmico “Prof. Waldemar Saffioti” – DAWS << Campus>> Universitário de Araraquara, Instituto de Química, 2005.
- Membro da Congregação do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, 2005.
- Professor de Física do Curso Unificado Campus Araraquara – CUCA, curso preparatório pré-vestibular, 2004.
- Bolsista do Programa Especial de Treinamento – PET, vinculado ao Ministério da Educação e do Desporto – MEC, realizando atividades como: palestras, seminários, organização de eventos e elaboração de textos, 2003.
- Participação em projetos do Centro de Ciências de Araraquara - UNESP, colaborando com os objetivos do CCA: difusão do conhecimento científico, 2002.

Experiência Profissional

- Professor de química em colégios Objetivo. Período: 01/2006 – 07/2008.

- Desenvolvimento de atividades administrativas na Sessão de Lançamentos do Serviço de Tratamento de Água e Esgoto de Araras – SAEMA. Vínculo: servidor público. Período: 04/2000 - 02/2002.

- Desenvolvimento de atividades administrativas na Cooperativa de Prestação de Serviços de Araras e Região – AGROSERV. Vínculo: celetista. Período: 10/1995 – 12/1999.

RESUMO

Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa por Imobilização Térmica do Poli (2-fenilpropil)metilsiloxano sobre Sílica.

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de fases estacionárias (FE) para utilização em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) a partir da imobilização térmica de poli (2-fenilpropil) metilsiloxano (PFPMS) sobre suporte de sílica. Diferentes quantidades de copolímero foram avaliadas, alcançando-se um bom desempenho cromatográfico com uma carga polimérica de 50 % (m/m, polissiloxano/sílica). As melhores condições de temperatura e tempo para a imobilização do copolímero sobre o suporte por tratamento térmico foram: 140 °C e 6 h, respectivamente. A extração do excesso de copolímero não imobilizado também foi otimizada, obtendo-se o melhor resultado com a utilização de clorofórmio por 3 horas, seguido de metanol por 2 horas, ambos a uma vazão de 1 mL min⁻¹. A caracterização físico-química do suporte de sílica, copolímero e da FE através de análise elementar, espectroscopia de absorção na região do infravermelho e determinação da área superficial específica, volume e diâmetro de poros das partículas indicam a presença do copolímero sobre o suporte e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear sugere que o copolímero se encontra sorvido e quimicamente ligado ao suporte de sílica. As FE preparadas com 50 % de PFPMS apresentaram aproximadamente 16,4 % de C, eficiência de 70.000 pratos m⁻¹ e fator de assimetria dentro da faixa aceita na literatura para o pico do naftaleno (0,9-1,6). Os estudos de aplicação demonstram que a FE desenvolvida apresenta potencial na separação de compostos aromáticos.

ABSTRACT

Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography using Thermal Immobilization of Poly (phenylpropyl) methylsiloxane onto Silica.

This work presents the development of stationary phases (SP) for use in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) prepared by thermal immobilization of poly (phenylpropyl) methylsiloxane (PPPMS) onto a silica support. Different amounts of copolymer were evaluated, achieving a good performance using a polymeric charge of 50% (m/m, polysiloxane/silica). The best conditions of temperature and time for immobilization onto silica support by thermal treatment were: 140 °C and 6 h, respectively. The non immobilized copolymer extraction was also optimized, where the best results were achieved using chloroform for 3 hours, followed by methanol for 2 hours, both with a flow rate of 1 mL min⁻¹. The presence of the copolymer on the silica support was demonstrated by physicochemical characterization of the support, the PPPMS and the SP by elemental analysis, infrared absorption spectroscopy and determining the volume and pore diameter of the particles, while nuclear magnetic resonance spectroscopy suggests sorption and chemical bonding between the support and polysiloxane. The SP prepared with 50% PPPMS showed approximately 16.4% of C, efficiencies of 70,000 plates m⁻¹ and asymmetry factors within the range accepted in the literature for the peak of naphthalene (0.9-1.6). The application studies showed that the SP developed presents potential capacity for separation of aromatic compounds.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. SUPORTE CROMATOGRÁFICO.....	2
1.1.1. <i>Sílica</i>	2
1.1.2. <i>Sílica híbrida</i>	4
1.2. FASES ESTACIONÁRIAS PARA CLAE-FR	6
1.2.1. <i>Fases estacionárias quimicamente ligadas</i>	6
1.2.1.1. Fases estacionárias alquilas convencionais.....	7
1.2.1.2. Fases estacionárias estericamente protegidas, bidentadas e com sílica híbrida	10
1.2.1.3. Fases estacionárias alquilas com polimerização vertical e horizontal.....	14
1.2.1.4. Fases estacionárias com grupo polar embutido.....	15
1.2.1.5. Fases estacionárias fenil.....	16
1.2.2 <i>Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados</i>	18
1.3. AVALIAÇÃO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	19
1.4. ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS (AHA)	24
2. OBJETIVOS	28
3.1. REAGENTES E COLUNAS	29
3.2. EQUIPAMENTOS	30
3.3. SUPORTE CROMATOGRÁFICO.....	31
3.4. FASE ESTACIONÁRIA LÍQUIDA.....	31
3.5. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	32
3.6. PREPARO DAS FASES ESTACIONÁRIAS	33
3.6.1. <i>Sorção do polímero sobre o suporte</i>	33
3.6.2. <i>Tratamento térmico</i>	34
3.6.3. <i>Extração do excesso de copolímero não imobilizado</i>	34
3.7. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PFPMS E DAS FASES ESTACIONÁRIAS	34
3.7.1. <i>Análise elementar</i>	34
3.7.2. <i>Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros</i>	35
3.7.3. <i>Análise termogravimétrica</i>	35

3.7.4. Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	35
3.7.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ²⁹ Si.....	36
3.8. ENCHIMENTO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	36
3.8.1. Suspensão da fase estacionária.....	36
3.8.2. Recheio das colunas com a fase estacionária.....	36
3.8.3. Condicionamento das colunas.....	37
3.9. CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS FASES ESTACIONÁRIAS	38
3.9.1. Preparo das fases móveis	38
3.9.2. Testes preliminares de avaliação	38
3.9.3. Mistura teste de Tanaka	39
3.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA FE PFPMS140-6.....	40
3.11. AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA FASE ESTACIONÁRIA	41
3.11.1. Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	41
3.11.2. Separação da mistura de Szabó e Csato	41
3.11.3. Separação de fármacos.....	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUPORTE DE SÍLICA, DO PFPMS E DA FASE ESTACIONÁRIA PFPMS140-6	42
4.1.1. Área superficial específica, volume e diâmetro de poros do suporte e da FE PFPMS140-6.....	42
4.1.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho.....	43
4.1.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ²⁹ Si.....	45
4.1.4. Termogravimetria.....	47
4.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO EXCESSO DE COPOLÍMERO NÃO IMOBILIZADO	48
4.3. OTIMIZAÇÃO DA CARGA DE COPOLÍMERO	50
4.4. CURVA DE VAN DEEMTER	50
4.5. OTIMIZAÇÃO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO POR TRATAMENTO TÉRMICO	51
4.6. CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FASE ESTACIONÁRIA PFPMS140-6 USANDO A MISTURA DE TANAKA.....	54
5. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA FE PFPMS140-6 EM MEIO ÁCIDO	58
6. AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA FE PFPMS140-6	59

6.1. SEPARAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)	59
6.2. SEPARAÇÃO DA MISTURA DE SZABÓ E CSATO.....	62
6.3. SEPARAÇÃO DE FÁRMACOS	64
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
8. CONCLUSÃO.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características do copolímero.	31
Tabela 2. Valores de pKa dos fármacos analisados.	42
Tabela 3. Área superficial específica, volume e diâmetro de poros do suporte e da FE PSPMS140-6.	42
Tabela 4. Porcentagem de carbono (%C) nas FE submetidas a três diferentes procedimentos de extração.	49
Tabela 5. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação das fases estacionárias submetidas à diferentes procedimentos de extração.	50
Tabela 6. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação das FE preparadas com diferentes cargas de polímero.	50
Tabela 7. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação das fases estacionárias preparadas em diferentes condições de imobilização do copolímero.	52
Tabela 8. Cálculo da média e do desvio padrão para os parâmetros cromatográficos medidos para três colunas diferentes enchidas com a FE PFPMS140-6.	53
Tabela 9. Características das colunas comerciais ^{29,51,52} com as quais a FE preparada apresentou maior similaridade quanto às propriedades medidas ao se aplicar o teste de Tanaka.	56
Tabela 10. Propriedades das colunas comerciais ^a com as quais a FE preparada apresentou maior similaridade quanto às propriedades medidas ao se aplicar o teste de Tanaka.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de silanóis e ligação siloxano presentes na sílica. ⁵	4
Figura 2. (A) sílica híbrida de 1ª geração. (B) sílica híbrida de 2ª geração. ¹⁵	5
Figura 3. Ligação obtida com um: (A) silano monofuncional, (B) e (C) silano bifuncional, (D) e (E) silano trifuncional, na ausência de água. ⁶	7
Figura 4. FE C18 dimetilsubstituída. ²²	8
Figura 5. Ilustração das possíveis conformações das cadeias orgânicas hidrofóbicas do tipo C18 ligadas na superfície da sílica: (A) estendida, quando solvatada por uma fase móvel adequada e (B) o colapso das cadeias orgânicas na presença de uma fase móvel composta por quase 100% de água. ²⁰	9
Figura 6. FE C18 estericamente protegida com grupo volumoso. ²²	10
Figura 7. Estrutura geral das fases estacionárias bidentadas. R = metil, n-butil, n-octil ou n-octadecil; Q = -CH ₂ -CH ₂ - ou -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -. ¹⁹	11
Figura 8. Comparação da estabilidade de três diferentes colunas C18 quimicamente ligadas a pH 0,9 e T = 90 °C. Fase móvel MeOH:H ₂ O (50:50, v/v) com 1% de ácido trifluoracético e vazão de 1,5 mL min ⁻¹ . Fator de retenção medido para o tolueno em fase móvel (60:40, v/v); vazão de 1,0 mL min ⁻¹ ; temperatura ambiente. ²⁴	12
Figura 9. Dissolução do suporte de sílica em pH elevado. Colunas: convencional – C18 (Agilent Technologies Zorbax® Rx – C18); bidentada – C18 (Agilent Technologies Zorbax® Extend® - C18); sílica híbrida – C18 (Waters Associates XTerra® - MS). Fase móvel: 50% metanol/50% 0,10 mol L ⁻¹ tampão carbonato/bicarbonato de sódio, pH 10, vazão: 1 mL min ⁻¹ e T = 25 °C. ²	13
Figura 10. Estabilidade em pH baixo de colunas recheadas com diferentes tipos de FE. Colunas: convencional – C18 (Inertsil® ODS-3); sílica híbrida – C18 (Waters Associates XTerra® - MS); estericamente protegida – C18 (StableBond® - C18). Fase móvel: MeOH:H ₂ O (50:50, V/V) com 1% de ácido trifluoracético, pH 1,3, vazão: 3,0 mL min ⁻¹ e T = 80 °C. Fator de retenção medido para um soluto neutro. ²²	14
Figura 11. Estrutura da FE C18. (A) com polimerização vertical e (B) com polimerização horizontal. ²²	15
Figura 12. FE com grupo polar embutido (GPE) ¹⁵	15

Figura 13. Esquema representando a estrutura de uma fase fenil comercial. ²⁹ Espaçador = geralmente de C ₁ a C ₆ ; X = heteroátomo ou CH ₂ ; Grupo fenil = 1 ou 2 anéis; Ligação = polimérica (R = OH ou Si-O-Si), monomérica (R = metil ou isopropil). ²⁹	18
Figura 14. Cromatograma com as medidas empregadas na determinação dos parâmetros cromatográficos. ¹	20
Figura 15. Cálculo do fator de assimetria ¹	22
Figura 16. Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel. ¹	24
Figura 17. Dispersão entre três indivíduos mensurados com relação a duas variáveis quantitativas contínuas.	24
Figura 18. Distância entre um ponto P=(x ₁ , x ₂) e a origem O=(0, 0), fornecida pelo teorema de Pitágoras.....	25
Figura 19. Dendrograma para agrupar 7 objetos (A, B, C, D, E, F e G).	27
Figura 20. Fórmula Estrutural do poli (2-fenilpropil) metilsiloxano.	31
Figura 21. Coluna cromatográfica e suas conexões. ⁵ a) porcas terminais, b) corpo da coluna, c) manga com filtro retentor, d) redutor de volume.	32
Figura 22. Representação esquemática do sistema de enchimento de colunas. ⁵	37
Figura 23. Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a sílica, utilizando pastilha de KBr.	43
Figura 24. Espectro de absorção na região do infravermelho do copolímero PFPMS.	44
Figura 25. Espectro de absorção na região do infravermelho da FE PFPMS140-6.	45
Figura 26. Espectros de RMN ²⁹ Si obtidos para a sílica (SiO ₂).	46
Figura 27. Espécies de silício presentes na sílica com seus valores de deslocamento químico.	46
Figura 28. Espectros de ²⁹ Si NMR obtidos para uma amostra de FE PFPMS140-6.	47
Figura 29. Espécies de silício presentes na FE PFPMS140-6 com seus valores de deslocamento químico.....	47
Figura 30. Curvas TGA (—) e DTG (---) obtidas para o copolímero PFPMS sob atmosfera inerte, a uma velocidade de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , de 25 °C a 1000 °C, utilizando-se aproximadamente 14 mg de FE em suporte de Al ₂ O ₃	48
Figura 31. Curva de van Deemter para uma FE imobilizada a 120 °C por 12 h.	51
Figura 32. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste 1 com as FE preparadas por imobilização térmica do copolímero em diferentes condições. Condições cromatográficas:	

volume de injeção: 5 μL , FM: metanol:água 65:35 (v/v); vazão 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos da MT-1: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.....53

Figura 33. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste 2 com as FE preparadas por imobilização térmica do copolímero em diferentes condições. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; FM: metanol:água 60:40 (v/v); vazão 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos da MT-2: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N - dimetilaniлина (4) naftaleno e (5) acenafteno.....54

Figura 34. Dendograma da FE PFPMS140-6 e de FE comerciais. Esquerda: Grupo contendo a FE PFPMS140-6: Nó (similaridade = 0,743; distância = 2,815; descendentes = 7). Direita: HCA completo. O círculo indica a localização do grupo que contém a FE PFPMS140-6.....55

Figura 35. Porcentagem da eficiência inicial em função do volume de coluna. Condições cromatográficas: FM metanol:0,1 % de ácido trifluoracético em H_2O pH 1,7 (50:50, v/v); vazão de 0,5 mL min^{-1} ; volume de amostra: 1 μL ; temperatura do forno da coluna: 80 $^{\circ}\text{C}$; detecção UV-Vis a 254 nm. Analito-teste: tolueno.....59

Figura 36. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de HPA na FE PFPMS140-6 (A) e nas colunas comerciais Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm (B) e Nova-Pak C18, 4 μm , 150 x 3,9 mm (C). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (65:35, v/v); vazão: (A) 0,3 mL min^{-1} (B) 1,0 mL min^{-1} e (C) 1,0 mL min^{-1} ; volume de amostra: 5 μL ; temperatura ambiente; detecção UV a 254 nm. Compostos: (1) acenaftileno, (2) fluoreno, (3) acenafteno, (4) fluoranteno, (5) pireno, (6) criseno.....61

Figura 37. Cromatogramas obtidos na separação da mistura de Szabó e Csató na FE PFPMS140-6 (A) e nas colunas comerciais Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm (B) e Nova-Pak C18, 4 μm , 150 x 3,9 mm (C). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol: H_2O 55:45 (v/v); vazão: (A) 0,3 mL min^{-1} , (B) 1,0 mL min^{-1} , (C) 1,0 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos: (1) uracila, (2) fenol, (3) *m*-cresol, (4) acetofenona, (5) benzoato de metila, (6) tolueno, (7) *p*-xileno e (8) propilbenzeno.63

Figura 38. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de fármacos na FE PFPMS140-6 (A) e nas colunas comerciais Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm (B) e Nova-Pak C18, 4 μm , 150 x 3,9 mm (C). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:0,020 mol L^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ a pH 2,7 (50:50, v/v); vazão de: 0,3 mL min^{-1} (A), 1,0 mL min^{-1} (B), 1,0 mL min^{-1} (C); volume de amostra: 5 μL ; temperatura de 30 $^{\circ}\text{C}$; detecção

UV a 220 nm. Compostos: (1) levofloxacina, (2) dextrometorfan, (3) nortriptilina, (4) amitriptilina, (5) diazepam.....65

1. INTRODUÇÃO

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) compreende um conjunto de métodos físico-químicos de separação de compostos que, atualmente, são amplamente empregados em diversas áreas, análises clínicas, alimentos, polímeros sintéticos e química ambiental.^{1,2} Esse vasto campo de aplicação deve-se, principalmente, à sua versatilidade em separar compostos com as mais variadas características físico-químicas, independente da volatilidade e da estabilidade térmica dos mesmos.^{1,3}

De um modo geral, o processo de separação cromatográfica em CLAE envolve um equilíbrio de distribuição dos componentes de uma amostra entre duas fases: uma fase móvel (FM), que é bombeada sob alta pressão a uma vazão controlada, arrastando os analitos através de uma coluna, de tamanho reduzido, normalmente preenchida com um material finamente pulverizado, a fase estacionária (FE). A distinta distribuição dos analitos entre a FE e a FM garante que estes percorram a coluna com diversas velocidades, resultando em retenções diferenciadas, fundamentais para a separação cromatográfica.⁴

As separações utilizando os métodos da CLAE empregam, predominantemente, a modalidade fase reversa (FR)², que consiste de uma FE menos polar que a FM, fixada em um suporte cromatográfico, normalmente, um sólido inorgânico como a sílica. Embora o desenvolvimento da CLAE-FR tenha iniciado há cerca de quatro décadas², esta modalidade ainda continua despertando grande interesse, resultando em intensas pesquisas em universidades e empresas.^{5,6} Isso se deve as suas inúmeras vantagens, como: uso de fases móveis de menor custo e menos tóxicas, devido à presença de água em sua composição; equilíbrio rápido da coluna após a mudança de fase móvel (FM); possibilidade da condução de separações no modo de eluição por gradiente, resultando em maior rapidez e melhor separação nas análises; boa repetibilidade dos tempos de retenção; amplo campo de atuação, devido à possibilidade de separar compostos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas.^{1,3}

As FE para CLAE-FR são normalmente constituídas de camadas orgânicas ligadas quimicamente^{7,8} ou imobilizadas^{9,10} ou apenas sorvidas¹¹ no suporte cromatográfico. Colunas com propriedades cromatográficas diferentes são desenvolvidas variando-se o tipo de camada orgânica, o modo de fixação desta camada e o material empregado como suporte.¹² Estudos recentes relacionados ao tema têm sido impulsionados por dois fatores: estabilidade, ou seja, aumento do tempo de vida útil das colunas, e seletividade, isto é, FE

com alto desempenho para análises específicas de certos analítos ou classe de analítos. Associados a esses fatores estão a busca por maior reprodutibilidade dos parâmetros cromatográficos de coluna para coluna e de lote para lote, melhor desempenho na análise de compostos orgânicos básicos, bem como a necessidade de novos materiais que suportem as condições necessárias para se reduzir o tempo das análises.

1.1. SUPORTE CROMATOGRÁFICO

As principais características desejáveis em um suporte cromatográfico^{7,12-14} são as seguintes:

- Ser suficientemente poroso, a fim de permitir que o líquido estacionário seja absorvido pelos seus poros;
- O método de síntese das partículas deve ser altamente reprodutível e resultar em partículas com estreita faixa de distribuição de tamanho de partículas e de poros;
- Possuir diâmetro de poro entre 5 e 100 nm. Poros muito estreitos tornam difícil a transferência de massa, podendo ocorrer efeitos de exclusão por tamanho. Poros muito largos impedem a fixação do líquido estacionário por forças capilares, e, desta forma, o líquido pode ser removido com a passagem da FM;
- Possuir uma alta concentração de grupos ativos em sua superfície para facilitar a adsorção do líquido estacionário ou a reação de fixação do mesmo ou a modificação da superfície;
- Possuir área superficial suficientemente grande para aumentar a capacidade de aceitação da amostra;
- Ser de alta durabilidade sob condições adversas, especialmente em pH alto e baixo;
- Resistência mecânica alta para suportar as altas pressões utilizadas, tanto no enchimento de colunas, como nas análises.

1.1.1. Sílica

A sílica (SiO_2) é um sólido inorgânico formado por unidades tetraédricas SiO_4 . Os átomos de silício internos tendem a manter uma coordenação tetraédrica com o oxigênio, formando a ligação siloxano (Si-O-Si), enquanto os mais externos completam o seu número de coordenação através da ligação com grupos hidroxilas, formando os grupos silanóis (Si-OH).¹ Atualmente, a obtenção de partículas esféricas de sílica porosa se dá basicamente por variações no processo sol-gel.¹⁵

Por várias razões, a sílica é o material mais empregado como suporte cromatográfico em CLAE. Primeiro, as suas partículas esféricas pequenas são resistentes mecanicamente, possuem grande área superficial e apresentam-se disponíveis com uma excelente uniformidade de tamanho e considerável gama de diâmetros e tamanhos de poro. Segundo, a facilidade de modificação de sua superfície através de métodos já bem consolidados permite a obtenção de FE com seletividades diversificadas.¹⁴

A resistência mecânica, característica da sílica, possibilita o emprego de altas pressões, necessárias ao se utilizar micropartículas como material de recheio. Além disso, micropartículas porosas de sílica, além de aceitarem quantidades consideráveis de amostra, devido a sua grande área superficial, não sofrem inchaço pela ação de solventes ou compressão devido às altas pressões usuais em CLAE, o que afetaria o desempenho das separações, bem como a reprodutibilidade dos parâmetros cromatográficos.^{6,14}

Colunas extremamente eficientes são obtidas associando a rápida transferência de massa apresentada pelas micropartículas, com a redução do espalhamento molecular de analitos, alcançada pela uniformidade dos recheios contendo partículas esféricas similares quanto à forma e ao tamanho.^{1,4}

Por outro lado, a superfície da sílica possui a desvantagem de ser quimicamente heterogênea, o que afeta a sua funcionalização no processo de fixação da FE e, conseqüentemente, a repetibilidade dos parâmetros cromatográficos. Ela apresenta pelo menos três tipos de grupos silanóis: germinais, vicinais e isolados ou livres, sendo estes últimos, embora em menor quantidade, os mais ácidos.¹⁶ Esses grupos são considerados os principais sítios de adsorção, sendo que os procedimentos de fixação da FE líquida sobre a sílica são capazes de eliminá-los ou recobri-los apenas parcialmente, o que resulta nos chamados silanóis residuais, responsáveis por reterem fortemente compostos básicos, ocasionando perda de resolução em separações cromatográficas. Também possui grupos siloxanos, em que os dois pares de elétrons π do oxigênio estão envolvidos em interações $d_{\pi-p} \pi$, fortalecendo as ligações σ , mas se tornando inacessíveis para a formação de ligações de hidrogênio com moléculas doadoras de prótons¹⁶, sendo estes grupos a base da estrutura rígida da sílica e fracos sítios de interações hidrofóbicas. Na Figura 1 podem ser visualizados os tipos de silanóis e a ligação siloxano presentes na sílica.⁵

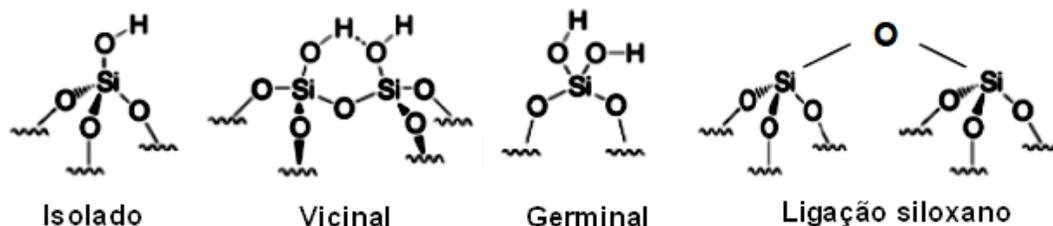


Figura 1. Tipos de silanóis e ligação siloxano presentes na sílica.⁵

As maneiras normalmente utilizadas a fim de se evitar as interações indesejadas por troca iônica de compostos básicos com os silanóis residuais são:

- supressão parcial da ionização dos silanóis e a protonação de analitos básicos utilizando-se fases móveis com baixos valores de pH, contudo, em valores de pH menores que 2 ocorre a degradação de muitas FE fixadas ao suporte, devido à hidrólise de ligações Si-C catalisada por ácidos;^{6,14}
- utilização de FM com altos valores de pH, condição em que os silanóis e analitos básicos estão desprotonados, porém, a dissolução da sílica é acelerada acima de pH 7, principalmente em temperaturas superiores a 40 °C, provocando a degradação da fase estacionária.^{14,17-19}

Deve-se evidenciar que o ritmo de degradação da sílica é acelerado com o aumento do teor de água na FM e ainda mais intenso, se os tampões forem preparados com sais inorgânicos, como fosfatos e principalmente carbonatos.

