



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

Tese de Doutorado

***Preparo, Caracterização e Aplicação de Fases Estacionárias de
Poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano) Sorvidas e
Imobilizadas sobre Sílica e Sílica Zirconizada***

Milena Pinotti Segato

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

Campinas – SP

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

Se37p

Segato, Milena Pinotti.

Preparo, caracterização e aplicação de fases estacionárias de poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano) sorvidas e imobilizadas sobre sílica e sílica zirconizada / Milena Pinotti Segato. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

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

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano).
2. Fases estacionárias reversas. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Suporte de sílica metalizada.
I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Preparation, characterization and application of stationary phases based on poly(dimethylsiloxane-co-methylphenylsiloxane) sorbed and immobilized onto silica and zirconized silica

Palavras-chaves em inglês: Reversed stationary phases, High-performance liquid chromatography, Poly(dimethylsiloxane-co-methylphenylsiloxane), Metalized silica support

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (orientadora), Profa. Dra. Eny Maria Vieira (IQSC-USP), Prof. Dr. Emanuel Carrilho (IQSC-USP), Prof. Dr. Fabio Augusto (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 25/02/2011

Aos meus pais, Milton e Teresa, por sempre acreditaram em mim e serem a base para que eu chegasse até aqui, ao meu irmão Thiago, e ao meu noivo Giovani, em sinal de gratidão e amor, dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

- ↳ À Profa. Isabel Jardim, pela oportunidade e os ensinamentos, pelo exemplo de orientação e pela amizade, confiança e liberdade para conduzir meu projeto.
- ↳ À Profa. Carol Collins, pelos conhecimentos transmitidos, pela companhia agradável e pelas aulas sobre a história dos EUA durante as reuniões científicas no país.
- ↳ Aos professores Fábio Augusto, Susanne Rath, Solange Cadore e Lauro Kubota, pelos ensinamentos valiosos durante os semestres de estágio docente.
- ↳ À Profa. Maria Izabel Bueno e seus alunos Juliana e Alexandre, pela disponibilidade e auxílio com as medidas de fluorescência de raios X.
- ↳ À Livia, minha amiga-irmã, pela amizade incondicional, pelos momentos de alegria, aprendizagem e pelas sugestões sensatas sobre meu trabalho e sobre a vida.
- ↳ Aos amigos do LabCrom: Anizio, Adriana, Ana Carla, Ana Paula, Bianca, Camila, Carla, Dani, Elias, Fernanda Sales, Fernanda Benini, Gizelle, Juliano, Karen, Lais, Liane, Lívia, Louise, Lucília, Marcelo, Marcel, Mariza, Patrícia, Priscila, Rafa, Raquel, Renata, Rose, pela companhia agradável e pelas inúmeras discussões sobre nossos trabalhos.
- ↳ Aos amigos do IQ: Larissa, Cyntia, Ricardo, Werickson, Leonardo, Sandra, Mare, Márcio, China, Alex, Stanislau, Bruna, Mayra, Mariana, pH, Carlos, Valeska, Hugo e Marcelo, pelos bons momentos juntos.
- ↳ À minha família e meus amigos de Dracena e de São Carlos, pelo carinho, torcida e incentivo a minha carreira.
- ↳ Às mineiras, Fabi e Maurinha, pela amizade e pelos trabalhos em conjunto.
- ↳ Aos técnicos do IQ: Mirian, Eraldo, Divino, José, Priscila, Anderson, Rita, Ricardo, Daniel, Cláudia, Márcia e Fabiana, que tiveram contribuições diretas para a conclusão deste trabalho.
- ↳ Aos demais professores, técnicos e funcionários do IQ, que contribuíram para a conclusão deste trabalho.
- ↳ À FAPESP pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.
- ↳ Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.
- ↳ A todos os demais que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

MESTRADO EM QUÍMICA (QUÍMICA ANALÍTICA) - Universidade de São Paulo, USP, Instituto de Química de São Carlos, IQSC, São Carlos, SP, Brasil. Título: *Estudos termoanalíticos do ácido algínico e dos alginatos de metais alcalinos, alcalino-terrosos, amônio, mono-, di- e trietanolamônio*. Período: 03/2005 a 02/2007. Orientação: Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro. Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

BACHARELADO EM QUÍMICA (COM ATRIBUIÇÕES TECNOLÓGICAS) - Universidade de São Paulo, USP, Instituto de Química de São Carlos, IQSC, São Carlos, SP, Brasil. Período: 02/2001 a 12/2004.

INICIAÇÃO CIENTÍFICA: Determinação de parâmetros cinéticos de decomposição térmica do ácido algínico e dos alginatos de lítio, sódio, potássio e amônio. Orientação: Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro. Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Período: 08/2003 a 12/2004.

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

- Monitora da Disciplina QA-213 Química II (Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Período: 02/2008 a 07/2008.

- Monitora da Disciplina QA-416 Química Analítica IV, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Período: 08/2008 a 12/2008.

- Monitora da Disciplina QA-682 Química Analítica Instrumental II, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Período: 02/2009 a 07/2009.

- Monitora da Disciplina QA-582 Química Analítica Instrumental I, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Período: 08/2009 a 12/2009.

- Monitora da Disciplina QA-682 Química Analítica Instrumental II, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Período: 02/2010 a 07/2010.

INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS NACIONAIS: 10

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS INTERNACIONAIS: 11

ARTIGOS CIENTÍFICOS

SEGATO, M. P., CAVALHEIRO, E. T. G.

Thermal analysis of ammonium, mono-, di- and triethanolammonium alginates. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.87, p.737-741, 2007. (DOI 10.1007/s10973-006-7753-5).

SEGATO, M. P., SILVA, C. R., JARDIM, I. C. S. F.

Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas. *Química Nova*, v.32, n.2, p.431-440, 2009. (DOI 10.1590/S0100-40422009000200030).

CARVALHO, L. C., **SEGATO, M. P.**, NUNES, R. S., NOVAK, C., CAVALHEIRO, E. T. G.

Thermolanalytical studies of some sweeteners, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v.97, p.359-365, 2009. (DOI 10.1007/s10973-009-0262-6).

RESUMO

PREPARO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS DE POLI(DIMETILSILOXANO-CO-METILFENILSILOXANO) SORVIDAS E IMOBILIZADAS SOBRE SÍLICA E SÍLICA ZIRCONIZADA. Este trabalho descreve o desenvolvimento de novas fases estacionárias (FE) sorvidas e immobilizadas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), utilizando-se suporte de sílica não modificada e metalizada com zircônia, recobertos com o polímero poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano) (PDMFS). O processo de imobilização do polímero foi feito por tratamento térmico e as condições que forneceram FE com o melhor desempenho cromatográfico foram 140 °C e 6 h. As FE preparadas sob estas condições apresentaram porcentagens de carbono entre 10 e 11 % e espessura de camada entre 0,6 e 0,7 nm. Foi feito o capeamento das FE buscando-se um melhor recobrimento dos sítios ativos do suporte e, após este procedimento, houve um aumento de cerca de 2 % na porcentagem de carbono e redução do número de silanóis livres e vicinais nos suportes cromatográficos. A caracterização físico-química das FE sugere que o PDMFS está fisicamente adsorvido e quimicamente ligado aos suportes, sendo que as interações com o suporte metalizado são mais intensas. As FE foram avaliadas cromatograficamente por meio da separação de algumas misturas teste e seus desempenhos foram similares aos de colunas comerciais tradicionais, com eficiências superiores a 70000 pratos m^{-1} para o acenafteno, nas FE não capeadas, e acima de 56000 pratos m^{-1} nas FE capeadas. As características cromatográficas das FE preparadas foram similares no que diz respeito às seletividades hidrofóbica, estérica e aromática. As FE capeadas apresentaram maior hidrofobicidade e menor capacidade de formação de ligações de hidrogênio que as FE não capeadas. A zirconização aumentou a acidez dos sítios ativos e a capacidade de troca iônica das sílicas zirconizadas. Por outro lado, a combinação da zirconização do suporte com o capeamento é uma estratégia importante para a obtenção de FE com estabilidade elevada. As FE desenvolvidas neste trabalho apresentam potencial para serem aplicadas na separação de compostos aromáticos de diferentes polaridades, agrotóxicos e fármacos contendo grupos básicos.

ABSTRACT

PREPARATION, CHARACTERIZATION AND APPLICATION OF STATIONARY PHASES BASED ON POLY(DIMETHYLSILOXANE-CO-METHYLPHENYLSILOXANE) SORBED AND IMMOBILIZED ONTO SILICA AND ZIRCONIZED SILICA. This work describes the development of new stationary phases (SP) based on poly(dimethylsiloxane-co-methylphenylsiloxane) sorbed and immobilized onto silica and zirconized silica for reversed phase high performance liquid chromatography. The polymer was immobilized by thermal treatment at 140 °C during 6 h, which were the conditions that produced SP with the best chromatographic performance. The SP prepared using these conditions presented carbon loadings between 10 and 11 % and polymeric thicknesses between 0.6 and 0.7 nm. The SP were end-capped aiming at a better coverage of the active sites of the support. This procedure increased the carbon loadings by about 2 % and reduced the number of free and vicinal silanols on the chromatographic supports. Physico-chemical characterization of the SP suggests that PDMFS is physically absorbed and chemically bonded to the supports and that the interactions with the metalized support are stronger. The SP were chromatographically evaluated by the separation of some test mixtures and the performances were similar to those of traditional commercial columns, with column efficiencies higher than 70000 plates m^{-1} for acenaphthene on the SP without end-capping, and above 56000 plates m^{-1} with the end-capped SP. The chromatographic characteristics of the SP were similar with regard to hydrophobic, spatial and aromatic selectivities. The end-capped SP presented higher hydrophobicity and lower hydrogen bonding capacity than the not end-capped SP. The metallization procedure increased the acidity of active sites and the ion exchange capacity of zirconized silica. However, the combination of zirconization of the support and the end-capping procedure is an important strategy to obtain SP with high stability. The SP presented potential for the separations of aromatic compounds with different polarities, of pesticides and of pharmaceuticals having basic groups.

ÍNDICE

Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Figuras.....	xxi
1. Introdução	1
1.1 Suportes cromatográficos.....	2
1.2 Fases estacionárias para CLAE-FR	6
1.2.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas.....	6
1.2.2 Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados.....	8
1.3 Fases estacionárias do tipo fenil.....	12
1.4 Avaliação das colunas cromatográficas.....	22
2. Objetivos	27
3. Parte Experimental.....	29
3.1 Reagentes e colunas	29
3.2 Equipamentos.....	30
3.3 Suporte cromatográfico	31
3.3.1 Preparo do suporte de sílica zirconizada	32
3.4 Fase estacionária líquida.....	33
3.5 Colunas cromatográficas	33
3.6 Preparo das fases estacionárias.....	34
3.6.1 Sorção do polímero sobre o suporte.....	34
3.6.2 Imobilização térmica	35
3.6.3 Extração do excesso de polímero	35
3.6.4 Capeamento.....	36
3.7 Testes com outro polissiloxano fenil substituído - poli(metilfenilsiloxano) (PMFS)	37
3.8 Caracterização físico-química da sílica não modificada, da sílica zirconizada, do PDMFS e das fases estacionárias.....	38
3.8.1 Análise elementar (porcentagem de carbono)	38
3.8.2 Microscopia eletrônica de varredura	40
3.8.3 Espectroscopia de fluorescência de raios X.....	40
3.8.4 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis com refletância difusa.....	41

3.8.5	Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros	41
3.8.6	Termogravimetria	41
3.8.7	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	42
3.8.8	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de silício-29 (RMN ²⁹ Si)	42
3.9	Enchimento das colunas cromatográficas	42
3.9.1.	Suspensão da fase estacionária	42
3.9.2.	Recheio das colunas com a fase estacionária	43
3.10	Preparo da fase móvel.....	44
3.11	Condicionamento das colunas cromatográficas	45
3.12	Avaliação cromatográfica das fases estacionárias	45
3.12.1	Misturas testes usadas para a avaliação cromatográfica.....	46
	Misturas teste de Tanaka.....	47
3.12.2	Avaliação da aplicabilidade das FE preparadas - comparação com colunas comerciais.....	50
3.13	Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias	55
4.	Resultados e Discussão	57
4.1	Fases estacionárias preparadas a partir do poli(metilfenilsiloxano) (PMFS)	57
4.2	Avaliação da estabilidade térmica do poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano).	59
4.3	Avaliação das melhores condições de imobilização das fases estacionárias de PDMFS	60
4.4	Determinação da vazão ótima de fase móvel para avaliação das fases estacionárias	64
4.5	Caracterização físico-química da sílica não modificada, da sílica zirconizada e das FE	65
4.5.1	Espectroscopia de fluorescência de raios X.....	65
4.5.2	Termogravimetria	65
4.5.3	Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros dos suportes e das FE, e porcentagem de PDMFS e espessura da camada polimérica das FE.....	68
4.5.4	Microscopia eletrônica de varredura	69
4.5.5	Espectroscopia de absorção na região do UV-vis com refletância difusa.....	70

4.5.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	71
4.5.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de silício-29	75
4.6 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias	78
4.6.1 Separação das misturas teste 1 e 2.....	78
4.6.2 Misturas teste de Tanaka.....	83
4.6.3 Avaliação da aplicabilidade das FE preparadas - comparação com colunas comerciais.....	89
4.7 Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias	96
5. Conclusões	101
6. Referências Bibliográficas.....	103

Lista de Tabelas

Tabela 1. Experimentos realizados empregando-se diferentes condições de tempo e temperatura de imobilização das FE.....	35
Tabela 2. Parâmetros cromatográficos obtidos com as FE de PMFS imobilizadas termicamente sobre sílica não modificada, empregando-se diferentes condições experimentais.....	57
Tabela 3. Parâmetros cromatográficos obtidos com as FE de PDMFS imobilizadas termicamente sobre sílica não modificada, empregando-se diferentes condições experimentais.....	63
Tabela 4. Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros dos suportes e das FE, porcentagens de carbono e de PDMFS e espessura da camada polimérica das FE.....	68
Tabela 5. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do PDMFS, com os valores de número de onda e atribuição das ligações e dos respectivos grupos funcionais.....	73
Tabela 6. Parâmetros cromatográficos obtidos para o naftaleno (MT-1), para o acenafteno e para a N,N-dimetilanilina (MT-2), a partir da separação dos compostos das MT-1 e MT-2 utilizando as FE Si(PDMFS), SiZr(PDMFS), Si(PDMFS) _{ec} e SiZr(PDMFS) _{ec}	83
Tabela 7. Parâmetros cromatográficos obtidos a partir da separação dos compostos das misturas de Tanaka empregando as FE preparadas.....	85

Lista de Figuras

Figura 1. Grupos funcionais presentes na superfície da sílica.	3
Figura 2. Agentes silanos empregados na organossilanização de fases estacionárias, monofuncional (A), bifuncional (B) e trifuncional (C). R = normalmente CH ₃ , R' = comumente C8 ou C18, X = grupos metóxi ou etóxi ou cloro.	7
Figura 3. Tipos de deposição polimérica nos poros do suporte cromatográfico, recobrimento das paredes dos poros (a) ou preenchimento do volume dos poros (b) ¹¹	10
Figura 4. Fórmula estrutural do poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano).....	12
Figura 5. Diagrama representativo da estrutura de uma fase fenil ⁶⁸	14
Figura 6. Cromatograma com as medidas empregadas na determinação dos parâmetros cromatográficos.....	23
Figura 7. Cálculo do fator de assimetria.....	25
Figura 8. Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel.	26
Figura 9. Coluna cromatográfica e suas conexões. a) porcas terminais, b) corpo da coluna, c) manga com filtro retentor e d) redutor de fluxo.	33
Figura 10. Sistema de refluxo para a reação de capeamento.	37
Figura 11. Fórmula estrutural do poli(metilfenilsiloxano).	38
Figura 12. Representação do sistema de enchimento das colunas.	43
Figura 13. Fórmulas estruturais dos compostos que constituem as misturas teste 1 e 2.	47
Figura 14. Fórmulas estruturais dos compostos que constituem as misturas teste de Tanaka.	49
Figura 15. Fórmulas estruturais dos compostos aromáticos estudados.....	50
Figura 16. Fórmulas estruturais dos agrotóxicos analisados.....	52
Figura 17. Fórmulas estruturais dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estudados.	53
Figura 18. Fórmulas estruturais dos fármacos estudados.....	54
Figura 19. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste 1 empregando as FE de PMFS imobilizadas termicamente, em estufa, em diferentes condições	

experimentais. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L, FM: metanol:água 55:45 (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.	58
Figura 20. Curvas TGA (—) e DTG (---) obtidas para o PDMFS, sob atmosfera oxidante (O ₂) (100 mL min ⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , de 25 °C a 1000 °C, utilizando-se aproximadamente 12 mg de amostra em suporte de Al ₂ O ₃	60
Figura 21. Cromatogramas obtidos a partir da separação da MT-1 empregando as FE de PDMFS sobre sílica preparadas nas diferentes condições experimentais. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min ⁻¹ ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.	61
Figura 22. Cromatogramas obtidos a partir da separação da MT-2 empregando as FE de PDMFS sobre sílica preparadas nas diferentes condições experimentais. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min ⁻¹ ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.....	62
Figura 23. Curva de van Deemter obtida para a fase estacionária preparada a partir da imobilização do PDMFS sobre sílica não modificada, empregando temperatura de 140 °C e 6 h.	65
Figura 24. Curvas TGA (—) e DTG (---) obtidas para a (A) sílica e (B) sílica zirconizada sob atmosfera oxidante (O ₂) (100 mL min ⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , de 25 °C a 1000 °C, utilizando-se aproximadamente 12 mg de amostra em suporte de Al ₂ O ₃	66
Figura 25. Curvas TGA (—) e DTG (---) obtidas para a FE (A) Si(PDMFS) e (B) SiZr(PDMFS) sob atmosfera oxidante (O ₂) (100 mL min ⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ , de 25 °C a 1000 °C, utilizando-se aproximadamente 12 mg de amostra em suporte de Al ₂ O ₃	67
Figura 26. Fotomicrografias eletrônicas de varredura obtidas para (a) sílica não modificada com ampliação de 2.000 vezes, (b) sílica não modificada com ampliação de	

10.000 vezes, (c) sílica zirconizada com ampliação de 2.000 vezes e (d) sílica zirconizada com ampliação de 10.000 vezes.....	70
Figura 27. Espectros de absorção no UV-vis com refletância difusa de uma mistura mecânica de ZrO ₂ e SiO ₂ , do ZrO ₂ puro e da amostra de sílica zirconizada.....	71
Figura 28. Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos para as amostras de sílica não modificada e de sílica zirconizada, empregando o método da pastilha de KBr, 1 % (m/m).....	72
Figura 29. Espectro obtido na região do infravermelho para o PDMFS.	73
Figura 30. Espectros de absorção no infravermelho obtidos para (A) Si(PDMFS) no modo de refletância difusa, (B) Si(PDMFS) em pastilha de KBr, (C) SiZr(PDMFS) no modo refletância difusa e (D) SiZr(PDMFS) em pastilha de KBr.....	74
Figura 31. Espectros de RMN de ²⁹ Si obtidos para a sílica não modificada (A) e para a sílica zirconizada (B).	75
Figura 32. Espécies de silício presentes nas fases estacionárias, com os valores de deslocamento químico.	76
Figura 33. Espectros de RMN de ²⁹ Si obtidos para as FE (A) Si(PDMFS) e (B) SiZr(PDMFS).....	77
Figura 34. Espectros de RMN de ²⁹ Si obtidos para as FE capeadas (A) Si(PDMFS)ec e (B) SiZr(PDMFS)ec.	78
Figura 35. Cromatogramas obtidos na separação dos compostos da MT-1 utilizando as FE Si(PDMFS), SiZr(PDMFS), Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; FM: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min ⁻¹ ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.	79
Figura 36. Cromatogramas obtidos na separação dos compostos da MT-2 utilizando as FE Si(PDMFS), SiZr(PDMFS), Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; FM: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min ⁻¹ ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.....	81
Figura 37. Cromatograma obtido a partir da separação da MT-2 empregando a FE SiZr(PDMFS). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; vazão: 0,3 mL	

min⁻¹; detecção a 254 nm; temperatura de 25 °C, FM: metanol:tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ pH 7 (55:45) (v/v). Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 82

Figura 38. Cromatogramas obtidos na separação da mistura A do protocolo de Tanaka, utilizando as FE (A) Si(PDMFS) e SiZr(PDMFS) e (B) Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; FM: metanol:água 80:20 (v/v); vazão:0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 30 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) trifenileno, (4) pentibenzeno e (5) *o*-terfenila. 84

Figura 39. Cromatogramas obtidos na separação da mistura B do protocolo de Tanaka, utilizando as FE (A) Si(PDMFS) e SiZr(PDMFS) e (B) Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; FM: metanol:água 30:70 (v/v); vazão:0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 30 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) fenol e (3) cafeína. 86

Figura 40. Cromatogramas obtidos na separação da mistura C do protocolo de Tanaka, utilizando as FE (A) Si(PDMFS) e SiZr(PDMFS) e (B) Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; fase móvel: metanol: metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹ 30:70 (v/v) pH 7,6; vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 220 nm e temperatura de 30 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas. 87

Figura 41. Cromatogramas obtidos na separação da mistura D do protocolo de Tanaka, utilizando as FE (A) Si(PDMFS) e SiZr(PDMFS) e (B) Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; fase móvel: metanol:KH₂PO₄/H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹ 30:70 (v/v) pH 2,7; vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 220 nm e temperatura de 30 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas. 88

Figura 42. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de compostos aromáticos empregando as colunas preparadas no laboratório, 5 µm, 60 mm x 4 mm, Si(PDMFS) , SiZr(PDMFS), Si(PDMFS)ec, SiZr(PDMFS)ec e as colunas comerciais C18 Nova Pak[®], 4 µm, 150 mm x 3,9 mm, e fenil-hexil Zorbax[®], 5 µm, 150 mm x 4,6 mm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; fase móvel: metanol:H₂O 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹ nas colunas preparadas no laboratório e 1,0 mL min⁻¹

nas colunas comerciais; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) fenol, (3) *m*-cresol, (4) acetofenona, (5) benzoato de metila, (6) tolueno, (7) *p*-xileno e (8) propilbenzeno. 90

Figura 43. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de agrotóxicos empregando a coluna SiZr(PDMFS)ec preparada no laboratório, 5 µm, 60 mm x 4 mm, SiZr(PDMFS)ec e a coluna comercial fenil-hexil Zorbax®, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; fase móvel: metanol:H₂O 50:50 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹ na coluna SiZr(PDMFS)ec e 1,0 mL min⁻¹ na coluna comercial; detecção a 220 nm e temperatura de 25 °C. Compostos teste: (1) benomil, (2) cianazina, (3) tebutiuram, (4) paratiom, (5) linurom e (6) diurom. 92

Figura 44. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura contendo benzeno e alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos empregando a coluna SiZr(PDMFS)ec preparada no laboratório, 5 µm, 60 mm x 4 mm, e a coluna comercial Fenil-hexil Zorbax®, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; fase móvel e vazão: metanol:H₂O 55:45 (v/v) a 0,3 mL min⁻¹ na coluna SiZr(PDMFS)ec e metanol:H₂O 65:35 (v/v) a 1,0 mL min⁻¹ na coluna comercial; detecção a 262 nm e temperatura de 25 °C. Compostos teste: (1) benzeno, (2) naftaleno, (3) acenaftileno, (4) acenafteno, (5) fluoreno, (6) fenantreno, (7) antraceno, (8) fluoranteno e (9) pireno. 93

Figura 45. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de fármacos empregando as colunas preparadas no laboratório, 5 µm, 60 mm x 4 mm, Si(PDMFS) e Si(PDMFS)ec e as colunas comerciais C18 Nova Pak®, 4 µm, 150 mm x 3,9 mm, e fenil-hexil Zorbax®, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 µL; fase móvel: metanol:KH₂PO₄/H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹ pH 2,7 50:50 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹ nas colunas preparadas no laboratório e 1,0 mL min⁻¹ nas colunas comerciais; detecção a 220 nm e temperatura de 25 °C. Compostos teste: (1) levofloxacina, (2) dextrometorfano, (3) nortriptilina, (4) amitriptilina e (5) diazepam. 95

Figura 46. Variação da porcentagem de eficiência das colunas recheadas com as fases Si(PDMFS), Si(PDMFS)ec, SiZr(PDMFS) e SiZr(PDMFS)ec em função da passagem da fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (55:45, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; temperatura de 50 °C e detecção a 254 nm. 97

Figura 47. Variação do fator de assimetria ($As_{10\%}$) do acenafteno obtido pelas FE Si(PDMFS), Si(PDMFS)ec, SiZr(PDMFS) e SiZr(PDMFS)ec em função da passagem de fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (55:45, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; temperatura de 50 °C e detecção a 254 nm. 99

1. Introdução

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, que normalmente utiliza colunas metálicas, de tamanho reduzido, preenchidas com material finamente pulverizado que oferece grande resistência ao fluxo da FM (fase móvel), exigindo o uso de bombas de alta pressão para forçar a passagem da FM através da coluna^{1,2,3}.

As principais vantagens da CLAE incluem a capacidade de realizar separações de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, independente da volatilidade e da estabilidade térmica, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade¹.

Apesar das inúmeras vantagens, a CLAE, assim como outros métodos cromatográficos, não é capaz de fornecer informações que permitam a identificação dos picos, exceto com o uso de um detector qualitativo¹, como o espectrômetro de massas e por arranjo de diodos.

Atualmente, a CLAE tem sido escolhida como a técnica analítica de separação em diversas áreas de pesquisa, tanto científica quanto aplicada, com destaque para a saúde, como medicina e farmácia; alimentos; química ambiental; polímeros e forense^{4,5}.

Estima-se que cerca de 85 % das aplicações da CLAE são realizadas em fase reversa (CLAE-FR), que consiste de uma modalidade da CLAE na qual a FE (fase estacionária) apresenta menor polaridade que a FM⁵.

Esta grande popularidade da CLAE-FR deve-se às suas inúmeras vantagens, entre elas o uso de fases móveis mais simples, por ter água em sua composição; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da FM; boa repetibilidade dos tempos de retenção; possibilidade de eluição por gradiente, resultando em análises mais rápidas; grande variedade de FE disponíveis e vasta faixa de aplicação, devido à possibilidade de separação de compostos de diferentes polaridades, massas molares e grupos funcionais⁴.

O aumento da estabilidade química e a redução da alta atividade de grupos residuais têm sido os principais focos das pesquisas em fases estacionárias para CLAE-FR. Novas estratégias de modificação da superfície da sílica e a introdução de

novos materiais como suportes cromatográficos têm minimizado estas limitações e possibilitado a crescente popularização da técnica⁶. Além do aumento da estabilidade, outra linha de pesquisa que tem alcançado grandes avanços em CLAE-FR é o desenvolvimento de novos tipos de fases estacionárias, com seletividades alternativas às fases estacionárias tradicionais C8 e C18⁷.

1.1 Suportes cromatográficos

As FE empregadas em CLAE-FR normalmente são obtidas a partir do recobrimento de um suporte com um líquido estacionário. Para se obterem FE com desempenho cromatográfico satisfatório, o material empregado como suporte deve apresentar uma série de características^{3,8}, sendo elas: ser suficientemente poroso, possibilitando a absorção do líquido no interior dos poros, cujos diâmetros devem ser de 5 a 100 nm, permitindo a entrada do analito, uma rápida taxa de transferência de massa e fixação adequada do líquido estacionário; apresentar alta concentração de grupos ativos em sua superfície, facilitando a modificação química da mesma a partir da adsorção ou reação de fixação do líquido estacionário; as partículas devem ser obtidas em uma faixa estreita de distribuição de tamanhos e apresentarem área superficial elevada, proporcionando alta capacidade de aceitação de amostra; devem apresentar estabilidades térmica, mecânica e química elevadas; e serem inertes quimicamente para não reagirem com os componentes da amostra.

Ainda não foi encontrado um material que apresente todas as características requeridas citadas acima e, dentre os diferentes materiais, orgânicos ou inorgânicos, que vêm sendo utilizados como suporte desde o surgimento da CLAE-FR, a sílica tem sido o material mais empregado, devido à sua estabilidade mecânica; suscetibilidade de modificação química da sua superfície, sendo possível a obtenção de materiais de diferentes seletividades; disponibilidade comercial em uma larga faixa de tamanhos de partículas, nas formas irregulares e esféricas, com estrutura de poros bem controlada por procedimentos de síntese, com uniformidade de diâmetro de partículas e grande área superficial^{9,10}.

A superfície da sílica consiste de uma rede de grupos silanóis, alguns dos quais podem formar grupos siloxano ou ligações de hidrogênio entre si ou com a água. A Figura 1 apresenta os grupos funcionais presentes na superfície da sílica.

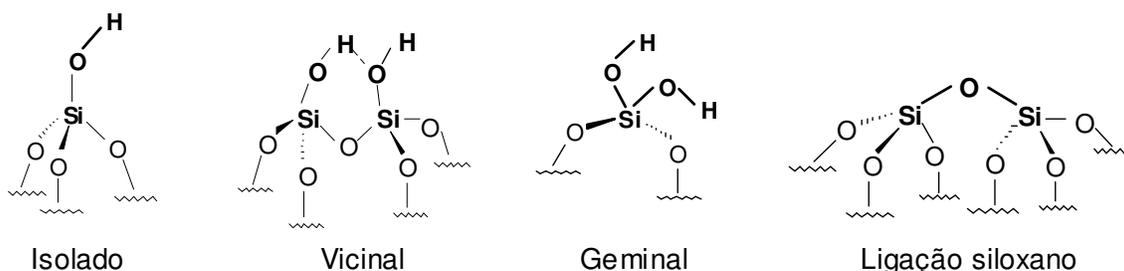


Figura 1. Grupos funcionais presentes na superfície da sílica.

Os grupos silanóis são o centro de adsorção na cromatografia em fase normal, apresentam caráter hidrofílico e interagem com grupos funcionais da fase móvel e das moléculas dos analitos. Em CLAE-FR, podem atuar como âncoras para ligações covalentes de polímeros ou substâncias que apresentem um grupo funcional apropriado.

Comparada com outros suportes cromatográficos, além das características citadas anteriormente, a sílica apresenta inúmeras vantagens em termos de eficiência e desempenho. Por outro lado, tanto a sílica, quanto as FE baseadas em sílica são limitadas em dois aspectos importantes^{4,11}. Um deles está relacionado à não-homogeneidade da sua superfície, que apresenta diferentes tipos de grupos silanóis, os quais afetam a funcionalização e, conseqüentemente, o mecanismo de retenção. Os silanóis ($\equiv\text{Si-OH}$) são ácidos e podem interagir fortemente com compostos básicos e adsorvê-los de forma reversível ou irreversível, resultando em picos assimétricos, diminuindo o desempenho cromatográfico e a reprodutibilidade das análises, ou na deterioração do leito cromatográfico.

O outro aspecto limitante é a instabilidade das FE a base de sílica frente a FM ácidas e alcalinas que, respectivamente, atacam as ligações Si-C provocando a perda da FE, e/ou dissolvem o suporte causando o colapso da estrutura do leito da coluna¹¹.

Para evitar o problema da instabilidade da FE em soluções ácidas ou alcalinas, existe a possibilidade de substituir a sílica por outros suportes, entre eles, polímeros orgânicos, como o poliestireno-divinilbenzeno^{6,7,12,13}, ou alguns óxidos metálicos, como alumina, titânia e zircônia^{6,14,15,16,17} que, apesar de serem estáveis em uma faixa bastante ampla de pH (1-14 ou 1-12), também apresentam algumas desvantagens, como maior dificuldade de modificação química da superfície e/ou FE com desempenho cromatográfico inferior quando comparado com as FE a base de sílica^{4,18}.

Em função destas limitações, muitas pesquisas vêm sendo realizadas para minimizar a atividade dos silanóis e/ou melhorar a estabilidade da sílica e das FE a base de sílica em condições extremas de pH. Algumas se baseiam na modificação da superfície da sílica, aproveitando suas propriedades favoráveis, como rigidez e reprodutibilidade de tamanho de poro e de partícula, e outras consistem em novas tecnologias de desenvolvimento de partículas de sílica, como as chamadas partículas de sílica híbrida¹⁹.

As partículas de sílica híbrida contêm partes inorgânicas, como a sílica, e orgânicas, como um organossilano¹⁹. Estas partículas são preparadas por processo sol-gel, por exemplo, a partir da mistura de tetraetoxissilano (TEOS) e metiltrietoxissilano (MTEOS) ou bis(trietoxissililetano) (ETEOS), sendo o TEOS responsável por gerar as unidades SiO₂ e o MTEOS ou ETEOS responsável pelas unidades de organossilano^{19,20,21}. Os grupos organossilano são formados tanto na superfície como no interior das partículas. Dentro deste tipo de partículas, destacam-se as desenvolvidas pela Waters Corporation, que contêm ligações silício-metil^{19,20} (Si-CH₃), denominadas de sílica híbrida de 1^a geração e empregadas nas colunas XTerra[®], e as que contêm pontes de etano²¹, denominadas de sílica híbrida de 2^a geração, empregadas nas colunas XBridge[®]. Estas partículas apresentam alta estabilidade mecânica, principalmente as de 2^a geração, e ambas possuem eficiências elevadas e resultam em picos simétricos para compostos básicos, além de serem estáveis na faixa de pH de 1-12. Outras empresas que também empregam a tecnologia das partículas híbridas em suas colunas são a Microsolv, a Phenomenex e a Akzo Nobel. O processo de obtenção das partículas utilizado por cada empresa é diferente. As partículas da Microsolv contêm ligações silício-hidrogênio incorporadas na sua estrutura e na

superfície, enquanto as partículas da Phenomenex e da Akzo Nobel contêm uma camada de organossilano apenas na superfície²².

Com relação à modificação da superfície da sílica para diminuir a atividade dos silanóis, um processo relativamente simples e bem difundido consiste na remoção de impurezas metálicas a partir da lavagem ácida e reidroxilação da superfície das partículas de sílica, após a obtenção das mesmas por processo sol-gel e a desidratação a alta temperatura^{10,22,23,24}. O teor de metal presente na sílica depende do processo de síntese e do material de partida, mas geralmente a sílica cromatográfica contém cerca de 0,1 a 0,3 % de metais. Dentre os metais comumente encontrados na sílica (Fe, Al, Na, K, Mg, Ca, La, Ti, Zr, Cu, Cr e Zn), a redução do teor de Al e Fe para quantidades inferiores a 3 µg g⁻¹ e do teor de Ti, Zr e Zn para quantidades não detectáveis por absorção atômica, caracterizam a sílica como sendo de alta pureza^{22,23,25}. Devido à presença de traços metálicos na sílica, a acidez dos grupos silanóis aumenta e, com isso, a interação destes grupos com determinados analitos também aumenta, podendo ser 50 vezes mais forte em relação às interações dos silanóis na ausência de metais. Estas interações mais fortes são a causa de alargamento dos picos cromatográficos, principalmente de compostos básicos, levando à perda de resolução e reprodutibilidade das análises. Portanto, a sílica empregada nas separações cromatográficas deve apresentar o maior grau de pureza possível²⁵.

Buscando-se maior estabilidade química do suporte e das FE, no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LabCrom) alguns estudos vêm sendo desenvolvidos a partir da modificação da superfície da sílica com camadas de óxidos metálicos de transição como titânio^{6,26,27,28} e zircônio^{6,29,30,31,32,33}. Ambos são óxidos anfóteros e portanto, insolúveis em meio alcalino³⁴. Os primeiros suportes recobertos com metal no LabCrom foram preparados a partir da reação, sob refluxo, entre a sílica e tetracloreto de zircônio(IV) em tolueno³⁵, no entanto, as porcentagens de zircônio incorporadas por esta reação eram muito baixas (~1,5 %). Os suportes posteriores foram preparados empregando-se tetrabutóxido de zircônio(IV) ao invés do tetracloreto, e a reação em banho termostaticado a 40 °C, sem refluxo; as porcentagens de zircônio obtidas com este novo procedimento aumentaram para valores entre 15 e 22 %^{29,30,31}. Os resultados mostram que as FE obtidas a partir da sílica metalizada, principalmente

a zirconizada, são mais estáveis frente a FM neutras e alcalinas, apresentando o mesmo desempenho cromatográfico das FE baseadas em sílica não modificada³².

1.2 Fases estacionárias para CLAE-FR

Como as FE para utilização em FR devem apresentar caráter apolar e as superfícies dos óxidos utilizados como suporte são polares, devem-se introduzir grupos orgânicos apolares nas suas superfícies. Existem várias formas de se obterem as camadas orgânicas apolares sobre as superfícies dos diferentes óxidos, discutindo-se a seguir algumas delas.

1.2.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas

O método mais comum de obtenção de FR envolve a introdução de monocamadas orgânicas por meio de reação com reagentes apropriados, produzindo as chamadas fases quimicamente ligadas. Neste tipo de fase, as cadeias orgânicas são ligadas covalentemente à superfície do suporte fornecendo alta estabilidade hidrolítica ao líquido estacionário³. Existem vários procedimentos para a formação de uma camada quimicamente ligada sobre a superfície de óxidos, como a esterificação, cloração seguida por reação com reagente de Grignard ou com compostos organo-lítio e a organossilanização, que é a mais empregada^{1,3}.

Na organossilanização, as fases ligadas são preparadas pela reação dos grupos silanóis da sílica com reagentes organossilanos, resultando em FE com ligações do tipo siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$). As colunas recheadas com esse material apresentam eficiências altas devido aos rápidos efeitos de transferência de massa⁴.

O agente silano pode ser monofuncional, bifuncional ou trifuncional (Figura 2). Dependendo destas funções, as fases apresentam características físicas e cromatográficas bastante distintas. Utilizando-se silanos mono, bi ou trifuncionais na ausência de água tem-se as fases monoméricas e silanos bi ou trifuncionais na presença de água geram reações cruzadas que levam à polimerização vertical do modificador e, conseqüentemente, as fases estacionárias poliméricas⁴.

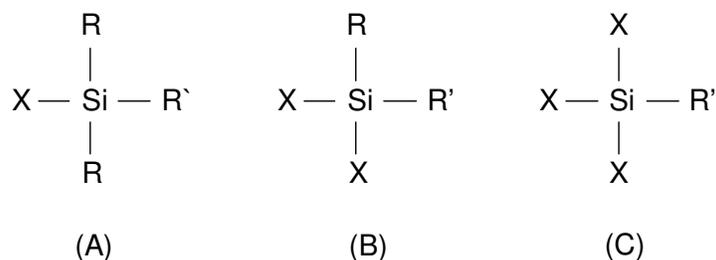


Figura 2. Agentes silanos empregados na organossilanização de fases estacionárias, monofuncional (A), bifuncional (B) e trifuncional (C). R = normalmente CH₃, R' = comumente C8 ou C18, X = grupos metóxi ou etóxi ou cloro.

As colunas cromatográficas recheadas com a fase monomérica apresentam eficiências mais altas devido à cinética favorável envolvendo a rápida difusão dentro e fora da camada fina da FE. No entanto, o principal inconveniente do preparo deste tipo de fase é que mais de 50 % dos grupos silanóis da sílica permanecem sem reagirem (silanóis residuais), após o processo de síntese. Esta baixa concentração do ligante na superfície está associada ao impedimento estérico ocasionado pelos volumosos agentes silanos empregados na reação. Embora os silanóis residuais não estejam disponíveis para a reação com os agentes silanos, alguns são suficientemente acessíveis para interagirem com os compostos durante a separação cromatográfica. Os silanóis residuais são os principais responsáveis pelo aumento da retenção e do alargamento de pico de compostos básicos³⁶.

Na tentativa de contornar o problema dos silanóis residuais e também como forma de melhorar a estabilidade das FE à base de sílica frente a fases móveis agressivas, foram sugeridas diversas alternativas de preparo das fases ligadas: o capeamento, as fases poliméricas, as fases com polimerização horizontal, as estericamente protegidas, as com grupos polares embutidos e as FE bidentadas.

- a) Capeamento^{37,38}: após a ligação das espécies químicas na superfície da sílica, a FE é submetida a uma segunda reação com um agente silano apropriado (trimetilclorossilano e/ou hexametildissilazano – contêm grupos orgânicos pequenos), reduzindo o número de silanóis residuais, e devido ao melhor recobrimento do suporte de sílica, ocorre um aumento da estabilidade da FE em fase móvel alcalina.

- b) Fases poliméricas ou com polimerização vertical^{39,40,41,42}: são obtidas pela reação de agente silano bi ou trifuncional na presença de traços de água. Apesar da maior estabilidade hidrolítica desta fase, a dificuldade em controlar a reação de entrecruzamento e a espessura da camada resultante torna o processo pouco reproduzível, sendo raramente formada uma camada uniforme.
- c) Fases com polimerização horizontal⁴³: neste método, monocamadas auto-organizadas de silanos trifuncionais de cadeias longas (C8, C18) e curtas (C1) são ligadas sobre as partículas de sílica melhorando a estabilidade hidrolítica das fases com substancial redução do acesso aos silanóis residuais. Além disso, o processo de obtenção destas fases é altamente reproduzível.
- d) Fases estericamente protegidas^{44,45}: são obtidas pela reação de um reagente organossilano contendo o grupo principal (C8 ou C18) na cadeia lateral e dois grupos alquilas volumosos (isopropil ou terc-butil) que restringem o acesso de solutos básicos aos grupos silanóis residuais e protegem a ligação siloxano, evitando a quebra entre a fase ligada e o suporte quando são empregadas fases móveis ácidas.
- e) Fases estacionárias com grupos polares embutidos⁴⁶: trata-se de um método alternativo de redução da atividade dos silanóis residuais, pois a inserção de grupos polares (como amida, amina, uréia e carbamato) promove uma competição destes com os solutos básicos pelos silanóis residuais, estabelecendo uma redução da atividade silanofílica.
- f) Fases estacionárias bidentadas⁴⁷: preparadas a partir de silanos bifuncionais, formados por dois átomos de silício ligados entre si por um grupo etil ou propil, proporcionam maior restrição de acesso aos silanóis residuais e maior estabilidade química quando empregadas fases móveis com pH superior a 8.

1.2.2 Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados

Outra alternativa para reduzir os grupos silanóis residuais baseia-se no recobrimento superficial da sílica, ou de outros óxidos, com polímeros orgânicos pré

sintetizados, cujo objetivo é combinar a resistência mecânica do suporte inorgânico à versatilidade e à inércia química dos polímeros orgânicos^{48,49,50}.

Estas fases apresentam uma série de vantagens que as tornam extremamente atrativas para uso em CLAE-FR, como: melhor proteção dos grupos silanóis residuais (sílica) ou de sítios ácidos de Lewis (zircônia, titânia e alumina), quando comparadas às FE quimicamente ligadas; maior facilidade de preparo e a possibilidade de maior seletividade da FE pela escolha do polímero apropriado^{6,51}.

Existem várias formas de se fazer o recobrimento polimérico. O mais comumente empregado consiste na adsorção física de um polímero pré-sintetizado, com composição química bem definida sobre o suporte cromatográfico^{47,48,49,50,52}. Ou, alternativamente, o polímero pode ser depositado pela polimerização *in situ* de uma solução de monômeros ou oligômeros iniciada ou propagada na superfície do suporte^{53,54}. A primeira forma é preferida por fornecer maior reprodutibilidade no preparo das FE⁴⁵.

A química da superfície do suporte tem uma influência significativa na sorção dos polímeros. Os grupos reativos superficiais agem como pontos de ancoramento, nos quais os polímeros podem se ligar covalentemente^{55,56,57} ou apenas interagirem fracamente^{58,59,60,61}.

Outro ponto a ser destacado na preparação destas fases é a quantidade de polímero depositado na superfície do suporte. Se, por um lado, uma maior quantidade de polímero fornecerá um material com maior proteção dos silanóis ou dos sítios ácidos de Lewis contra interações indesejáveis com a amostra, por outro lado, resultará em uma camada mais espessa e bloqueio dos poros do suporte, diminuindo a velocidade dos processos de transferência, o que implica em FE com eficiência baixa. Portanto, a preparação das fases recobertas com polímeros é uma etapa crítica que tem por finalidade a obtenção de duas propriedades idealizadas^{6,11,62}:

(1) Um filme fino que não bloqueie a entrada dos poros para manter a estrutura geral e a conectividade e resultar em rápida transferência de massa nos poros e no filme polimérico.

(2) Uma camada polimérica uniforme para recobrir completamente os sítios não específicos de interações indesejáveis e, se possível, impermeável aos outros solutos a serem separados.

Basicamente, o polímero sorvido pode formar um filme fino na superfície da sílica (Figura 3a) ou preencher o volume do poro (Figura 3b), é possível também haver uma combinação destas duas formas. Em ambos os casos as cadeias poliméricas podem apenas recobrir (por mecanismo de sorção) as paredes dos poros sem entrecruzamento e sem ligar à superfície (representado no lado esquerdo da Figura 3a e b), pode formar uma camada densamente entrecruzada sem ligação química com a superfície dos poros (parte central) ou então pode se ligar quimicamente às paredes dos poros (representado no lado direito da Figura 3a e 3b)^{6,11}. Porém, se a sorção do polímero ao suporte for governada por forças de interação fraca, ele poderá ser facilmente removido durante a passagem da FM. Faz-se necessário, portanto, uma etapa de imobilização posterior à sorção para melhor “ancoramento” do polímero ao suporte, dando uma maior estabilidade à FE^{6,11,62}.

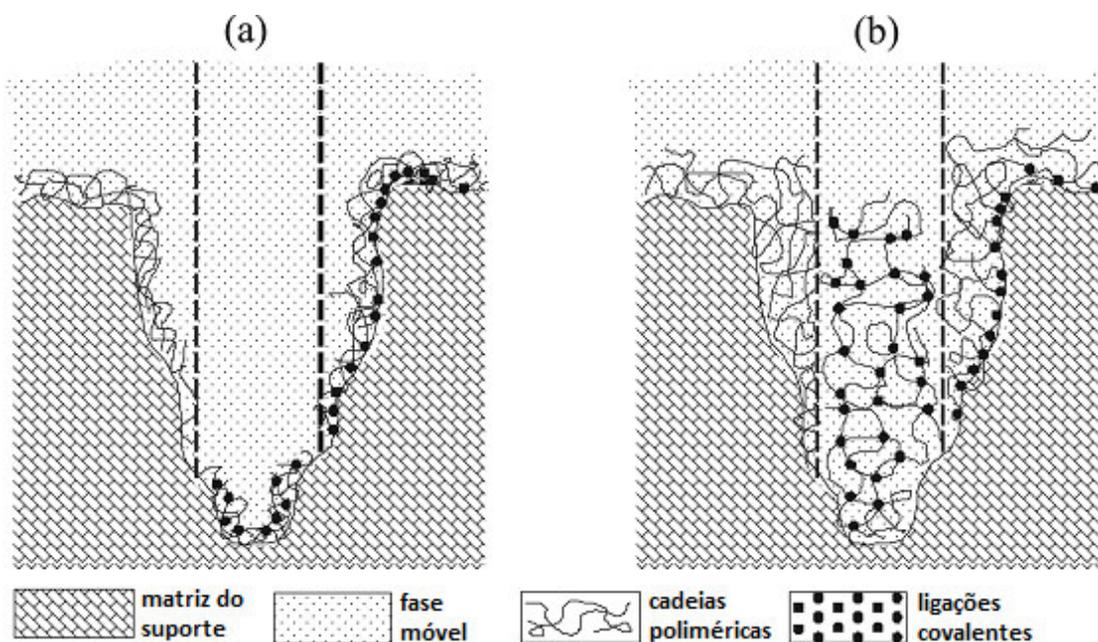


Figura 3. Tipos de deposição polimérica nos poros do suporte cromatográfico, recobrimento das paredes dos poros (a) ou preenchimento do volume dos poros (b)¹¹.

Os métodos de imobilização de polímeros atuais são originários das várias técnicas para a criação de camadas poliméricas em materiais de vidro ou de sílica, da experiência de fases estacionárias poliméricas em suportes para cromatografia gasosa e das várias técnicas para modificação de suportes para cromatografia líquida clássica, antes do desenvolvimento da CLAE. Porém, o grande avanço conquistado nos procedimentos de imobilização de polímeros aconteceu com a introdução de micropartículas de sílica porosas, pois diminuiu o risco de entupimento dos poros e possibilitou altas eficiências de separação, comparadas às sílicas modificadas com ligantes de baixa massa molar usados no passado⁶.

Atualmente, as FE imobilizadas são obtidas por reações entre as moléculas individuais da fase líquida sorvida, induzidas ou não por processos de entrecruzamento, ou entre a fase líquida e o suporte⁶³ (Figura 3). Estas reações de entrecruzamento resultam em camadas estáveis, quando comparadas com as FE sorvidas, e são insolúveis nas fases móveis comumente empregadas em CLAE-FR. Vários métodos são empregados para que estas reações ocorram, como: reticulação induzida por agentes químicos como peróxidos e azocompostos^{50,64}, auto-imobilização⁶³, tratamento térmico sem iniciador^{59,63}, radiação gama³⁰ e radiação microonda^{58,65,66,67}.

Ao longo dos últimos 20 anos, o LabCrom tem direcionado esforços para o preparo de FE com polímeros [poli(butadieno) e polissiloxanos] sorvidos e imobilizados por diferentes tratamentos sobre suportes de sílica e sílica metalizada, sem a utilização de agentes químicos para indução do entrecruzamento das cadeias poliméricas⁶. O principal foco destes estudos tem sido a obtenção de fases estacionárias com maior estabilidade química em condições drásticas de fase móvel^{6,31}.

Este trabalho envolve a aplicação de três das alternativas descritas anteriormente para aumentar a estabilidade química das fases estacionárias e reduzir interações indesejáveis entre alguns analitos e os sítios ativos da superfície da sílica: 1) recobrimento do suporte de sílica a partir de tetrabutóxido de zircônio, 2) preparo da fase estacionária a partir da sorção e imobilização por tratamento térmico de um

polímero pré-sintetizado sobre as partículas do suporte e 3) capeamento da fase estacionária após sorção e imobilização do polímero.

O copolímero utilizado neste trabalho é o poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano), pertencente à classe dos polissiloxanos fenil substituídos, que têm sido extensivamente empregados em cromatografia gasosa⁶²; no entanto, a sua aplicação em CLAE ainda não é muito explorada.