Outro parâmetro muito importante é o conteúdo de metais contaminantes presentes na sílica, os quais podem atuar como ácidos de Lewis complexando com espécies que apresentam pares de elétrons isolados, resultando em perda de resolução nas separações. Além disso, interagem com grupos silanóis adjacentes aumentando a acidez dos mesmos. As sílicas de alta pureza, contendo baixo teor de metais, são chamadas de tipo B, enquanto as de baixa pureza, com maior teor de metais, tipo A.¹ Com intuito de minimizar os efeitos causados pelos silanóis residuais, tem-se preferido a sílica do tipo B (alta pureza), já que os seus silanóis são menos ácidos.

1.1.2. Sílica híbrida

A sílica híbrida difere da convencional por apresentar grupos orgânicos incorporados na matriz inorgânica da sílica. A presença de grupos hidrofóbicos confere uma estabilidade química e térmica superior à da sílica convencional. Além disso, a sílica híbrida possui uma

concentração de grupos silanóis menor que a sílica inorgânica, devido a incorporação de grupos metila ou etila.¹ Na Figura 2 encontram-se as estruturas químicas da sílica híbrida de 1ª geração, que contém grupos metila e da sílica híbrida de 2ª geração, que contém grupos com pontes etano.¹⁵

A tecnologia híbrida desenvolvida pela Waters Corporation consiste em ligações silício-metil (Si-CH₃) (Figura 2A) e com pontes de etano (Si-CH₂-CH₂-Si), (Figura 2B). As partículas de sílica híbrida com ligações silício-metil são denominadas de partículas de sílica híbrida de 1ª geração, desenvolvidas em 1999, são empregadas nas colunas comercializadas como XTerra®. Estas partículas possuem maior resistência mecânica, resultam em colunas com altas eficiências, possuem estabilidade na faixa de pH de 1-12 e geram picos simétricos para compostos básicos. Em 2003, foram introduzidas as partículas de sílica híbrida com pontes etano, denominadas de partículas de sílica híbrida de 2ª geração (Figura 2B), sendo empregadas nas colunas comercializadas como XBridge™. O desenvolvimento dessas partículas foi direcionado para análises rápidas, sendo que as primeiras partículas fabricadas com essa tecnologia foram de 1,7 µm e próprias para serem usadas na cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE). Essas partículas XBridge™ possuem estabilidade mecânica maior que as de 1ª geração, são resistentes a uma faixa de pH de 1-12 e fornecem boa simetria de pico e altas eficiências. Além disso, são estáveis em temperaturas mais elevadas, de acordo com o fabricante até 60 °C, entretanto, já foram publicados trabalhos reportando que estas partículas são estáveis em temperaturas de 100 °C e de até 150 °C.¹⁵

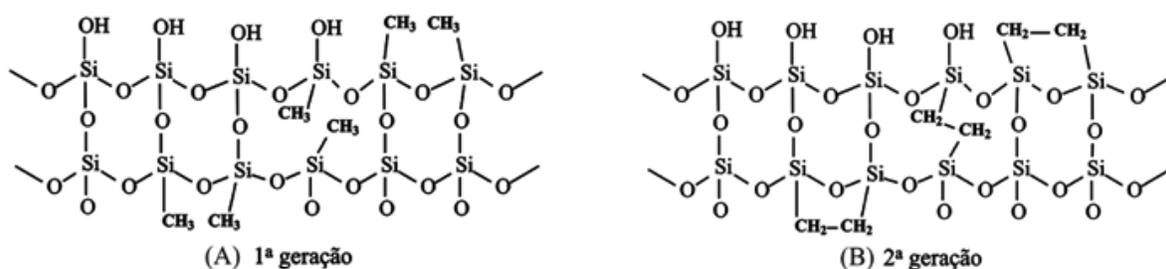


Figura 2. (A) sílica híbrida de 1ª geração. (B) sílica híbrida de 2ª geração.¹⁵

Recentemente a Phenomenex, com a tecnologia TWIN™ (*two in one*), e a Akzo Nobel, com a tecnologia Eternity™, vêm desenvolvendo partículas de sílica com uma camada de orgânica enxertada na superfície de um núcleo de sílica porosa. Esse processo é realizado no estágio final da fabricação da sílica e, dessa forma, a partícula mantém a força mecânica

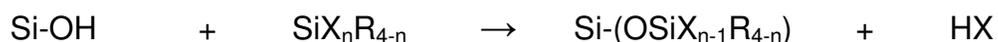
e a rigidez da sílica, promovendo altas eficiências, enquanto que a camada de sílica orgânica protege a partícula do ataque químico. Estas partículas são estáveis em uma faixa de pH de 1-12, possuem tempo de vida mais longo e fornecem boa simetria de pico. Com o mesmo intuito a Selerity Technologies vem desenvolvendo as partículas Blaze^{200™}, que consistem de partículas de sílica recobertas por um grupo orgânico polidentado, com múltiplos pontos de ligação com a sílica e com alto grau de entrecruzamento, que conferem a essas partículas alta estabilidade térmica (até 200 °C), química (na faixa de pH de 1-12) e hidrolítica.¹⁵

1.2. FASES ESTACIONÁRIAS PARA CLAE-FR

Existem várias formas de se fixar as camadas orgânicas sobre a superfície da sílica a fim de se obter uma fase estacionária para CLAE-FR, discutindo-se, a seguir, duas delas: reação de organossilanização e imobilização de polissiloxanos, com destaque para as seguintes características das FE: estrutura, estabilidade, reprodutibilidade, atividade silanofílica e seletividade.

1.2.1. Fases estacionárias quimicamente ligadas

Atualmente, as colunas amplamente disponíveis são as recheadas com fases quimicamente ligadas obtidas pela reação entre um reagente organossilano e a sílica:



em que X é um grupo reativo do tipo alcóxi ou haleto, e R normalmente é um grupo alquil ou um grupo alquil substituído. Esta reação gera ligações siloxano (**Si-O-Si-C**)²⁰ entre o organossilano e os átomos de silício do suporte. Essas FE são bastante estáveis hidroliticamente e as suas propriedades físico-químicas e cromatográficas dependem do reagente organossilano utilizado e da presença ou não de água no meio reacional.²

Diversas são as interações moleculares que governam o processo de retenção em (CLAE), como forças de dispersão ou de London, eletrostática e ligação de hidrogênio²¹, sendo que a maioria das separações em CLAE se processam pela otimização de forças de dispersão, já que as FE amplamente disponíveis são aquelas com grupo alquil. Contudo, nos últimos anos ocorreu uma proliferação de FE com grupos alquil substituídos, tais como as com grupo polar embutido e fenil e, portanto, com seletividade cromatográfica potencialmente distinta das tradicionais FE com grupos alquilas. Embora a otimização da fase móvel seja a maneira mais útil de se variar a seletividade cromatográfica, FE com seletividade

diferenciada das FE alquilas são especialmente vantajosas quando a separação está restrita ao uso de uma determinada fase móvel. Utilização de FM com quantidade de água superior a 95% além de causarem o colapso das FE alquilas, são incompatíveis com a detecção por EM. Outra incompatibilidade com esse sistema de detecção é o uso de sais inorgânicos, bastante empregados em FM utilizadas nas separações de compostos básicos.¹⁹

1.2.1.1. Fases estacionárias alquilas convencionais

As FE monoméricas são obtidas pela reação com reagentes organossilanos mono (n=1), bi (n=2) ou tri (n=3) funcionais na ausência de moléculas de água. Reagentes monofuncionais fixam-se ao suporte por apenas uma ligação covalente, enquanto os bi e trifuncionais podem fixar-se por uma ou duas ligações (Figura 3).⁶

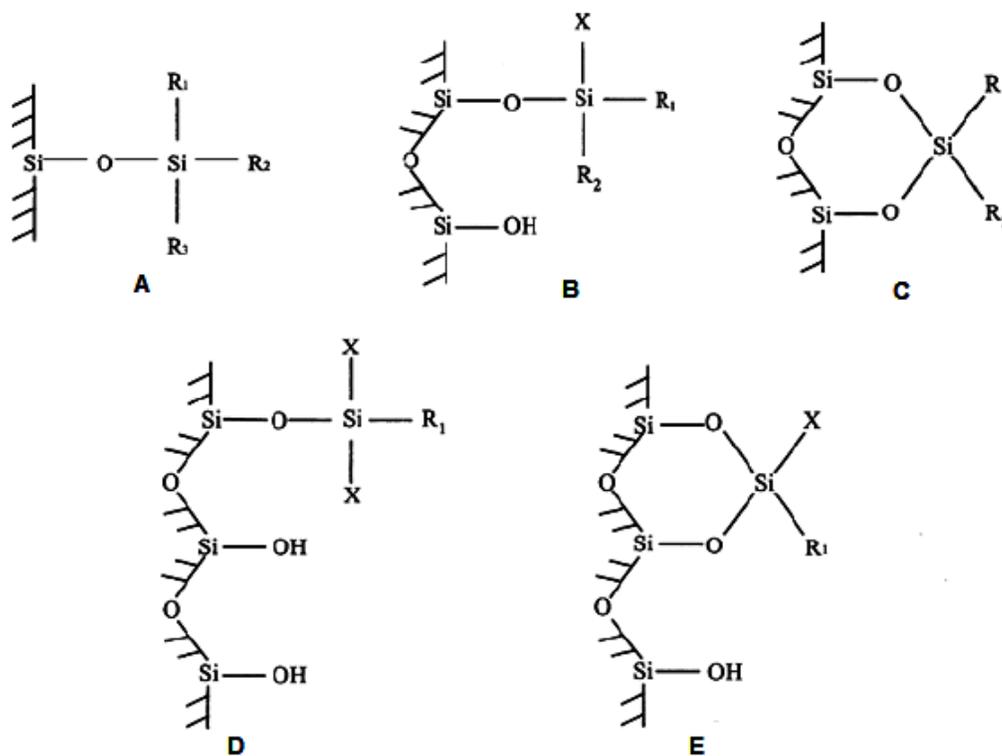


Figura 3. Ligação obtida com um: (A) silano monofuncional, (B) e (C) silano bifuncional, (D) e (E) silano trifuncional, na ausência de água.⁶

O método mais comum de preparo das fases quimicamente ligadas monoméricas envolve a reação dos grupos silanóis do suporte de sílica com um reagente monofuncional dimetilsubstituído chamado clorodimetilalquilsilano. A vantagem desse método está em sua reprodutibilidade, já que cada reagente organossilano monofuncional reage com um silanol, proporcionando alta repetitividade dos parâmetros cromatográficos em análises. Além disso,

a síntese resulta na formação de um filme fino sobre a superfície da sílica, com as cadeias alquilas extremamente organizadas (Figura 4), que garantem rápida transferência de massa e, portanto, alta eficiência.^{6,14,22}

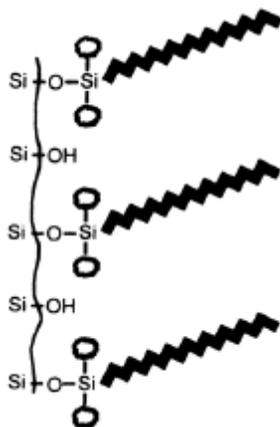


Figura 4. FE C18 dimetilsubstituída.²²

O grupo alquil mais utilizado é o C18, mas também existem colunas com C8, C6, C4 e outros. As FE C18 e C8 apresentam seletividades similares, mas a retenção normalmente é menor para C8, embora o contrário possa acontecer, no caso de colunas C18 que apresentam uma baixa porcentagem de carbono. Já as colunas do tipo C4-C6 diferem das anteriores, principalmente, por apresentar menor hidrofobicidade e maior tamanho de poro, sendo aplicadas na análise de peptídeos e proteínas. As FE C1-C3 são as de menor cadeia alquila disponíveis e são caracterizadas por apresentar mecanismos mistos de separação.²³

Vários fatores inerentes às colunas podem afetar a dissolução do suporte cromatográfico, dentre eles: pureza da sílica, estrutura de poros da sílica, tipo de FE e a densidade de recobrimento. A velocidade de degradação das FE C8 e C18 em fases móveis com pH elevado, foi estudado por Kirkland²² e outros trabalhos associados ao tema estão em diversas revisões.^{2,6,14} De um modo geral, os esforços para melhorar a estabilidade das fases quimicamente ligadas convencionais focam-se em reduzir a área não modificada da superfície da sílica que fica exposta ao ataque de ânions hidróxido, pois sabe-se que pelo menos 50% dos silanóis da sílica não reagem com os organossilanos, como consequência do impedimento estérico entre os volumosos grupos alquilas. O simples aumento do comprimento das cadeias alquilas e da sua densidade de ligação resulta numa maior proteção ao suporte cromatográfico, garantindo um aumento de estabilidade, bem como

minimiza a interação de compostos básicos com os silanóis residuais. Contudo, essa abordagem ainda deixa exposta uma parte significativa da superfície da sílica. Por outro lado, a síntese de FE com alto grau de recobrimento é menos reprodutível e, além disso, tais fases são mais susceptíveis ao colapso cromatográfico (Figura 5B) em FM com elevado teor de água, ou seja, as cadeias alquilas hidrofóbicas provavelmente atraem-se, perdendo sua organização habitual, ocasionando picos com caudas e variações no tempo de retenção dos analitos, afetando a reprodutibilidade dos parâmetros cromatográficos nas análises.^{14,22,23}

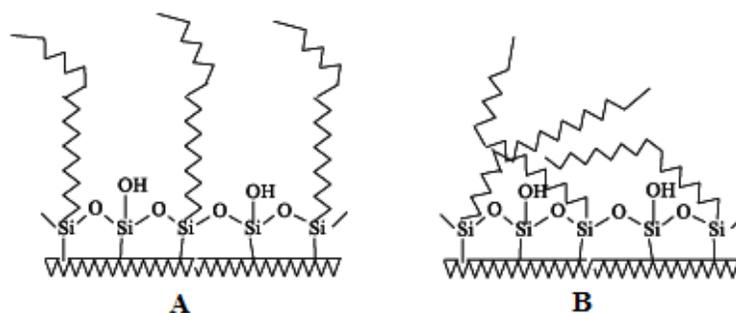


Figura 5. Ilustração das possíveis conformações das cadeias orgânicas hidrofóbicas do tipo C18 ligadas na superfície da sílica: (A) estendida, quando solvatada por uma fase móvel adequada e (B) o colapso das cadeias orgânicas na presença de uma fase móvel composta por quase 100% de água.²⁰

Pode-se aumentar o recobrimento do suporte e, conseqüentemente, diminuir a quantidade de silanóis residuais através de reações com organossilanos com cadeia alquila pouco volumosa (normalmente trimetilclorossilano ou hexametildissilazano), os quais conseguem reagir com silanóis estericamente inacessíveis para os organossilanos de cadeia longa. Esse procedimento recebe o nome de capeamento e resulta numa menor atividade silanofílica e maior estabilidade da FE em pH elevado. Deve-se destacar que fases capeadas não devem ser utilizadas em baixo pH, pois as ligações entre o suporte e os pequenos agentes silanos utilizados no capeamento são extremamente susceptíveis à hidrólise catalisada por ácidos.^{14,19}

O aumento da estabilidade das fases quimicamente ligadas convencionais em baixo pH se dá pela maior proteção das ligações Si-C à hidrólise catalisada por ácidos. O simples aumento da cadeia alquila provoca uma melhora na estabilidade. A seguir serão discutidos outras maneiras de se ampliar o tempo de vida das colunas em fases móveis ácidas.¹⁴

Enfim, colunas alquilas convencionais normalmente são consideradas estáveis na faixa de pH de 2 a 8.

1.2.1.2. Fases estacionárias estericamente protegidas, bidentadas e com sílica híbrida

Reagentes silanos monofuncionais contendo grupos isopropil ou isobutil ligados diretamente ao átomo de silício, também podem ser usados ao invés dos agentes dimetilsubstituídos, permitindo a síntese das chamadas FE estericamente protegidas (Figura 6). A inserção desses grupos volumosos próximos à superfície da sílica protegem as ligações Si-C da hidrólise em FM com pH inferior a 3. Esse procedimento tem sido bastante empregado em FE com cadeias alquilas curtas, utilizadas nas separações de compostos em meio ácido, como peptídeos, proteínas e ácidos orgânicos.²³ Embora as FE estericamente protegidas sejam bem mais estáveis em fases móveis ácidas do que as equivalentes FE convencionais, elas não devem ser usadas em pH acima de 7, pois o impedimento estérico entre esses grupos volumosos dificultam a reação de fixação, resultando numa menor densidade de ligação, o que expõem a superfície da sílica à dissolução em fases móveis básicas.^{14,23,17}

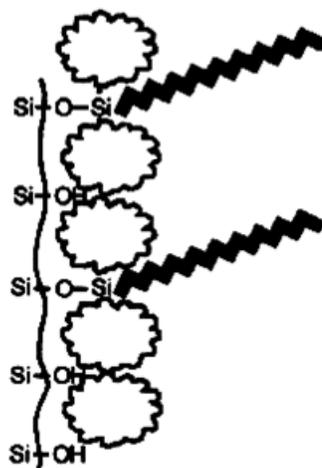


Figura 6. FE C18 estericamente protegida com grupo volumoso.²²

As FE bidentadas⁸ são obtidas a partir de agentes organossilanos formados por dois átomos de silício interligados por uma cadeia alquila Q, permitindo que o agente se fixe ao suporte cromatográfico através de duas ligações covalentes (Figura 7). Assim, tem-se uma diminuição na degradação dessas FE em fases móveis ácidas, provavelmente pela formação de um ciclo que confere maior estabilidade do que nas FE C18 convencionais. Além disso, a distribuição espacial das cadeias alquílicas nas fases bidentadas garantem uma rápida

transferência de massa.^{6,19} Assim como as fases estacionárias estericamente protegidas, essas fases são recomendadas para análises em pH menor que 3.¹⁷

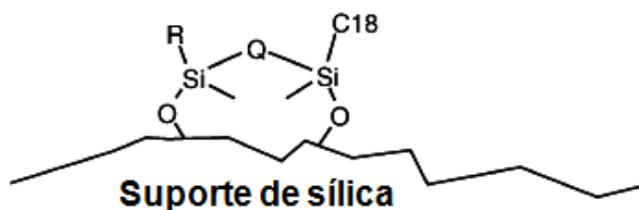


Figura 7. Estrutura geral das fases estacionárias bidentadas. R = metil, n-butil, n-octil ou n-octadecil; Q = $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ou $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$.¹⁹

A Figura 8 ilustra as estabilidades químicas de três colunas recheadas com FE C18 quimicamente ligada, convencional, bidentada e estericamente protegida. A estabilidade foi avaliada através de medidas do fator de retenção para o tolueno em determinados intervalos de tempo, com FM MeOH:H₂O 60:40 (v/v), vazão de 1 mL min⁻¹, temperatura ambiente. O teste de estabilidade foi realizado em condições drásticas, por meio da passagem de vários volumes de coluna da FM MeOH:H₂O pH 0,9 ajustado com ácido trifluoracético (50:50, v/v), vazão de 1,5 mL min⁻¹ e temperatura de 90 °C. Observa-se que a FE C18 convencional apresenta uma velocidade de degradação significativamente superior a da fase estacionária C18 estericamente protegida e bidentada. Deve-se destacar a maior estabilidade química da FE diisobutil-C18 (esticamente protegida), que pode ser utilizada em condições drásticas, até aproximadamente 30.000 volumes de coluna.^{19,24}

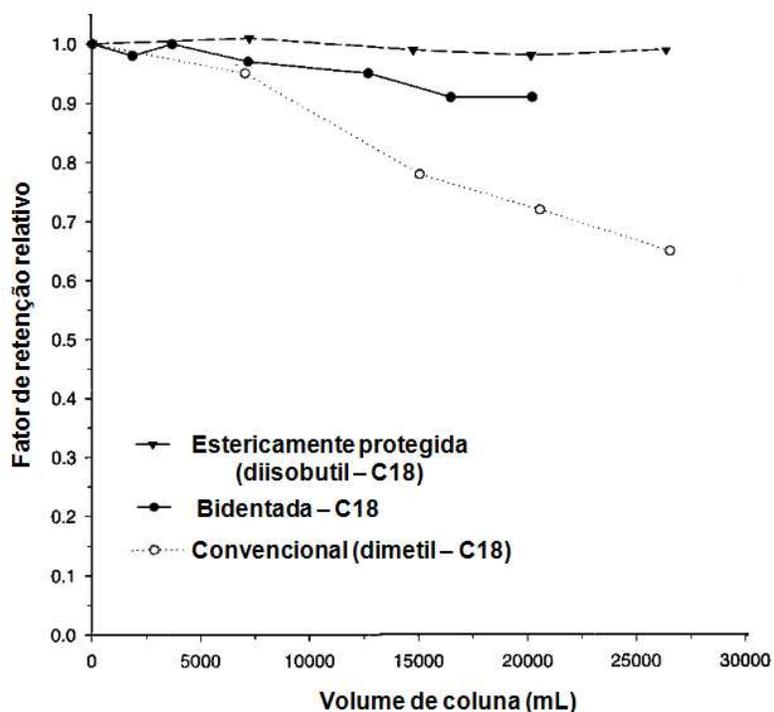


Figura 8. Comparação da estabilidade de três diferentes colunas C18 quimicamente ligadas a pH 0,9 e T = 90 °C. Fase móvel MeOH:H₂O (50:50, v/v) com 1% de ácido trifluoracético e vazão de 1,5 mL min⁻¹. Fator de retenção medido para o tolueno em fase móvel (60:40, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; temperatura ambiente.²⁴

Também se tem demonstrado que FE bidentadas que possuem um duplo capeamento apresentam uma maior proteção e recobrimento da sílica do que as tradicionais FE C18, implicando numa maior estabilidade em pH alto. Tais FE são recomendadas para análises em valores de pH até 12, devendo-se evitar tampões de sais fosfato e principalmente carbonato.¹⁹

Fase estacionária baseada em sílica híbrida é uma outra alternativa para se minimizar as desvantagens potenciais apresentadas pelas FE a base de sílica, como: indesejáveis interações de analitos com silanóis residuais e dissolução em pH elevado. Esta afirmação pode ser comprovada analisando a Figura 9² que mostra a quantidade de sílica dissolvida, em mg, ao passar através de três colunas, recheadas com FE C18 convencional (Agilent Technologies Zorbax[®] Rx – C18), FE bidentada (Agilent Technologies Zorbax[®] Extend[®] – C18) e com sílica híbrida (Waters Associates XTerra[®] - MS), a fase móvel MeOH:solução tampão 0,10 mol L⁻¹ carbonato/bicarbonato de sódio, pH 10 (50:50, v/v), vazão de 1 mL min⁻¹ e temperatura de 25 °C. Analisando a Figura 9 constata-se que a coluna recheada com FE convencional apresentou a maior quantidade de sílica dissolvida, com poucos volumes de FM. A solubilidade de pequena quantidade de sílica na coluna recheada com sílica híbrida

iniciou após a passagem de 10 L de FM, enquanto a coluna recheada com FE bidentada permaneceu estável após a passagem de aproximadamente 15 L de FM.