A estrutura molecular do copolímero está representada na Figura 4.

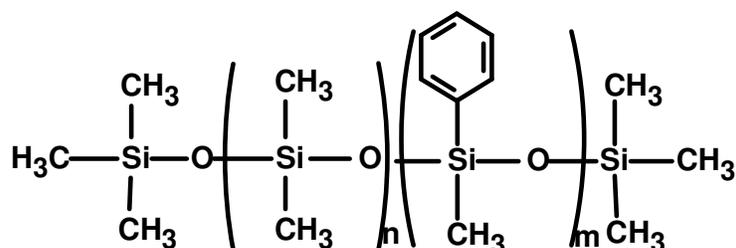


Figura 4. Fórmula estrutural do poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano).

1.3 Fases estacionárias do tipo fenil

As primeiras fases estacionárias quimicamente ligadas para CLAE-FR continham cadeias octadecil (C18), provavelmente devido à disponibilidade e ao baixo custo dos reagentes cloro- ou alcoxiocetadecilssilanos. Além disso, estes compostos apresentam reatividade elevada com os grupos silanóis da sílica e este é um aspecto muito importante, pois a sílica empregada na época apresentava área superficial reduzida, e era necessária uma grande quantidade de ligante para que houvesse retenção suficiente dos analitos. Outro aspecto importante das fases C18 é o fato das cadeias longas proporcionarem um bom recobrimento do suporte de sílica e fases estacionárias com maior estabilidade que as FE empregando ligantes de cadeia mais curta, como C8^{6,7}.

Por outro lado, as fases C18 tradicionais são limitadas para a separação de analitos polares devido à baixa retenção destes compostos na superfície altamente hidrofóbica da FE ou devido às interações indesejáveis entre os grupos básicos dos

analitos e os silanóis residuais da FE⁶. Um aumento da retenção de compostos polares pode ser obtido empregando-se maior quantidade de água na fase móvel, porém, o uso de FM contendo acima de 95 % de água resulta no colapso da coluna cromatográfica e é incompatível com detecção por espectrometria de massas. Para minimizar as interações entre os compostos básicos e os grupos silanóis, a alternativa principal é o emprego de solução tampão de sais inorgânicos em condições ácidas ou alcalinas, no entanto, conforme já discutido, a estabilidade química das FE a base de sílica é limitada a valores de pH entre 2 e 8. Além disso, o emprego de sais inorgânicos pode reduzir o tempo de vida das colunas e dos sistemas cromatográficos se não forem tomados os devidos cuidados com relação à concentração dos sais e à limpeza do sistema^{7,22}.

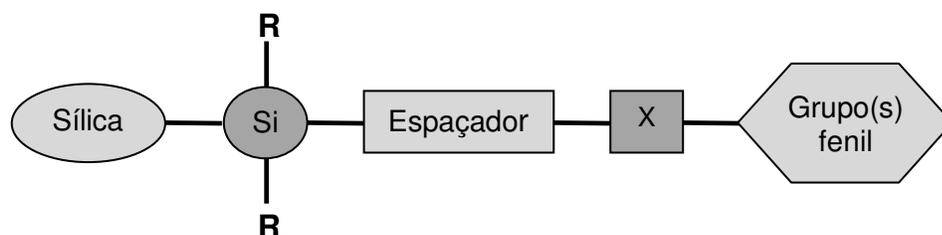
Estas limitações das fases C18 encorajaram as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de fases estacionárias alternativas, de diferentes comprimentos de cadeia e/ou diferentes grupos funcionais ligados à sílica, capazes de separar misturas cada vez mais complexas, contendo compostos de diferentes polaridades. Dentro destas fases podem-se destacar as fases do tipo fenil, que estão entre as primeiras fases não-alquilas introduzidas no mercado⁷.

A popularidade e a disponibilidade comercial das fases estacionárias para CLAE-FR contendo grupos fenil têm aumentado em ritmo acelerado. Atualmente, cerca de 40 % das análises por CLAE-FR empregam colunas C18 e aproximadamente 10 % empregam colunas do tipo fenil. Esta popularidade crescente das fases fenil reside na seletividade diferencial em relação às fases C-alquilas tradicionais, devido à capacidade de realizar interações π - π com analitos aromáticos, o que confere certa polaridade à FE e permite o emprego de fases móveis contendo maior quantidade de água⁶⁸.

As interações π - π são interações intermoleculares que ocorrem entre um doador e um aceptor de elétrons nos sistemas que contém elétrons π , ou seja, grupos funcionais insaturados⁶⁹. Em um sistema cromatográfico, estas interações podem ocorrer entre elétrons π da fase estacionária e do analito. Este tipo de interação é favorecido quando a fase estacionária fenil é rica em elétrons (base de Lewis fraca) e o analito é pobre em elétrons (ácido de Lewis fraco)⁶⁸.

Fases estacionárias contendo grupos fenil quimicamente ligados têm sido empregadas com sucesso na separação de isômeros de posição, tocoferóis, flavonóides, compostos aromáticos polinucleares, nitroaromáticos e fármacos^{70,71,72,73}.

A farmacopéia americana (USP)⁷⁴ classifica as fases estacionárias comerciais que contém grupos fenil como L11 (definição: grupos fenil quimicamente ligados a partículas porosas de sílica). Atualmente, existem no mercado aproximadamente 100 tipos de fases estacionárias que se enquadram na definição citada anteriormente⁷. A estrutura de uma fase fenil pode ser exemplificada pelo diagrama⁶⁸ apresentado na Figura 5.



Sílica = pura ou tradicional

R = OH, metila ou isopropila

Espaçador = C₀ a C₆

X = heteroátomo ou CH₂

Grupos fenil = 1 ou 2 anéis

Capreamento = sim ou não

Ligação = monomérica ou polimérica

Figura 5. Diagrama representativo da estrutura de uma fase fenil⁶⁸.

A sílica empregada pode ser tradicional, de alta pureza ou híbrida. A tecnologia de ligação pode ser monomérica (por exemplo, as colunas ACE, nas quais R = metila e Zorbax SB, em que R = isopropila) ou polimérica (por exemplo, Prodigy e Ascentis, nas quais R = OH ou O-Si-O). O número de átomos de carbono do espaçador entre o átomo de silício e o anel aromático pode variar de n = 0 a n = 6, proporcionando diferentes graus de caráter hidrofóbico e aromático à fase. A fase pode conter um ou

dois grupos fenil, o que também influencia na hidrofobicidade e na aromaticidade da fase. Pode existir um heteroátomo entre o espaçador e o anel fenil, e a fase pode ser capeada ou não, sendo possível o capeamento com reagente polar⁶⁸.

A faixa de porcentagem de carbono (% C) das fases fenil é muito ampla, podendo variar, por exemplo, de 2,5 % (Spherisorb) a 19 % (Ascentis fenil)⁶⁸.

Os primeiros a ligarem grupos fenil à superfície da sílica foram Neimark e Chertov, em 1961, empregando como reagentes feniltriclorossilano e difenildiclorossilano⁷⁵.

Posteriormente, três fases estacionárias foram preparadas por Szabó *et al.*⁷⁶ empregando sílica modificada por fenil-metil-diclorossilano, difenil-diclorossilano e trifenil-diclorossilano, para CLAE-FR. As colunas recheadas com as fases estacionárias preparadas e uma coluna comercial C18 foram empregadas na separação de alguns compostos aromáticos de diferentes polaridades. Comparando-se o desempenho das colunas desenvolvidas com o desempenho da coluna C18, os autores observaram que a coluna C18 apresentou maior retenção para os compostos apolares (tolueno, bromobenzeno, *p*-xileno e propilbenzeno), enquanto as colunas fenil apresentaram maior retenção para os compostos mais polares (fenol, cresol, anisol, acetofenona e benzoato de metila), concluindo que a fase C18 é menos polar que qualquer uma das fases fenil preparadas, e a polaridade das fases fenil aumenta de acordo com o substituinte silano ligado à sílica na seguinte ordem: fenil-metil < difenil < trifenil.

Szabó *et al.*⁷⁷ empregaram três diferentes polissiloxanos fenil substituídos para modificar a superfície da sílica, obtendo-se fases estacionárias com diferentes polaridades. Estas fases foram aplicadas na separação de alguns compostos aromáticos por CLAE e seu desempenho foi comparado ao de uma fase estacionária monomérica preparada a partir de fenil-metil-diclorossilano. A ordem de eluição dos analitos foi a mesma em todas as fases estacionárias preparadas, no entanto, as fases poliméricas apresentaram maior retenção para os compostos apolares (tolueno, *p*-xileno, bromobenzeno e propilbenzeno) que a fase monomérica, enquanto a retenção dos compostos mais polares (fenol, cresol, anisol, acetofenona e benzoato de metila) foi maior na fase estacionária monomérica. As fases poliméricas não apresentaram diferenças significativas no que diz respeito à porcentagem de carbono e ao

recobrimento superficial do suporte de sílica quando comparadas à fase monomérica, entretanto, as características hidrofóbicas das fases poliméricas foram significativamente maiores, o que pode ser devido às interações adicionais das ligações siloxanos (essencialmente hidrofóbicas) do modificador polimérico com os solutos.

Yang *et al.*⁷⁸ prepararam cinco fases estacionárias quimicamente ligadas do tipo fenil a partir da ligação de poli(metilfenilsiloxano) com OH terminais e diferentes graus de polimerização sobre a superfície da sílica gel. As fases preparadas foram avaliadas e seus desempenhos foram comparados ao de uma coluna comercial C18. Os resultados das determinações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e ciclossiloxanos indicaram uma contribuição significativa das interações π - π das fases estacionárias com grupo fenil no processo de separação. Além disso, os autores sugerem que o uso da CLAE empregando uma coluna que contenha elétrons π na fase estacionária é uma alternativa vantajosa em relação à cromatografia por permeação em gel para se investigar os mecanismos de reação envolvidos na formação de um copolímero do tipo fenil. Para isso, baseiam-se no fato de que a CLAE-FR empregando colunas fenil apresenta alta resolução para os monômeros, oligômeros de cadeia cíclica e intermediários e possibilita a quantificação dos produtos e intermediários de reação de maneira mais simples e rápida que a cromatografia por permeação em gel.

Goss⁷⁹ comparou o desempenho de duas colunas comerciais, uma contendo grupo fenil e outra C18, na separação de ácido salicílico e algumas de suas impurezas e metabólitos. A coluna do tipo fenil apresentou separações com picos mais simétricos e com melhor resolução que a coluna C18, além disso, houve alteração na ordem de eluição de alguns compostos, sugerindo diferentes interações entre os analitos e os dois tipos de fases estacionárias.

Letzel *et al.*⁸⁰ desenvolveram um método para análise de compostos aromáticos de diferentes faixas de massa molar, estrutura e polaridade, baseado em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. Os autores empregaram uma coluna a base de sílica modificada com grupos fenil e destacaram que este tipo de coluna apresenta melhor resolução que uma coluna C18 para compostos aromáticos mais polares, como os derivados de HPA parcialmente

oxidados. O método desenvolvido empregou fase móvel metanol:água no modo de eluição por gradiente, e sua aplicabilidade foi demonstrada a partir da separação de 81 compostos (HPA, fenóis, quinonas, ácidos, lactonas e ésteres) em amostras de interesse ambiental, médico e da área de combustíveis (água de lagos, urina humana e amostras de diesel).

Yang *et al.*⁸¹ investigaram a influência do metanol e da acetonitrila nos mecanismos de retenção do ingrediente ativo de um fármaco e algumas de suas impurezas, empregando uma coluna C18 e uma coluna fenil. Não foi possível separar o ingrediente ativo do fármaco de uma de suas impurezas empregando a coluna C18, independente do solvente orgânico utilizado na fase móvel (acetonitrila ou metanol). Por outro lado, estes dois compostos puderam ser separados empregando-se a coluna fenil e metanol como solvente orgânico, enquanto que a separação não pôde ser obtida nesta mesma coluna utilizando-se acetonitrila na fase móvel. Para avaliar a influência da acetonitrila na separação, os autores empregaram uma mistura ternária de solventes (metanol:acetonitrila:água) em seis proporções diferentes, e observaram um aumento da resolução entre os dois compostos à medida que se aumentava a proporção de metanol em relação à acetonitrila. Como a coluna C18 não foi capaz de separar estes compostos, presume-se que a polaridade dos dois é bastante similar e a separação obtida na coluna fenil pode ser atribuída às interações π - π entre os analitos e os grupos fenil da fase estacionária. Além disso, o aumento da concentração de acetonitrila na fase móvel parece suprimir essas interações π - π , o que pode ser devido ao aumento das interações entre a acetonitrila, que contém uma tripla ligação (C \equiv N), e a fase estacionária fenil. Para confirmar este raciocínio, os autores empregaram as mesmas colunas na separação de uma mistura contendo ácido 1-naftóico e 1-naftol. Quando a separação foi feita empregando-se a coluna C18, as resoluções obtidas foram muito parecidas tanto em acetonitrila como em metanol, com o ácido 1-naftóico eluindo antes do 1-naftol. Quando os autores fizeram a separação na coluna fenil utilizando metanol na fase móvel, a ordem de eluição dos compostos foi invertida e a maior retenção do ácido 1-naftóico pode ser devido às interações π - π entre a carbonila e o grupo fenil da fase estacionária. Conforme esperado, quando se empregou a coluna fenil e acetonitrila ao invés de metanol, a ordem de eluição dos compostos foi

invertida novamente, passando a ser a mesma da coluna C18, demonstrando o efeito de supressão das interações π - π entre os analitos e a fase fenil causado pela acetonitrila.

Kayillo *et al.*⁸² avaliaram a seletividade e a retenção do benzeno e de alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos lineares e não lineares empregando 5 colunas de fase reversa diferentes, todas elas da Phenomenex, sendo: SphereClone ODS (2) C18 (reagente de capeamento apolar), C18 Aqua (capeamento com reagente polar), propil-fenil (capeamento apolar), Synergi polar-RP (capeamento polar) e Cosmosil 5PBB (capeamento polar). As principais diferenças entre cada uma destas fases, além do tipo de fase reversa, C18 e fenil, envolvem os diferentes tipos de capeamento empregados, diferentes tipos de sílica, e no caso das fases fenil, a Synergi polar-RP e a Cosmosil 5PBB apresentam ligação éter entre o anel aromático e a cadeia propil. Dentre as colunas avaliadas, a propil-fenil apresentou menor retenção para todos os compostos analisados, por exemplo, para eluição do pentaceno com fator de retenção igual a 10 nesta coluna, a proporção necessária de metanol na fase móvel foi de 43 %, enquanto que na C18 Aqua, Synergi polar-RP e C18 foram 77, 78 e 81 %, respectivamente. Por outro lado, o pentaceno foi fortemente retido na coluna Cosmosil 5PBB mesmo com 100 % de metanol na fase móvel ($k = 26,9$). Os autores demonstraram que as colunas do tipo fenil, principalmente a Cosmosil 5PBB e a propil-fenil, apresentam melhor separação para o benzeno e HPA lineares homólogos (benzeno, naftaleno, antraceno, 2,3-benzantraceno e pentaceno) que as colunas C18 e C18 Aqua, podendo ocorrer coeluição do 2,3-benzantraceno com antraceno nestas duas colunas, dependendo da força cromatográfica da fase móvel. A melhor separação para os HPA homólogos lineares é decorrente das interações π - π que as fases fenil conseguem realizar com os HPA. A coluna propil-fenil proporcionou interações mais fortes entre a fase estacionária e os analitos, apesar de apresentar o menor recobrimento superficial e a menor densidade de ligante entre as colunas avaliadas, evidenciando que um recobrimento superficial elevado não fornecerá necessariamente uma superfície ideal para interações com os analitos. Para os HPA isômeros estruturais contendo 4 e 5 anéis, as melhores separações foram obtidas empregando-se as colunas C18, C18 Aqua e propil-fenil, e ocorreram mudanças significativas na ordem de

eluição dos isômeros nas colunas do tipo fenil em comparação com a ordem de eluição nas colunas C18. A partir da maioria das análises, os autores concluíram que a coluna Synergi polar-RP apresentou comportamento mais próximo aos das colunas C18, o que pode ser devido à orientação espacial do anel aromático em relação à superfície da sílica, que difere da orientação encontrada nas colunas propil-fenil e Cosmosil 5PBB.

Dando continuidade ao trabalho citado anteriormente, os mesmos autores⁸³ investigaram as interações termodinâmicas responsáveis pela retenção de uma série de HPA lineares, empregando as colunas do trabalho anterior⁸². A partir da avaliação das variações de entalpia e entropia da retenção em função do número de anéis aromáticos dos analitos, os autores observaram diferenças significativas entre as interações termodinâmicas que ocorrem nas duas colunas C18, que podem ser devido às densidades de ligante diferentes e à polaridade do reagente de capeamento empregado em cada uma destas fases. As interações termodinâmicas observadas na coluna Synergi polar-RP foram similares às da coluna C18 Aqua, e ambas são capeadas com reagentes polares, indicando que estes grupos devem influenciar no processo de retenção pois, embora não sejam responsáveis pela interação com o analito, eles devem provocar uma limitação na reordenação das cadeias C18 e dos grupos propil-oxi-fenil durante a interação com os analitos. As interações termodinâmicas observadas na coluna propil-fenil foram significativas, apesar da densidade de ligante desta coluna ser menor que das demais, corroborando com o alto grau de seletividade desta fase observado pelos autores no trabalho anterior⁸². Os autores também avaliaram os formatos dos picos nas diferentes colunas empregadas e observaram que as colunas C18, C18 Aqua, Synergi polar-RP e Cosmosil 5PBB apresentaram picos relativamente simétricos, com valores de assimetria entre 1,2 e 1,4, enquanto a coluna propil-fenil apresentou picos com caudas significativas, e valores de assimetria próximos de 2,2. Em consequência disto, os autores passaram a suspeitar da existência de interações π - π indesejáveis ocorrendo na superfície da fase propil-fenil ou do baixo recobrimento superficial e do capeamento parcial desta fase deixando a superfície da sílica exposta. A existência de interações π - π indesejáveis foi avaliada a partir da eluição do criseno na coluna propil-fenil

empregando-se duas fases móveis com a mesma força cromatográfica, uma com metanol e outra com acetonitrila como modificadores orgânicos. A assimetria do pico diminuiu de 2,2 para 1,9 em acetonitrila, devido à capacidade deste solvente de reduzir as interações π - π , e conseqüentemente, a cauda do pico, descartando a hipótese de interação entre os analitos e a superfície exposta da sílica.

Durante o desenvolvimento dos dois trabalhos descritos anteriormente^{82,83}, os autores observaram diferenças na retenção de alguns compostos quando utilizavam colunas contendo a mesma fase estacionária, porém de lotes diferentes. Por este motivo, desenvolveram um terceiro trabalho⁸⁴ com o objetivo de comparar a reprodutibilidade de 3 colunas contendo fases estacionárias propil-fenil de lotes diferentes. Para isso, avaliaram diferentes parâmetros cromatográficos, entre eles retenção, assimetria de pico, seletividade e interações estéricas e entálpicas, a partir da separação de alguns HPA. Uma das colunas avaliadas, coluna 2, apresentou retenção absoluta significativamente menor que as outras duas para os compostos testados e não foi capaz de separar os grupos de HPA não lineares e os isômeros contendo 4 e 5 anéis. As colunas 1 e 3 apresentaram seletividade similar para os grupos de isômeros, enquanto a coluna 1 apresentou maior seletividade para todos os compostos analisados. Apesar de diferenças na retenção absoluta e no formato de picos, a avaliação do comportamento termodinâmico das fases a partir das medidas de variação de entalpia e de entropia dos HPA nas colunas 1 e 3 mostrou que o mecanismo de retenção envolvido nas duas colunas é o mesmo. Em outras palavras, o processo fundamental que garante a seletividade é uniforme, o que deve ser a característica mais importante a ser avaliada na escolha de uma fase estacionária, uma vez que a retenção pode ser controlada por meio de ajustes na composição da fase móvel.

Euerby *et al.*⁶⁸ avaliaram 21 fases estacionárias do tipo fenil disponíveis comercialmente no que diz respeito ao recobrimento superficial, seletividade hidrofóbica, seletividade estérica, capacidade de formação de ligação de hidrogênio, capacidades de troca iônica em pH 2,7 e pH 7,6 e seletividade aromática (interações π - π). Estas fases foram comparadas com fases C-álquilas correspondentes, três fases pentafluorfenil e uma série de fases fenil experimentais cujas estruturas são

conhecidas. Avaliando a seletividade aromática das fases a partir do fator de seletividade (α) entre o pentilbenzeno e a *o*-terfenila ($\alpha_{PB/O} = k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{\text{o-terfenila}}$), os autores observaram que todas as fases C18 analisadas apresentaram valores de $\alpha_{PB/O} > 1$, o que significa que o pentilbenzeno é mais retido que a *o*-terfenila nestas fases. Por outro lado, as fases fenil, nas quais estão presentes interações π - π , apresentaram valores de $\alpha_{PB/O} < 1$, ou seja, a *o*-terfenila é mais retida que o pentilbenzeno nestas fases. Ainda com relação à seletividade aromática, os autores avaliaram as diferentes fases estacionárias a partir da separação de alguns compostos nitroaromáticos (nitrobenzeno, os isômeros 2, 3 e 4-nitrotolueno, dinitrotolueno e trinitrobenzeno) e, de acordo com a ordem de eluição dos mesmos em cada tipo de fase estacionária, concluíram que o mecanismo de interação hidrofóbica predomina nas fases C-alkila, enquanto nas fases fenil as interações π - π influenciam fortemente os mecanismos de retenção, em adição às interações hidrofóbicas. Apesar disto, existem divergências na seletividade destes compostos na maioria das fases do tipo fenil analisadas, evidenciando que estas fases apresentam interações π - π distintas com os analitos, o que pode ser atribuído às diferenças na estrutura química de cada fase estacionária, principalmente o comprimento da cadeia alquila do espaçador entre o átomo de silício e o anel aromático e o tipo de heteroátomo ou grupo adjacente ao anel aromático (Figura 5). Com relação ao espaçador, a seletividade aromática aumenta à medida que aumenta o comprimento da cadeia alquila, permitindo melhor acesso do analito ao anel aromático da fase estacionária quando este está mais distante da superfície da sílica, facilitando as interações π - π . Analisando-se o heteroátomo ou grupo adjacente ao anel aromático, quanto maior a eletronegatividade do mesmo, maior a intensidade dos efeitos de conjugação eletrônica no anel, tornando-o mais rico em elétrons, o que resulta em interações π - π mais elevadas. Para os substituintes analisados pelos autores, a ordem de seletividade aromática obtida foi: X = CH₂ < O < NH. Comparando-se as fases fenil com as pentafluorfenil, a principal diferença observada com relação à seletividade cromatográfica foi que as últimas apresentam melhor seletividade espacial e menor seletividade aromática que as fases fenil. A hidrofobicidade das fases fenil foi menor que das fases C18 correspondentes. Em geral, as fases fenil apresentaram maior capacidade de formação de ligações de hidrogênio que as fases C-alkila, no

entanto, os autores são cautelosos com relação a esta afirmação, pois o analito empregado para este teste, a cafeína, pode ser retido pelas fases fenil por meio de ligações de hidrogênio e por interações aromáticas. Conforme esperado, as fases fenil que contém cadeias de carbono mais longas como espaçador, como as fases fenil hexil, apresentaram maior hidrofobicidade, maior seletividade espacial e aromática, menor interação por troca iônica e maior capacidade de formação de ligação de hidrogênio (o que pode ser resultado da maior seletividade aromática e não das ligações de hidrogênio de fato).

A partir dos trabalhos descritos anteriormente, pode-se observar que as FE contendo grupos fenil apresentam vantagens na maioria das separações de compostos aromáticos em relação às FE convencionais do tipo C18. Estas vantagens resultam da presença dos anéis aromáticos que conferem polaridade intermediária à FE contendo grupos fenil e têm um papel importante na separação, graças às interações tipo π - π com os analitos.

1.4 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 previamente selecionados.

Na Figura 6 está apresentado um cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes¹.

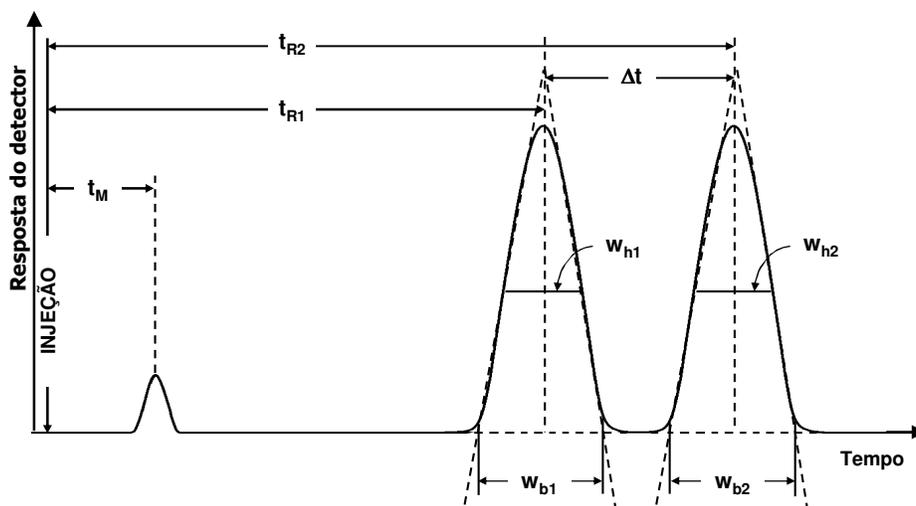


Figura 6. Cromatograma com as medidas empregadas na determinação dos parâmetros cromatográficos.

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.

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 1,00 são suficientes para fins quantitativos, enquanto valores de R_S acima de 1,50 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 cromatográfico 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 literatura^{1,3} indica que A_{s10} deve ter valores de 0,9 a 1,2. Embora menos desejáveis, valores entre 0,8 e 1,6 são admitidos⁷⁴. 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 7 apresenta a forma como é feito o cálculo do fator de assimetria do pico¹:

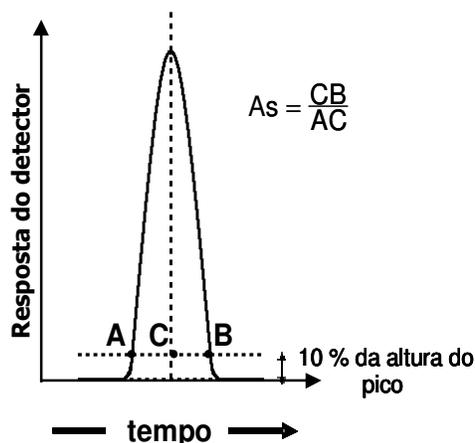


Figura 7. Cálculo do fator de assimetria.

A 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 maiores velocidades lineares de fase móvel.

O termo C equivale à transferência de massa e corresponde ao alargamento da banda devido à dificuldade de transferência de massa do soluto entre a FM e a FE. O termo C está subdividido em C_M e C_S , sendo C_M 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 8, que é conhecida como curva de van Deemter¹. A curva de van Deemter mostra que existe uma vazão ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ($\mu_{\text{ótima}}$), na qual H terá um valor mínimo e corresponde ao valor máximo de eficiência da coluna. Na prática, esta é a maneira de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica.

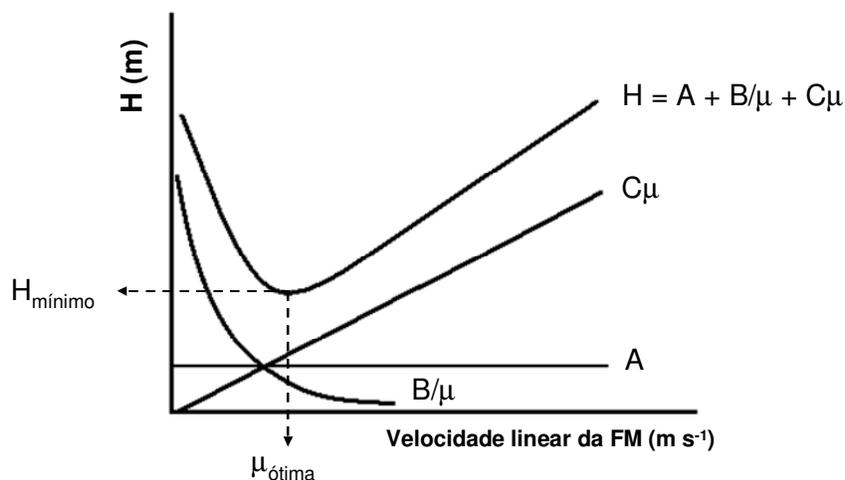


Figura 8. Curva de van Deemter hipotética mostrando a relação entre eficiência e velocidade linear média da fase móvel.

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é o preparo de novas FE, sorvidas e imobilizadas por tratamento térmico, de poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano) sobre sílica não modificada ou zirconizada, que apresentem alta eficiência, estabilidade química e reprodutibilidade. Definir, com base em testes físicos, químicos, e cromatográficos, as características das novas FE, sua seletividade, estabilidade química e campo de aplicação.

Para alcançar o objetivo geral, foram definidas as seguintes metas:

- 1) Obtenção da sílica zirconizada a partir da reação da sílica não modificada com tetrabutóxido de zircônio.
- 2) Caracterização das partículas de sílica zirconizada, empregando métodos físicos e químicos.
- 3) Preparo das fases estacionárias empregando o método de evaporação estática do solvente e imobilização por tratamento térmico do PDMFS sobre as partículas de sílica e sílica zirconizada.
- 4) Otimização das condições de imobilização das fases estacionárias para a obtenção de colunas com bom desempenho cromatográfico.
- 5) Caracterização físico-química e cromatográfica das fases estacionárias preparadas.
- 6) Avaliação da aplicabilidade das fases estacionárias na separação de diferentes classes de compostos.
- 7) Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias empregando condições alcalinas de fase móvel.

3. Parte Experimental

3.1 Reagentes e colunas

- Acenafteno, 99 %, Sigma-Aldrich
- Acetofenona, 99 %, Vetec
- Acetonaftileno, 99 %, Aldrich
- Ácido fosfórico, 85 %, Nuclear
- Ácido nítrico p.a., Synth
- Água deionizada, Milli-Q, Millipore
- Amitriptilina, 99 %, Aldrich
- Benomil, 99,4 %, Riedel-de Hæn
- Benzeno p.a., Synth
- Benzilamina, 99 %, Merck
- Benzoato de metila, Carlo Erba
- Benzonitrila, Riedel-de Hæn
- Butilbenzeno, 98 %, Merck
- Cafeína, 100 % USP, Sigma-Aldrich
- Cianazina, 98 %, Cyanamid
- Clorofórmio, grau HPLC, Tedia
- Coluna C18 Nova Pak[®], Waters, 4 µm, 150 mm x 3,9 mm d.i.
- Coluna Fenil-hexil Zorbax[®] Eclipse Plus, Agilent, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm d.i.
- Dextromertofano, 99 %, Sigma
- Diazepan, Medley
- Diclorometano, p.a., Tedia
- Diurom, 99,3 %, Du Pont
- Fenol, 99 %, Sigma-Aldrich
- Hidróxido de sódio, 97 %, Ecibra
- Isopropanol p.a., Tedia
- Levofloxacina, Medley
- Linurom, 99,5 %, Hoescht
- *m*-Cresol, 99 %, Merck
- Metanol, grau HPLC, Tedia
- N,N-dimetilanilina, 98 %, Fluka
- Naftaleno, Carlo Erba
- Nortriptilina, 98 %, Sigma
- *o*-Terfenila, 99 %, Merck
- Óxido de Zircônio, 99,9 %, Sigma-Aldrich
- *p*-Xileno, BDH Laboratory Supplies
- Paratiom, 99, 5 %, Du Pont
- Peneira molecular de 3 Å, Alfa Inorganics Ventron
- Pentilbenzeno, 98 %, Merck
- Pireno, 98 %, Aldrich
- Poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano) (PDMFS), Sigma-Aldrich
- Propilbenzeno, 98 %, Aldrich
- Sílica Kromasil, Akzo Nobel, partículas de 5 µm e diâmetro de poros de 11,1 nm
- Tebutiurom, 99,5 %, Chem Service
- Tetrabutóxido de Zircônio, 80 %, Sigma-

- Fluoranteno, 99 %, Aldrich Aldrich
- Fluoreno, 99 %, Aldrich • Tetraidrofurano, grau HPLC, Tedia
- Fosfato de dipotássio dibásico anidro, 99 %, Synth • Tolueno p.a., Merck
- Fostato de potássio monobásico anidro, 99 %, Synth • Trifenileno, 98 %, Fluka
- Hexametildissilazano (HMDS), 99 %, Fluka • Trimetilclorossilano (TMCS), 99 %, Fluka
- Uracila, 98 %, Sigma-Aldrich

3.2 Equipamentos

- Agitador do tipo vórtex, Phoenix, modelo AP56.
- Agitador magnético, Corning GlassWorks, modelo PC-351.
- Agitador rototorque, Cole Parmer, modelo 7637-01.
- Analisador elementar (CHN), Perkin Elmer, modelo 2400.
- Analisador termogravimétrico, TA Instruments, modelo TGA-2050.
- Balança analítica com precisão de 0,0001 g, Fisher Scientific, modelo A-250.
- Banho de ultrassom, Thornton, modelo T14.
- Banho ultratermostatizado, Marconi, MA-184.
- Centrífuga Fisher Scientific, modelo 225.
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu, constituído de bomba de alta pressão modelo LC-10AD; detector UV-Vis modelo SPD-10AV; forno de coluna CTO-10AS e injetor Rheodyne, modelo 7725i, com alça de amostragem de 5 µL; programa computacional de aquisição e tratamento de dados ChromPerfect Spirit versão 5.5.6, da Justice Laboratory (sistema utilizado em todas as análises cromatográficas, exceto nos estudos de estabilidade).
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu, constituído de bomba de alta pressão modelo LC-10AD; detector UV-Vis modelo SPD-10A; forno de coluna CTO-10AS; injetor automático Shimadzu, SIL-10AD e um sistema controlador SCL-10A; programa computacional de aquisição e tratamento de dados CLASS-VP, da Shimadzu (sistema cromatográfico utilizado para avaliação da estabilidade das colunas).

- Espectrômetro de absorção na região do infravermelho FT-IR Bomem MB Series, modelo 3102, utilizado para a análise das amostras em pastilha de KBr e das amostras líquidas (PDMFS).
- Espectrômetro de absorção na região do infravermelho FT-IR Nicolet 520, utilizado para a obtenção dos espectros de refletância difusa.
- Espectrofotômetro de absorção na região do UV-Vis, Varian, modelo CARY 5G, com acessório de refletância difusa.
- Espectrômetro de Fluorescência de Raios X, Shimadzu, modelo EDX-720, constituído por um tubo de Rh e um detector semiconductor de Si(Li).
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Bruker ASX 300 Avancell.
- Estufa a vácuo, Yamato, modelo ADP-21.
- Forno tubular, EDG, modelo 10P-S.
- Mandril, Shulz, modelo FSB, para polimento das colunas.
- Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol JMS 6360-Lv.
- pHmetro, Digimed modelo DM 21.
- pHmetro, Metrohm modelo 827 US.
- Porosímetro, Micrometrics, modelo ASAP 2010.
- Sistema de deionização de água, Milli-Q-Plus, Millipore.
- 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 51769.
- Sistema de extração em fluxo contínuo, constituído de bomba de alta pressão, Waters, modelo 510, para extração do excesso de polímero.

3.3 Suporte cromatográfico

Como suporte cromatográfico utilizou-se a sílica porosa Kromasil, da Akzo Nobel, tipo B, forma esférica, tamanho de partícula de 5 μm , tamanho de poro de 11,1 nm, lote 5052. Utilizou-se a sílica sem modificação de sua superfície e a sílica zirconizada, cujo preparo está descrito a seguir.

3.3.1 Preparo do suporte de sílica zirconizada

A síntese do suporte de sílica zirconizada foi dividida em duas etapas, na primeira foi promovida a ligação do reagente tetrabutóxido de zircônio à sílica, enquanto na segunda, fez-se a hidrólise dos grupos butóxidos que não reagiram com a sílica. O procedimento de metalização empregado foi o mesmo otimizado por Faria *et al.*³³, no qual se usaram: sílica não-ativada, tolueno, 5 h de reação sob temperatura de 40 °C e tetrabutóxido de zircônio.

Em um tubo de ensaio com rosca de vedação, foram colocados 2,5 g de sílica e 6,8 mL de tetrabutóxido de zircônio em 15 mL de tolueno previamente seco em peneira molecular de 0,3 nm. Essa mistura foi agitada em agitador vórtex até a sua homogeneização e depois foi transferida para um banho ultrassônico por 10 min, com a finalidade de eliminar bolhas de ar. Em seguida, o tubo contendo a mistura foi deixado em banho termostatizado a 40 °C por 5 horas. Durante este tempo de reação, o tubo foi retirado de 30 em 30 min para agitação no vórtex durante 5 min. Após o período no banho termostatizado, a sílica já zirconizada, mas não hidrolisada, foi centrifugada durante 15 min a 3400 G, e o sobrenadante foi descartado. Adicionaram-se 15 mL de tolueno anidro e agitou-se a mistura no vórtex até sua homogeneização. A mistura foi deixada no ultrassom por 3 min e centrifugada até deposição completa do material. Esta sequência foi repetida por 4 vezes, com o objetivo de se eliminar todo o tetrabutóxido de zircônio que não reagiu durante as 5 horas.

A segunda etapa do preparo do suporte consistiu na hidrólise do material para eliminação dos íons tetrabutóxido da superfície. O tolueno foi evaporado com auxílio de um fluxo de N₂ e em seguida foram adicionados 20 mL de HNO₃ 1 x 10⁻³ mol L⁻¹. A mistura foi submetida à agitação no vórtex e ultrassom por 3 min, ficando em repouso por 15 min, em seguida, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante removido. O próximo passo consistiu na lavagem do material com água, agitação no vórtex e centrifugação. A sílica zirconizada foi seca em estufa a 120 °C por 17 h. Em seguida, repetiu-se todo o procedimento de metalização, sobre a mesma alíquota de sílica, para a obtenção da dupla camada de zircônio.

3.4 Fase estacionária líquida

Como fase estacionária líquida foi empregado o copolímero do tipo fenil poli[dimetilsiloxano(48-52 %)-co-metilfenilsiloxano(52-48 %)] (PDMFS), 550® fluid, Sigma-Aldrich, código do produto 37848-8, lote 01113TU, viscosidade 125 cSt (25 °C) e densidade 1,065 g mL⁻¹ (25 °C).

3.5 Colunas cromatográficas

As colunas utilizadas neste trabalho apresentam, em média, 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 9¹⁸. 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.

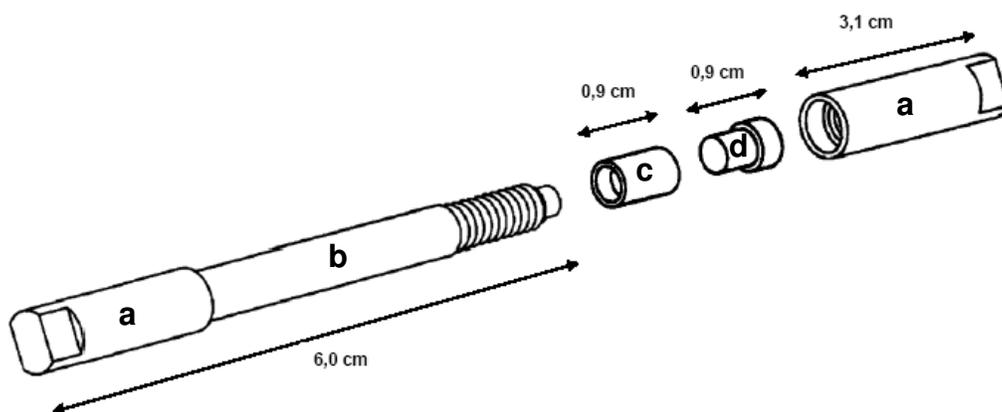


Figura 9. Coluna cromatográfica e suas conexões. a) porcas terminais, b) corpo da coluna, c) manga com filtro retentor e d) redutor de fluxo.

As paredes internas das colunas foram polidas usando a técnica desenvolvida no LabCrom, por Collins *et al.*⁸⁵. Esta etapa do trabalho é necessária para garantir que a superfície interna contribua para melhor fluidez da FM durante o enchimento das colunas, bem como durante as análises, assegurando uma boa eficiência

cromatográfica. 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. O processo de polimento foi aplicado até a obtenção de uma superfície interna livre de imperfeições. Após o polimento, os tubos foram lavados com detergente e água para remoção do excesso de pasta de polimento. Finalmente, as colunas foram deixadas em ácido nítrico 50 % (v/v) por 24 horas e lavadas com água e etanol, para garantir sua limpeza completa.

3.6 Preparo das fases estacionárias

3.6.1 Sorção do polímero sobre o suporte

A sorção do polímero à superfície e aos poros do suporte, tanto da sílica não-modificada como da sílica zirconizada, foi feita utilizando-se o método de evaporação estática do solvente⁶. Para isso, preparou-se, separadamente, uma suspensão de sílica, previamente ativada em estufa a 150 °C por 16 horas, e uma solução do polímero, ambas em diclorometano, na proporção de 10 mL de solvente para cada grama de material. A solução do polímero 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 10 minutos, sonicada por mais 10 minutos, agitada durante 3 horas e deixada em repouso na capela por 6 dias, para que o solvente evaporasse lentamente. A carga de polímero utilizada foi calculada a partir do produto de densidade do PDMFS ($\rho = 1,065 \text{ g mL}^{-1}$) e do volume total de poros do suporte (sílica não modificada $V_p = 0,86 \text{ mL g}^{-1}$ e sílica zirconizada $V_p = 0,72 \text{ mL g}^{-1}$), $X = \rho_{\text{PDMFS}} \times V_p$, em que X representa a quantidade mínima de PDMFS necessária para preencher todos os poros da sílica. Fazendo-se os cálculos, os valores obtidos foram 48 % de PDMFS para a sílica não-modificada e 43 % para a sílica zirconizada, sendo assim, utilizando excesso de PDMFS de 2 %, prepararam-se FE com cargas de polímero de 50 % sobre a sílica pura e 45 % sobre a sílica metalizada.

Após a sorção do PDMFS ao suporte, o material foi submetido ao procedimento de imobilização por tratamento térmico. Esta etapa se faz necessária, pois aumenta a intensidade da interação do polímero com o suporte, evitando a sua lixiviação com a passagem contínua de fase móvel.

3.6.2 Imobilização térmica

Para o tratamento térmico, cerca de 2 g de FE com o PDMFS sorvido foram colocadas em um béquer de 50 mL e este foi levado à estufa para a imobilização do polímero sobre o suporte.

Com base nos resultados apresentados por Lourenço⁸⁶, as FE foram preparadas sobre o suporte de sílica não modificada, variando-se o tempo e a temperatura de imobilização, a fim de se determinar as condições que fornecessem FE com melhores desempenhos cromatográficos. As diferentes condições de imobilização térmica empregadas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Experimentos realizados empregando-se diferentes condições de tempo e temperatura de imobilização das FE.

Experimentos	Condições de imobilização	
	Temperatura (°C)	Tempo (h)
1	130	4
2	150	4
3	130	8
4	150	8
5	140	6
6	140	6
7	140	6

3.6.3 Extração do excesso de polímero

A quantidade de polímero que não se imobiliza ao suporte deve ser removida antes do enchimento da coluna cromatográfica, a fim de se obter uma camada fina do

polímero sobre o suporte, resultando em maiores velocidades de transferência de massa do soluto entre a FM e a FE e, conseqüentemente, maior eficiência.

A extração das FE foi feita no sistema de extração com fluxo contínuo, citado no item 3.2, empregando a seguinte seqüência de solventes e os respectivos tempos de eluição: 1) clorofórmio durante 3 horas e 2) metanol durante 2 horas. Estes solventes foram bombeados, a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, através da fase contida em um tubo de aço inoxidável (comprimento 80 mm, diâmetro interno 13 mm). Esta seqüência de solventes vem sendo empregada no LabCrom para o preparo das FE a base de polissiloxanos fenil substituídos^{62,86}.

Após a extração, a fase estacionária foi retirada do reservatório, transferida para um bquer e deixada em capela sob fluxo de N_2 para evaporação do solvente. Após esta etapa, uma parte da FE foi submetida à reação de capeamento, enquanto as demais partes foram analisadas por técnicas de caracterização físico-química e preparadas para o enchimento das colunas para avaliação cromatográfica.

3.6.4 Capeamento

A reação de capeamento das FE foi feita após a imobilização do PDMFS buscando-se uma melhor proteção dos grupos -OH dos suportes de sílica e sílica zirconizada. Para isto, em um balão tritubulado de 500 mL foram adicionados 5,0 g de FE previamente seca em estufa durante 12 h e 100 mL de tolueno anidro (seco em peneira molecular). A este balão foi conectado um sistema para refluxo em atmosfera inerte (gás N_2), conforme ilustrado na Figura 10. Ao balão contendo a solução de FE em tolueno foram adicionados 35 mL de trimetilclorossilano (TMCS) e 15 mL de hexametildissilazano (HMDS). Esta mistura foi mantida sob agitação branda em temperatura de refluxo do tolueno ($\sim 110 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 48 h. Após este período, a solução foi transferida do balão para um funil de placa porosa nº. 4 para filtração, sob vácuo, do material sólido. O material foi submetido a etapas de lavagens sequenciais com aproximadamente 25 mL de tolueno, 25 mL de isopropanol, 25 mL de metanol e 25 mL de metanol:água 1:1 (v/v) para remoção dos resíduos dos reagentes. Em seguida, a FE capeada [Si(PDMFS)ec ou SiZr(PDMFS)ec] foi transferida quantitativamente para um frasco e este foi mantido em estufa a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por

6 h para a volatilização dos solventes. A Figura 10 apresenta o sistema utilizado para a reação de capeamento.



Figura 10. Sistema de refluxo para a reação de capeamento.

As diferentes FE preparadas neste trabalho foram denominadas de acordo com a terminação a seguir:

PDMFS imobilizado sobre sílica não modificada: **Si(PDMFS)**

PDMFS imobilizado sobre sílica zirconizada: **SiZr(PDMFS)**

PDMFS imobilizado sobre sílica não modificada, capeada: **Si(PDMFS)ec**

PDMFS imobilizado sobre sílica zirconizada, capeada: **SiZr(PDMFS)ec**

3.7 Testes com outro polissiloxano fenil substituído - poli(metilfenilsiloxano) (PMFS)

O polissiloxano escolhido inicialmente para o desenvolvimento deste trabalho foi o poli(metilfenilsiloxano) (PMFS), empregado anteriormente por Fioravanti⁶² para o preparo de fases estacionárias para CLAE-FR.

A estrutura do poli(metilfenilsiloxano) está mostrada na Figura 11.

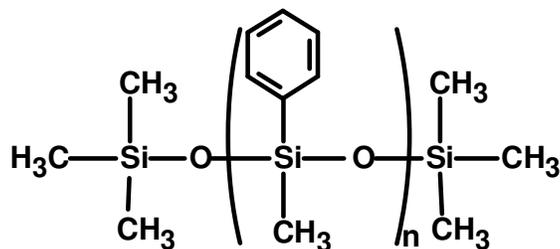


Figura 11. Fórmula estrutural do poli(metilfenilsiloxano).

Algumas fases estacionárias foram preparadas no início trabalho a partir do PMFS. O procedimento de preparo destas fases, empregando suporte de sílica não modificada, foi o mesmo descrito anteriormente para o PDMFS, com mudanças apenas nas temperaturas e tempos empregados para o tratamento térmico. Apesar de alguns bons resultados terem sido obtidos com as FE preparadas a partir do PMFS, estas fases apresentaram problemas de repetibilidade durante a avaliação das melhores condições de imobilização térmica do polímero.

Antes de se optar pela troca do polissiloxano, vários testes foram feitos buscando-se solucionar o problema da repetibilidade das FE. Primeiramente fez-se a troca do equipamento utilizado para o tratamento térmico das FE, que inicialmente estava sendo feito em um forno tubular e, após o problema, passou a ser feito em uma estufa. Os outros testes envolveram a troca do lote de PMFS e a troca do diclorometano, neste caso, foram empregados solventes de diferentes fabricantes e graus de pureza, e o problema da repetibilidade persistiu. Alguns resultados obtidos empregando-se as FE preparadas a partir do PMFS estão apresentados no item 4.1.

3.8 Caracterização físico-química da sílica não modificada, da sílica zirconizada, do PDMFS e das fases estacionárias

A sílica pura, a sílica zirconizada, o PDMFS e as diferentes FE preparadas foram caracterizadas de acordo com os procedimentos descritos a seguir.

3.8.1 Análise elementar (porcentagem de carbono)

Todas as FE preparadas foram submetidas à análise elementar para a determinação da porcentagem de carbono, a fim de se avaliar o grau de recobrimento

efetivo do suporte cromatográfico pelo PDMFS. As análises foram realizadas em duplicatas, utilizando-se 1 mg de amostra adicionada a 1 mg de mistura oxidante composta de Pb_2O_4 e NaF, na proporção 1:1 (m/m).

Sabendo-se que o PDMFS contém 52,4 % (m/m) de carbono, as porcentagens de carbono obtidas por análise elementar foram convertidas em porcentagens de PDMFS pela equação 9:

$$\%PDMFS = \frac{\%C \times 100}{52,4} \quad (9)$$

Além disso, as porcentagens de carbono também foram convertidas em massa de polímero (m_{PDMFS}) por grama do suporte ($m_{suporte}$), denominado de massa específica (\bar{m}_{PDMFS}) de acordo com a equação 10:

$$\bar{m}_{PDMFS} = \frac{m_{PDMFS}}{m_{suporte}} = \frac{\%C}{52,4 - \%C} \quad (10)$$

Através dos resultados obtidos com a massa específica, pode-se estimar o grau do recobrimento de PDMFS no suporte de sílica. Para tal, calculou-se a espessura da camada polimérica (τ) depositada na superfície e nas paredes dos poros do suporte cromatográfico, empregando a equação 11:

$$\tau = - \left(\frac{\sqrt{d^2 - Fd^2} - d}{2} \right) \quad (11)$$

onde F é a fração de polímero imobilizado e d é o diâmetro médio do poro da sílica. Para tal assume-se que os poros do suporte possuem diâmetros uniformes e que o polímero imobilizado é caracterizado por uma camada de espessura constante nas paredes dos poros do suporte.