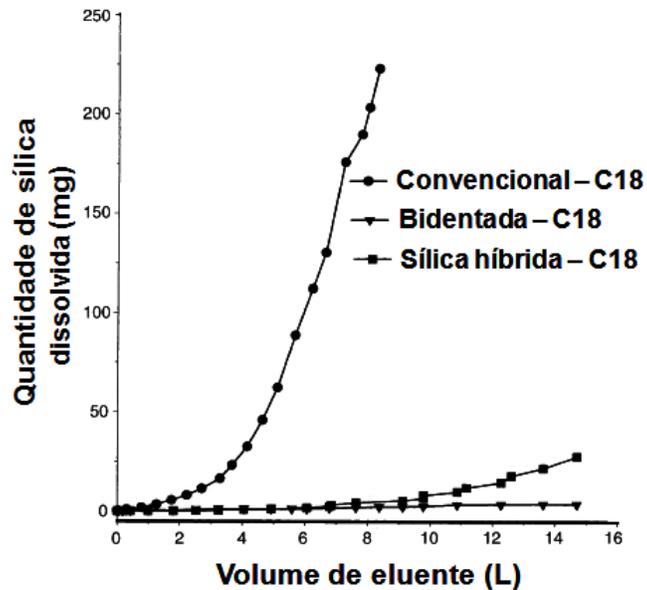


Figura 9. Dissolução do suporte de sílica em pH elevado. Colunas: **convencional – C18** (Agilent Technologies Zorbax® Rx – C18); **bidentada – C18** (Agilent Technologies Zorbax® Extend® - C18); **sílica híbrida – C18** (Waters Associates XTerra® - MS). Fase móvel: 50% metanol/50% 0,10 mol L⁻¹ tampão carbonato/bicarbonato de sódio, pH 10, vazão: 1 mL min⁻¹ e T = 25 °C.²

A estabilidade avaliada através de medidas do fator de retenção para certo composto neutro, em três colunas, convencional C18 (Inertsil® ODS-3), recheada com sílica híbrida – C18 (Waters Associates XTerra® - MS) e estericamente protegida – C18 (Stable Bond® - C18) está mostrado na Figura 10. Este teste foi feito pela passagem da FM MeOH:H₂O com 1 % de ácido trifluoracético, pH 1,3, 50:50 v/v, a uma vazão de 3,0 mL min⁻¹) e temperatura de 80 °C. Deve-se destacar que a coluna recheada com sílica híbrida foi a que apresentou menor estabilidade em pH < 1, enquanto as colunas recheadas com FE convencional e estericamente protegidas permaneceram estáveis até a passagem de 30.000 volumes de coluna.

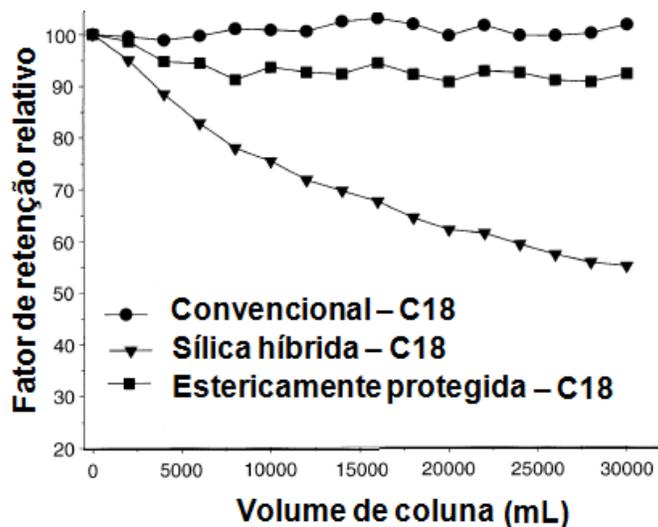


Figura 10. Estabilidade em pH baixo de colunas recheadas com diferentes tipos de FE. Colunas: **convencional – C18** (Inertsil® ODS-3); **sílica híbrida – C18** (Waters Associates XTerra® - MS); **esticamente protegida – C18** (StableBond® - C18). Fase móvel: MeOH:H₂O (50:50, V/V) com 1% de ácido trifluoracético, pH 1,3, vazão: 3,0 mL min⁻¹ e T = 80 °C. Fator de retenção medido para um soluto neutro.²²

1.2.1.3. Fases estacionárias alquilas com polimerização vertical e horizontal

Algumas colunas geralmente denominadas de poliméricas são resultantes da reação entre agentes silano bi ou trissubstituídos na presença de água. As FE com polimerização vertical (Figura 11A) apresentam uma cadeia polimérica orientada verticalmente em relação ao suporte cromatográfico, o que leva a uma maior resistência ao ataque de FM ácidas, devido ao maior número de ligações a serem rompidas para ocasionar a perda da FE líquida. Porém, apresentam alta atividade silanofílica, provavelmente por causa da presença de silanóis nas cadeias poliméricas. Quando o encadeamento ocorre de forma paralela ao suporte, têm-se as FE com polimerização horizontal (Figura 11B), as quais apresentam maior estabilidade em baixo e alto pH e atividade silanofílica bem menor do que as convencionais monoméricas, devido ao intenso recobrimento do suporte gerado pelo encadeamento na direção horizontal. Deve-se salientar que o método de preparo desses dois tipos de FE é menos repetitivo do que o das monoméricas, podendo ocorrer variações na retenção e seletividade de colunas de diferentes lotes.¹⁹ Apesar desses problemas, essas FE poliméricas apresentam propriedades cromatográficas interessantes, tal como melhor

seletividade do que as FE monoméricas para a separação⁶ de isômeros com estruturas rígidas, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA).^{25,26}

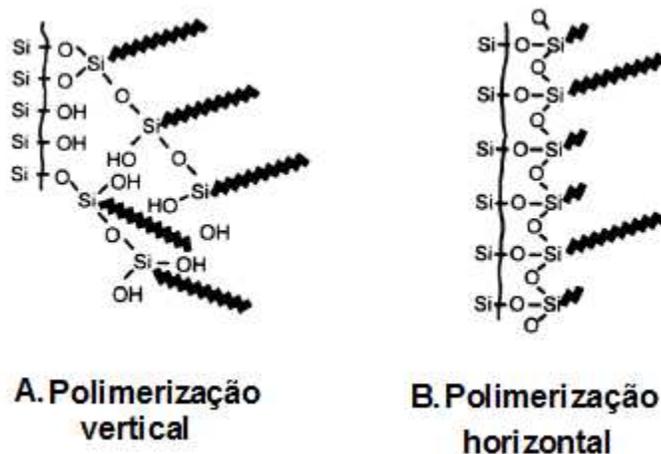


Figura 11. Estrutura da FE C18. (A) com polimerização vertical e (B) com polimerização horizontal.²²

1.2.1.4. Fases estacionárias com grupo polar embutido

As FE com grupo polar embutido (GPE) possuem um grupo polar inserido na cadeia alquílica, geralmente após o terceiro grupo metileno ligado ao átomo de silício do organossilano, como ilustrado na Figura 12. Comumente, os grupos polares empregados nestas FE são capazes de estabelecer ligações de hidrogênio, como os grupos carbamato, amida, amina, ureia e éter, deixando estas FE com caráter mais “básico”.¹⁵

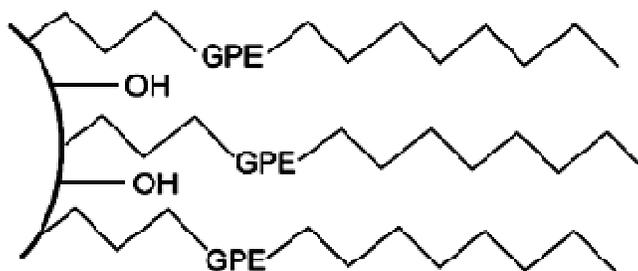


Figura 12. FE com grupo polar embutido (GPE)¹⁵

As principais características apresentadas pelas FE com GPE são:

- ✓ mantêm o caráter de FR;
- ✓ fornecem uma seletividade diferenciada em relação as FE alquílica, pois os seus grupos polares blindam os grupos silanóis residuais, resultando numa menor retenção de

analitos polares e básicos; já analitos passíveis de estabelecer ligação de hidrogênio, como fenóis, sulfonamidas e ácidos carboxílicos não ionizados, ficam mais retidos, devido às interações por ligações de hidrogênio entre estes compostos e o grupo polar presente neste tipo de FE;

- ✓ são compatíveis com o uso de FM com altas porcentagens de solvente aquoso, podendo serem usadas até mesmo com 100% de água sem ocorrer o colapso da FE. Isso pode ser explicado pela maior solvatação da superfície das FE com GPE, consequente das interações, por ligações de hidrogênio, entre os grupos polares e as moléculas de água. Esta característica é especialmente útil para a retenção de compostos polares e promove uma melhora no desempenho cromatográfico (retenção reprodutível e estável) e um rápido re-equilíbrio da FE após a eluição por gradiente;
- ✓ a atividade silanofílica é suprimida, propiciando a obtenção de picos simétricos para compostos básicos, particularmente em valores intermediários de pH. Têm sido propostos quatro mecanismos diferentes para explicar esta menor interação entre os compostos básicos e os grupos silanóis residuais: interação, por ligações de hidrogênio, entre os grupos polares embutidos e os grupos silanóis, bloqueando o acesso dos analitos de interesse aos grupos silanóis residuais; interação, por ligações de hidrogênio, entre o grupo polar embutido e as moléculas de água, criando uma camada de água firmemente ligada ao redor do grupo polar embutido, enfraquecendo as interações entre o analito e os grupos silanóis residuais; interação preferencial do analito com os grupos polares embutidos ao invés da interação com os silanóis residuais e, interação, por ligações de hidrogênio, entre os grupos polares de cadeias adjacentes, blindando o acesso aos grupos silanóis.¹⁵

Em vista destas características, as FE com GPE podem ser consideradas uma alternativa às FE clássicas, especialmente para a separação de compostos polares e básicos.

1.2.1.5. Fases estacionárias fenil

As FE do tipo fenil são capazes de realizar interações π - π com compostos aromáticos ou que possuam ligações π .^{27,28} Esse tipo de interação se dá por complexação do tipo doador-aceptor de elétrons e é favorecida quando a fase estacionária é rica em elétrons

(atuando como uma base de Lewis) e o analito, deficiente em elétrons (atuando como um ácido de Lewis), ou vice-versa.

A Figura 13 ilustra uma típica estrutura de uma fase fenil comercial. A sílica empregada pode ser de alta pureza ou híbrida. A tecnologia de ligação pode ser monomérica ou polimérica. O número de átomos de carbono do espaçador entre o átomo de silício e o anel aromático pode variar de 1 a 6, resultando em graus diferentes de caráter hidrofóbico e aromático à FE. A fase pode conter um ou dois grupos fenil, o que também influencia na aromaticidade e na hidrofobicidade da fase. Pode existir um heteroátomo entre o espaçador e o grupo fenil.

Colunas contendo o espaçador com seis átomos de carbono demonstraram-se ser mais seletivas na separação de compostos nitroaromáticos. Essa diferença de seletividade tem sido explicada em função da acessibilidade dos analitos aos grupos fenil da fase estacionária. Espaçadores maiores tornam esses grupos mais disponíveis às interações com os analitos do que espaçadores de menor tamanho, ampliando o caráter π - π , bem como a hidrofobicidade da FE fenil.²⁹

Em adição, algumas colunas comerciais apresentam um heteroátomo eletronegativo entre o espaçador e o grupo fenil, que resulta numa liberação de elétrons por efeitos de conjugação, tornando o anel aromático rico em elétrons, ou seja, aumentando a sua basicidade e favorecendo interações com analitos deficientes em elétrons. A seletividade aromática ou a capacidade da FE realizar interações π - π com analitos aumenta de acordo com a ordem: $X=CH_2 < O < NH$.²⁹

Fases fenil têm sido usadas com sucesso na separação de isômeros de posição³⁰, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e compostos nitroaromáticos.²⁹

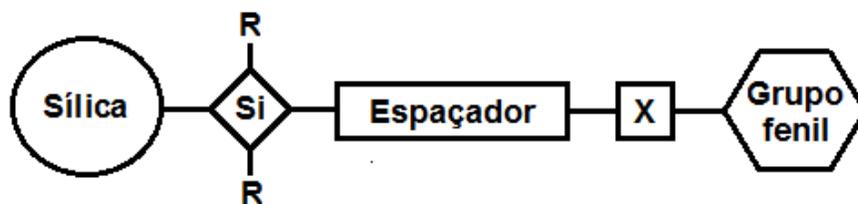


Figura 13. Esquema representando a estrutura de uma fase fenil comercial.²⁹ Espaçador = geralmente de C₁ a C₆; X = heteroátomo ou CH₂; Grupo fenil = 1 ou 2 anéis; Ligação = polimérica (R = OH ou Si-O-Si), monomérica (R = metil ou isopropil).²⁹

1.2.2 Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados

Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência também podem ser preparadas depositando-se sobre óxidos inorgânicos, como a sílica, uma fina camada de um líquido polimérico, combinando-se, assim, a resistência mecânica do suporte com a inércia química de cadeias poliméricas.

A forma mais simples de preparo das fases recobertas com polímeros é realizada pelo método de evaporação estática do solvente, sem etapas posteriores de imobilização da camada polimérica no suporte cromatográfico. Para isto, o polímero é apropriadamente dissolvido em um solvente no qual ele seja completamente solúvel e a esta solução com polímero é adicionada a matriz do óxido inorgânico. Em seguida, evapora-se o solvente obtendo a fase estacionária sorvida.^{5,11}

Um ponto importante que deve ser destacado na preparação destas fases é a quantidade de polímero depositado na superfície do suporte. Se por um lado, uma quantidade maior de polímero fornece um material com maior proteção dos silanóis ou sítios ácidos de Lewis, contra interações indesejáveis com analitos, por outro, garante uma camada mais espessa e bloqueio dos poros do suporte. Desta forma, resulta em um processo de transferência de massa mais lento e, portanto, fases estacionárias com baixo desempenho cromatográfico.^{5,31}

Portanto, a preparação das fases recobertas com polímeros é uma etapa crítica que tem por finalidade a obtenção de duas propriedades idealizadas.⁵

- *Um filme fino que não bloqueie ou restrinja a entrada dos poros*, para manter a estrutura geral e a conectividade, resultando em rápida transferência de massa nos poros e no filme polimérico;
- *Uma camada polimérica uniforme*, para recobrir completamente os sítios não específicos de interações indesejáveis e, se possível, impermeável aos analitos a serem separados.

Existem várias formas de se fazer o recobrimento. O mais comumente empregado, que apresenta maior repetitividade, consiste na adsorção física de um polímero pré-sintetizado, com composição química bem definida sobre o suporte cromatográfico. Porém se a sorção do polímero ao suporte for governada por interação fraca, ele poderá ser facilmente removido durante a passagem da fase móvel.^{5,31} Então, após o recobrimento do suporte, pode-se fazer a imobilização do polímero nos poros do suporte buscando-se camadas mais estáveis de FE, insolúveis em fases móveis. Os procedimentos de imobilização usados são: tratamento térmico³²⁻³⁵, radiação gama³⁶⁻³⁸ e radiação micro-ondas.³⁹⁻⁴¹ Nas fases imobilizadas, existem ligações entre as moléculas individuais da fase líquida, induzidas por processos de entrecruzamento, sendo que também podem existir ligações entre a fase líquida e o suporte.

Tais FE são de fácil preparo se comparadas com as quimicamente ligadas e também apresentam um bom recobrimento dos silanóis da sílica. Além disso, organoclorossilanos, que são carcinogênicos, não são utilizados em seu preparo. Polissiloxanos têm se demonstrado ideais para tal finalidade, provavelmente devido à distância entre as unidades monoméricas $[(-Si-O-)_n]$ que possibilita uma ótima adsorção das cadeias siloxanos na superfície da sílica.⁴² A desvantagem é que o polímero não se deposita homogeneamente ao suporte, permitindo a interação de analitos com os silanóis residuais, bem como tornando exposto o suporte à dissolução provocada por ânions hidróxidos.

1.3. AVALIAÇÃO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

As colunas cromatográficas são avaliadas através da análise de parâmetros calculados¹ a partir de medidas obtidas nos cromatogramas de misturas de compostos testes padrão.

Na Figura 14 está apresentado um cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de três componentes.

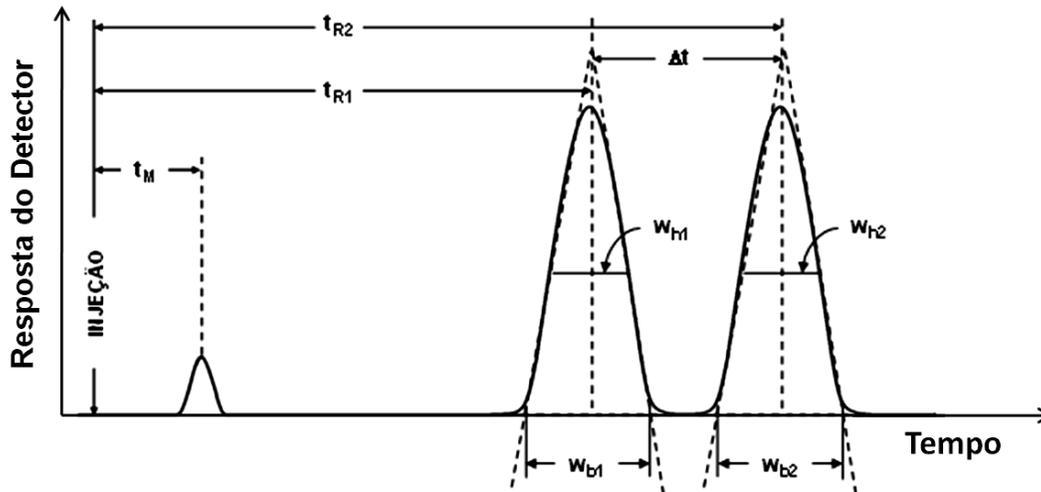


Figura 14. Cromatograma com as medidas empregadas na determinação dos parâmetros cromatográficos.¹

Tempo de retenção do soluto (t_R) é o tempo gasto desde o momento da injeção do soluto até a detecção do máximo do pico correspondente.

Tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária ou tempo de retardamento da fase móvel (t_M) é o tempo gasto por um composto não retido pela fase estacionária para percorrer o sistema cromatográfico desde a injeção até a chegada no detector. Normalmente é obtido pelo tempo gasto pela fase móvel, na qual está diluída a amostra.

Tempo de retenção ajustado (t'_R) é o tempo em que o soluto fica retido na fase estacionária, sendo calculado por:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (1)$$

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

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

Os valores ideais para k variam de 1,0 a 10,0. Valores menores que 1,0 indicam pouca interação entre o soluto e a fase estacionária, enquanto valores maiores de 10 indicam interação muito forte com a fase estacionária, resultando em análises demoradas.

Resolução entre picos (R_S) é o parâmetro que indica se ocorreu ou não uma boa separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada pela Equação 3.

$$R_S = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right) \quad (3)$$

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

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

w_{h1} e w_{h2} = largura dos picos a meia-altura, em unidades de tempo.

Valores de R_S iguais a 1,25 são suficientes para fins quantitativos, enquanto valores de R_S acima de 1,25 indicam separação dos compostos na linha de base.

Número de pratos (N) é o parâmetro relacionado à eficiência cromatográfica. Um prato equivale a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel. Quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto, melhor a separação. Na prática, o número de pratos é uma medida do alargamento do pico que ocorre quando o analito passa através do sistema e pode ser calculado pela Equação 4.

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (4)$$

Como existem colunas com diferentes tamanhos, para poder compará-las é usual expressar a eficiência em pratos por metro (N/m)

$$N/m = \frac{N}{L} \quad (5)$$

onde: L = comprimento da coluna, em metros

Qualitativamente, a eficiência pode ser avaliada pelo formato do pico cromatográfico. Quanto mais estreito for o pico, maior é a eficiência da coluna na separação do soluto a que o pico se refere.

A expressão para o cálculo de número de pratos, ou seja, a eficiência descrita na equação 4, é válida para picos simétricos. Para picos assimétricos, existem erros no cálculo de N se a equação 4 for utilizada. Por essa razão deve-se calcular o fator de assimetria (A_s) do pico a 10 % de sua altura.

Fator de assimetria do pico a 10 % da sua altura (A_{s10}) é uma medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido horizontal a 10 % da sua altura. A literatura¹ indica que A_{s10} deve ter valores de 0,9 a 1,2. Embora menos desejáveis, valores até 1,6 são admitidos. Escolheu-se realizar a medida a 10 % da altura do pico para se evitar que a instabilidade da linha de base interfira nos cálculos.

A Figura 15 apresenta a forma como é feito o cálculo da assimetria:

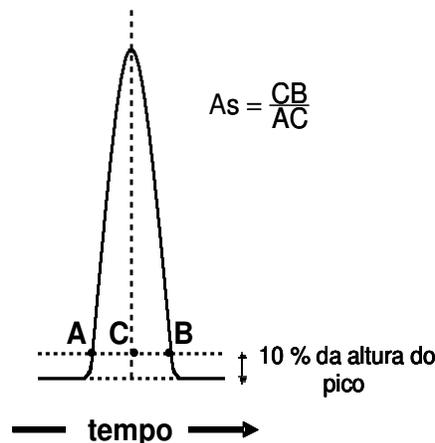


Figura 15. Cálculo do fator de assimetria¹.

Avaliação comparativa entre colunas também pode ser feita usando a medida da altura de prato (H):

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

A eficiência de uma coluna também pode ser expressa por meio da equação clássica de van Deemter, em função da altura de prato (H):

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (7)$$

onde: μ = velocidade linear da fase móvel, obtida pela Equação 8:

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad (8)$$

O termo A, da Equação 7, é a difusão turbilhonar responsável pelo alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto no interior da coluna cromatográfica. Uma forma de minimizar este efeito é utilizar colunas de diâmetro interno reduzido e partículas pequenas e uniformes.

O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na FM e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares de fase móvel. Este termo tem contribuição de pouca relevância em CLAE, pois o coeficiente de difusão de um dado composto em um líquido é muito baixo.

O termo C equivale à transferência de massa e corresponde ao alargamento da banda devido à dificuldade de transferência de massa do soluto entre a FM e a FE. O termo C está subdividido em C_M e C_S , onde C_M é a transferência de massa na FM e C_S , a transferência de massa na FE. Para minimizar o termo C, o ideal é que a espessura da fase estacionária que recobre o suporte seja a menor possível.

O gráfico de H vs μ fornece uma curva como a da Figura 16 que é conhecida como curva de van Deemter. A curva de van Deemter mostra que existe uma vazão ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ($\mu_{ótima}$), na qual H terá um valor mínimo e corresponde ao valor máximo de eficiência da coluna. Na prática, esta é a maneira de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica.