O valor de F foi determinado a partir da equação 12:

$$F = \frac{\bar{m}_{POLÍMERO\text{imobilizado}}}{\bar{m}_{POLÍMERO\text{poros cheios}}} \quad (12)$$

A massa de polímero necessária para encher os poros do suporte, $\bar{m}_{POLÍMERO\text{poros cheios}}$, foi determinada a partir do volume específico de poro da sílica, $Vp_{suporte} = 0,86 \text{ mL g}^{-1}$ para a sílica não modificada e $Vp_{suporte} = 0,72 \text{ mL g}^{-1}$ para a sílica

zirconizada, e da densidade do polímero, para o PDMFS $\rho = 1,065 \text{ g mL}^{-1}$ conforme apresentado na equação 13:

$$\bar{m}_{PDMFS_{poroscheios}} = V_{P_{sup\,orte}} \times \rho_{POLÍMERO} \quad (13)$$

Portanto, para o suporte de sílica, a \bar{m}_{PDMFS} é igual a 0,92 g de PDMFS por g de suporte, e para a sílica zirconizada \bar{m}_{PDMFS} é igual a 0,77 g de PDMFS por g de suporte metalizado.

3.8.2 Microscopia eletrônica de varredura

Empregou-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar a morfologia das partículas do suporte cromatográfico.

As partículas de sílica ou sílica zirconizada foram fixadas no suporte de amostra por meio de uma fita dupla face de carbono e em seguida foram recobertas com uma fina camada de ouro. A superfície, contendo a amostra e o ouro, foi bombardeada com átomos de argônio, sob alto vácuo, por 120 s, para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. As fotomicrografias das partículas foram obtidas com resoluções de 2.000 até 10.000 vezes.

3.8.3 Espectroscopia de fluorescência de raios X

Por meio da espectroscopia de fluorescência de raios X (FRX) é possível avaliar a quantidade de zircônio incorporada sobre a superfície de sílica. Para isso, foi construída uma curva analítica, na qual cada ponto foi obtido a partir da análise de 100 mg de padrão contendo uma mistura de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$, na faixa de concentração de 0 a 40 % de zircônio em massa. A concentração de zircônio no suporte preparado foi determinada a partir da análise de 100 mg de amostra. Para a análise por FRX, a mistura de padrão e as amostras de suporte foram dispostas em celas Chemplex 1300, sustentadas por filme de Mylar[®] (Chemplex 100) com 2,5 μm de espessura. As medidas foram feitas em triplicata. A voltagem aplicada no tubo de raios X foi de 50 kV, corrente de 50 μA , colimador de 10 mm, com 25 % de tempo morto do detector. Os espectros foram obtidos de 0 a 40 keV. O tempo de irradiação foi de 300 s.

3.8.4 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis com refletância difusa

O suporte de sílica zirconizada foi analisado na região do UV-vis, na faixa de comprimento de onda 190-800 nm. Os espectros foram obtidos utilizando-se o acessório de refletância difusa, devido ao fato da grande área superficial das partículas de sílica provocar perturbações no espectro de absorção, resultantes do espalhamento de luz. Utilizou-se o sulfato de bário (BaSO_4) como refletância padrão, devido ao baixo nível de ruído apresentado. O espectro da amostra de sílica metalizada foi comparado com os espectros da sílica não modificada e de uma amostra de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$, preparada pela simples mistura dos dois óxidos em agitador vórtex.

3.8.5 Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros

Os valores de área superficial específica, volume e diâmetro de poros da sílica não modificada, da sílica zirconizada e das FE foram obtidos por meio da adsorção e dessorção de nitrogênio a $-195,5\text{ }^\circ\text{C}$. Previamente às análises, fez-se a degaseificação das amostras a $100\text{ }^\circ\text{C}$, por 24 h, sob vácuo. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET⁸⁷ a pressões relativas (p/p_0) entre 0,06 e 0,25, em que p e p_0 representam pressão de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a $-195,5\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. O cálculo do volume total de poro foi feito pelo método do ponto único, convertendo-se o volume de nitrogênio adsorvido na p/p_0 de 0,995 para o volume de adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poro e da área superficial BET ($4 V_p/S_{\text{BET}}$).

3.8.6 Termogravimetria

A estabilidade térmica dos suportes de sílica não modificada e zirconizada, do PDMFS e das fases estacionárias não capeadas foi avaliada por meio da termogravimetria (TGA). Estes experimentos foram feitos em um analisador termogravimétrico, sob atmosfera oxidante, empregando uma vazão de 100 mL min^{-1} de O_2 , de 25 a $1000\text{ }^\circ\text{C}$, a uma velocidade de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Para todas as análises, utilizaram-se cerca de 12 mg de material, em suporte de amostra de Al_2O_3 .

As curvas TGA foram obtidas em porcentagem de perda de massa em função da temperatura, e as curvas DTG (derivada termogravimétrica) representam a taxa de variação de massa em função da variação da temperatura, ou seja, a derivada da massa em relação à temperatura (dm/dT).

3.8.7 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos na faixa 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 suporte foram obtidos empregando-se pastilhas de KBr na concentração de 1 % (m/m) e os espectros das FE foram obtidos utilizando o acessório de refletância difusa, e também por meio de pastilhas de KBr. Para as amostras líquidas (PDMFS), foram obtidos espectros de transmissão utilizando-se uma janela de NaCl.

3.8.8 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de silício-29 (RMN ^{29}Si)

Os espectros de RMN de ^{29}Si 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.

Estas análises foram feitas para avaliar possíveis alterações químicas causadas na superfície da sílica após a metalização e após a imobilização do PDMFS.

3.9 Enchimento das colunas cromatográficas

3.9.1. Suspensão da fase estacionária

A suspensão da fase estacionária foi preparada em clorofórmio, por ser um solvente adequado para esta finalidade, prevenindo a aglomeração de partículas da fase estacionária e a sedimentação das mesmas.

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). As suspensões ficaram em agitação, num agitador roto-torque, por períodos que variaram de 14 a 16 horas.

3.9.2. Recheio das colunas com a fase estacionária

O sistema utilizado para o recheio das colunas está representado¹⁸, de forma simplificada, na Figura 12.

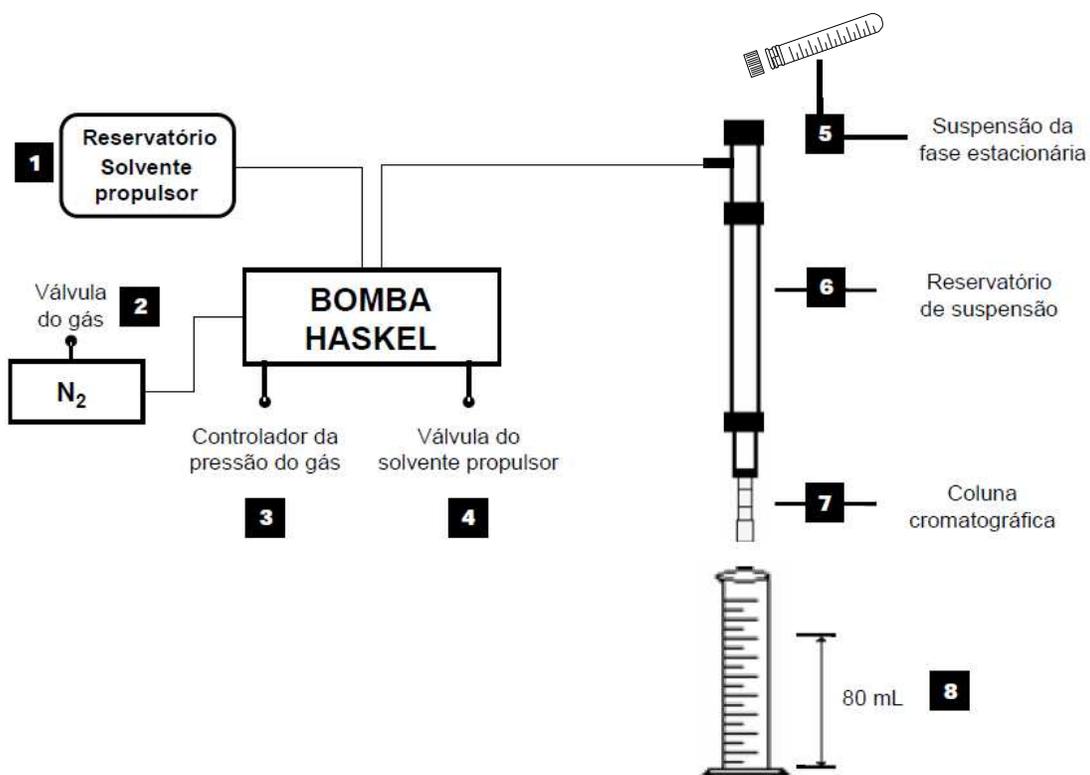


Figura 12. Representação do sistema de enchimento das colunas.

- Inicialmente, abre-se a válvula do nitrogênio (2);
- Em seguida, abre-se a válvula de controle da pressão do gás (3) até se obter a pressão desejada para o enchimento, neste estudo, 6000 psi. A pressurização é obtida através de uma bomba pneumática da marca Haskel;

- Conecta-se na parte inferior do reservatório de suspensão (6) a coluna (7) contendo um filtro retentor poroso e as peças terminais em sua extremidade oposta, para evitar a perda da fase estacionária;
- Com o uso de um funil, transfere-se a suspensão de fase estacionária (5), contida em um tubo com rosca de vedação, para o reservatório, completa-se o volume com clorofórmio e imediatamente fecha-se a entrada superior do reservatório;
- Abre-se a válvula do solvente (4) para a passagem de 80 mL do solvente propulsor (metanol previamente filtrado), que é recolhido em uma proveta (8) colocada abaixo da saída da coluna;
- Após a passagem de 80 mL, fecha-se a válvula do solvente (4);
- Desconecta-se a coluna do reservatório e na extremidade superior da coluna são conectados seus acessórios restantes;
- Fecha-se, na sequência, as válvulas de controle da pressão do gás (3) e a válvula do nitrogênio (2)

Após os devidos testes, as colunas foram esvaziadas neste mesmo sistema, no entanto, aplicando-se uma pressão de 3000 psi, ao invés de 6000 psi. Para isto, a coluna foi acoplada ao reservatório de suspensão, sem nenhum acessório em suas extremidades, para permitir o deslocamento da fase contida no seu interior. O reservatório de suspensão foi completado com metanol, a seguir, fechado e a válvula controladora do solvente propulsor (metanol) foi aberta, deixando-a deste modo até a completa retirada da fase contida na coluna. Após esta etapa, a coluna foi retirada e lavada com água e detergente juntamente com seus acessórios. Após a lavagem com água e detergente, todos os acessórios e a coluna foram lavados com água deionizada e, em seguida, colocados no ultrassom com isopropanol por aproximadamente 10 minutos, para garantir a retirada de toda a sílica e a desobstrução dos poros dos filtros.

3.10 Preparo da fase móvel

Todos os solventes empregados no preparo da fase móvel foram filtrados em uma membrana GV (Durapore), 0,22 μm de poro, 47 mm de diâmetro, hidrofílica (GVWP04700 – Millipore) para eliminar as impurezas sólidas. Os volumes dos solventes que compõem a fase móvel foram medidos individualmente, com o auxílio de

uma proveta e, a seguir, misturados em um frasco de vidro. Após a preparação e também rotineiramente antes da sua utilização, as fases móveis foram desgaseificadas em ultrassom por 30 minutos.

3.11 Condicionamento das colunas cromatográficas

O condicionamento das colunas após o enchimento é necessário para eliminar qualquer resquício do polímero e dos solventes usados no enchimento e para que se obtenha equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel, garantindo a repetibilidade nos tempos de retenção dos compostos eluídos. O condicionamento da coluna foi feito no cromatógrafo, sem acoplá-la ao detector, para evitar que partículas provenientes da coluna pudessem obstruir a tubulação de entrada ou a saída do detector ou, principalmente, a cela de detecção.

No condicionamento das colunas, após recheio, foram utilizadas as fases móveis na vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, durante 2 horas.

3.12 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias

A avaliação cromatográfica das fases estacionárias foi feita por meio do cálculo dos parâmetros cromatográficos dos compostos eluídos de misturas teste sintéticas. 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) de 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, em valores de comprimentos de onda adequados para cada separação. Utilizou-se sempre o mesmo volume de amostra injetado, que foi de $5 \mu\text{L}$. Inicialmente, a vazão utilizada foi de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ e foi definida com base em outros estudos desenvolvidos no LabCrom^{2,18,62,86}. Após a obtenção de uma FE com desempenho cromatográfico satisfatório, foi construída a curva de van Deemter, para a determinação da vazão ótima.

3.12.1 Misturas testes usadas para a avaliação cromatográfica

Para a avaliação cromatográfica das colunas, foram utilizadas diferentes misturas testes, descritas a seguir com as respectivas fases móveis:

Misturas teste 1 e 2

- 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 a hidrofobicidade das FE na separação de compostos neutros de polaridades diferentes: polares (benzonitrila) e apolares (benzeno, tolueno e naftaleno). Todas as FE preparadas foram avaliadas a partir da separação desta mistura teste como uma forma de se analisar a qualidade do enchimento das colunas cromatográficas.

A mistura 2 foi utilizada para avaliar o comportamento das fases diante de compostos de caráter ácido (fenol), básico (N,N-dimetilanilina), neutros e apolares (naftaleno e acenafteno), fornecendo informações sobre a acidez e a polaridade das fases estacionárias.

As duas misturas foram preparadas qualitativamente em fase móvel metanol:água, na proporção 55:45 (v/v) e armazenadas em geladeira.

As fórmulas estruturais dos compostos que constituem as misturas teste 1 e 2 estão apresentadas na Figura 13.

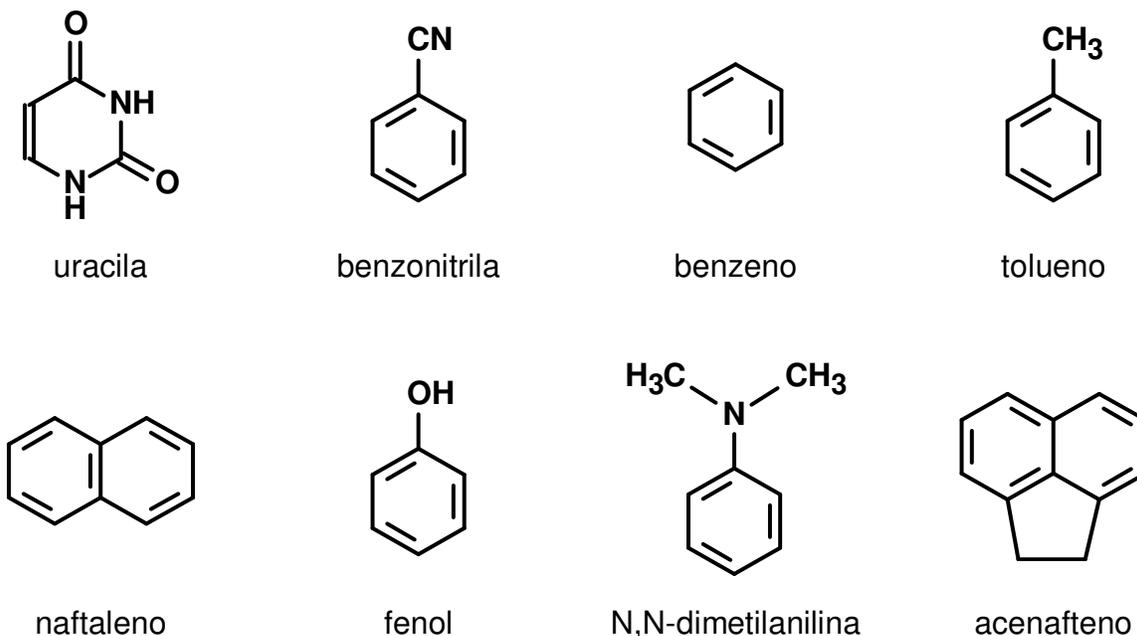


Figura 13. Fórmulas estruturais dos compostos que constituem as misturas teste 1 e 2.

Alguns testes cromatográficos têm sido discutidos na literatura^{88,89,90,91} buscando uma caracterização geral que permita comparar as diferentes propriedades de uma determinada FE com outra específica ou em relação aos valores encontrados na literatura. Neste trabalho, foram utilizados os testes sugeridos por Tanaka e colaboradores⁸⁸ e um teste de seletividade aromática sugerido por Horak e Lindner⁹² que se baseia em valores obtidos a partir da separação de misturas do protocolo de Tanaka.

Misturas teste de Tanaka

No teste de Tanaka⁸⁸, quatro misturas foram utilizadas, sendo que cada uma emprega uma composição de fase móvel específica. As misturas foram analisadas a 30 °C, conforme sugerido pelos autores do teste, empregando uma vazão ótima de fase móvel de 0,3 mL min⁻¹. As misturas e as respectivas fases móveis são:

Mistura A: uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, o-terfenila e trifenileno.

- FM: metanol:água, 80:20 (v/v), detecção a 254 nm.

Mistura B: uracila, cafeína e fenol.

- FM: metanol:água, 30:70 (v/v), detecção a 254 nm.

Mistura C: uracila, benzilamina e fenol.

- FM: metanol:20 mmol L⁻¹ de K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,6, 30:70 (v/v), detecção a 220 nm.

Mistura D: uracila, benzilamina e fenol.

- FM: metanol:20 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,7, 30:70 (v/v), detecção a 220 nm.

A partir do teste de Tanaka, foi possível avaliar as seguintes propriedades das FE:

✓ Hidrofobicidade (k_{PB}) – Medida a partir do fator de retenção do pentilbenzeno, reflete a área superficial e o recobrimento da fase.

✓ 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 da fase, pois a seletividade entre alquilbenzenos, diferenciados por um grupo CH₂, 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 pelo espaçamento dos ligantes e também pela funcionalidade do polímero.

✓ 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 silanofílica total da FE.

✓ 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.

✓ Seletividade aromática ($\alpha_{PB/O}$) – Horak e Lindner⁹² sugeriram que a razão entre os fatores de retenção do pentilbenzeno e da *o*-terfenila, da mistura A, fornece uma indicação da capacidade da fase estacionária em realizar interações π - π com compostos aromáticos.

As fórmulas estruturais dos compostos que constituem as misturas teste de Tanaka estão apresentadas na Figura 14.

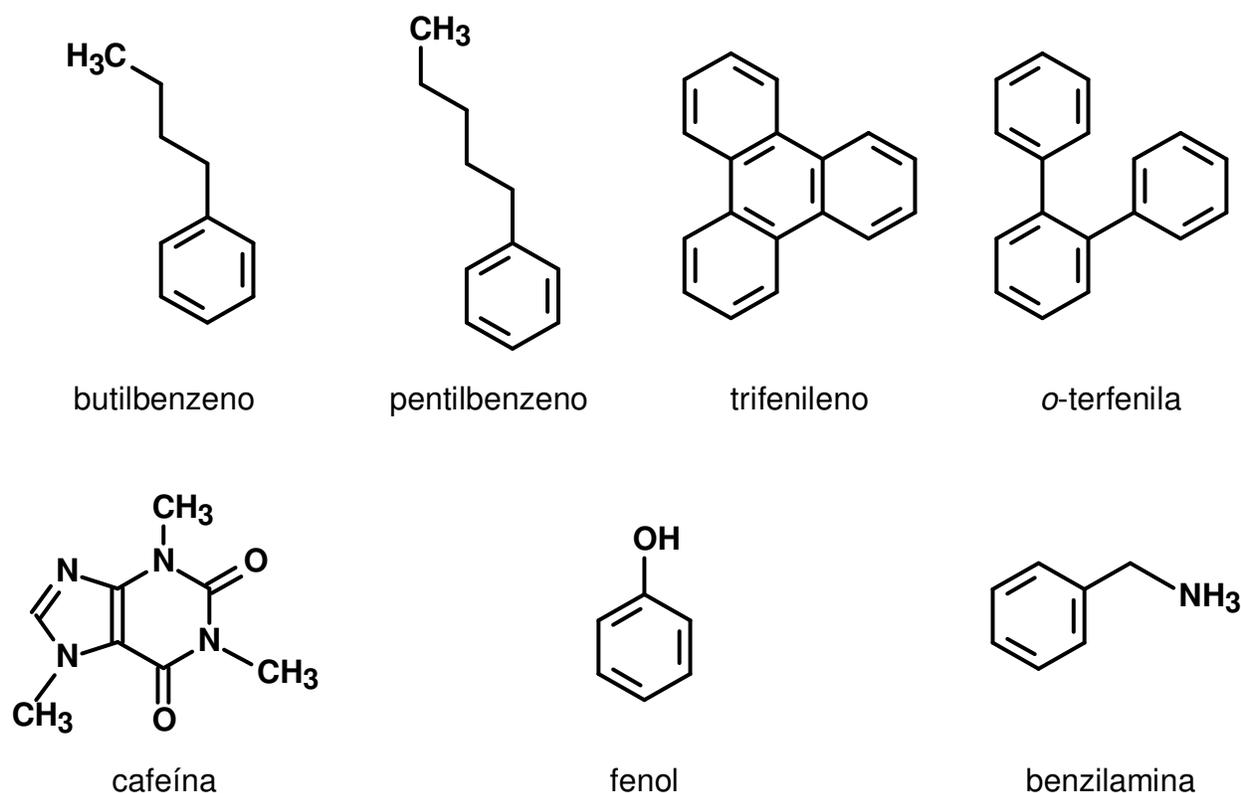


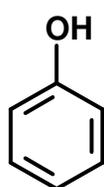
Figura 14. Fórmulas estruturais dos compostos que constituem as misturas teste de Tanaka.

A uracila é adicionada em todas as misturas-teste para se obter o t_M , tempo necessário para que a fase móvel passe através de todo o sistema cromatográfico, essencial para o cálculo dos parâmetros cromatográficos.

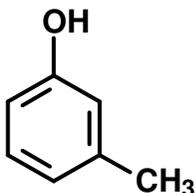
3.12.2 Avaliação da aplicabilidade das FE preparadas - comparação com colunas comerciais

A aplicabilidade das FE preparadas foi avaliada a partir da separação de misturas contendo compostos de diferentes classes, como compostos aromáticos de polaridades distintas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, agrotóxicos e fármacos. Para isto, foram empregadas colunas cromatográficas de 60 mm de comprimento x 4,0 mm de diâmetro interno, contendo as FE preparadas ao longo do trabalho.

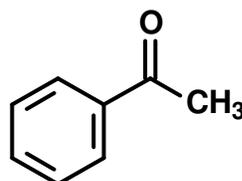
Todas as FE preparadas foram empregadas na separação de uma mistura de compostos aromáticos, sugerida por Szabó *et al.*⁷⁷, e o desempenho destas FE foi comparado com o desempenho de duas colunas comerciais: coluna 1) C18 Nova Pak[®], Waters, 4 µm, 150 mm x 3,9 mm d.i.; coluna 2) fenil-hexil Zorbax[®] Eclipse Plus, Agilent, 5 µm, 150 mm x 4,6 mm d.i.. Os compostos que constituem esta mistura são: uracila (1 mg L⁻¹), fenol (20 mg L⁻¹), *m*-cresol (20 mg L⁻¹), acetofenona (30 mg L⁻¹), benzoato de metila (30 mg L⁻¹), tolueno (30 mg L⁻¹), *p*-xileno (30 mg L⁻¹) e propilbenzeno (40 mg L⁻¹), cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 15.



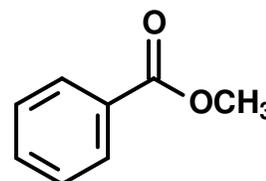
fenol



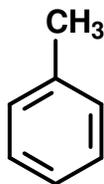
m-cresol



acetofenona



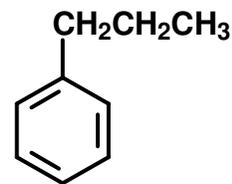
benzoato de metila



tolueno



p-xileno



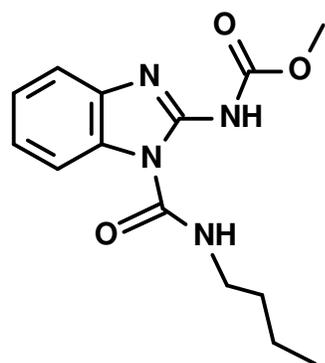
propilbenzeno

Figura 15. Fórmulas estruturais dos compostos aromáticos estudados.

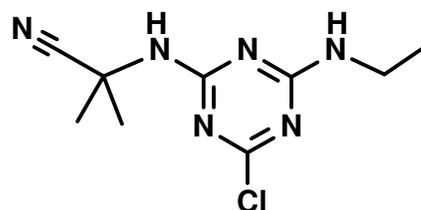
Para a separação destes compostos, empregou-se a fase móvel metanol:água (55:45 v/v), a vazão de 0,3 mL min⁻¹ nas colunas preparadas no laboratório e 1,0 mL min⁻¹ nas colunas comerciais, temperatura de 25 °C e detecção a 254 nm. Os compostos aromáticos foram analisados individualmente para determinação do tempo de retenção, e então, foi preparada a mistura com adição de todos eles, em fase móvel metanol:água (55:45 v/v).