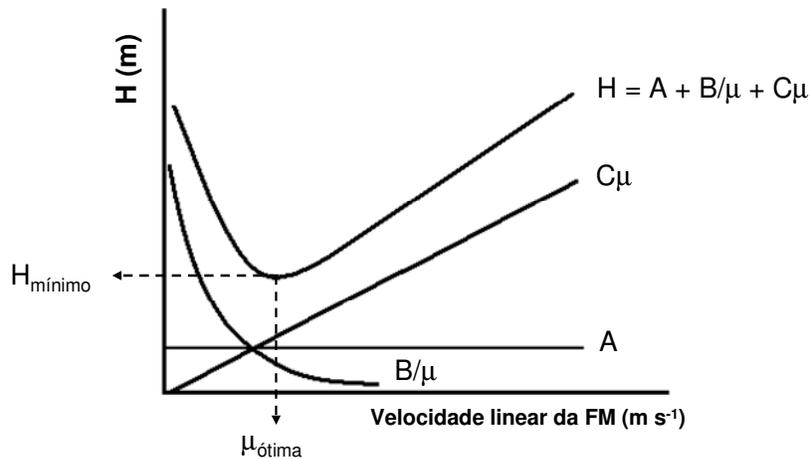


Figura 16. Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel.¹

1.4. ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS (AHA)

A análise hierárquica de agrupamentos é uma ferramenta exploratória de resultados que possibilita selecionar dentro de um número grande de objetos, aqueles que apresentam maior similaridade entre si. A comparação dos objetos com maior similaridade, em detrimento de um número grande de objetos, permite evidenciar, de uma maneira clara e objetiva, as principais diferenças entre conjuntos de valores que medem as propriedades de um sistema.

A AHA consiste em agrupar objetos semelhantes segundo suas características (variáveis). Quando o número de variáveis envolvidas é pequeno, a inspeção visual poderá responder. Assim, por exemplo, na Figura 17 observa-se uma situação em que A é mais parecido com C do que com B. Intuitivamente para fazer tal inferência usou-se o conceito de distância euclidiana, o qual definiu a idéia de parenceza.⁴³

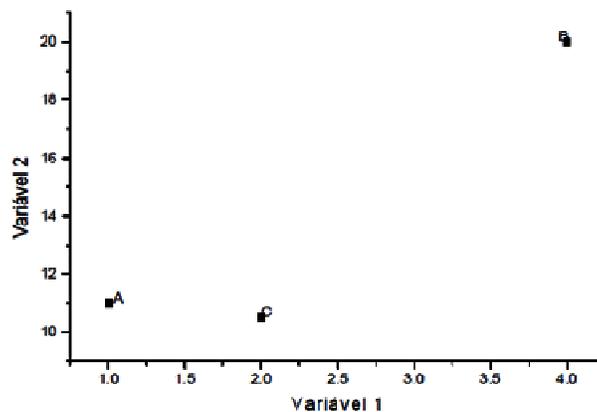


Figura 17. Dispersão entre três indivíduos mensurados com relação a duas variáveis quantitativas contínuas.

O conceito de distância euclidiana pode ser facilmente ilustrado (Figura 18) considerando um ponto $P = (x_1, x_2)$ no plano cartesiano, a distância deste ponto P da origem $O=(0,0)$, definida por $d(O,P)$, é dada pelo teorema de Pitágoras por:

$$d(O,P) = \sqrt{x_1^2 + x_2^2} \quad (9)$$

Em geral, se o ponto P tem p coordenadas, de tal forma que $P=(x_1, x_2, \dots, x_p)$, a distância de P da origem $O=(0, 0, \dots, 0)$, pode ser generalizada por:

$$d(O,P) = \sqrt{x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_p^2} \quad (10)$$

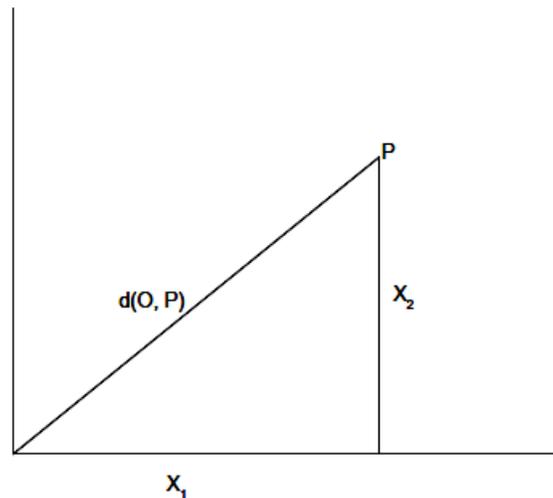


Figura 18. Distância entre um ponto $P=(x_1, x_2)$ e a origem $O=(0, 0)$, fornecida pelo teorema de Pitágoras.

Todos os pontos (x_1, x_2, \dots, x_p) que contém uma distância ao quadrado, denominada c^2 , da origem, satisfaz a equação:

$$d^2(O,P) = x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_p^2 = c^2 \quad (11)$$

A expressão em (12) representa a equação de uma hipersfera (um círculo se $p = 2$), e os pontos eqüidistantes da origem por uma distância $d(O, P)$ pertencem a essa hipersfera. A distância de um ponto P a um ponto arbitrário Q, com coordenadas $P=(x_1, x_2, \dots, x_p)$ e $Q=(y_1, y_2, \dots, y_p)$ é dada por:

$$d(P,Q) = \sqrt{(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_p - y_p)^2} \quad (12)$$

A distância euclidiana é insatisfatória para muitas situações estatísticas. Isso ocorre devido à contribuição de cada coordenada ter o mesmo peso para o cálculo da distância. Quando estas coordenadas representam medidas que são provenientes de um processo que

sofre flutuações aleatórias de diferentes magnitudes, é muitas vezes desejável ponderar as coordenadas com grande variabilidade por menores pesos em relação às aquelas com baixa variabilidade. Isto sugere a necessidade de uma nova medida de distância, ou seja, um novo coeficiente de parença (similaridade ou dissimilaridade).⁴³

Uma alternativa é a eliminação das diferenças de variabilidades das variáveis (coordenadas) dividindo-se cada coordenada pelo desvio padrão amostral. Após a divisão, têm-se as coordenadas estandardizadas, como se segue:

$$x_1^* = x_1 / \sqrt{s_{11}} \quad x_2^* = x_2 / \sqrt{s_{22}} \quad (13)$$

Assim, a distância passa a ser calculada a partir das coordenadas padronizadas, dando origem ao coeficiente de distância euclidiana padronizado:

$$d(O,P) = \sqrt{(x_1^*)^2 + (x_2^*)^2} = \sqrt{\frac{x_1^2}{s_{11}} + \frac{x_2^2}{s_{22}}} \quad (14)$$

Os agrupamentos hierárquicos são realizados por sucessivas fusões ou por sucessivas divisões. Os métodos hierárquicos aglomerativos iniciam com tantos grupos quanto aos objetos, ou seja, cada objeto forma um agrupamento. Inicialmente, os objetos mais similares são agrupados e fundidos formando um único grupo. Eventualmente o processo é repetido, e com o decréscimo da similaridade, todos os subgrupos são fundidos, formando um único grupo com todos os objetos.

Um tipo de método hierárquico aglomerativo é o da ligação média ou método do centróide, em que as distâncias entre grupos são baseadas na média das distâncias entre todos os elementos de um grupo com relação aos elementos de outro grupo.

Os resultados finais destes agrupamentos podem ser apresentados por gráficos denominados dendrogramas. Os dendrogramas apresentam os elementos e os respectivos pontos de fusão ou divisão dos grupos formados em cada estágio. Na Figura 19 está representado um dendrograma para agrupar sete objetos.

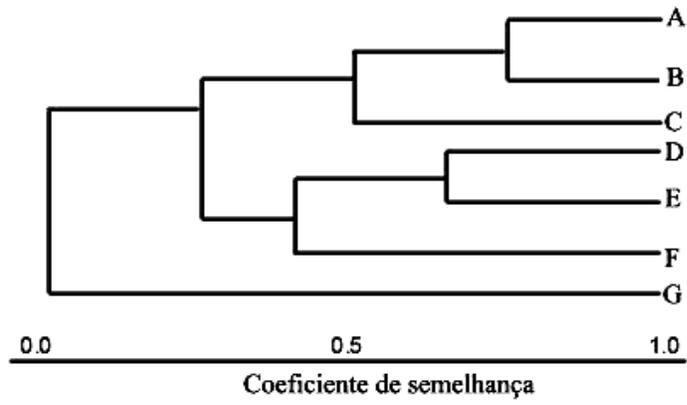


Figura 19. Dendrograma para agrupar 7 objetos (A, B, C, D, E, F e G).

2. Objetivos

Este trabalho visa o desenvolvimento, a caracterização cromatográfica e físico-química de uma nova FE para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), utilizando-se sílica nua como suporte e o copolímero poli (2-fenilpropil) metilsiloxano imobilizado termicamente, como fase estacionária líquida. Também objetivou a avaliação da aplicabilidade da FE preparada, que foi realizada através da separação de algumas misturas de compostos aromáticos contendo isômeros, compostos com polaridades similares e com grupos básicos, com o intuito de explorar as potenciais diferenças na seletividade da FE preparada em relação às já existentes, devido às suas características estruturais e a sua capacidade de estabelecer interações π - π com os analitos analisados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e colunas

- Acenafteno, 99 %, Aldrich
- Acenaftileno, 99 %, Aldrich
- Acetofenona, 99 %, Vetec
- Ácido fosfórico, 85 %, Nuclear
- Ácido nítrico p.a., Synth
- Água deionizada, Milli-Q, Millipore
- Anilina, 99,5 %, Fluka
- Benzeno p.a., Synth
- Benzilamina, 99 %, Merck
- Benzonitrila, Riedel – de Häen
- Benzo[a]pireno, 99 %, Aldrich
- Benzoato de metila, 99 %, Carbo Erba
- Butilbenzeno, 98 %, Merck
- Cafeína, 100 % USP, Aldrich
- Clorofórmio deuterado, Aldrich
- Clorofórmio grau HPLC, Tedia
- Criseno, 98,3 %, Fluka Analytical
- Coluna comercial Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm d.i.
- Coluna comercial Nova-Pak C18, 4 µm, 150 x 3,9 mm d.i.
- Diclorometano p.a., Tedia
- Etilbenzeno, 99 %, Merck
- Fenol, 99 %, Aldrich
- Fluoranteno, 99 %, Aldrich
- Fluoreno, 99 %, Aldrich
- Isopropanol p.a., Tedia
- Metanol grau HPLC, Tedia
- *m*-cresol, 99 %, Merck
- Naftaleno, reagente puro, Carlo Erba
- N,N-dimetilanilina, 98 %, Fluka

- O-terfenila, 99 %, Merck
- Pentilbenzeno, 98 %, Merck
- Pireno, 98 %, Aldrich
- *p*-xileno, BDH Laboratory Supplies
- Propilbenzeno, 98 %, Aldrich
- Tolueno p.a., Merck
- Trifenileno, 98 %, Fluka
- Uracila, 98 %, Aldrich

3.2. Equipamentos

- Agitador magnético, Corning GlassWorks, modelo PC-351;
- Agitador rototorque, Cole Parmer, modelo 7637-01;
- Analisador elementar (CHN), Perkin Elmer 2400;
- Analisador termogravimétrico, TA Instruments, modelo TGA-2050;
- Balança analítica, Fischer Scientific modelo A-250, precisão de 0,0001 g;
- Banho de ultrassom, Thornton, modelo T14;
- Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, composto de uma bomba de alta pressão, Shimadzu modelo LC-10 AD; detector UV-Vis, Shimadzu modelo SPD-10 AV utilizado em $\lambda = 254$ nm; válvula de injeção (alça de amostragem de 5 μ L), Rheodyne modelo 8125; Softwares usados para aquisição de dados - ChromPerfect for Windows 3.52 e Report Write Plus (Justice Innovations);
- Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, equipado com uma bomba de alta pressão, Shimadzu modelo LC-10AD; detector UV-Vis, Shimadzu modelo SPD-10A utilizado em 254 nm; forno de coluna CTO-10AS; injetor automático SIL-10AD e um sistema controlador SCL-10A. Os dados foram adquiridos e processados empregando o software CLASS-VP da Shimadzu (utilizado para realizar o teste de estabilidade);
- Espectrômetro de absorção no infravermelho, Perkin-Elmer modelo FTIR 1600;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Bruker ASX 300, Avancell;
- Estufa a vácuo, Yamato, modelo ADP-21;
- Forno com controlador de temperatura, tipo tubular, EDG 10 P-S, com sistema de atmosfera dinâmica de nitrogênio, para as imobilizações por tratamento térmico;
- Mandril, Shuk, modelo FSB, para polimento de colunas;

- pHmetro, Digimed modelo DM 21;
- Porosímetro, Micromeritics ASAP 2010;
- Sistema de enchimento de colunas composto por uma bomba de alta pressão, pneumática, pressurizada com nitrogênio, para enchimento de colunas, com faixa de pressão de 1000 a 15000 psi, Haskel, modelo 29769;
- Sistema de extração em fluxo contínuo, constituído de bomba de alta pressão, WatersTM, modelo 510, para extração do excesso de polímero;
- Sistema de deionização de água, Milli-Q-Plus, Millipore;

3.3. SUPORTE CROMATOGRÁFICO

Como suporte cromatográfico foi utilizado a sílica porosa Kromasil, da Akzo Nobel, tipo B, forma esférica, tamanho de partícula 5 μm , tamanho de poro e área superficial, respectivamente, 11,4 nm e 308 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, lote 5052.

3.4. Fase estacionária líquida

Devido às características dos polissiloxanos e a importância das interações π - π na separação de compostos aromáticos com polaridade similares, o copolímero utilizado foi o poli (2-fenilpropil) metilsiloxano.

Na Tabela 1 e na Figura 20 estão, respectivamente, as principais características e a fórmula estrutural do copolímero.

Tabela 1. Características do copolímero.

Copolímero	Designação	Lote	Densidade (g mL) 25 °C	Viscosidade (cSt)
Poli (2-fenilpropil) metilsiloxano	PFPMS	8C-12390	1,02	1000

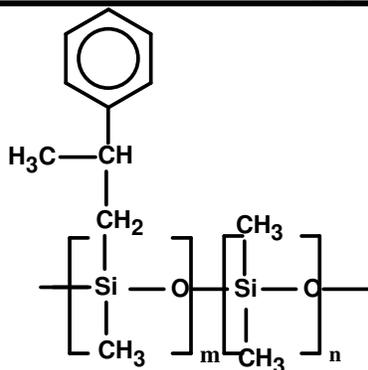


Figura 20. Fórmula Estrutural do poli (2-fenilpropil) metilsiloxano.

3.5. COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

As colunas utilizadas neste trabalho apresentam, 60 mm de comprimento e 4 mm de diâmetro interno e foram confeccionadas na oficina mecânica do IQ-UNICAMP, a partir de tubos de aço inoxidável 316, sem costura. Cada coluna é acompanhada pelos seguintes acessórios: 2 mangas com filtros retentores, 2 redutores de volume e 2 porcas terminais, que são conectados em cada uma das suas extremidades, de acordo com a Figura 21. Além destes acessórios, são usados parafusos de vedação, para armazenar a coluna quando esta não está sendo utilizada em análises, evitando-se o ressecamento do leito cromatográfico.

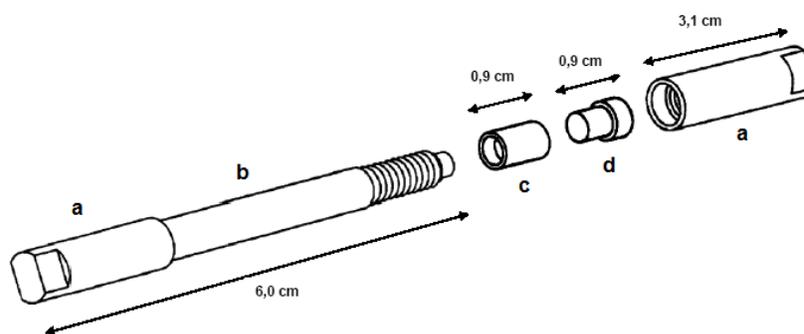


Figura 21. Coluna cromatográfica e suas conexões.⁵ a) porcas terminais, b) corpo da coluna, c) manga com filtro retentor, d) redutor de volume.

As paredes internas das colunas já haviam sido polidas usando a técnica desenvolvida no LabCrom.⁴⁴ Esta etapa do trabalho foi necessária, pois tubos com superfícies rugosas podem levar a uma redução do número de pratos da ordem de dez vezes, especialmente quando são empregadas partículas inferiores a 20 μm .⁴⁴ A técnica emprega uma haste metálica, de diâmetro menor que o tubo da coluna, recoberta com lã de aço e pasta de polimento contendo partículas abrasivas. A haste é presa a um mandril, e, por ela, o tubo da coluna é passado inúmeras vezes, em movimento de sobe e desce. Deve-se tomar o devido cuidado para manter o diâmetro uniforme, pois o diâmetro interno de uma coluna cromatográfica é um dos fatores que afetam o seu desempenho. Quanto maior o diâmetro interno da coluna menor será a eficiência do sistema.

O processo de polimento deve ser aplicado até a obtenção de uma superfície interna livre de imperfeições. Após o polimento, os tubos são lavados com detergente e água para remoção do excesso de pasta de polimento. Finalmente, os tubos das colunas são deixados

em ácido nítrico 50 % (v/v) por 24 horas e lavados com água e etanol, para garantir a sua limpeza completa.

3.6. PREPARO DAS FASES ESTACIONÁRIAS

3.6.1. Sorção do polímero sobre o suporte

Inicialmente foi estudada a carga de copolímero a ser depositada sobre o suporte. Através de cálculos⁵ verificou-se que a quantidade de copolímero necessária para preencher os poros da sílica é de 47% (m/m). Essa quantidade foi determinada a partir do volume específico de poro da sílica ($V_p = 0,86 \text{ mL}$) e da densidade do copolímero ($\rho = 1,02 \text{ g mL}^{-1}$):

$$m(\text{PFPMMS})_{\text{poros cheios}} = V_p \times \rho = 0,86 \text{ mL g}^{-1} \times 1,02 \text{ g mL}^{-1} = 0,8772 \text{ g} \quad (15)$$

Assim, a carga de copolímero (%) necessária para preencher os poros da sílica é:

$$\text{Carga de copolímero (\%)} = (m(\text{PFPMMS})_{\text{poros cheios}} / m(\text{PFPMMS})_{\text{poros cheios}} + 1\text{g}) \times 100 \quad (16)$$

$$\text{Carga de copolímero (\%)} = (0,8772\text{g} / 0,8772\text{g} + 1\text{g}) \times 100$$

$$\text{Carga de copolímero (\%)} = 47\%.$$

A fim de otimizar a carga de copolímero, fases estacionárias com carga de 40, 50 e 60% (m/m) foram preparadas.

A sorção do copolímero à superfície e aos poros do suporte foi feita utilizando-se o método de evaporação estática do solvente.^{5,9} Para isso, prepararam-se, separadamente, uma suspensão de sílica, previamente ativada em estufa a 140 °C por 16 horas, e soluções de copolímeros, ambas em diclorometano, na proporção de 10 mL de solvente para cada grama de material. A solução do copolímero foi agitada durante 10 minutos em agitador magnético, enquanto a suspensão de sílica foi sonicada pelo mesmo intervalo de tempo. Em seguida, a solução polimérica foi adicionada lentamente à suspensão de sílica, a mistura foi agitada durante 3 horas e deixada em repouso na capela por 7 dias, para que o solvente evaporasse lentamente.

Após a sorção do copolímero ao suporte de sílica, a fase sorvida foi submetida ao tratamento de imobilização térmica. Esta etapa se faz necessária, pois aumenta a interação do copolímero com o suporte, evitando a sua lixiviação com a passagem contínua da FM.

3.6.2. Tratamento térmico

Para a imobilização por tratamento térmico, cerca de 4 g de FE com o copolímero sorvido foram colocadas em um tubo de aço inoxidável (comprimento 80 mm, diâmetro interno 13 mm) e este foi conectado a um forno tubular, de maneira a obter um fluxo constante de nitrogênio através do tubo. Realizou-se um estudo, no qual se variaram a temperatura e o tempo de imobilização, empregando-se as seguintes condições: 120 °C por 12 h, 140 °C por 6 h e 140 °C por 4 h. Tais temperaturas foram escolhidas de acordo com um estudo preliminar que foi realizado para verificar o efeito da temperatura e do tempo de imobilização sobre o desempenho cromatográfico.

3.6.3. Extração do excesso de copolímero não imobilizado

Após a imobilização térmica do copolímero, o seu excesso deve ser extraído para que o material residual não imobilizado não seja carregado pela fase móvel durante as análises, diminuindo a reprodutibilidade dos parâmetros cromatográficos. Para isto, um tubo de aço inox (150 mm x 10 mm) contendo o material imobilizado ou auto-imobilizado foi conectado a uma bomba recíproca de alta pressão de pistão duplo. Levando-se em consideração estudos anteriores realizados no LabCrom,^{5,45,46} três procedimentos de extração foram testados: passagem de clorofórmio ou diclorometano pelo tubo de extração durante três horas a uma vazão de 1 mL min⁻¹, ambos seguidos da passagem de metanol durante duas horas na mesma vazão e passagem de hexano durante quatro horas a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹ a T = 50 °C.

Após a extração, a fase estacionária foi retirada do reservatório, transferida para um béquer e deixada em capela para evaporação do solvente.

3.7. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PFPMS E DAS FASES ESTACIONÁRIAS

3.7.1. Análise elementar

Todas as fases estacionárias preparadas neste trabalho foram submetidas à análise elementar para a determinação da porcentagem de carbono após a etapa de imobilização, avaliando-se, desta forma, o grau de recobrimento efetivo do suporte cromatográfico com o PFPMS. O método empregado utiliza a combustão do material devidamente seco para converter os elementos da amostra em gases simples, como CO₂, H₂O e N₂. Estes gases

são homogêneos e controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume. Em seguida, os gases são despressurizados através de uma coluna, separados e detectados em função das respectivas condutividades térmicas, sendo convertidos em percentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio.⁵

3.7.2. Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros

Amostras de FE foram submetidas à determinação da área superficial específica, volume e diâmetro de poros. Estas medidas foram obtidas pela adsorção e dessorção de nitrogênio a $-195,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET a pressões relativas (p/p_0) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p_0 são, respectivamente, pressão de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a $-195,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. O volume total de poro foi determinado empregando o método do ponto único, pela conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poro e da área superficial BET ($4 V_p/S_{BET}$).⁵

3.7.3. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica do copolímero foi avaliada através da termogravimetria (TGA). Este experimento foi feito em um analisador termogravimétrico, sob atmosfera inerte, de 25 a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$, a uma velocidade de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Para a análise, utilizaram-se cerca de 14 mg de FE, em suporte de amostra de Al_2O_3 . A curva de TGA foi obtida em percentagem de perda de massa em função da temperatura, e a curva DTG (derivada termogravimétrica) representa a taxa de variação de massa em relação à temperatura (dm/dT).

3.7.4. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na região de 400 a 4000 cm^{-1} , empregando resolução de 4 cm^{-1} e taxa de aquisição de 20 varreduras por minuto. Os espectros das amostras de sílica e das fases estacionárias foram obtidos por meio de pastilhas de KBr preparadas na concentração de 1 % (m/m). Para as amostras líquidas (PMFS), foram obtidos espectros de transmissão utilizando-se uma janela de NaCl.

3.7.5. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ²⁹Si

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

3.8. ENCHIMENTO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

3.8.1. Suspensão da fase estacionária

As suspensões utilizadas para fazer o enchimento das colunas foram preparadas em tubos de ensaio com rosca de vedação, utilizando uma concentração de 10 % (m/v) em clorofórmio (0,75 g de FE em 7,5 mL de clorofórmio), que promove uma boa dispersão das partículas e impede a sedimentação rápida das mesmas. As suspensões ficaram em agitação, num agitador roto-torque, por períodos que variaram de 14 a 24 horas.

3.8.2. Recheio das colunas com a fase estacionária

As colunas cromatográficas foram recheadas utilizando o método de suspensão à alta pressão. De acordo com a Figura 22, para o enchimento das colunas cromatográficas, o reservatório do solvente (1) foi preenchido com metanol previamente filtrado (solvente propulsor). Em seguida, ajustou-se a pressão da bomba (2 e 3) para um valor fixo de 6.000 psi. Ao reservatório de suspensão (6) foi conectada a coluna cromatográfica (7) e adicionada a suspensão da FE (5), completando o volume do reservatório com clorofórmio filtrado. Na etapa seguinte, a válvula do solvente propulsor (4) foi aberta e a pressão exercida pelo gás N₂ empurra a suspensão para o interior da coluna, ficando retidas apenas as partículas, devido à presença de um filtro (diâmetro de poro de 2 µm) na extremidade inferior da coluna. O sistema foi mantido sob pressão até a passagem de 80 mL de solvente (8). A manutenção de uma pressão constante durante todo o procedimento de recheio da coluna resultará em um leito homogêneo e com boa compactação. Depois de terminado o enchimento, o sistema foi despressurizado e a coluna desconectada do reservatório, fechando apropriadamente sua extremidade superior com um filtro terminal, reservando o excesso da FE, encontrado nas conexões do reservatório, para testes subsequentes.

Deve-se evidenciar que, normalmente, a cada 12 colunas enchidas, 66 % apresentam baixa eficiência (40.000 N/m) para o pico do naftaleno e apenas 34 % são obtidas com desempenho satisfatório (70.000 N/m). Apenas duas colunas com eficiência de 90.000 N/m foram obtidas e como outras colunas com o mesmo desempenho não foram conseguidas, as mesmas foram descartadas.

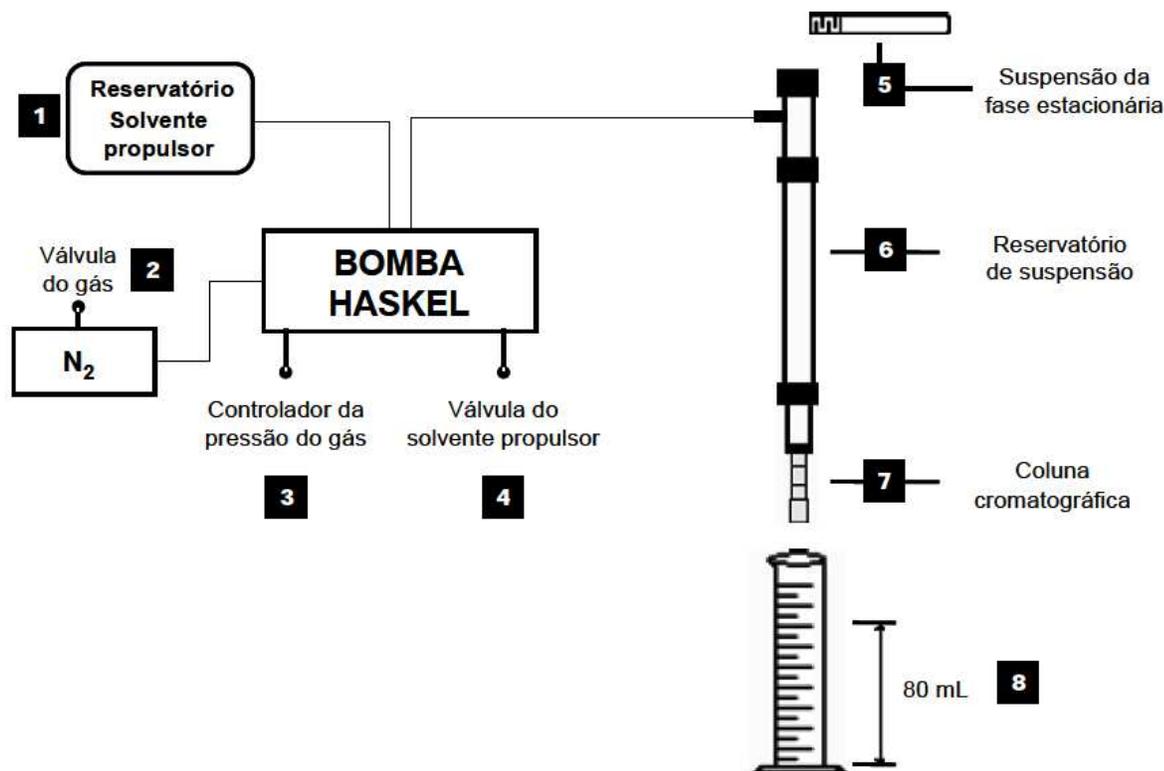


Figura 22. Representação esquemática do sistema de enchimento de colunas.⁵

3.8.3. Condicionamento das colunas

Após o enchimento, a coluna deve ser condicionada para que seja atingido o equilíbrio entre a FE e a FM na composição a ser empregada nas análises e para eliminar os resíduos do solvente de propulsão. Para o condicionamento, a coluna foi acoplada apenas ao sistema de injeção, evitando, desta forma, a obstrução de tubulações e da cela de detecção, uma vez que impurezas podem ser removidas de dentro do leito cromatográfico nesta etapa. Todas as colunas preparadas neste trabalho foram submetidas à pelo menos uma hora de condicionamento, na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, sendo esta etapa prolongada, caso a linha de base no cromatograma não se apresentasse estável.

3.9. CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS FASES ESTACIONÁRIAS

3.9.1. Preparo das fases móveis

Para a avaliação das fases estacionárias foram utilizadas diversas fases móveis, de acordo com a mistura a ser analisada. Os solventes das fases móveis foram filtrados em membrana hidrofílica de 0,45 μm de tamanho de poros e medidos individualmente em provetas. Em seguida, os solventes da fase móvel foram misturados, sempre adicionando o componente aquoso (água ou solução tampão) ao orgânico (metanol). Após a mistura dos componentes e rotineiramente antes da sua utilização, as fases móveis foram desgaseificadas em ultrassom por 20 minutos. Para fases móveis tamponadas procedeu-se a filtração após a mistura dos componentes.

3.9.2. Testes preliminares de avaliação

A avaliação cromatográfica das fases estacionárias foi feita por meio do cálculo dos parâmetros cromatográficos de compostos separados de misturas teste sintéticas. Os cálculos foram obtidos através do software “Report Write Plus”, inserido no software de tratamento de dados “Chrom Perfect”. Foram feitos cálculos de N/m (número de pratos por metro de coluna), As_{10} (fator de assimetria a 10 % da altura do pico), R_s (resolução) e k (fator de retenção) para todos os componentes da mistura teste. A avaliação de cada coluna foi feita em triplicata.

Todas as análises foram realizadas utilizando o detector UV-Visível, no comprimento de onda de 254 nm. Utilizou-se sempre o mesmo volume de amostra injetado, que foi de 5 μL . Com base em outros trabalhos realizados no LabCrom,^{45,46} empregou-se uma vazão de 0,3 mL min^{-1} , a qual, após a otimização da extração e da carga de polímero utilizada, foi determinada pela curva de van Deemter como sendo a vazão ótima.

Para a avaliação cromatográfica preliminar das colunas, foram utilizadas duas misturas testes de uso padrão no laboratório, descritas a seguir:

- Mistura Teste 1 (MT 1): uracila (1 mg L^{-1}), benzonitrila (30 mg L^{-1}), benzeno (30 mg L^{-1}), tolueno (30 mg L^{-1}) e naftaleno (30 mg L^{-1}).
- Mistura Teste 2 (MT 2): uracila (1 mg L^{-1}), fenol (20 mg L^{-1}), N,N-dimetilanilina (20 mg L^{-1}), naftaleno (30 mg L^{-1}) e acenafteno (50 mg L^{-1}).

A mistura 1 foi utilizada para avaliar a seletividade e hidrofobicidade das FE na separação de compostos neutros de polaridades diferentes: polares (acetofenona) e apolares (benzeno, tolueno e naftaleno).

A mistura 2 foi utilizada para avaliar o comportamento da fase diante de compostos de caráter ácido (fenol), básico (N,N-dimetilanilina), neutros e hidrofóbicos (naftaleno e acenafteno).

A uracila foi adicionada nas misturas teste para se obter o t_M , tempo necessário para que a FM passe através do sistema cromatográfico, essencial para o cálculo de alguns parâmetros cromatográficos.

As duas misturas foram preparadas qualitativamente na FM MeOH: H₂O 50:50 (v/v) e armazenadas em geladeira.

3.9.3. Mistura teste de Tanaka

O teste de Tanaka e colaboradores⁴⁷ foi utilizado para a caracterização cromatográfica da fase estacionária por ser o mais popular dentre todos os existentes na literatura. Além disso, esse teste engloba praticamente todas as variáveis analisadas em outras misturas, como a de Engelhardt e Jungheim.⁴⁸

No teste de Tanaka, quatro misturas-teste foram avaliadas empregando-se uma determinada composição de FM para cada uma delas. Todas as misturas foram analisadas a 40 °C. As misturas A e B foram detectadas a 254 nm, enquanto as misturas C e D, a 220 nm. As misturas e suas respectivas fases móveis utilizadas foram:

- *Mistura A*: uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, *o*-terfenila e trifenileno. Fase móvel: MeOH: H₂O (80:20, v/v);
- *Mistura B*: uracila, cafeína e fenol. Fase móvel: MeOH: H₂O (30:70, v/v);
- *Mistura C*: uracila, benzilamina e fenol. Fase móvel: MeOH:0,020 mol L⁻¹ de K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,6 (30:70, v/v);
- *Mistura D*: uracila, benzilamina e fenol. Fase móvel: MeOH:0,020 mol L⁻¹ de KH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,7 (30:70, v/v).

Com a realização destes testes foi possível avaliar cinco diferentes propriedades cromatográficas da fase preparada a 140 °C durante 6 h:

- *Hidrofobicidade* ($k_{pentilbenzeno}$). Medida a partir do fator de retenção do pentilbenzeno. Fornece informação sobre o recobrimento superficial da FE;

- *Seletividade hidrofóbica* (α_{CH_2}). Medida pela razão dos fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno, $\alpha_{CH_2} = k_{PB} / k_{BB}$. Esta é uma medida do recobrimento superficial do suporte cromatográfico, pois a seletividade entre alquilbenzenos, diferenciados por um grupo CH_2 , é dependente da quantidade de polímero imobilizado;
- *Seletividade estérica* ($\alpha_{T/O}$). Medida pela razão entre os fatores de retenção do trifenileno e da *o*-terfenila, $\alpha_{T/O} = k_T / k_O$. O $\alpha_{T/O}$ é uma medida da seletividade estérica, a qual é influenciada por várias características da FE, tais como: tamanho das cadeias aquilas ligadas, funcionalidade do copolímero, porcentagem de carbono, densidade de ligação, área superficial e tamanho de poro.
- *Capacidade de ligação de hidrogênio* ($\alpha_{C/F}$). Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/F} = k_C / k_F$. O $\alpha_{C/F}$ é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com os constituintes da amostra;
- *Capacidade de troca iônica total* ($\alpha_{B/F}$ pH 7,6). Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/F}$ pH 7,6 = k_B / k_F . O valor obtido é uma estimativa da atividade silanfílica total da fase estacionária;
- *Capacidade de troca iônica em meio ácido* ($\alpha_{B/F}$ pH 2,7). Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/F}$ pH 2,7 = k_B / k_F . O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais.⁵

3.10. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA FE PFPMS140-6

A estabilidade química da FE PFPMS140-6 foi avaliada em condição ácida monitorando-se o decaimento da eficiência para o pico do tolueno ao se utilizar uma FM metanol:0,1 % de ácido trifluoracético em H_2O pH 1,7 (50:50,v/v), vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Deve-se evidenciar que as injeções foram realizadas de hora em hora, sendo que a vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ foi escolhida de modo que o tempo de retenção da uracila fosse de 1 min, mantendo-a constante durante toda a execução do teste.

A estabilidade de cada fase estacionária foi avaliada em função do número de volume de coluna (V_{col}) eluído através da coluna cromatográfica. O volume de coluna corresponde ao volume de fase móvel que ocupa os espaços dentro da coluna, os quais não são ocupados

pelo recheio cromatográfico. Ele foi calculado a partir do t_M da uracila e da vazão da fase móvel, conforme a equação 17:

$$V_{col} = F \times t_M \quad \text{Equação 17}$$

na qual F é a vazão da fase móvel e t_M é o tempo de retenção do composto não retido (uracila). O valor de V_{col} calculado foi igual a 0,50 mL de fase móvel.

3.11. AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA FASE ESTACIONÁRIA

A FE PFPMS140-6 foi empregada na separação de uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, de alguns compostos aromáticos sugeridos por Szabó e Csató⁴⁹ e também na separação de alguns fármacos que geralmente apresentam forte interação com os grupos silanóis residuais das FE a base de sílica.⁵⁰ O desempenho da FE preparada foi comparado ao de colunas comerciais C18 e Fenil-Hexil.

3.11.1. Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Empregando-se a FE PFPMS140-6 (A), as colunas comerciais Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm (B) e Nova-Pak C18, 4 μm , 150 x 3,9 mm (C), realizou-se a separação de uma mistura contendo seis hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA): acenaftileno, fluoreno, acenafteno, fluoranteno, pireno e criseno. As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel metanol:água (65:35, v/v); vazão de: (A) 0,3 mL min^{-1} , (B) e (C) 1,0 mL min^{-1} ; volume de amostra: 5 μL ; temperatura de 30 $^\circ\text{C}$; detecção UV a 254 nm.

3.11.2. Separação da mistura de Szabó e Csató⁴⁹

Empregando-se a FE PFPMS140-6 (A), as colunas comerciais Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm (B) e Nova-Pak C18, 4 μm , 150 mm x 3,9 mm (C), realizou-se a separação da mistura de Szabó e Csató⁴⁹: uracila, fenol, *m*-cresol, acetofenona, benzoato de metila, tolueno, *p*-xileno e propilbenzeno. As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel metanol:água 55:45, (v/v); vazão de: 0,3 mL min^{-1} (A), (B) e (C) de 1,0 mL min^{-1} ; volume de amostra: 5 μL ; temperatura de 25 $^\circ\text{C}$; detecção UV a 254 nm.

3.11.3. Separação de fármacos

Empregando-se a FE imobilizada termicamente a 140 °C por 6 h (A), as colunas comerciais Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm (B) e Nova-Pak C18, 4 µm, 150 mm x 3,9 mm (C), realizou-se a separação de uma mistura contendo cinco fármacos: levofloxacina, dextrometorfano, diazepam, amitriptilina e nortriptilina. Na Tabela 2 estão indicados os pKa desses compostos. As condições cromatográficas utilizadas foram: fase móvel metanol:0,020 mol L⁻¹ KH₂PO₄/H₃PO₄ a pH 2,7 (50:50, v/v); vazão: (A) 0,3 mL min⁻¹, (B) e (C) 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; temperatura de 25 °C; detecção UV a 220 nm.

Tabela 2. Valores de pKa dos fármacos analisados.

Fármaco	pka
levofloxacina	5,59 ^a , 7,94 ^b
dextrometorfan	8,3
diazepan	3,3
amitriptilina	9,4
nortriptilina	9,7

^apka₁, ^bpka₂

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO SUPORTE DE SÍLICA, DO PFPMS E DA FASE ESTACIONÁRIA PFPMS140-6

4.1.1. Área superficial específica, volume e diâmetro de poros do suporte e da FE PFPMS140-6

Os valores de área superficial específica, volume e diâmetro de poros obtidos para as amostras de sílica nua e para a FE PFPMS140-6 estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Área superficial específica, volume e diâmetro de poros do suporte e da FE PFPMS140-6.

Amostra	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Volume de poros (mL g ⁻¹)	Diâmetro de poros (nm)
Sílica nua	308	0,86	11,4
PFPMS140-6	165	0,47	11,2

Os valores obtidos para a FE PFPMS140-6 mostram que a imobilização do PFPMS provocou uma diminuição significativa do volume de poro e da área superficial específica do suporte, decorrente do espaço ocupado pelas cadeias do polímero. O valor de diâmetro de poro não foi afetado significativamente após a imobilização do PFPMS, indicando, juntamente com a diminuição da área superficial e do volume de poros, que a deposição do polímero ocorre principalmente no interior dos poros do suporte, sem a obstrução dos mesmos.

4.1.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho

No espectro da sílica (Figura 23), as principais bandas são observadas em 3.463, 1.109 cm^{-1} e 975 cm^{-1} . A primeira é atribuída aos grupos silanóis e às moléculas de água adsorvidas na superfície da sílica e a segunda banda, ao estiramento das ligações siloxano ($\equiv \text{Si} - \text{O} - \text{Si} \equiv$). A pequena banda em 975 cm^{-1} é atribuída aos grupos silanóis livres.

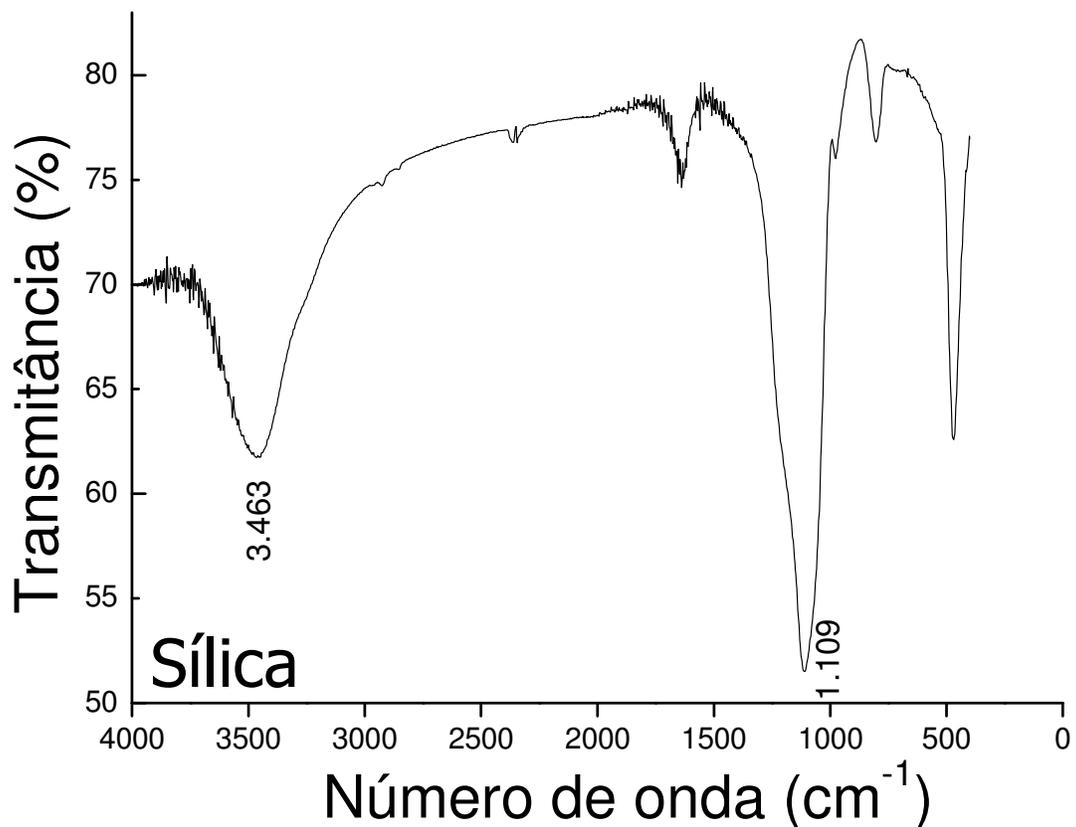


Figura 23. Espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a sílica, utilizando pastilha de KBr.

Na Figura 24 pode ser visualizado o espectro de absorção na região do infravermelho obtido para o copolímero PFPMS. Observam-se bandas em torno de 2.960 cm^{-1} atribuída às vibrações de C-H de grupos metila e metileno. As bandas em 1.261 e 802 cm^{-1} referem-se às deformações angular de ligações C-H no plano e fora do plano, respectivamente. As bandas em 1.094 e 1.021 cm^{-1} são atribuídas às ligações siloxano.

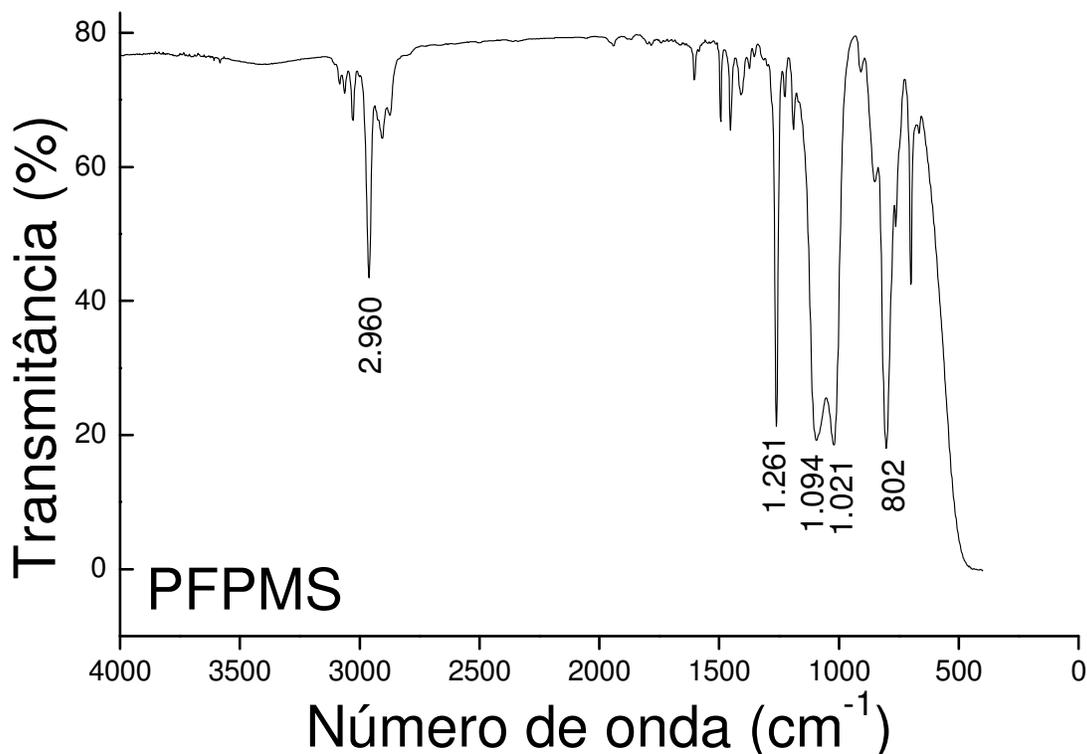


Figura 24. Espectro de absorção na região do infravermelho do copolímero PFPMS.

As principais bandas no espectro de absorção da FE PFPMS140-6 na região do infravermelho estão indicadas na Figura 25. Observam-se bandas características do PFPMS em torno de 2.964 cm^{-1} atribuída às vibrações de C-H de grupos metila e metileno, bem como em 1.262 e 802 cm^{-1} , as quais se referem às deformações angular de ligações C-H no plano e fora do plano, respectivamente. A banda em 1.101 é atribuída às ligações siloxano, enquanto a banda alargada em 3456 cm^{-1} é atribuída aos grupos silanóis e às moléculas de água adsorvidas na superfície da sílica. Também se constata a diminuição do pequeno ombro em 975 cm^{-1} , referente aos silanóis livres presentes na sílica, indicando que o processo de imobilização do PFPMS sobre o suporte promoveu o recobrimento de parte destes grupos.