A FE SiZr(PDMFS)_{ec} e a coluna comercial fenil-hexil Zorbax[®] foram aplicadas na separação de uma mistura de agrotóxicos, contendo os seguintes compostos: benomil (3,0 mg L⁻¹), cianazina (3,0 mg L⁻¹), tebutiurrom (3,0 mg L⁻¹), paratiom (3,0 mg L⁻¹), linurom (3,0 mg L⁻¹) e diurom (3,0 mg L⁻¹). As fórmulas estruturais dos compostos estão apresentadas na Figura 16.

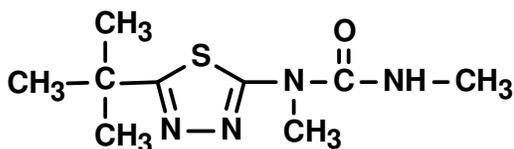
Para a separação dos agrotóxicos, empregou-se a fase móvel metanol:água (50:50 v/v), a vazão de 0,3 mL min⁻¹ na coluna preparada no laboratório e 1,0 mL min⁻¹ na coluna comercial; temperatura de 25 °C e detecção a 220 nm. Os compostos foram analisados individualmente para determinação do tempo de retenção, e então, foi preparada a mistura com adição de todos eles, em fase móvel metanol:água (50:50 v/v).



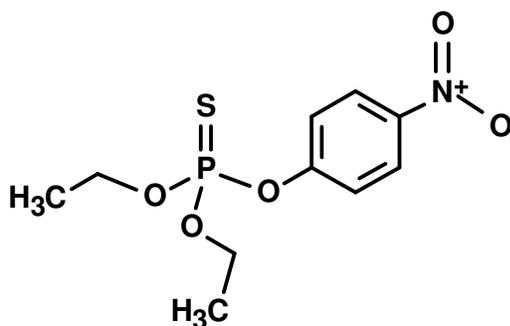
benomil



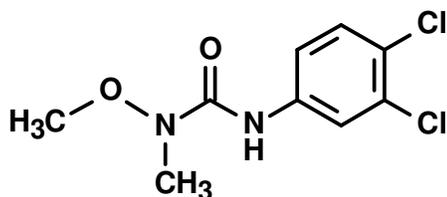
cianazina



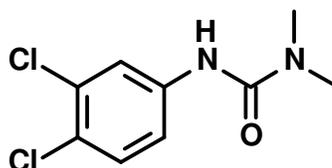
tebutiurom



paratiom



linurom



diurom

Figura 16. Fórmulas estruturais dos agrotóxicos analisados.

As colunas SiZr(PDMFS)ec e a coluna comercial fenil-hexil também foram aplicadas na separação de uma mistura contendo benzeno (30 mg L^{-1}) e 8 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA): naftaleno (30 mg L^{-1}), acenaftileno (50 mg L^{-1}), acenafteno (30 mg L^{-1}), fluoreno (10 mg L^{-1}), fenantreno (30 mg L^{-1}),

antraceno (30 mg L⁻¹), fluoranteno (30 mg L⁻¹) e pireno (30 mg L⁻¹). As fórmulas estruturais destes compostos estão apresentadas na Figura 17.

Para a separação dos HPA, empregou-se a fase móvel metanol:água (55:45 v/v), a vazão de 0,3 mL min⁻¹ na coluna preparada no laboratório e a fase móvel metanol:água (65:35 v/v) a 1,0 mL min⁻¹ na coluna comercial; temperatura de 25 °C e detecção a 262 nm. Os compostos foram analisados individualmente para determinação do tempo de retenção, e então, foi preparada a mistura com adição de todos eles, em fase móvel metanol:água (55:45 v/v).

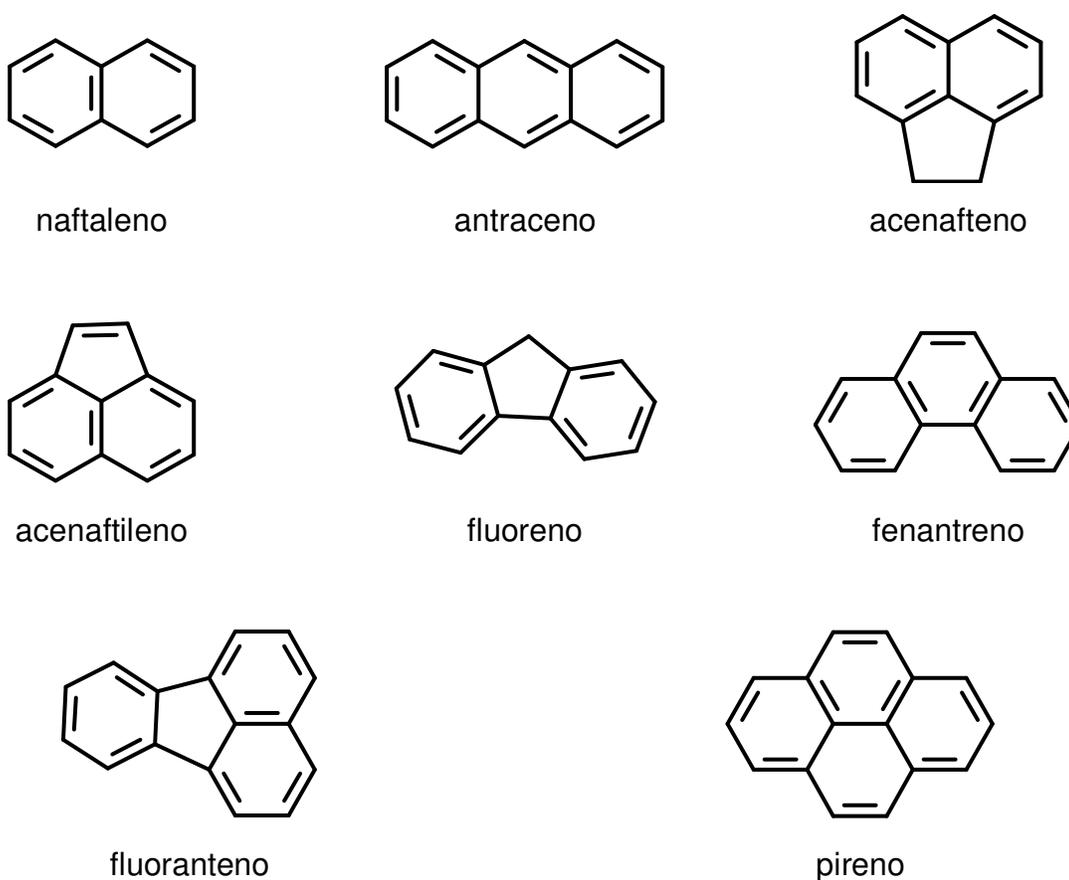
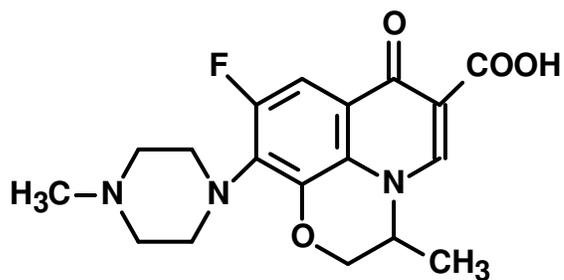


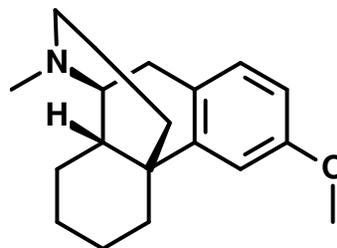
Figura 17. Fórmulas estruturais dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos estudados.

As FE Si(PDMFS) e Si(PDMFS)ec foram empregadas na separação de alguns fármacos que costumam apresentar forte interação com os grupos silanóis residuais das FE a base de sílica⁹³. Estes mesmos fármacos foram analisados empregando-se

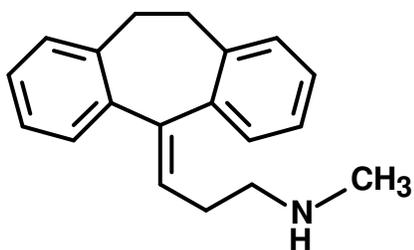
as duas colunas comerciais citadas anteriormente. Os fármacos escolhidos foram: levofloxacina ($5,0 \text{ mg L}^{-1}$), dextrometorfano (10 mg L^{-1}), nortriptilina ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), amitriptilina ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) e diazepam (15 mg L^{-1}), cujas formulas estruturais estão apresentadas na Figura 18.



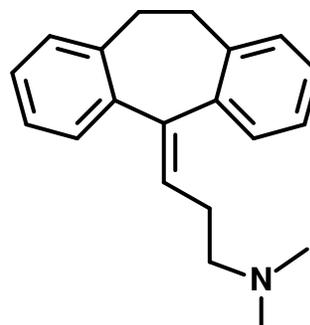
levofloxacina



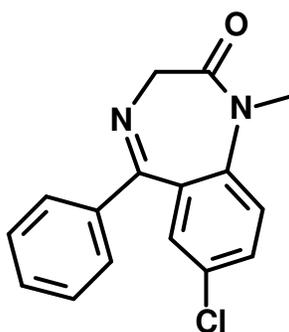
dextrometorfano



nortriptilina



amitriptilina



diazepam

Figura 18. Fórmulas estruturais dos fármacos estudados.

Para a separação destes fármacos, empregou-se a fase móvel metanol:KH₂PO₄/H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹ pH 2,7 (50:50 v/v), a vazão de 0,3 mL min⁻¹ nas colunas preparadas no laboratório e 1,0 mL min⁻¹ nas colunas comerciais, temperatura de 25 °C e detecção a 220 nm. Os fármacos foram analisados individualmente para determinação do tempo de retenção, e então, foi preparada a mistura com adição de todos eles, em fase móvel metanol:água (50:50 v/v).

3.13 Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias

A estabilidade química das FE foi avaliada em condição alcalina de fase móvel, metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ pH 10,0 (55:45 v/v), a partir do monitoramento de parâmetros cromatográficos, como eficiência, fator de assimetria calculado a 10 % da altura do pico e fator de retenção para o composto mais retido da mistura teste 2 (acenafteno). Para isso, a FM foi eluída através das colunas contendo as FE a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, empregando temperatura de 50 °C. O pH da solução aquosa de tampão carbonato foi medido previamente à adição do solvente orgânico. As colunas foram avaliadas periodicamente quanto ao seu comportamento cromatográfico a partir da separação da mistura teste 2, empregando a mesma fase móvel na vazão otimizada de trabalho, 0,3 mL min⁻¹, e temperatura de 50 °C. A estabilidade das FE foi determinada em termos do número de volumes de coluna eluídos, sendo que cada volume de coluna corresponde ao volume de fase móvel que ocupa os espaços dentro da coluna, os quais não são ocupados pelo recheio cromatográfico (voluma de coluna cheia - V_{col}). O volume de coluna é calculado a partir do t_M (uracila) e da vazão da fase móvel (F), conforme a equação 14:

$$V_{col} = F \times t_M \quad (14)$$

O valor de V_{col} calculado foi igual a 0,57 mL de fase móvel.

As condições de análise empregadas aceleram o processo de deterioração e colapso da coluna, possibilitando avaliações mais rápidas e com menor gasto de fase móvel⁹⁴.

4. Resultados e Discussão

4.1 Fases estacionárias preparadas a partir do poli(metilfenilsiloxano) (PMFS)

Conforme descrito no item 3.7, no início do trabalho empregou-se o poli(metilfenilsiloxano) para o preparo das FE.

As fases estacionárias foram preparadas utilizando-se 50 % de carga de PMFS, de acordo com o procedimento descrito no item 3.6, sem o uso de capeamento. Após a sorção do polímero ao suporte, as FE foram submetidas à etapa de imobilização térmica, variando-se a temperatura e o tempo em 11 experimentos. A porcentagem de PMFS, a espessura da camada polimérica (τ) e os parâmetros cromatográficos obtidos a partir da separação da MT-1 estão apresentados na Tabela 2 e os respectivos cromatogramas são mostrados na Figura 19.

Tabela 2. Parâmetros cromatográficos obtidos com as FE de PMFS imobilizadas termicamente sobre sílica não modificada, empregando-se diferentes condições experimentais

Experimentos	Parâmetros Cromatográficos				PMFS (%)	τ (nm)
	N/L ^a (pratos m ⁻¹)	As ₁₀ ^a	k ^{a,b}	Rs ^c		
1 (130 °C /8 h)	49843	1,9	3,1	1,4	12,9	0,45
2 (150 °C /8 h)	38669	1,1	6,0	2,2	17,3	0,65
3 (130 °C /16 h)	62766	1,2	4,8	2,4	16,0	0,59
4 (150 °C /16 h)	15928	2,3	0,7	NA	4,8	0,15
5 (140 °C /12 h)	11809	2,7	0,3	NA	3,2	0,10
6 (140 °C /12 h)	12510	2,5	0,4	NA	4,0	0,12
7 (140 °C /12 h)	14347	2,2	0,5	NA	3,9	0,12
8 (126 °C /12 h)	10282	3,3	0,3	NA	2,9	0,09
9 (154 °C /12 h)	19198	2,3	0,6	NA	4,8	0,15
10 (150 °C /6,4 h)	45737	1,4	4,3	2,0	14,8	0,53
11 (150 °C /17,6 h)	50615	0,8	5,9	2,8	19,2	0,74

^aCalculado para o pico do naftaleno; ^bt_M medido para a uracila; ^ccalculado para o par benzonitrila-benzeno, NA - valor não determinado, pois não houve separação. Os experimentos foram realizados aleatoriamente.

Como pode ser observado a partir dos valores dos parâmetros cromatográficos mostrados na Tabela 2 e dos cromatogramas da Figura 19, apenas as FE preparadas nos experimentos 1, 2, 3, 10 e 11 apresentaram separação de todos os compostos da mistura teste 1. Considerando-se que todas as FE foram preparadas empregando-se o mesmo lote de diclorometano, as FE preparadas nos experimentos de 4 a 9 deveriam apresentar separação para todos os compostos da MT-1. A partir dos resultados obtidos não se conseguiu chegar a um consenso sobre a temperatura e o tempo adequados, uma vez que os valores de eficiência e de assimetria de pico não mostraram uma sequência lógica.

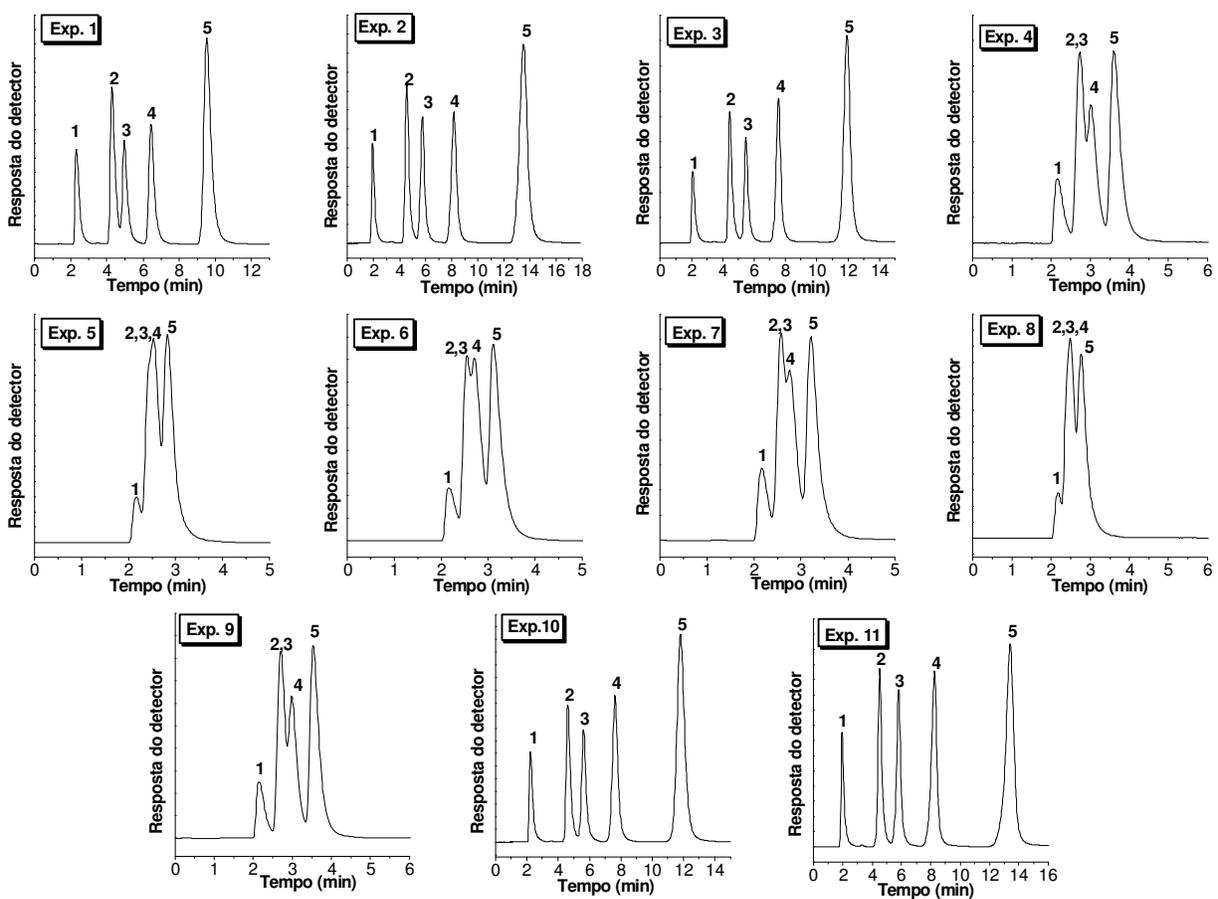


Figura 19. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste 1 empregando as FE de PMFS imobilizadas termicamente, em estufa, em diferentes condições experimentais. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L, FM: metanol:água 55:45 (v/v); vazão 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}$ C. Compostos da MT-1: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

Estes resultados mostram que o comportamento das FE preparadas a partir do PMFS não apresenta repetibilidade. A partir dos valores de porcentagem de polímero, observa-se que a falta de separação ocorre devido à baixa quantidade de PMFS imobilizado. Este problema de imobilização pode ser devido ao impedimento estérico da própria estrutura do polímero. Corrobora com esta suposição o fato de que quando há pouco PMFS imobilizado, verifica-se, durante a evaporação do diclorometano no preparo das FE, que o polímero é arrastado pelo solvente ficando aderido às paredes do béquer que contém a FE. Isto provavelmente não ocorre com o PDMFS, porque os grupos metila da unidade dimetilsiloxano diminuem o impedimento estérico entre as cadeias poliméricas, permitindo a obtenção de FE com boa repetibilidade, conforme é apresentado na sequência deste trabalho.

4.2 Avaliação da estabilidade térmica do poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano)

Fez-se a avaliação da estabilidade térmica do PDMFS para definição da temperatura máxima que pode ser empregada no tratamento térmico, evitando-se a decomposição do polímero durante a imobilização das FE. As curvas TGA/DTG obtidas para o PDMFS estão apresentadas na Figura 20.

O PDMFS apresenta-se estável termicamente até cerca de 200 °C, quando se inicia a decomposição térmica da cadeia polimérica, que ocorre em três etapas, entre 200 °C e 700 °C, aproximadamente. A perda de massa total, até 1000 °C, foi de 80 % da massa inicial do polímero, restando 20 % de resíduo de decomposição térmica, cujo teor calculado confere com o óxido SiO₂. Como o polímero é estável termicamente até aproximadamente 200 °C, deve-se empregar uma temperatura máxima de 150 °C nos procedimentos de imobilização térmica das FE.

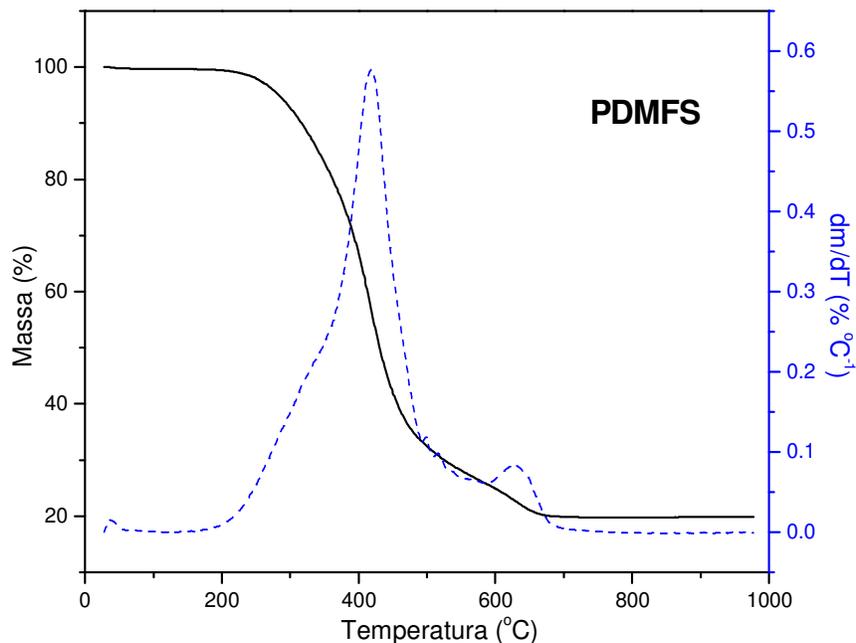


Figura 20. Curvas TGA (—) e DTG (---) obtidas para o PDMFS, sob atmosfera oxidante (O_2) (100 mL min^{-1}), a uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando-se aproximadamente 12 mg de amostra em suporte de Al_2O_3 .

4.3 Avaliação das melhores condições de imobilização das fases estacionárias de PDMFS

Após a sorção do polímero ao suporte, as FE foram submetidas à etapa de imobilização térmica, de acordo com as condições apresentadas na Tabela 1. A temperatura e o tempo foram as variáveis estudadas e o domínio experimental foi definido de acordo com resultados obtidos em um estudo preliminar realizado e os obtidos por Lourenço⁸⁶. Os cromatogramas obtidos para a MT-1 e MT-2 empregando as FE preparadas nas diferentes condições experimentais estão apresentadas nas Figuras 21 e 22, respectivamente. As porcentagens de carbono e de PDMFS, a espessura da camada polimérica (τ) e os parâmetros cromatográficos obtidos a partir da separação da MT-1 e da MT-2 estão apresentados na Tabela 3.