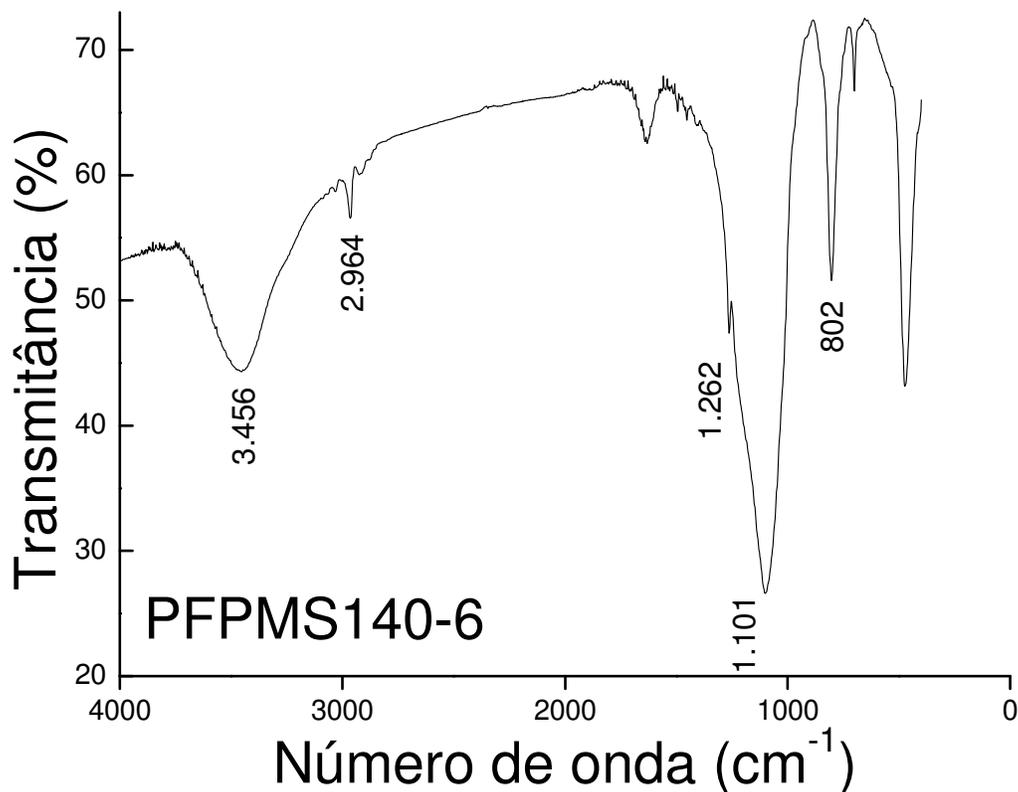


Figura 25. Espectro de absorção na região do infravermelho da FE PFPMS140-6.

4.1.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{29}Si

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^{29}Si foi empregada com o objetivo de se obter uma caracterização mais específica da FE, por meio da identificação das espécies de silício presentes.

O espectro de RMN ^{29}Si obtidos para a sílica estão apresentados na Figura 26, enquanto na Figura 27 encontram-se as nomenclaturas e os deslocamentos químicos das espécies de silício presentes na sílica.

No espectro de RMN ^{29}Si da sílica observam-se picos em -92, -101 e -110 ppm, atribuídos aos grupos silanóis geminais (Q_2), aos silanóis livres e vicinais (Q_3), e às ligações do tipo siloxano (Q_4), respectivamente.

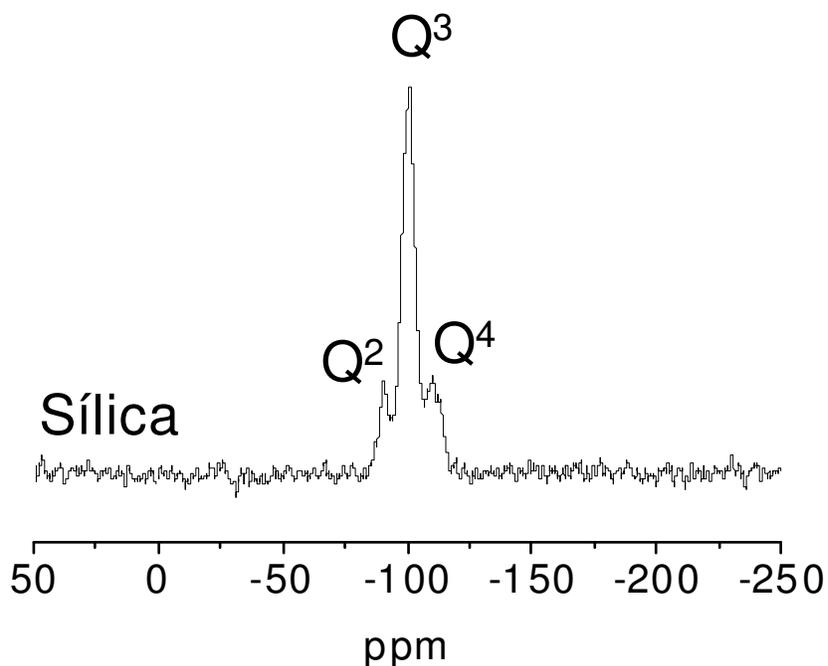


Figura 26. Espectros de RMN ^{29}Si obtidos para a sílica (SiO_2).

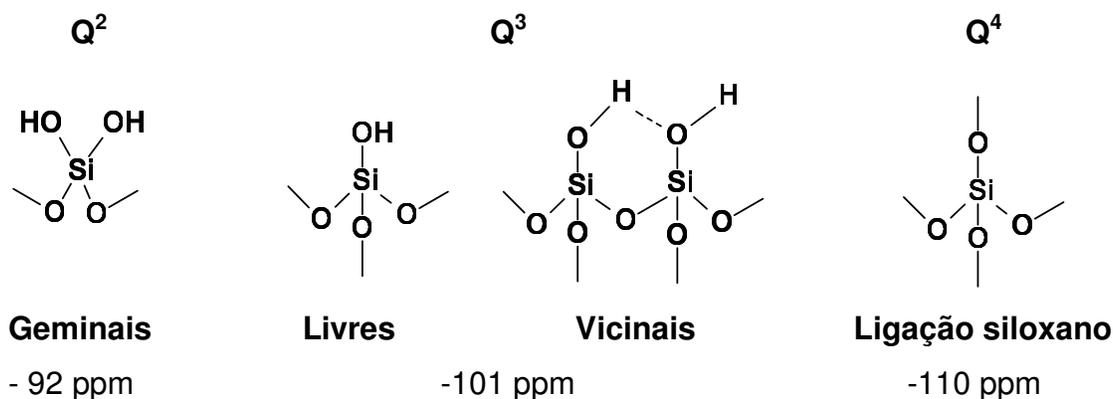


Figura 27. Espécies de silício presentes na sílica com seus valores de deslocamento químico.

O espectro de RMN ^{29}Si obtido para a FE PFPMS140-6 está apresentado na Figura 28, enquanto na Figura 29 encontram-se as nomenclaturas e os deslocamentos químicos das novas espécies de silício presentes, os quais não aparecem no espectro do suporte.

Os picos em -90, -100 e -110 ppm, característicos da sílica, são atribuídos aos grupos silanóis geminais (Q^2), aos silanóis livres e vicinais (Q^3), e às ligações do tipo siloxano (Q^4), respectivamente. Analisando a Figura 28, verifica-se que a FE apresenta uma diminuição significativa na razão das espécies Q^2/Q^4 em relação à sílica nua, indicando que o

copolímero interage preferencialmente com os grupos silanóis geminais. Também ocorre uma pequena diminuição na proporção das espécies Q^3/Q^4 , sugerindo interação do copolímero com os grupos vicinais e livres. As novas espécies de silício presentes na FE PFPMS140-6 geram picos entre -16 (D^1_H), -17 ppm (D^2') e -21 ppm (D^2''), resultantes de adsorção física e de ligação química entre o copolímero e o suporte.

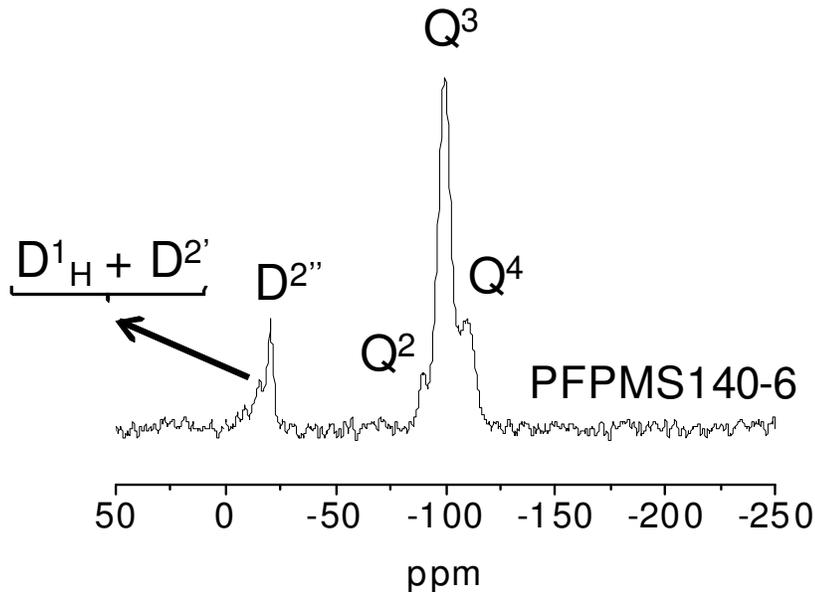


Figura 28. Espectros de ^{29}Si NMR obtidos para uma amostra de FE PFPMS140-6.

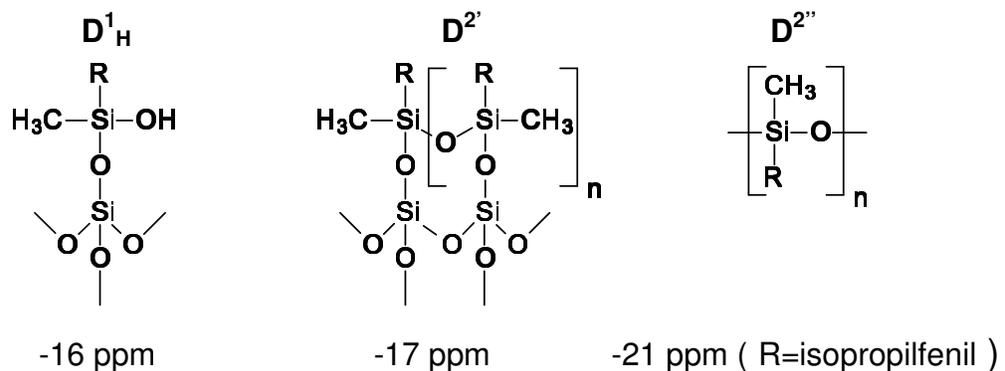


Figura 29. Espécies de silício presentes na FE PFPMS140-6 com seus valores de deslocamento químico.

4.1.4. Termogravimetria

As curvas TGA/DTG (DTG – derivada termogravimétrica: derivada de massa em função da temperatura) obtidas para o copolímero PFPMS encontra-se na Figura 30. Analisando essa figura, pode-se concluir que o poli (2-fenilpropil) metilsiloxano é estável termicamente até cerca de 250 °C. Essa temperatura foi considerada o limite máximo para a

imobilização térmica. A partir desta temperatura, inicia-se a decomposição térmica da cadeia polimérica, que ocorre em várias etapas, estendendo-se de 250 °C a 700 °C, aproximadamente. A perda de massa total, até 700 °C, foi de 70 % da massa inicial do copolímero, restando SiO₂ como resíduo de decomposição.

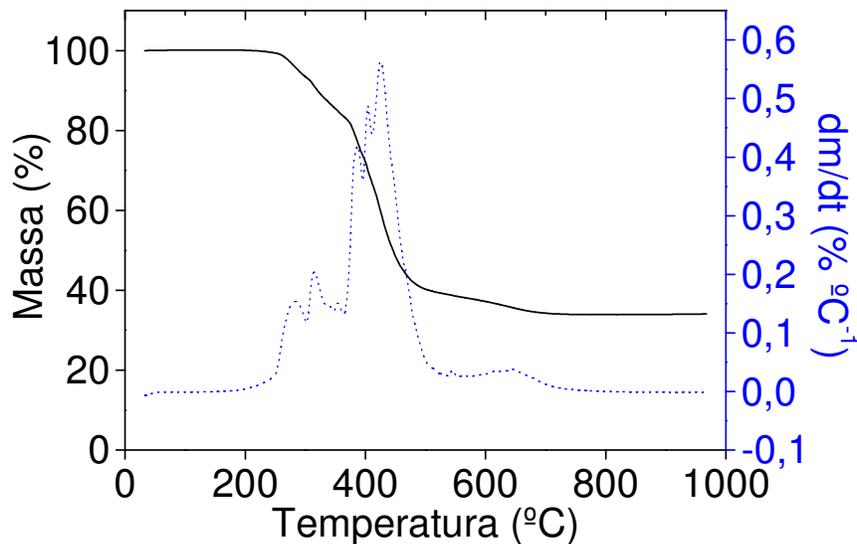


Figura 30. Curvas TGA (—) e DTG (---) obtidas para o copolímero PFPMS sob atmosfera inerte, a uma velocidade de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 25 °C a 1000 °C, utilizando-se aproximadamente 14 mg de FE em suporte de Al₂O₃.

4.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DO EXCESSO DE COPOLÍMERO NÃO IMOBILIZADO

Para a otimização do processo de extração, fases estacionárias foram preparadas sob as mesmas condições: temperatura de imobilização ($T = 120$ °C), tempo ($t = 12$ h) e quantidade suficiente de copolímero para preencher os poros da sílica (47 %). Vale evidenciar que essa temperatura e o tempo de imobilização foram escolhidos baseando-se num estudo prévio realizado para avaliar diversas condições de imobilização.

Na Tabela 4 encontram-se as porcentagens de carbono presentes nas FE antes e após a extração e depois do enchimento, necessárias para se avaliar o procedimento de extração mais eficiente.

A partir da análise da Tabela 4, deve-se destacar que as fases estacionárias apresentaram porcentagens de carbono similares, exceto depois do enchimento. Enquanto que as fases nas quais clorofórmio ou diclorometano foram empregados na extração apresentaram porcentagens de carbono similares, respectivamente, 15,5 e 15,0%; a FE cujo

excesso de copolímero foi extraído com hexano apresentou um valor inferior, de 12,2%. Como era de se esperar, depois do enchimento ocorreu a diminuição nas porcentagens de carbono das FE extraídas com clorofórmio e diclorometano, pois quantidades remanescentes do excesso de copolímero (não imobilizado) não extraído são arrastadas pelo solvente propulsor durante o enchimento das colunas. Já a drástica redução da porcentagem de carbono na FE extraída com hexano deve ocorrer por ele ser um solvente mais apolar que os demais solventes avaliados, facilitando a remoção do copolímero imobilizado mais fracamente, ou seja, como a disposição do copolímero sobre o suporte de sílica ocorre em gotas ou “plugs”, deve-se esperar que ocorra uma sobreposição de camadas poliméricas, sendo as mais externas, menos fortemente fixadas ao suporte.

Na Tabela 5 são mostrados os parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos compostos das misturas teste 1 e 2 nas FE submetidas aos diferentes procedimentos de extração. A extração com hexano resultou numa menor porcentagem de carbono em relação às FE submetidas aos outros dois procedimentos, resultando em menor fator de retenção para o naftaleto ($k = 5,7$), que se apresentou como um pico largo e assimétrico, denotando a baixa eficiência obtida com esta FE. Os resultados obtidos com o clorofórmio e o diclorometano foram similares, contudo, optou-se pelo uso do clorofórmio, pelo fato de todos os parâmetros cromatográficos obtidos estarem dentro do intervalo citado na literatura, além de poder utilizar o mesmo solvente empregado na suspensão do enchimento das colunas, o qual garante uma boa dispersão das partículas, como já foi demonstrado anteriormente em outros trabalhos realizados no LabCrom.^{45,46}

Tabela 4. Porcentagem de carbono (%C) nas FE submetidas a três diferentes procedimentos de extração

Procedimento de extração	%C		
	Antes da extração	Depois da extração	Depois do enchimento
clorofórmio – 3 h metanol – 2 h	24,7	18,0	15,5
diclorometano – 3 h metanol – 2 h	24,3	17,6	15,0
hexano – 4 h (T=50 °C)	24,1	17,4	12,2

Tabela 5. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação das fases estacionárias submetidas à diferentes procedimentos de extração.

Procedimento de extração	N/m ^a	As ^a	As ^b	As ^c	k ^a	Rs ^d
clorofórmio – 3 h metanol – 2 h	50.100	1,0	1,6	0,9	9,2	4,5
diclorometano – 3 h metanol – 2 h	55.000	0,9	1,2	0,8	7,5	4,2
hexano – 4 h	39.000	1,3	1,7	0,9	5,7	3,8

^a Calculado para o pico do naftaleno; ^b Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^c Calculado para o pico do acenafteno; ^d Calculado para o par tolueno-naftaleno.

4.3. OTIMIZAÇÃO DA CARGA DE COPOLÍMERO

Visando-se a otimização da carga de copolímero utilizado, FE foram preparadas, com cargas de 40, 50 e 60 %, sob as mesmas condições de temperatura e tempo de imobilização: 120 °C por 12 h, e extração durante 3h com clorofórmio e 2 h com metanol a uma vazão de 1mL min⁻¹.

Pela Tabela 6, que mostra os parâmetros cromatográficos obtidos na separação dos compostos da mistura teste 1 e 2, pode-se perceber que a FE com carga de copolímero de 50 % apresentou o valor mais alto de eficiência para o pico do naftaleno (N/m = 53.000) e fator de assimetria para o pico do naftaleno (As) e para a N,N-dimetilanilina (As), respectivamente igual a 1,0 e 1,5, portanto, dentro do intervalo aceito na literatura. Sendo assim, a carga de 50 % passou a ser utilizada no preparo das FE.

Tabela 6. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação das FE preparadas com diferentes cargas de polímero.

Carga de polímero	N/m ^a	As ^a	As ^b	k ^a	Rs ^c
40	40.100	1,7	1,9	4,4	3,6
50	53.000	1,0	1,5	8,4	4,6
60	41.000	1,4	1,7	9,7	4,3

^a Calculado para o pico do naftaleno; ^b Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^c Calculado para o par tolueno-naftaleno.

4.4. CURVA DE van DEEMTER

A vazão ótima da fase móvel metanol:água 65:35 (v/v) foi definida com base na curva de van Deemter, que relaciona a altura de um prato (H) à velocidade linear da fase móvel (μ).

A vazão ótima determina a velocidade linear da fase móvel que proporciona a máxima eficiência de coluna (menor valor da altura de prato, H), localizada no ponto mínimo da curva. Os termos H e μ foram obtidos a partir do valor de eficiência para o pico do naftaleno, do comprimento da coluna (L) e do tempo de retenção da uracila, Equações 6 e 8. A Figura 31 mostra a curva de van Deemter para a fase de estacionária com PFPMS imobilizado termicamente a 120 °C por 12 h.

O ponto mínimo da curva, correspondente à máxima eficiência de coluna, apresenta altura de prato (H) equivalente a 0,7 μm (ou eficiência de coluna de 86.000 pratos m^{-1}) para o composto naftaleno. Esta máxima eficiência da fase estacionária foi obtida em vazão de fase móvel de 0,3 mL min^{-1} (velocidade linear de aproximadamente 4 cm min^{-1}). Assim, a vazão de 0,3 mL min^{-1} foi escolhida para dar continuidade ao desenvolvimento do trabalho.

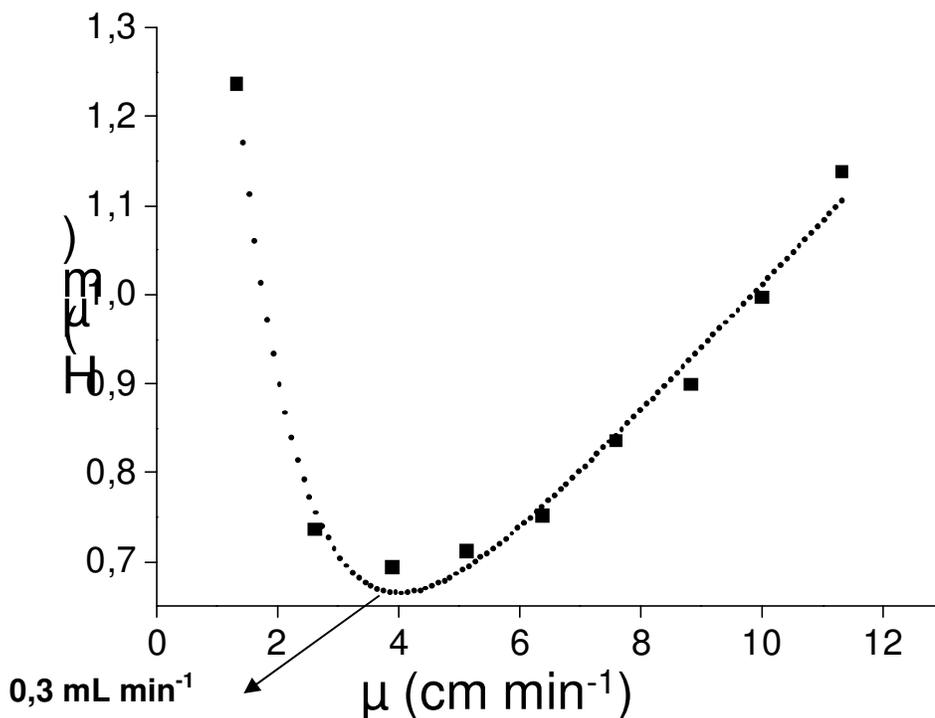


Figura 31. Curva de van Deemter para uma FE imobilizada a 120 °C por 12 h.

4.5. OTIMIZAÇÃO DA TEMPERATURA E DO TEMPO DE IMOBILIZAÇÃO POR TRATAMENTO TÉRMICO

Vale evidenciar que antes da otimização da temperatura e do tempo de imobilização, como ainda não se tinha conseguido eficiências em torno de 70.000 pratos m^{-1} para o pico do naftaleno, valor geralmente obtido para as fases desenvolvidas no LabCrom, empregando

partículas de 5 µm, trocaram-se os corpos de coluna e os filtros. Além disso, as FE passaram a ser analisadas num sistema cromatográfico com as conexões coluna-detector de menor volume extra.

Na Tabela 7 encontram-se os parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação das FE preparadas para a otimização do tempo e da temperatura de imobilização e na Tabela 8 podem ser visualizados o cálculo da média e da estimativa do desvio padrão amostral para os parâmetros cromatográficos medidos para três diferentes colunas enchidas com a FE PFPMS140-6. Nas Figuras 32 e 33 estão os cromatogramas resultantes da separação das misturas teste 1 e 2, respectivamente, pelas colunas preparadas nas diversas condições de imobilização testadas. Os parâmetros cromatográficos mostrados na Tabela 7 indicam que todas as fases estacionárias preparadas apresentaram eficiência maior ou igual a 70.000 N/m e fatores de assimetria entre 0,9 e 1,6, ou seja, dentro da faixa aceita na literatura. Contudo, optou-se em dar continuidade ao trabalho através da FE PFPMS140-6 por necessitar de um tempo razoável de imobilização (6 horas), apresentar um bom valor de eficiência e maior porcentagem de carbono.

Tabela 7. Parâmetros cromatográficos obtidos na avaliação das fases estacionárias preparadas em diferentes condições de imobilização do copolímero.

FE	Procedimento de imobilização	N/m^a	As^a	As^b	k^a	Rs^c	%C
PFPMS140-4	140 °C / 4 h	70.000	1,3	1,4	6,6	4,5	16,0
PFPMS140-6	140 °C / 6 h	78.500	1,2	1,4	7,6	4,9	16,4
PFPMS120-12	120 °C / 12 h	80.000	0,9	1,1	6,5	4,7	15,7

^a Calculado para o pico do naftaleno; ^b Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^c Calculado para o par tolueno-naftaleno.