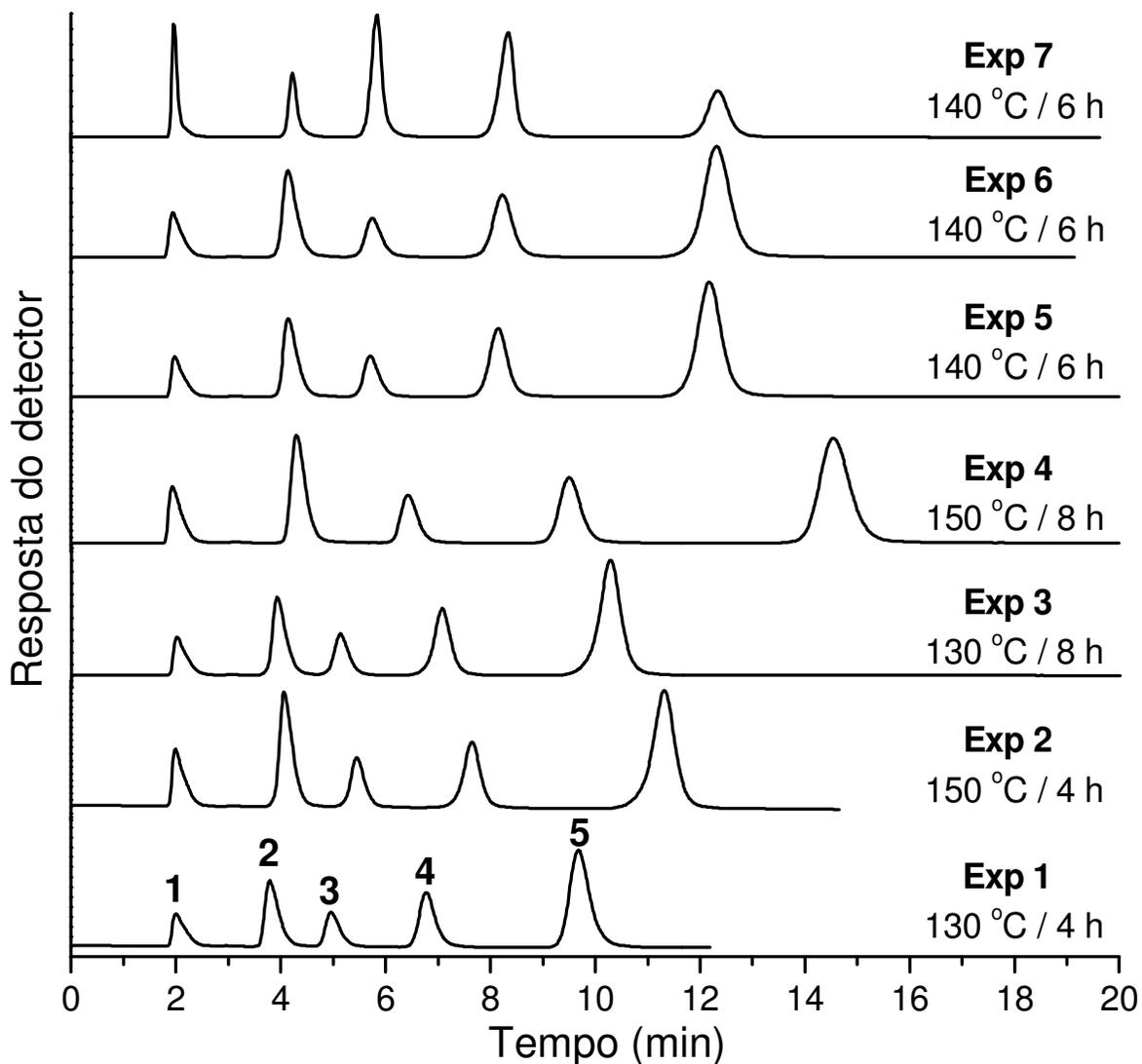


Figura 21. Cromatogramas obtidos a partir da separação da MT-1 empregando as FE de PDMFS sobre sílica preparadas nas diferentes condições experimentais. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

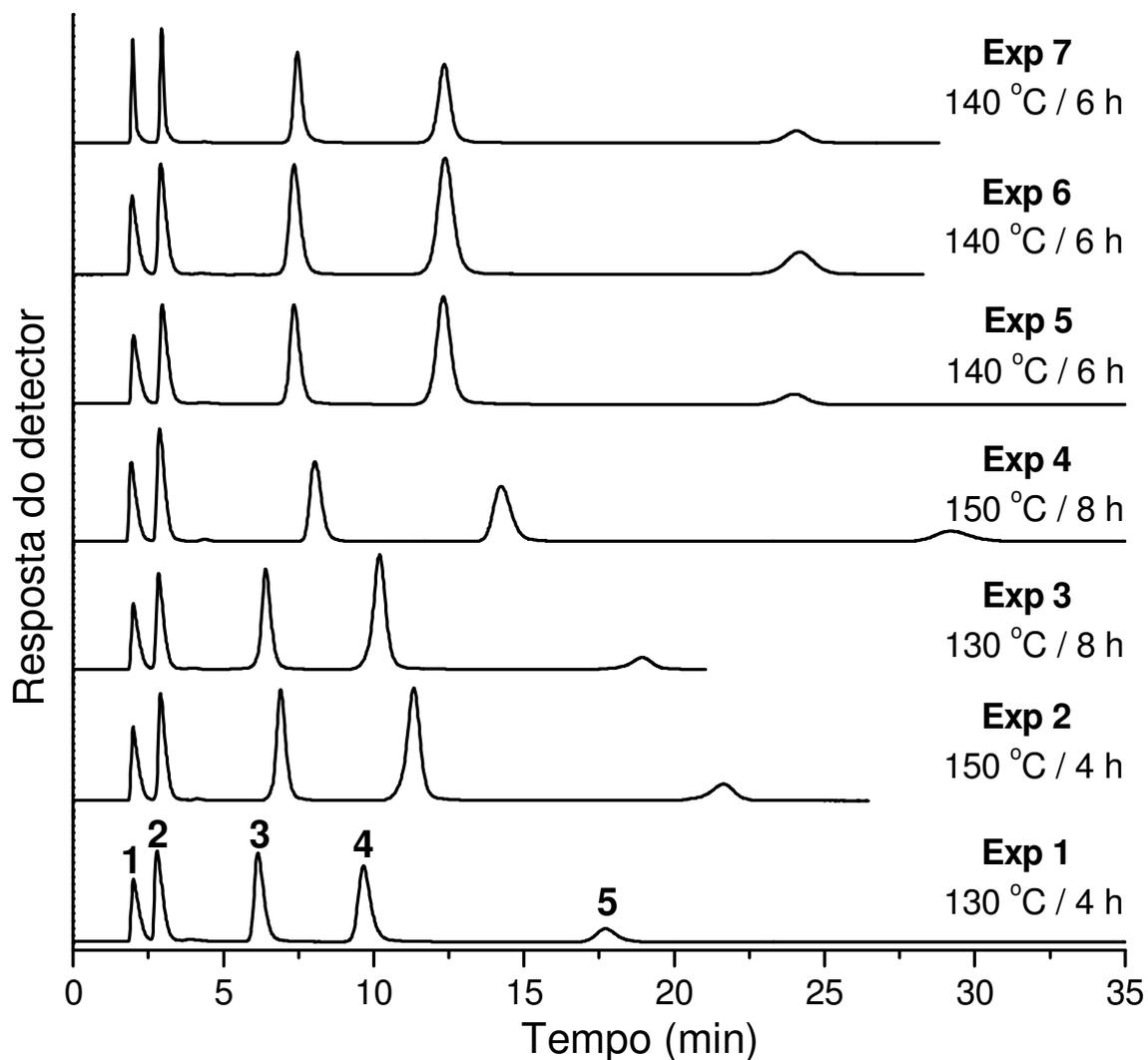


Figura 22. Cromatogramas obtidos a partir da separação da MT-2 empregando as FE de PDMFS sobre sílica preparadas nas diferentes condições experimentais. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteño.

Tabela 3. Parâmetros cromatográficos obtidos com as FE de PDMFS imobilizadas termicamente sobre sílica não modificada, empregando-se diferentes condições experimentais

Experimentos	Parâmetros Cromatográficos					% C	% PDMFS	τ (nm)
	N/L ^a (pratos m ⁻¹)	As ₁₀ ^a	As ₁₀ ^b	k ^{a,c}	Rs ^d			
1 (130 °C /4 h)	54669	1,3	1,9	7,8	2,4	8,8	16,8	0,47
2 (150 °C /4 h)	60104	0,7	1,3	9,9	2,9	10,4	19,8	0,58
3 (130 °C /8 h)	59442	0,7	1,2	8,5	2,5	9,9	18,9	0,55
4 (150 °C /8 h)	50128	1,3	1,5	14,1	3,8	12,2	23,3	0,73
5 (140 °C /6 h)	49485	1,0	1,5	11,3	3,0	11,2	21,4	0,65
6 (140 °C /6 h)	59965	0,9	1,5	10,9	3,1	10,5	20,0	0,59
7 (140 °C /6 h)	74071	1,0	1,6	11,2	4,8	11,4	21,8	0,66

^aCalculado para o pico do acenafteno; ^bcalculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^ct_M medido para a uracila; ^dcalculado para o par benzonitrila-benzeno. Os experimentos não foram feitos nesta ordem, e sim aleatoriamente.

As FE foram preparadas em triplicata na condição de 140 °C e 6 h de imobilização (experimentos 5, 6 e 7) para avaliação da repetibilidade do preparo, e a estimativa do desvio padrão relativo (RSD) obtida para estes experimentos, em termos de fator de retenção do acenafteno, foi de 1,8 %, mostrando que o procedimento de preparo das FE de PDMFS apresenta boa repetibilidade.

A partir dos valores de eficiência, observa-se que as FE apresentaram desempenho cromatográfico similar, com exceção da FE preparada no experimento 7, que apresentou eficiência superior a 74000 pratos m⁻¹. No entanto, dentre os parâmetros cromatográficos, este é o mais influenciado do enchimento das colunas, que por sua vez, é uma variável que não pode ser totalmente controlada, sendo necessário o enchimento de várias colunas com uma mesma FE para a obtenção de um valor que represente, com maior confiança, a eficiência da FE. Portanto, para a escolha das melhores condições de tratamento térmico, optou-se pela comparação entre os valores de assimetria de pico obtidos para o acenafteno e para a N,N-dimetilanilina. Sabe-se que os valores ideais de As₁₀ estão entre 0,8 e 1,6⁷⁴, e apenas as FE preparadas a 140 °C por 6 h e 150 °C por 8 h apresentaram valores de As₁₀ nesta faixa. Deste modo, as condições que fornecem FE com desempenho

cromatográfico adequado são: temperaturas entre 140 °C e 150 °C e tempos de imobilização entre 6 e 8 h. Valores acima desta faixa podem levar a obtenção de FE com bom desempenho cromatográfico, no entanto, existe o risco de degradação do polímero quando exposto por muitas horas a temperaturas acima de 150 °C. Além disto, mesmo que não ocorra a degradação, as FE serão muito retentivas, aumentando o tempo de análise e exigindo o uso de maior quantidade de solvente orgânico na FM.

Por fornecer análises com valores de As_{10} mais próximas de 1,0, definiu-se como condição ótima temperatura de 140 °C e tempo de imobilização de 6 h. Esta condição foi empregada para o preparo das FE sobre o suporte de sílica não modificada e sílica zirconizada, que em seguida foram capeadas, caracterizadas por técnicas físico-químicas e avaliadas cromatograficamente.

4.4 Determinação da vazão ótima de fase móvel para avaliação das fases estacionárias

Após a obtenção de uma FE de PDMFS com desempenho cromatográfico adequado, fez-se a determinação da vazão ótima de FM, ou seja, a vazão em que se obtêm análises com valores mais elevados de eficiência.

A Figura 23 mostra a curva de van Deemter obtida com a FE preparada sobre sílica não modificada, utilizando-se os valores de H calculados para o naftaleno, a partir da separação da MT-1. Apesar do ponto mínimo da curva, com H equivalente a 14,3 μm (eficiência de coluna de 69763 pratos m^{-1} para o naftaleno) ter sido obtido em uma vazão de 0,2 mL min^{-1} ($\mu \cong 1,9 \text{ cm min}^{-1}$), foi adotada a vazão de fase móvel igual a 0,3 mL min^{-1} , por resultar em análises mais rápidas e com eficiência bastante elevada (68824 pratos m^{-1}).

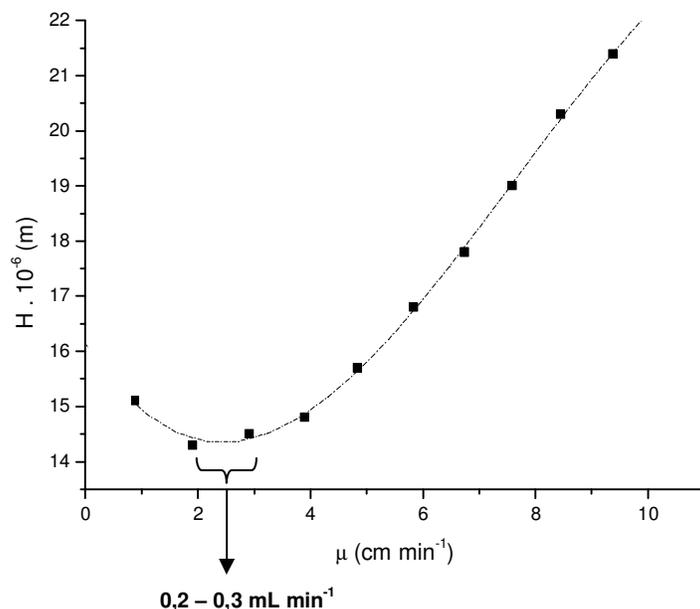


Figura 23. Curva de van Deemter obtida para a fase estacionária preparada a partir da imobilização do PDMFS sobre sílica não modificada, empregando temperatura de $140 \text{ }^\circ\text{C}$ e 6 h.

4.5 Caracterização físico-química da sílica não modificada, da sílica zirconizada e das FE

4.5.1 Espectroscopia de fluorescência de raios X

Nas condições de síntese otimizadas por Faria *et al.*³³, o teor de zircônio obtido por fluorescência de raios X foi de 20,9 % e a média determinada para a amostra de sílica zirconizada preparada neste trabalho foi de 23,5 %. Apesar de pequena, esta diferença entre os valores pode ser decorrente do emprego de lotes de sílica diferentes.

4.5.2 Termogravimetria

As curvas TGA/DTG (DTG – derivada termogravimétrica - derivada da massa em função da temperatura) obtidas para a sílica não modificada e para a sílica zirconizada estão apresentadas na Figura 24.

O comportamento térmico da sílica é caracterizado, principalmente, por processos de desidratação e desidroxilação. Nos processos de desidratação, as moléculas de água fracamente adsorvidas à superfície da sílica são eliminadas até aproximadamente 150 °C, enquanto que as moléculas de água adsorvidas fortemente são eliminadas entre 150 °C e 600 °C. A partir de 600 °C tem início o processo de desidroxilação, eliminando os grupos hidroxila da sílica. A perda de massa total até 1000 °C foi de apenas 3,5 % da massa inicial, mostrando que a sílica apresenta estabilidade térmica bastante elevada, sendo adequada para o preparo de FE por tratamento térmico.

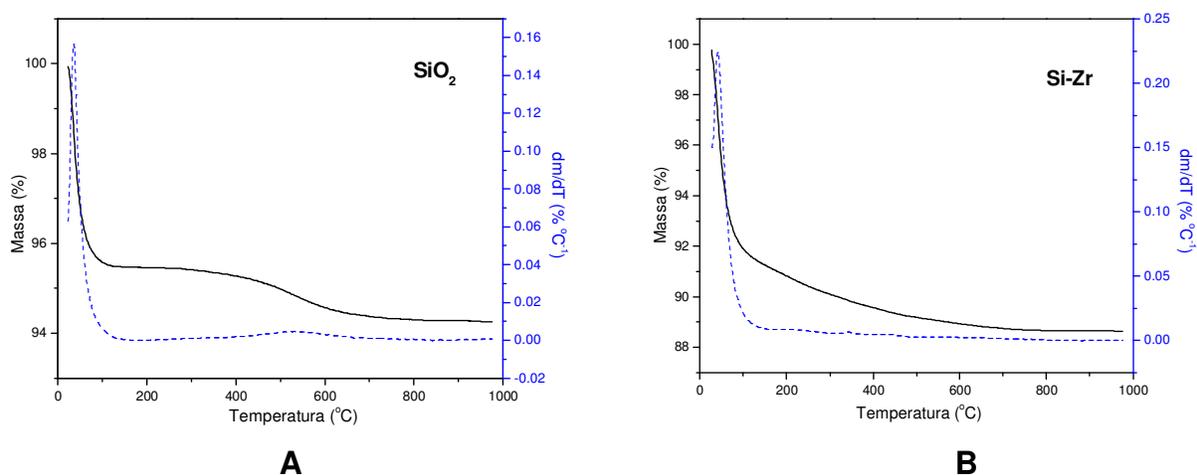


Figura 24. Curvas TGA (—) e DTG (---) obtidas para a (A) sílica e (B) sílica zirconizada sob atmosfera oxidante (O₂) (100 mL min⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 25 °C a 1000 °C, utilizando-se aproximadamente 12 mg de amostra em suporte de Al₂O₃.

A sílica zirconizada apresentou comportamento térmico similar ao da sílica não-modificada, com diferença apenas na quantidade de perda de massa inicial, que foi maior no suporte metalizado. Esta maior porcentagem de perda de massa pode ser decorrente de uma maior quantidade de água presente no suporte metalizado, ou pode ser devido a resíduos de solventes ou reagentes orgânicos do preparo do suporte metalizado. Apesar desta diferença, a sílica zirconizada também é considerada estável termicamente e adequada para o preparo de FE por tratamento térmico.

Fez-se a avaliação da estabilidade térmica das FE não capeadas para se verificar as possíveis mudanças no perfil de decomposição térmica do PDMFS em função das interações com os dois suportes cromatográficos. As curvas TGA/DTG obtidas para a FE Si(PDMFS) e SiZr(PDMFS) estão apresentadas na Figura 25.

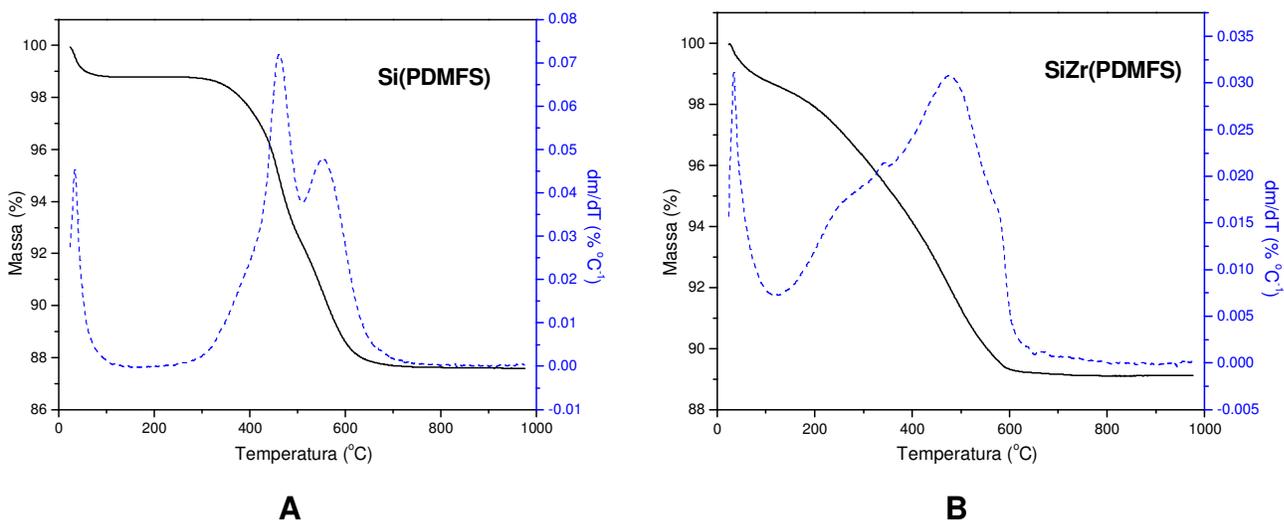


Figura 25. Curvas TGA (—) e DTG (---) obtidas para a FE (A) Si(PDMFS) e (B) SiZr(PDMFS) sob atmosfera oxidante (O_2) (100 mL min^{-1}), a uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ a $1000 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando-se aproximadamente 12 mg de amostra em suporte de Al_2O_3 .

Observa-se que a decomposição térmica das FE inicia-se em temperaturas diferentes, com velocidades de perda de massa distintas, sendo a FE Si(PDMFS) mais estável termicamente que a FE SiZr(PDMFS), enquanto nesta última, a perda do PDMFS ocorre mais lentamente, com velocidade máxima em torno $0,030 \text{ } \% \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$, enquanto na FE Si(PDMFS) a velocidade máxima é aproximadamente $0,07 \text{ } \% \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$. Estes resultados mostram que o PDMFS está imobilizado em ambos os suportes, no entanto, as interações com cada suporte são diferentes.

4.5.3 Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros dos suportes e das FE, e porcentagem de PDMFS e espessura da camada polimérica das FE

Os valores de área superficial específica, volume e diâmetro de poros obtidos para as amostras de sílica não modificada, sílica zirconizada e para as FE estão apresentados na Tabela 4, bem como os valores de porcentagem de PDMFS e espessura da camada polimérica obtidos para as FE.

Tabela 4. Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros dos suportes e das FE, porcentagens de carbono e de PDMFS e espessura da camada polimérica das FE

Amostra	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Volume de poros (cm ³ g ⁻¹)	Diâmetro de poros (nm)	% C	% PDMFS	τ (nm)
Sílica não modificada	308	0,86	11,1	---	---	---
Sílica zirconizada	348	0,72	8,3	---	---	---
Si(PDMFS)	194	0,53	10,9	11	21	0,64
SiZr(PDMFS)	172	0,38	8,7	10	19	0,67
Si(PDMFS)ec	174	0,48	10,9	13	21	0,64
SiZr(PDMFS)ec	158	0,33	8,4	12	19	0,67

O procedimento de incorporação de zircônia sobre a sílica provocou redução no volume e diâmetro de poros das partículas, evidenciando que ocorreu deposição no interior dos poros do material. Com relação à área superficial específica, o procedimento de metalização provocou um aumento da área superficial, que pode ser devido à deposição do óxido de zircônio no interior dos poros formando pequenas rugosidades nas paredes internas, porém sem obstruí-los³³. Apesar das alterações, estes valores de área superficial específica, volume e diâmetro de poros ainda se encontram dentro da faixa considerada ideal para a aplicação como suporte cromatográfico⁶¹.

Os valores obtidos para as FE mostram que a imobilização do PDMFS provocou uma diminuição significativa dos volumes de poros e das áreas superficiais específicas dos suportes, decorrente do espaço ocupado pelas cadeias do polímero. Os valores de

diâmetro de poros não foram afetados significativamente após a imobilização do PDMFS, este fato, juntamente com a diminuição da área superficial e do volume de poros, indica que a deposição do polímero ocorre principalmente no interior dos poros dos suportes, sem a obstrução dos mesmos.

Após o capeamento das FE, houve um aumento de 2 % na porcentagem de carbono, decorrente da ligação dos grupos metila ao suporte, resultando em uma pequena diminuição nos valores de área superficial específica e nos valores de volume de poros das FE, sem alteração significativa dos diâmetros de poros.

4.5.4 Microscopia eletrônica de varredura

Avaliou-se a morfologia das partículas de sílica não modificada e de sílica zirconizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As fotomicrografias obtidas para as amostras estão apresentadas na Figura 26.

As fotomicrografias eletrônicas com ampliação de 2.000 vezes mostram que o procedimento de zirconização não alterou a forma esférica e a distribuição de tamanho das partículas de sílica. Já nas fotomicrografias com ampliação de 10.000 vezes, os poros da sílica não modificada estão mais evidentes que os poros da sílica zirconizada, o que pode ser devido à diminuição do volume e diâmetro dos poros da sílica zirconizada em relação à sílica não modificada.

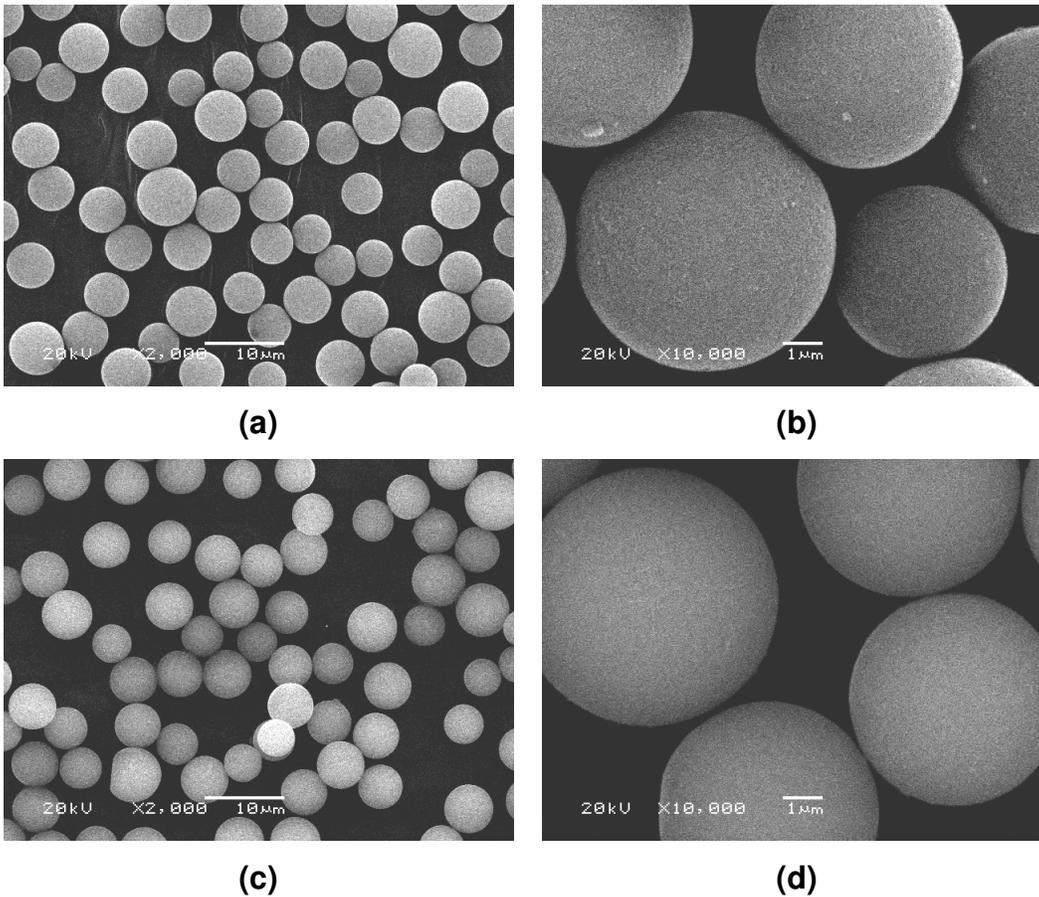


Figura 26. Fotomicrografias eletrônicas de varredura obtidas para (a) sílica não modificada com ampliação de 2.000 vezes, (b) sílica não modificada com ampliação de 10.000 vezes, (c) sílica zirconizada com ampliação de 2.000 vezes e (d) sílica zirconizada com ampliação de 10.000 vezes.