Tabela 8. Cálculo da média e da estimativa do desvio padrão para os parâmetros cromatográficos medidos para três colunas diferentes enchidas com a FE PFPMS140-6.

Fase estacionária PFPMS140-6		
Parâmetros cromatográficos	Média	Desvio padrão amostral
N/m ^a	78767	1124
k ^a	7,2	0,32
As ^a	1,1	0,1

^a Calculado para o pico do naftaleno

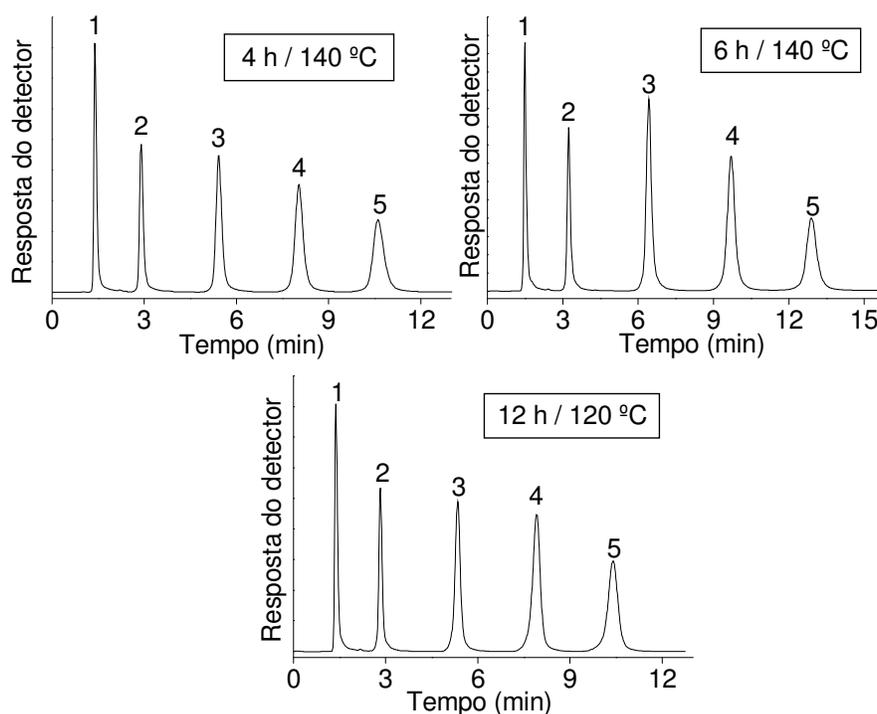


Figura 32. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste 1 com as FE preparadas por imobilização térmica do copolímero em diferentes condições. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L, FM: metanol:água 65:35 (v/v); vazão 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos da MT-1: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

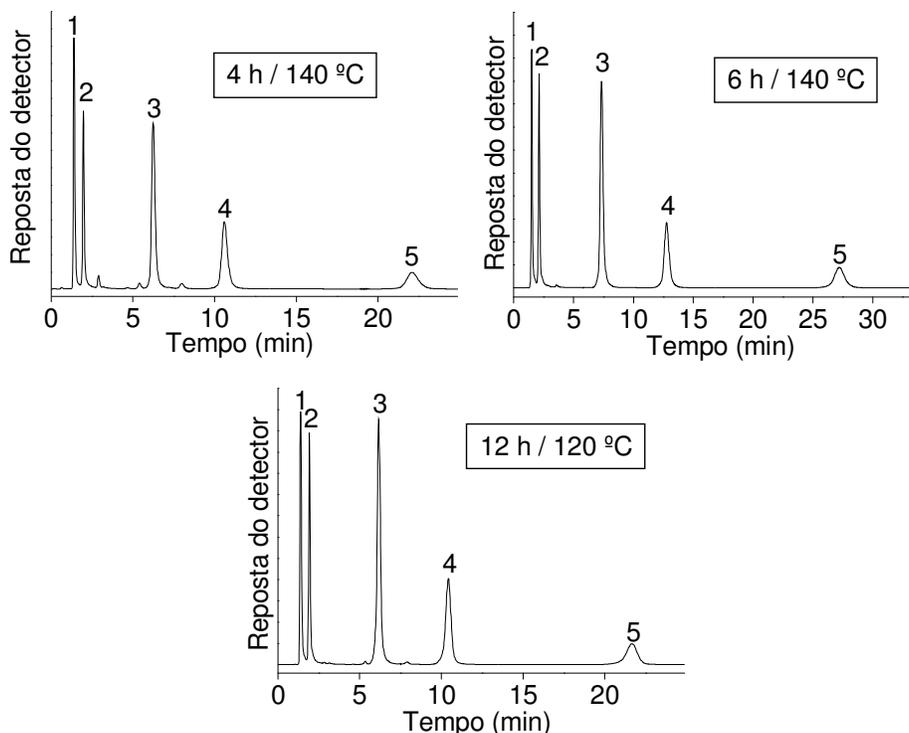


Figura 33. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste 2 com as FE preparadas por imobilização térmica do copolímero em diferentes condições. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; FM: metanol:água 60:40 (v/v); vazão 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Compostos da MT-2: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N - dimetilanilina (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.6. CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DA FASE ESTACIONÁRIA PFPMS140-6 USANDO A MISTURA DE TANAKA

Como já foi dito, a mistura teste de Tanaka permite avaliar diferentes propriedades da FE, dentre elas: recobrimento superficial (hidrofobicidade), seletividade hidrofóbica, seletividade estérica, capacidade de ligação de hidrogênio e capacidade de troca iônica em pH 2,7 e 7,6, respectivamente.

Usando o teste de Tanaka, Euerby e Petersson^{29,51} estudaram 229 fases comerciais aplicando análise de componentes principais (PCA) para classificar e comparar as FE disponíveis comercialmente. A fim de facilitar a demonstração de similaridades e dissimilaridades da FE imobilizada a 140 $^{\circ}\text{C}$ durante 6 h em relação às colunas disponíveis comercialmente, realizou-se a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) utilizando-se os dados disponibilizados por Euerby.⁵² Empregou-se o programa Pirouette 3.11,⁵³ selecionando distância euclidiana padronizada como medida de dissimilaridade e o Método

do Centróide para realizar os agrupamentos. O dendograma é mostrado na Figura 34. As características das colunas com as quais a FE preparada apresentou maior similaridade estão mostradas na Tabela 8 e suas propriedades cromatográficas podem ser visualizadas na Tabela 9.

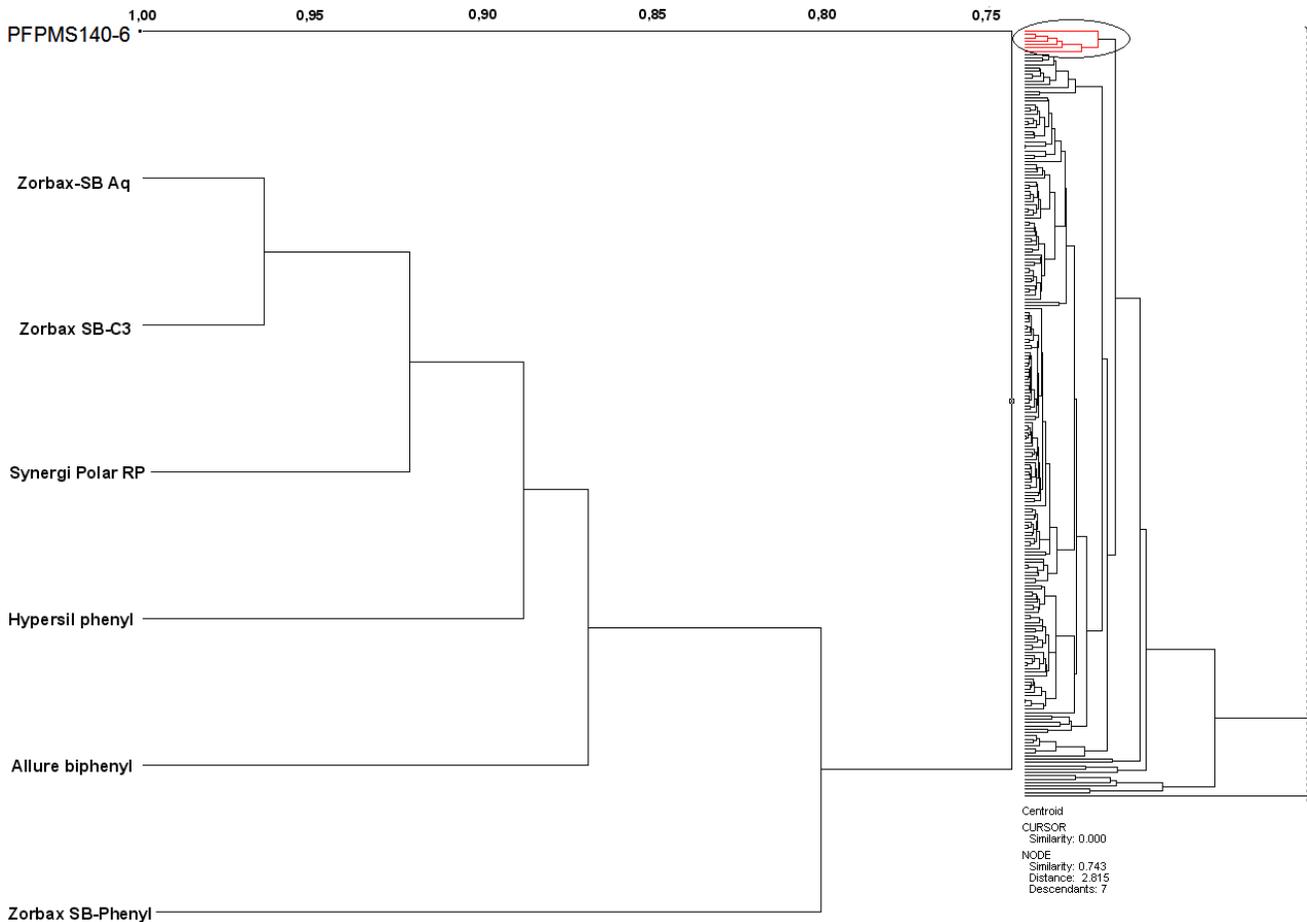


Figura 34. Dendograma da FE PFPMS140-6 e de FE comerciais. Esquerda: Grupo contendo a FE PFPMS140-6: Nó (similaridade = 0,743; distância = 2,815; descendentes = 7). Direita: HCA completo. O círculo indica a localização do grupo que contém a FE PFPMS140-6.

Tabela 9. Características das colunas comerciais^{29,51,52} com as quais a FE preparada apresentou maior similaridade quanto às propriedades medidas ao se aplicar o teste de Tanaka.

Coluna	^a d _{partícula} (µm)	%C	Capecamento	Informações
PFPMs140-6	5	16,4	não	Copolímero imobilizado
Zorbax-SB Aq (Agilent)	5	-	-	-
Zorbax SB-C3 (Agilent)	5	-	-	cadeia alquila curta
Synergi Polar RP (Phenomenex)	4	11	com grupo polar	fenilpropil
Hypersil phenyl (Thermo)	5	5	não	monomérica
Allure biphenyl (Restek)	5	23	sim	-
Zorbax SB phenyl (Agilent)	3,5	5,5	não	monomérica (isopropil)

^adiâmetro da partícula

A hidrofobicidade ($k_{\text{pentilbenzeno}}$), a seletividade hidrofóbica ($\alpha_{\text{CH}_2} = k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{\text{butilbenzeno}}$) e a seletividade estérica ($\alpha_{\text{T/O}} = k_{\text{trifenileno}}/k_{\text{o-terfenil}}$) foram obtidas pela eluição da mistura A do protocolo de Tanaka (uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, trifenileno e o-terfenila). Os valores obtidos estão indicados na Tabela 9.

Tabela 10. Propriedades das colunas comerciais^a com as quais a FE preparada apresentou maior similaridade quanto às propriedades medidas ao se aplicar o teste de Tanaka.

Coluna	k _{PB}	α_{CH_2}	$\alpha_{\text{T/O}}$	$\alpha_{\text{C/F}}$	$\alpha_{\text{B/F}}$ pH 7,6	$\alpha_{\text{B/F}}$ pH 2,7
PFPMs140-6	4,40	1,37	0,84	1,72	6,10	0,04
Zorbax-SB Aq	0,93	1,31	1,18	2,54	1,27	0,13
Zorbax SB-C3	0,91	1,32	1,06	2,71	0,88	0,11
Synergi Polar RP	1,18	1,22	1,35	2,53	1,00	0,14
Hypersil phenyl	0,47	1,25	0,92	2,04	2,00	0,85
Allure biphenyl	3,73	1,33	1,55	2,21	0,81	0,05
Zorbax SB-Phenyl	1,09	1,3	1,18	3,69	1,08	0,13

^aDados disponíveis no site <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/>

A resolução entre os picos do pentilbenzeno e butilbenzeno ($R_s = 3,4$) indica que eles estão completamente separados, fornecendo um valor de seletividade hidrofóbica (α_{CH_2}) de 1,37. Este valor é similar aos das colunas comerciais, que estão na faixa de 1,2 a 1,3 (Tabela 9). O valor que mede a hidrofobicidade ($k_{\text{pentilbenzeno}} = 4,40$) da FE preparada (%C = 16,4) indica que ela apresenta um recobrimento do suporte cromatográfico mais acentuado que o das comerciais (Tabela 9), sendo este valor mais parecido com o da coluna Allure biphenyl ($k_{\text{pentilbenzeno}} = 3,73$), uma coluna do tipo bifenil, com porcentagem de carbono de 23%.

Com relação à separação dos compostos trifenileno e o-terfenil, obteve-se separação completa entre os picos ($R_s = 1,9$) e o valor obtido para a seletividade estérica ($\alpha_{T/O} = k_{\text{trifenileno}}/k_{\text{o-terfenil}}$) foi de 0,84. O valor $\alpha_{T/O}$ foi menor que 1, porque esses compostos apresentaram inversão na ordem de eluição na fase em estudo em relação à separação nas tradicionais fases C-18^{29,47} e na maioria das fases fenil comerciais.^{29,51} Para avaliar a seletividade estérica comparando-se o valor de $\alpha_{T/O}$ obtido neste trabalho com os valores obtidos por Euerby e Petersson^{29,51} para os casos em que não houve inversão, considerou-se a equação contrária para o cálculo do $\alpha_{T/O}$, ou seja, $\alpha_{O/T} = k_{\text{o-terfenil}}/k_{\text{trifenileno}}$, e o valor obtido foi de 2, o qual indica que a FE apresenta seletividade estérica ou espacial.

A partir da separação dos compostos da mistura teste B de Tanaka, pôde-se avaliar a capacidade de formação de ligação de hidrogênio da FE, obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol ($\alpha_{C/F}$). Nesta separação, a cafeína eluiu depois do fenol, e o valor obtido para $\alpha_{C/F}$ foi de 1,72 (Tabela 9), o qual é similar aos apresentados pelas colunas comerciais (Tabela 9), contudo, superior aos das fases C18,^{29,47,51} mostrando que a FE apresenta maior capacidade de formação de ligação de hidrogênio que as tradicionais C18. Deve-se destacar que a cafeína pode estabelecer, além das interações por ligações de hidrogênio, também interações π - π com a FE, tornando o teste impreciso para avaliações de FE do tipo fenil.

Para determinar a atividade silanofílica total e a acidez dos grupos silanóis residuais da FE, foram analisadas as misturas C e D de Tanaka, respectivamente. Estas misturas contêm um composto básico (benzilamina, pK_a 9,4) e um ácido fraco (fenol, pK_a 9,9) que são analisados em fases móveis tamponadas em diferentes valores de pH (mistura C: pH 7,6; mistura D: pH 2,7).

Em fase móvel a pH 7,6, a maioria dos grupos silanóis residuais estão na forma desprotonada ($Si-O^-$) e a benzilamina protonada, então, devem interagir por meio de

mecanismo de troca iônica. O pico da benzilamina eluiu em 18,21 min, com $\alpha_{B/F}$ igual a 6,1, valor superior aos das fases comerciais (Tabela 9). Deste modo, pode-se inferir que, apesar do valor que mede a hidrofobicidade ($k_{\text{pentilbenzeno}} = 4,40$) da FE experimental indicar um bom recobrimento do suporte cromatográfico, este recobrimento não é homogêneo, já que a FE apresenta capacidade de troca iônica bastante elevada em $\text{pH} > 7$, evidenciando a presença de grupos silanóis residuais.

A acidez dos grupos silanóis residuais da FE foi avaliada pela separação da mistura D do protocolo de Tanaka. Em meio ácido ($\text{pH} 2,7$), a benzilamina ($t_R = 1,9$ min), encontra-se protonada e eluiu praticamente junto com a uracila ($t_R = 1,7$ min), mostrando que os grupos silanóis residuais apresentam baixa acidez, e a FE possui baixa capacidade de troca iônica em $\text{pH} < 3$.

5. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DA FE PFPMS140-6 EM MEIO ÁCIDO

Fases móveis ácidas têm sido amplamente empregadas em CLAE-FR na separação de importantes compostos farmacêuticos e ambientais. Baixo pH promove a supressão parcial das interações entre compostos básicos e os silanóis residuais, resultando em picos mais simétricos, menores retenções e seletividades cromatográficas potencialmente diferentes. Além disso, FM ácidas podem resultar na protonação de certos analitos ácidos, provocando redução em seus tempos de retenção e, portanto, alteração na seletividade.

Assim, a estabilidade química da FE PFPMS140-6 foi avaliada em meio ácido monitorando-se a variação da eficiência para o pico do tolueno (porcentagem inicial da eficiência) em função do volume de coluna (mL). Para tal, utilizou-se a condição drástica de FM metanol:0,1 % de ácido trifluoracético em H_2O pH 1,7 (50:50, v/v).

Através da Figura 35, que demonstra a variação da eficiência inicial em relação ao volume de coluna eluído, pode-se concluir que mesmo com a passagem de aproximadamente 3.600 volumes de coluna, que corresponde a 62 horas de teste, houve apenas uma pequena redução da eficiência inicial da coluna de cerca de 15 %, indicando que a FE PFPMS140-6 apresenta uma considerável estabilidade em meio ácido.

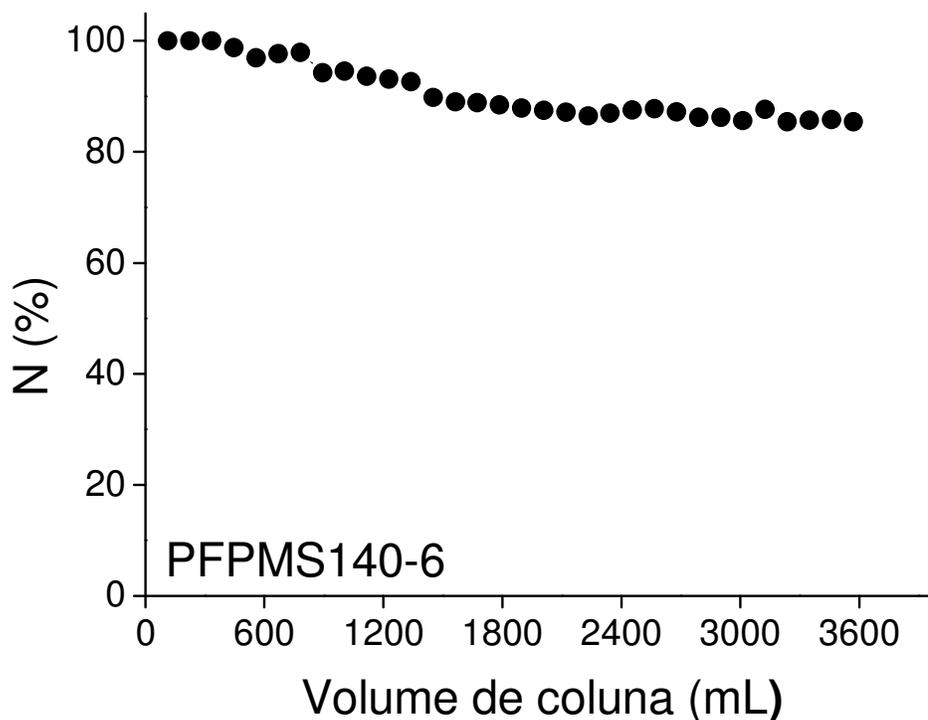


Figura 35. Porcentagem da eficiência inicial em função do volume de coluna. Condições cromatográficas: FM metanol:0,1 % de ácido trifluoracético em H₂O pH 1,7 (50:50, v/v); vazão de 0,5 mL min⁻¹; volume de amostra: 1 µL; temperatura do forno da coluna: 80 °C; detecção UV-Vis a 254 nm. Analito-teste: tolueno.

6. AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DA FE PFPMS140-6

6.1. SEPARAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPA)

Na Figura 36A pode ser visualizado o cromatograma obtido empregando a FE PFPMS140-6 na separação da seguinte mistura de HPA: (1) acenaftileno, (2) fluoreno, (3) acenafteno, (4) fluoranteno, (5) pireno, (6) criseno. O seu desempenho cromatográfico foi comparado aos de colunas comerciais do tipo fenil-hexil (Figura 36B) e C18 (Figura 36C).

Pode-se observar no comatograma obtido pela separação através da coluna preparada PFPMS140-6 (Figura 36A) que os compostos 2 e 3 coeluíram e, para os compostos 4 e 5, não houve separação completa entre os seus picos. A separação da mistura na coluna fenil comercial (Figura 36B) gerou um cromatograma com separação completa de todos os picos. A separação da mistura na coluna C18 comercial resultou no

cromatograma apresentado na Figura 36C, através do qual é possível observar a coeluição dos compostos 5 e 6.

Assim, deve-se evidenciar que a coluna fenil comercial apresentou o melhor desempenho cromatográfico na separação dessa mistura. Tem-se demonstrado na literatura que colunas do tipo fenil contendo espaçadores com cinco ou seis átomos de carbono apresentam maior capacidade de estabelecer interações π - π com analitos do que aquelas com espaçadores menores, como é o caso da FE PFPMS140-6, que possui apenas dois átomos de carbono, sendo mais seletivas para certos analitos.²⁹ Por outro lado, não se deve descartar a possibilidade da FE PFPMS140-6 separar completamente todos os HPA, caso fosse recheada numa coluna com comprimento similar aos das colunas comerciais, já que o seu comprimento é bem inferior (60 mm).

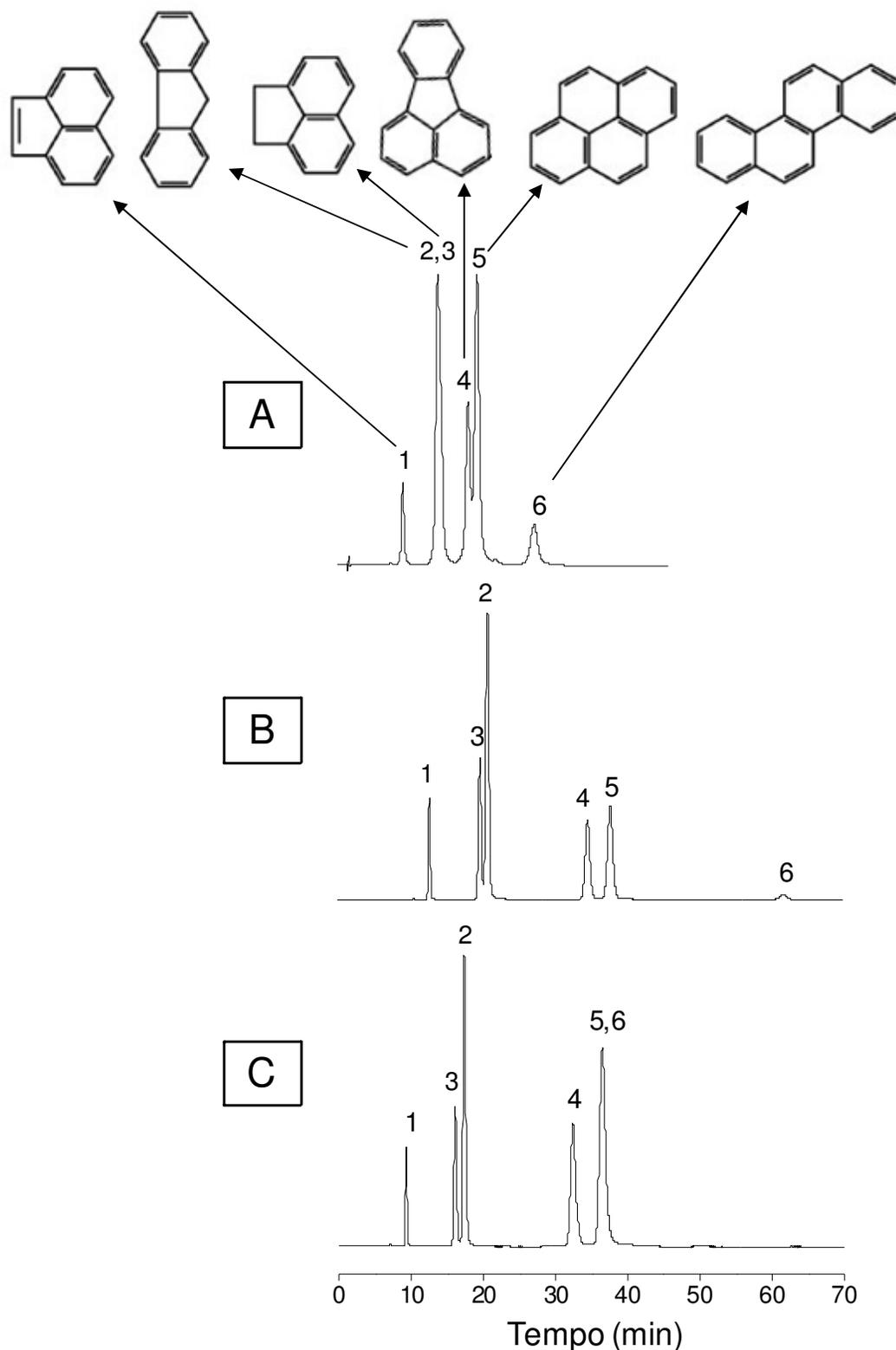


Figura 36. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de HPA na FE PFPMS140-6 (A) e nas colunas comerciais Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm (B) e Nova-Pak C18, 4 μm , 150 x 3,9 mm (C). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (65:35, v/v); vazão: (A) 0,3 mL min^{-1} (B) 1,0 mL min^{-1} e (C) 1,0 mL min^{-1} ; volume de amostra: 5 μL ; temperatura ambiente; detecção UV a 254 nm. Compostos: (1) acenafileno, (2) fluoreno, (3) acenafeno, (4) fluoranteno, (5) pireno, (6) criseno.

6.2. SEPARAÇÃO DA MISTURA DE SZABÓ E CSATO

Na Figura 37A encontra-se o cromatograma obtido empregando a FE PFPMS140-6 na separação da seguinte mistura de compostos aromáticos, sugerida por Szabó e Csató⁴⁹: (1) uracila, (2) fenol, (3) *m*-cresol, (4) acetofenona, (5) benzoato de metila, (6) tolueno, (7) *p*-xileno e (8) propilbenzeno. O seu desempenho cromatográfico foi comparado aos de colunas comerciais do tipo fenil-hexil (Figura 37B) e C18 (Figura 37C).

Como pode ser observado na Figura 37, a FE preparada PFPMS140-6 (Figura 37A) e a FE fenil-hexil comercial (Figura 37B) separaram todos os compostos, enquanto que na coluna comercial C18 (Figura 37C) houve coeluição dos compostos 3 e 4. Então, pode-se inferir que o estabelecimento de interações π - π com os analitos 3 e 4 deve conferir às fases do tipo fenil seletividade para a separação destes compostos nas condições cromatográficas empregadas nesta separação.

Por fim, a FE PFPMS140-6 apresentou um bom desempenho cromatográfico, pois separou todos os compostos, com resolução parcial para o fenol e o *m*-cresol, em um tempo inferior de análise que as demais fases, embora se usando uma vazão bem mais reduzida. Esse menor tempo de análise deve-se ao menor comprimento da coluna empregada.

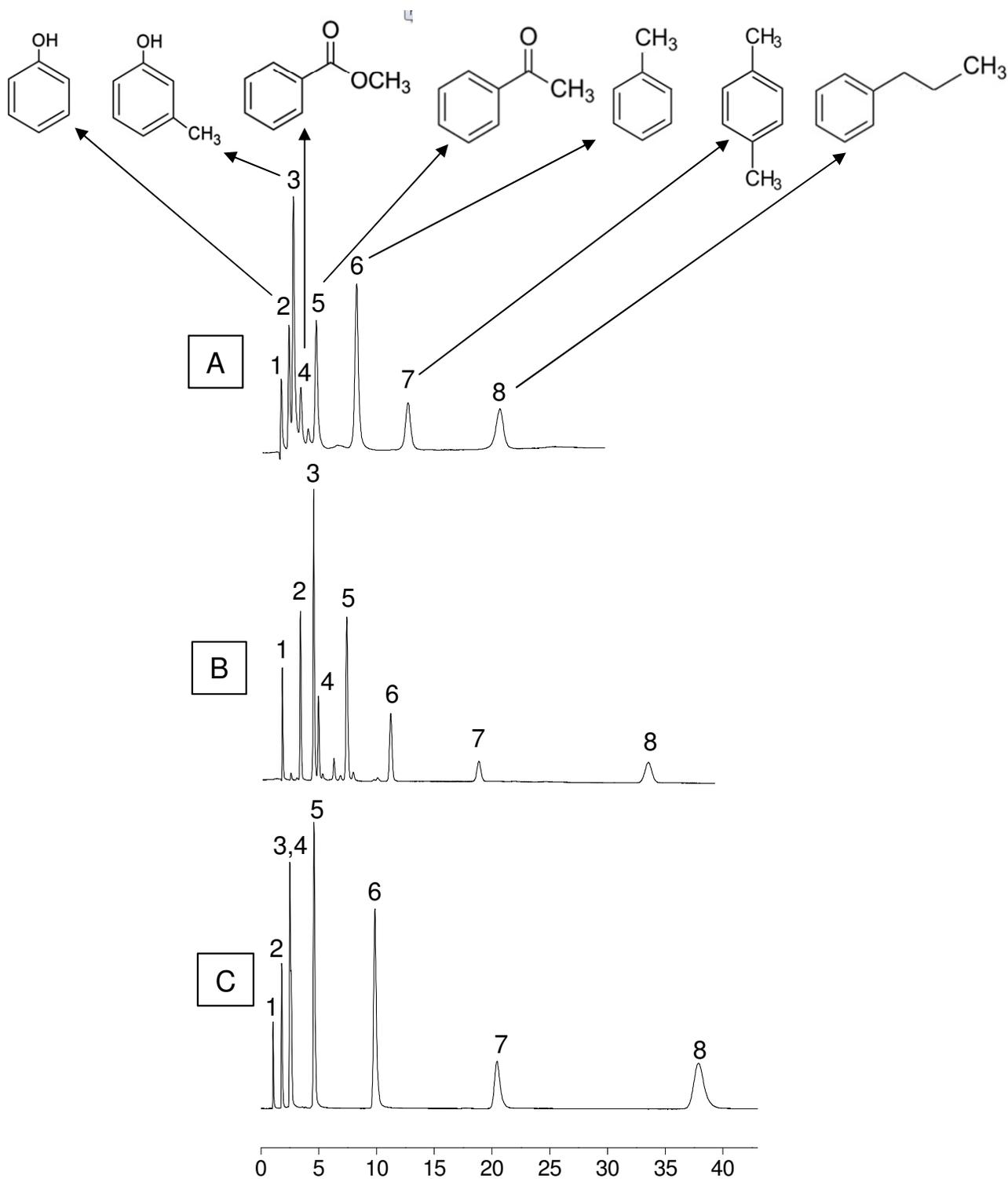


Figura 37. Cromatogramas obtidos na separação da mistura de Szabó e Csató na FE PFPMS140-6 (A) e nas colunas comerciais Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm (B) e Nova-Pak C18, 4 μm , 150 x 3,9 mm (C). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:H₂O 55:45 (v/v); vazão: (A) 0,3 mL min⁻¹, (B) 1,0 mL min⁻¹, (C) 1,0 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos: (1) uracila, (2) fenol, (3) *m*-cresol, (4) acetofenona, (5) benzoato de metila, (6) tolueno, (7) *p*-xileno e (8) propilbenzeno.

6.3. SEPARAÇÃO DE FÁRMACOS

Na Figura 38 pode-se visualizar os cromatogramas da separação de 5 fármacos: (1) levofloxacina, (2) dextrometorfan, (3) diazepam, (4) amitriptilina e (5) nortriptilina, na coluna preparada PFPMS140-6 (Figura 38A) e nas colunas comerciais do tipo fenil-hexil (Figura 38B) e C18 (Figura 38C). Como se pode observar nos cromatogramas, a FE PFPMS140-6 separou todos os compostos com resolução completa entre os picos, praticamente na metade do tempo requerido pelas colunas comerciais do tipo fenil-hexil e C18, as quais não possibilitaram a separação entre os picos 5, 3 e 4, e 4 e 3, respectivamente.

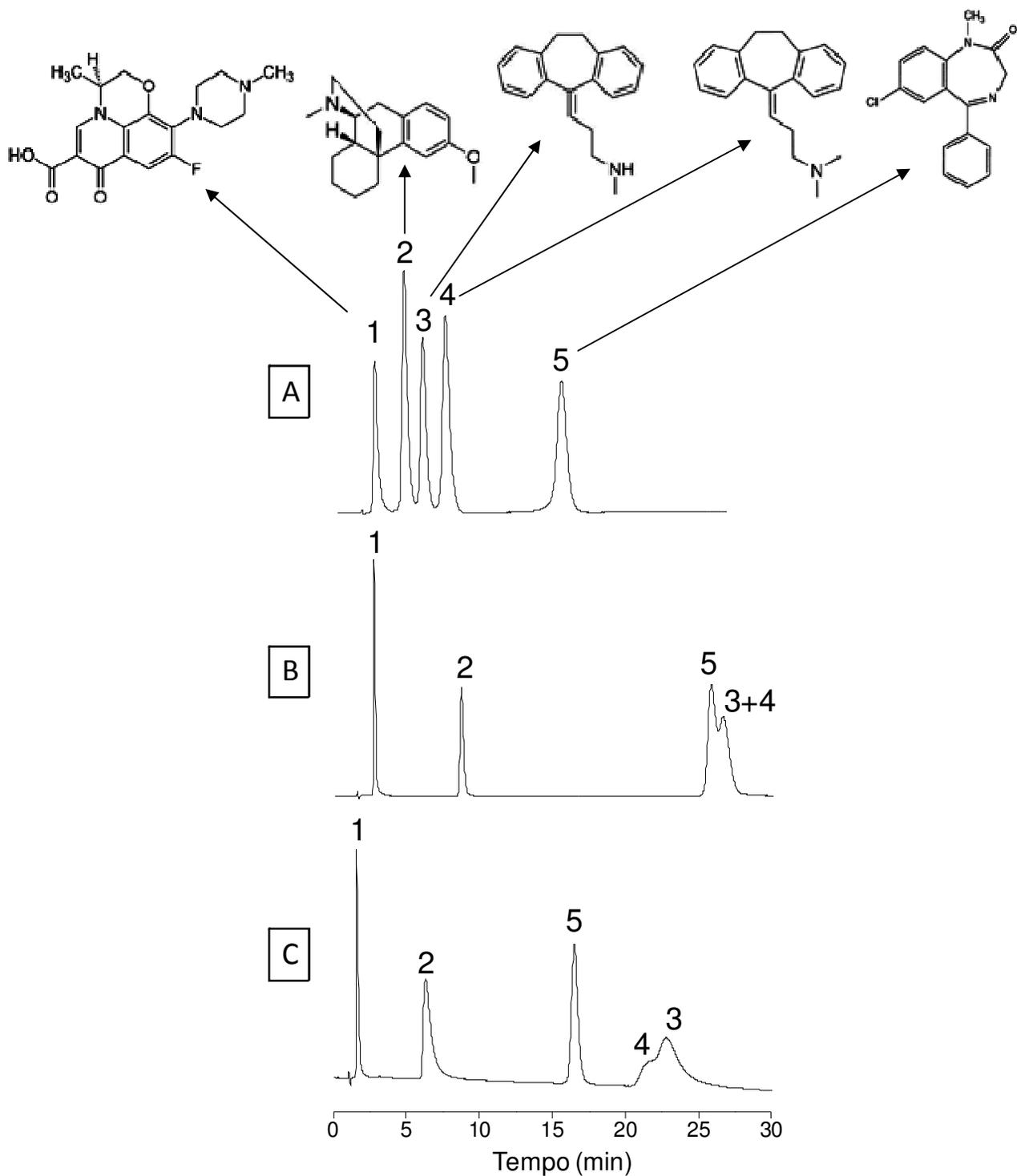


Figura 38. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de fármacos na FE PFPMS140-6 (A) e nas colunas comerciais Agilent - Eclipse Plus - Fenil-Hexil, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm (B) e Nova-Pak C18, 4 μm , 150 x 3,9 mm (C). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:0,020 mol L⁻¹ KH₂PO₄/H₃PO₄ a pH 2,7 (50:50, v/v); vazão de: 0,3 mL min⁻¹ (A), 1,0 mL min⁻¹ (B), 1,0 mL min⁻¹ (C); volume de amostra: 5 μL ; temperatura de 30 °C; detecção UV a 220 nm. Compostos: (1) levofloxacina, (2) dextrometorfan, (3) nortriptilina, (4) amitriptilina, (5) diazepam.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ As fases estacionárias imobilizadas a 140 °C por 6 h (PFPMS140-6), a 140 °C por 4 h (PFPMS140-4) e a 120 °C por 12 h (PFPMS120-12) apresentaram eficiência em torno de 70.000 pratos/metro, optando-se pela condição de 140 °C/ 6 h, devido ao seu razoável tempo de imobilização, por ter possibilitado uma alta eficiência e também a maior porcentagem de carbono;
- ✓ O valor que mede a hidrofobicidade ($k_{\text{pentilbenzeno}}$) da fase PFPMS140-6, 4,4, indica um recobrimento do suporte cromatográfico superior em relação às colunas comerciais do tipo fenil;
- ✓ A FE PFPMS140-6 apresentou alta capacidade de troca iônica em $\text{pH} > 7$, decorrente da não homogeneidade do recobrimento do suporte pelo copolímero, resultando em grupos silanóis residuais que estão desprotonados nestes valores de pH e que interagem com compostos básicos por meio de mecanismo de troca iônica. Além disso, o recobrimento não uniforme expõe a superfície da sílica à dissolução em fases móveis básicas, conferindo baixa estabilidade às fases se comparadas com às quimicamente ligadas. Essa não homogeneidade do recobrimento é inerente às fases com polímeros imobilizados e já está bem estabelecida na literatura;
- ✓ O teste de estabilidade em meio ácido demonstrou que mesmo com a passagem de aproximadamente 3.600 volumes de coluna, que corresponde a 62 horas de teste, houve apenas uma pequena redução da eficiência inicial da coluna, cerca de 15 %, indicando que a FE PFPMS140-6 apresenta uma considerável estabilidade em meio ácido;
- ✓ A FE PFPMS140-6 apresentou uma boa seletividade hidrofóbica ($\alpha_{\text{CH}_2}=1,37$) e estérica ($\alpha_{\text{T/O}}=0,84$). Além disso, ocorreu inversão na ordem de eluição do o-terfenil e trifenileno em relação à ordem de eluição em um grande número de FE comerciais, o que indica uma seletividade espacial diferenciada;
- ✓ Pode-se inferir que a FE PFPMS140-6 apresentou menor seletividade para os HPA do que a FE fenil-hexil comercial por causa do seu menor espaçador, que resulta numa menor capacidade de realizar interações π - π com os analitos. Contudo, não se deve descartar a possibilidade da FE desenvolvida separar todos os compostos dessa mistura, caso fosse recheada numa coluna com comprimento similar aos das colunas comerciais utilizadas;

- ✓ Deve-se destacar que A FE PFPMS140-6 demonstrou-se mais eficiente na separação da mistura de fármacos estudados do que as colunas comerciais, nas condições cromatográficas utilizadas.

8. CONCLUSÃO

A FE PFPMS140-6 preparada com a carga de copolímero de 50 %, a partir de sílica pura, tipo B – Kromasil e do copolímero poli (2-fenilpropil) metilsiloxano, imobilizada por tratamento térmico a 140 °C por 6 h apresentou eficiência comparável às demais FE empregadas em CLAE-FR. A sua caracterização físico-química sugere que o copolímero se encontra fisicamente adsorvido e quimicamente ligado ao suporte, entretanto, o recobrimento da sílica não ocorre de maneira uniforme, sendo este fator responsável pela baixa estabilidade desse tipo de FE em meio básico e pela sua alta atividade silanofílica nestas condições. Todavia, o teste de estabilidade demonstrou que a FE apresenta considerável estabilidade química em meio ácido. A FE desenvolvida neste trabalho possui seletividade adequada para ser empregada na separação de compostos aromáticos tais como: hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e compostos com polaridades semelhantes, sendo recomendada para aplicações em meio ácido ou neutro, devendo-se evitar a utilização de tampões fosfato e, principalmente, carbonato, pois aceleram drasticamente o processo de degradação da FE. As fases estacionárias com polímeros imobilizados são facilmente preparadas com o uso de reagentes menos agressivos e de menor custo, se comparadas ao preparo das quimicamente ligadas.

Referências Bibliográficas

1. C. H. Collins, G. L. Braga, P. S. Bonato, **Fundamentos de Cromatografia**, Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.
2. H.A. Claessens, **Trends Anal. Chem.** 20 (2001) 563.
3. E. Tonhi, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, **Quim. Nova** 25 (2002) 616.
4. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, **Practical HPLC method development**, 2^a ed., New York: Wiley, 1997.
5. A.M. Faria, **Desenvolvimento de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa a partir da adsorção e imobilização do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre sílica metalizada**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2006.
6. C. Stella, S. Rudaz, J.L. Veuthey, A. Tchaplá, **Chromatographia** 53 (2001) S113.
7. J.J. Kirkland, J.M. Henderson, **J. Chromatogr. Sci.** 32 (1994) 473.
8. J.J. Kirkland, J.L. Glajch, R.D. Farlee, **Anal. Chem.** 61 (1989) 2.
9. M. Petro, D. Berek, **Chromatographia** 37 (1993) 549.
10. L.S.R. Morais, I.C.S.F. Jardim, **J. Chromatogr. A** 1073 (2005) 127.
11. Hanson, M.; Unger, K.K., **Trends Anal. Chem.** 11 (1992) 368.
12. V.R. Meyer, **Practical High-Performance Liquid Chromatography**, 2^a ed., New York: Wiley, 1996.
13. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, **Practical HPLC Method Development**, 2^a ed., New York: Wiley, 1997.
14. J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr, **J. Chromatogr. A** 1028 (2004) 1.
15. L. Maldaner, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim; **Quim. Nova** 33 (2010) 1559.
16. J. Nawrocki, **J. Chromatogr. A** 779 (1997) 29.
17. J.J. Kirkland, M.A. van Straten, H.A. Claessens, **J. Chromatogr. A** 691 (1995) 3.
18. D.V. McCalley, **J. Chromatogr. A** 902 (2000) 311.
19. H.A. Claessens, M.A. van Straten, **J. Chromatogr. A** 1060 (2004) 23.
20. C.R. Silva, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, C. Airolidi, **Quim. Nova** 27 (2004) 270.
21. S. Kayillo; G. R. Dennis; R. A. Shalliker; **J. Chromatogr. A** 1126 (2006) 283.
22. J.J. Kirkland, **J. Chromatogr. A** 1060 (2004) 9.
23. R. E. Majors, **LC-GC Suppl.** 28 (2010) S7.
24. J.J. Kirkland, J. B. Adams, M. A. van Straten, H. A. Claessens, **Anal. Chem.** 70 (1998) 4344.
25. H. K. Lee, **J. Chromatogr. A** 710 (1995) 79.
26. J. Horak, N. M. Maier, W. Lindner, **J. Chromatogr. A** 1045 (2004) 43.
27. J.D., Goss; **J. Chromatogr. A** 828 (1998) 267.
28. F. Chan; L.S. Yeung; R. LoBrutto, Y.V. Kazakevich **J. Chromatogr. A** 1069 (2005) 217.
29. M. R. Euerby; P. Petersson, W. W. Roe, **J. Chromatogr. A** 1154 (2007) 138.
30. L. Zhou; Y. Wu; B. D. Johnson; R. Thompson; J. M. Wyvratt; **J. Chromatogr. A** 866 (2000) 281.
31. A. M. Faria, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, **J. Braz. Chem. Soc.** 20 (2009) 1385.
32. C.B.G. Bottoli, Z.F. Chaudhry, D.A. Fonseca, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A** 948 (2002) 121.
33. C.B.G. Bottoli, C.R.M. Vigna, G. Fischer, K. Albert, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 217.
34. K.E. Collins, A.L.A. Sá, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, **Chromatographia** 53 (2001) 661.
35. E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A** 1119 (2006) 135.

36. L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim, **J. Chromatogr. A** 845 (1999) 423.
37. I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, T.A. Anazawa, **J. Chromatogr. A** 849 (1999) 299.
38. L.F.C. Melo, C.H. Collins, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, **J. Chromatogr. A** 869 (2000) 129.
39. D.A. Fonseca, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 209.
40. L.S.R. Morais, **Preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a partir de sílica titanizada e polibutadieno**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2003.
41. E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A** 948 (2002) 109.
42. I.C.S.F. Jardim, K. E. Collins, C.H. Collins, **LC-GC N. Am.** 18 (2000) 106.
43. W. O. Bassa, E. S. Miazaki, D. F. Andrade, **Introdução à análise de agrupamentos, 9º Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística**, São Paulo, 1990.
44. K.E. Collins, A.C. Franchon, I.C.S.F. Jardim, E. Radanovic, M.C. Gonçalves, **LC-GC N. Am.** 18 (2000) 106.
45. L. M. A. Fioravanti; **Preparação e Caracterização de Fases Estacionárias para CLAE de Poli(metilfenilsiloxano) sobre Sílica Sorvida e Imobilizada por Radiação Microonda**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2007.
46. J. Lourenço; **Preparação e Caracterização de Fases estacionárias de dimetil-metil-fenilsiloxano sobre Sílica para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2005.
47. K. Kimata; K. Iwaguchi; S. Onishi; K. Jinno; R. Eksteen; K. Hosoya; M. Araki; N. Tanaka; **J. Chromatogr. Sci.** 27 (1989) 721.
48. H. Engelhardt; M. Jungheim; **Chromatographia** 29 (1990) 59.
49. G. Szabó, E. Csató, **J. Chromatogr. A** 463 (1989) 345.
50. K. Okusa, Y. Suita, Y. Otsuka, M. Tahara, T. Ikegami, N. Tanaka, M. Ohira, M. Takahashi, **J. Sep. Sci.** 33 (2010) 348.
51. M. R. Euerby; P. Petersson; **J. Chromatogr. A** 994 (2003) 13.
52. <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/> . acessado em abril de 2010.
53. Pirouette 3.11 User Guide.