4.5.5 Espectroscopia de absorção na região do UV-vis com refletância difusa

A espectroscopia de absorção no UV-vis fornece informações sobre o estado de oxidação de íons dos metais de transição, desta forma, pode-se investigar o tipo de ligação que o óxido de zircônio apresenta com a matriz de sílica. Para isso, obtiveram-se espectros de uma mistura de óxido de zircônio e sílica (ZrO_2/SiO_2), do óxido de zircônio puro e de uma amostra de sílica zirconizada. Os espectros de absorção no UV-vis encontram-se na Figura 27.

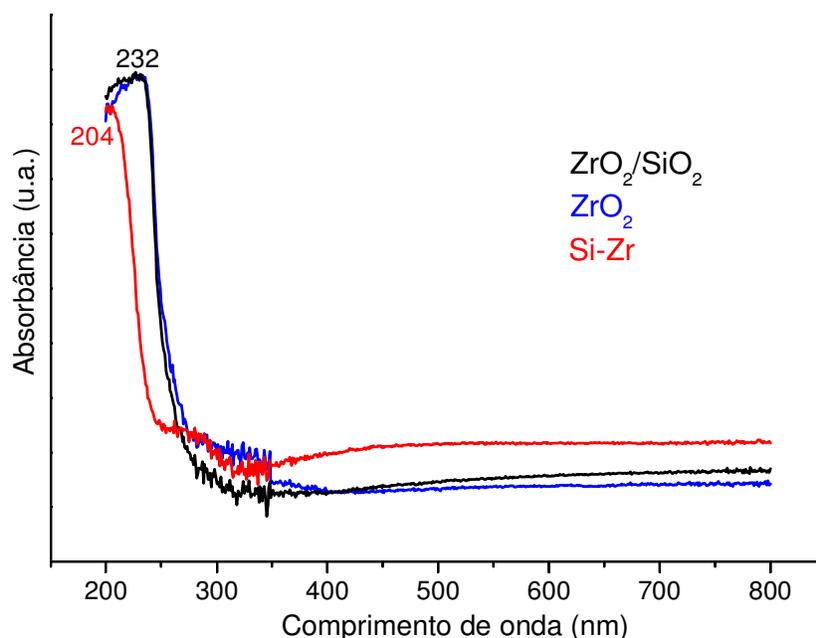


Figura 27. Espectros de absorção no UV-vis com refletância difusa de uma mistura mecânica de ZrO_2 e SiO_2 , do ZrO_2 puro e da amostra de sílica zirconizada.

Os espectros da mistura ZrO_2/SiO_2 e do óxido de zircônio puro mostram uma banda intensa na região de 232 nm, atribuída a ligações $Zr-O-Zr$ ^{95,96} na qual o zircônio se encontra em sua forma monoclinica, apresentando geometria octaédrica⁹⁷. No espectro da sílica zirconizada, observa-se o deslocamento desta banda para a região de 204 nm, decorrente da transferência de carga do ligante (O^{2-}) para o orbital do metal (Zr^{4+})^{95,96,97,98}. Neste caso, o zircônio encontra-se em geometria tetraédrica⁹⁹, confirmando a formação de ligações Si-O-Zr na sílica zirconizada.

4.5.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Foram obtidos os espectros de absorção na região do infravermelho da sílica não modificada e da sílica zirconizada, que estão apresentados na Figura 28.

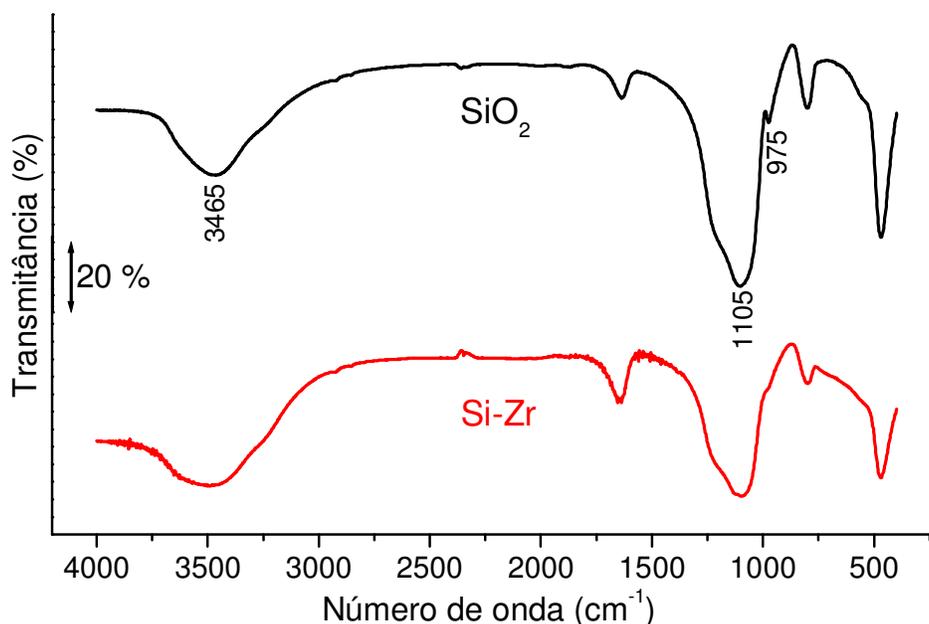


Figura 28. Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos para as amostras de sílica não modificada e de sílica zirconizada, empregando o método da pastilha de KBr, 1 % (m/m).

Em ambos os espectros foram observadas praticamente as mesmas bandas, podendo-se destacar as que aparecem em 3465, 1105 e 975 cm^{-1} . A banda larga em 3465 cm^{-1} é atribuída aos grupos silanóis, aos grupos hidroxilas da zircônia (zirconóis) e às moléculas de água adsorvidas aos suportes. A banda em 1105 cm^{-1} resulta do estiramento das ligações siloxano Si-O-Si . A pequena banda em 975 cm^{-1} é atribuída aos grupos silanóis livres. No espectro da sílica zirconizada, esta última banda praticamente desaparece, evidenciando que a incorporação do zircônio ocorreu principalmente nestes grupos.

Obteve-se o espectro do PDMFS no modo de transmissão empregando janela de NaCl, que está apresentado na Figura 29.

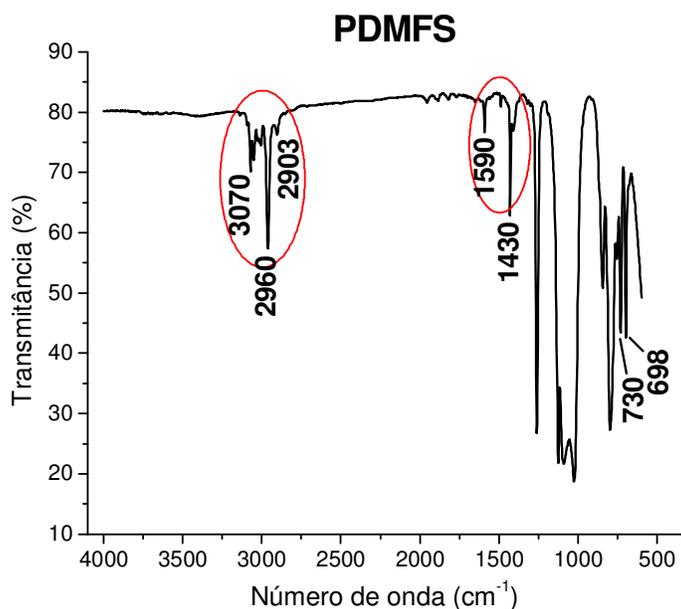


Figura 29. Espectro obtido na região do infravermelho para o PDMFS.

As principais bandas observadas no espectro do PDMFS e as respectivas atribuições estão resumidas na Tabela 5.

Tabela 5. Principais bandas observadas no espectro de infravermelho do PDMFS, com os valores de número de onda e atribuição das ligações e dos respectivos grupos funcionais

Grupo	Ligação	Número de onda (cm ⁻¹)
CH ₃	C-H	2960 ^a
		2903 ^a
	C-H	3060 ^a
Fenil	C=C	3070 ^a
		1590 ^a
		1430 ^a
	=C-H	730 ^b
		698 ^b

^adeformação axial; ^bdeformação angular

Para comparação com o espectro do polímero, foram obtidos os espectros de infravermelho das FE no modo refletância difusa, e para comparação com os espectros

dos suportes, obtiveram-se os espectros das FE empregando-se o método de pastilha de KBr, 1 % (m/m). Os espectros de estão apresentados na Figura 30.

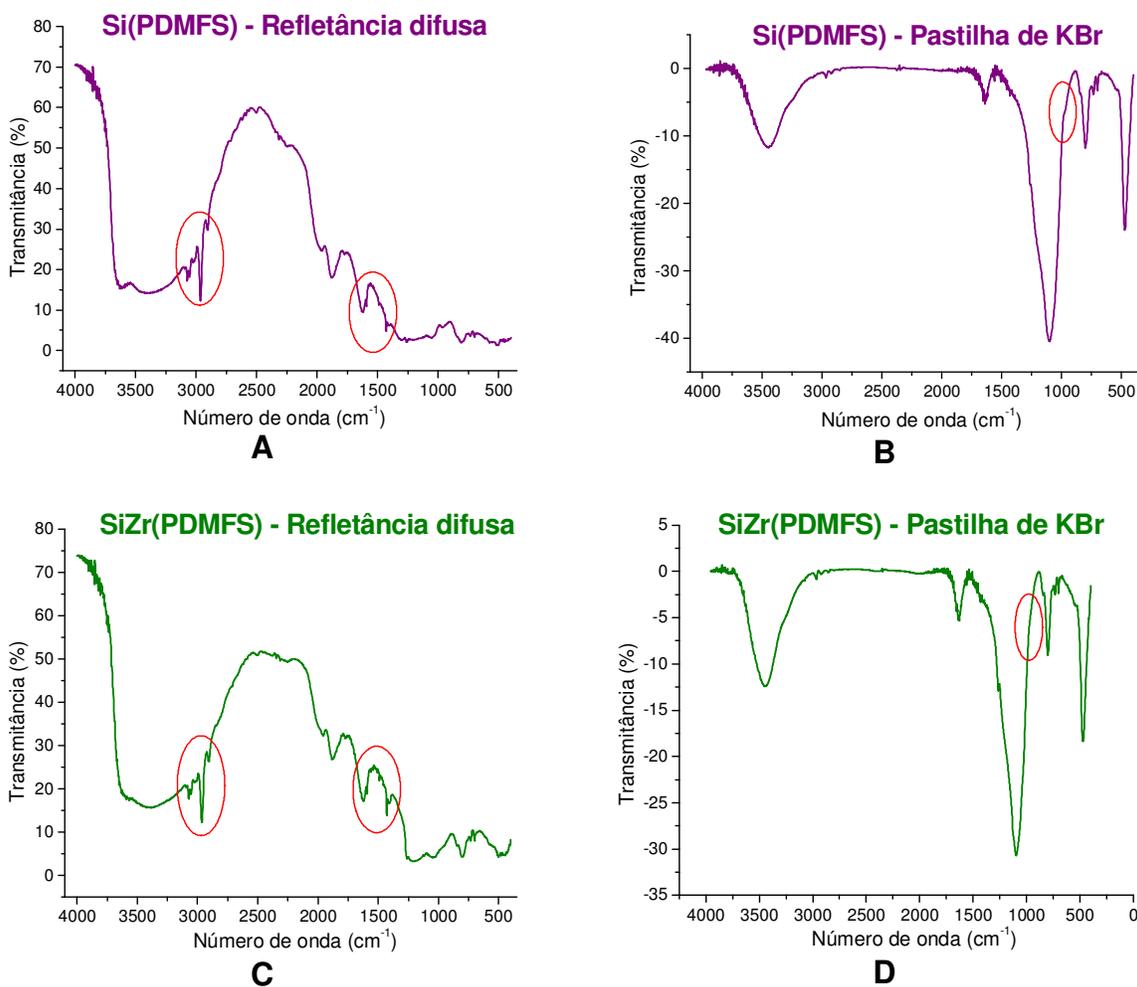


Figura 30. Espectros de absorção no infravermelho obtidos para (A) Si(PDMFS) no modo de refletância difusa, (B) Si(PDMFS) em pastilha de KBr, (C) SiZr(PDMFS) no modo refletância difusa e (D) SiZr(PDMFS) em pastilha de KBr.

Nos espectros de refletância difusa das FE (Figuras 30 A e 30 C), a presença de bandas nas regiões de 2900, 3070, 1590 e 1430 cm⁻¹, caracterizam a imobilização do polímero sobre os suportes. Nos espectros das FE obtidos com pastilha de KBr (Figuras 30 B e 30 D), a diminuição do pequeno ombro em 975 cm⁻¹, referente aos

silanóis livres presentes na sílica, mostra que o processo de imobilização do PDMFS sobre o suporte promoveu o recobrimento da maioria destes grupos.

4.5.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de silício-29

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de silício-29 foi empregada como uma forma de caracterização mais específica das FE, a partir da identificação das diferentes espécies de silício presentes.

Os espectros de RMN de Si-29 obtidos para a sílica não modificada e para a sílica zirconizada são apresentados na Figura 31.

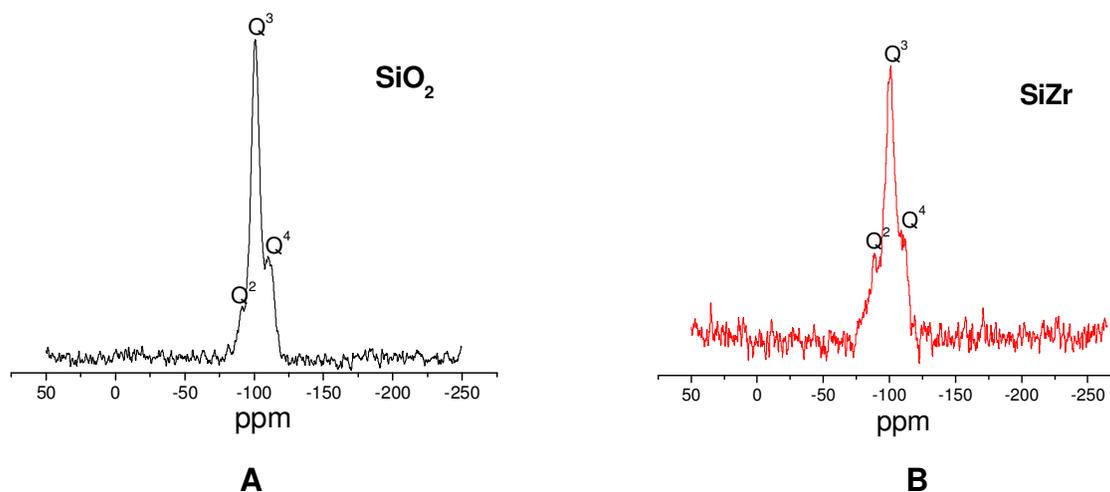


Figura 31. Espectros de RMN de ²⁹Si obtidos para a sílica não modificada (A) e para a sílica zirconizada (B).

Tanto no espectro da sílica não modificada como no espectro da sílica zirconizada, observam-se picos em -92, -101 e -110 ppm, atribuídos aos grupos silanóis geminais (Q²), aos silanóis livres e vicinais (Q³), e às ligações do tipo siloxano (Q⁴), respectivamente. Pode-se observar uma diminuição na razão Q³/Q⁴ no espectro da sílica zirconizada em relação ao espectro da sílica não modificada, indicando que a incorporação de zircônio na sílica ocorre principalmente nos grupos Q³.

Na Figura 32, estão ilustradas as espécies de silício observadas nos espectros das FE capeadas e não capeadas¹⁰⁰.

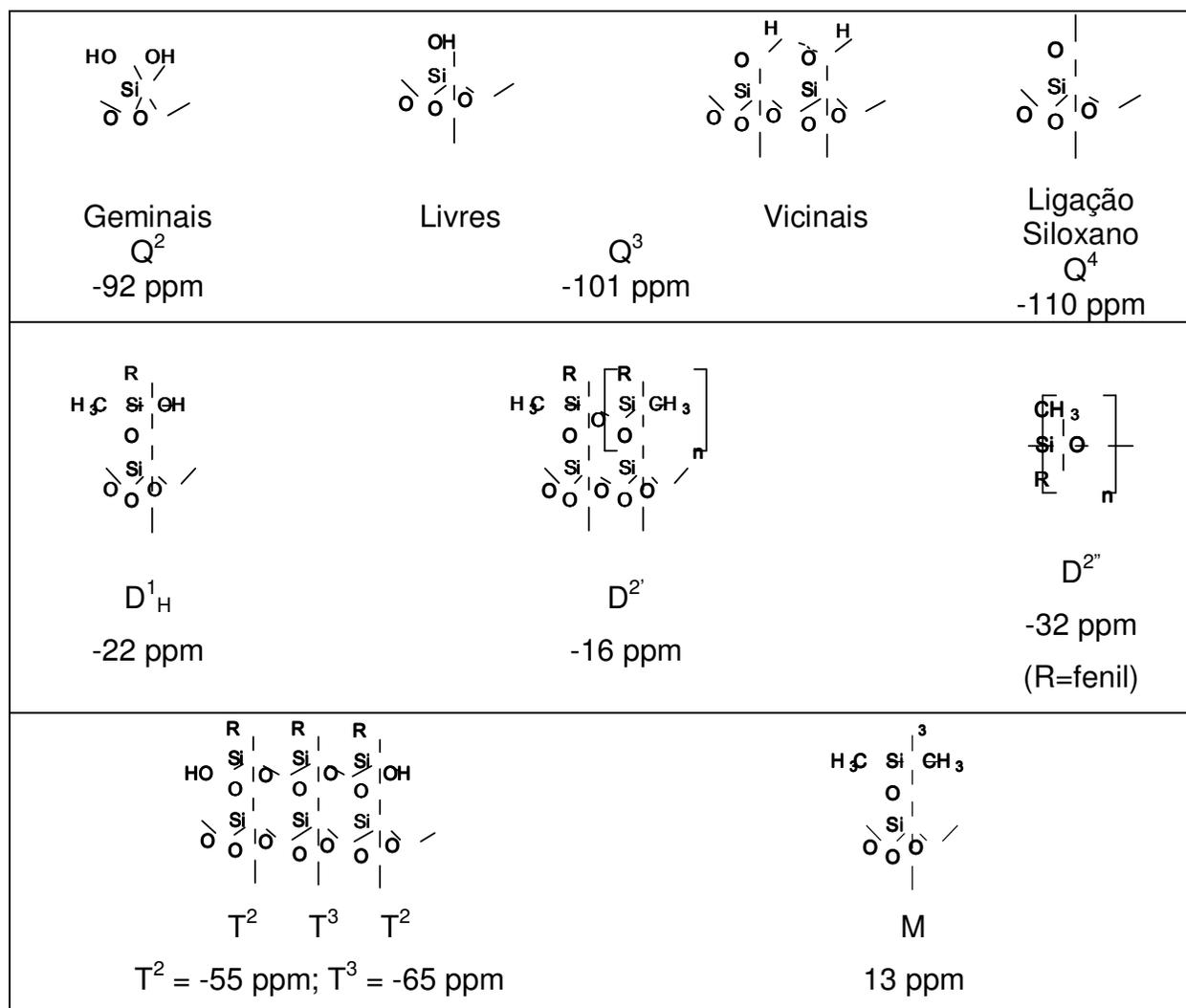


Figura 32. Espécies de silício presentes nas fases estacionárias, com os valores de deslocamento químico.

Os espectros de RMN obtidos para as FE não capeadas estão apresentados na Figura 33.

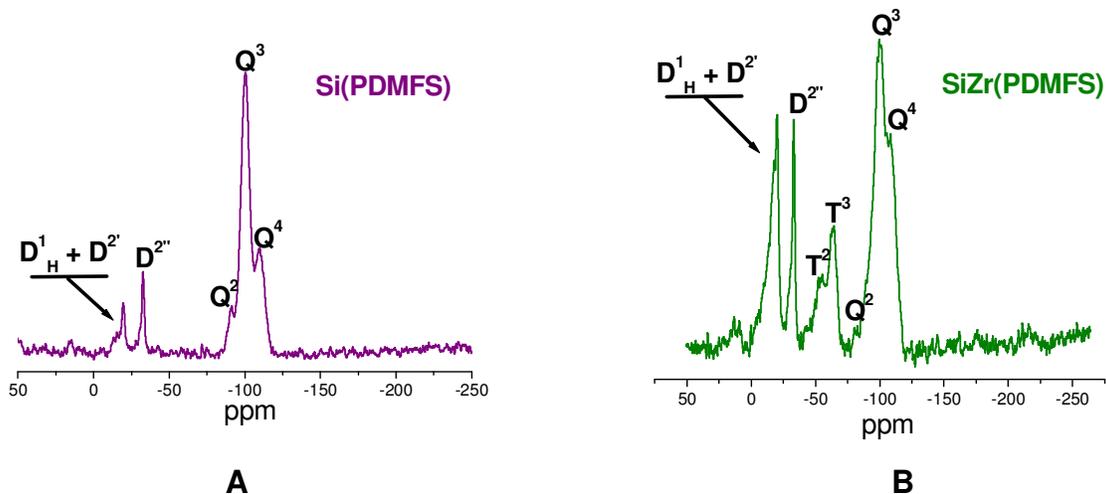


Figura 33. Espectros de RMN de ^{29}Si obtidos para as FE (A) Si(PDMFS) e (B) SiZr(PDMFS).

Comparando-se os espectros das FE com os espectros dos suportes, observa-se uma diminuição da razão Q^3/Q^4 , indicando que o PDMFS interage com os grupos silanóis livres e vicinais dos suportes, e este efeito é mais pronunciado no espectro da FE SiZr(PDMFS), no qual também se observa uma diminuição significativa do sinal referente ao grupo Q^2 , sugerindo que as interações do polímero com o suporte zirconizado são mais intensas. Além desta alteração, nos espectros das FE são observados sinais referentes ao silício da cadeia do PDMFS, em -32 ppm ($D^{2''}$), e sinais resultantes das interações que ocorrem entre as cadeias do polímero e o suporte, em -16 ppm ($D^{2'}$) e -22 ppm (D^{1_H}). No espectro da FE SiZr(PDMFS) observa-se um aumento da intensidade dos sinais entre -16 e -32 ppm e o surgimento de novos picos entre -50 e -70 ppm (T^2 e T^3), resultante de ligações entre o polímero e o suporte, com ligações siloxano dupla ou tripla. Estas diferenças entre os espectros das FE indicam que na FE SiZr(PDMFS) existe maior número de interações entre o polímero e o suporte, que pode ser resultado de um aumento da atividade dos grupos superficiais do suporte após a incorporação do zircônio.

Os espectros de RMN obtidos para as FE capeadas estão apresentados na Figura 34.

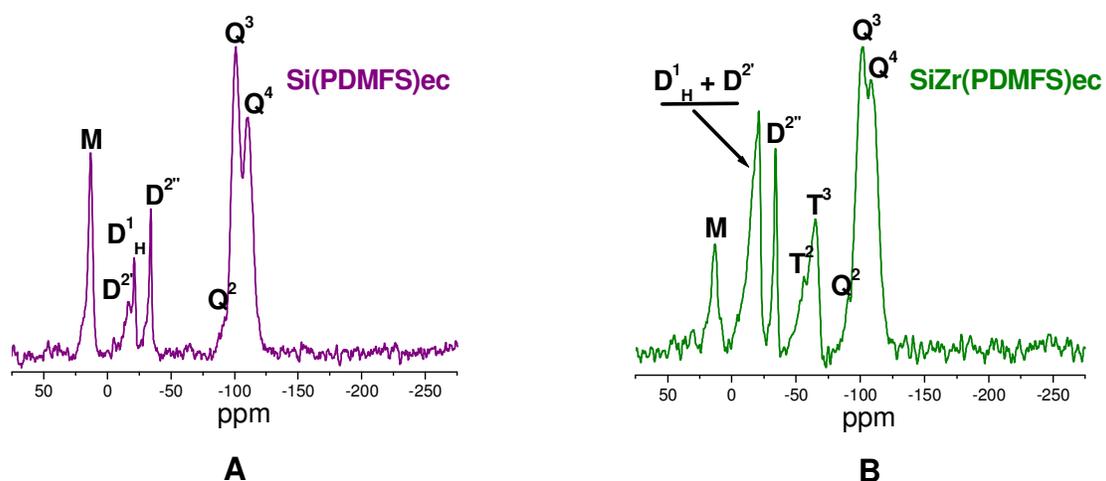


Figura 34. Espectros de RMN de ^{29}Si obtidos para as FE capeadas (A) Si(PDMFS)ec e (B) SiZr(PDMFS)ec.

Após o capeamento, houve uma redução ainda mais acentuada da razão Q^3/Q^4 , e o surgimento de um sinal intenso em 13 ppm, referente ao silano monofuncional empregado como reagente do capeamento (M). A diminuição significativa da razão Q^3/Q^4 sugere que o capeamento recobriu eficientemente os silanóis livres e vicinais dos suportes.

4.6 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias

4.6.1 Separação das misturas teste 1 e 2

As misturas teste 1 e 2, desenvolvidas no LabCrom, são utilizadas rotineiramente como uma forma de avaliação geral do desempenho cromatográfico das FE preparadas. Os cromatogramas obtidos a partir da separação dos compostos das misturas teste 1 (MT-1), empregando as FE Si(PDMFS), SiZr(PDMFS), Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec estão apresentados na Figura 35.

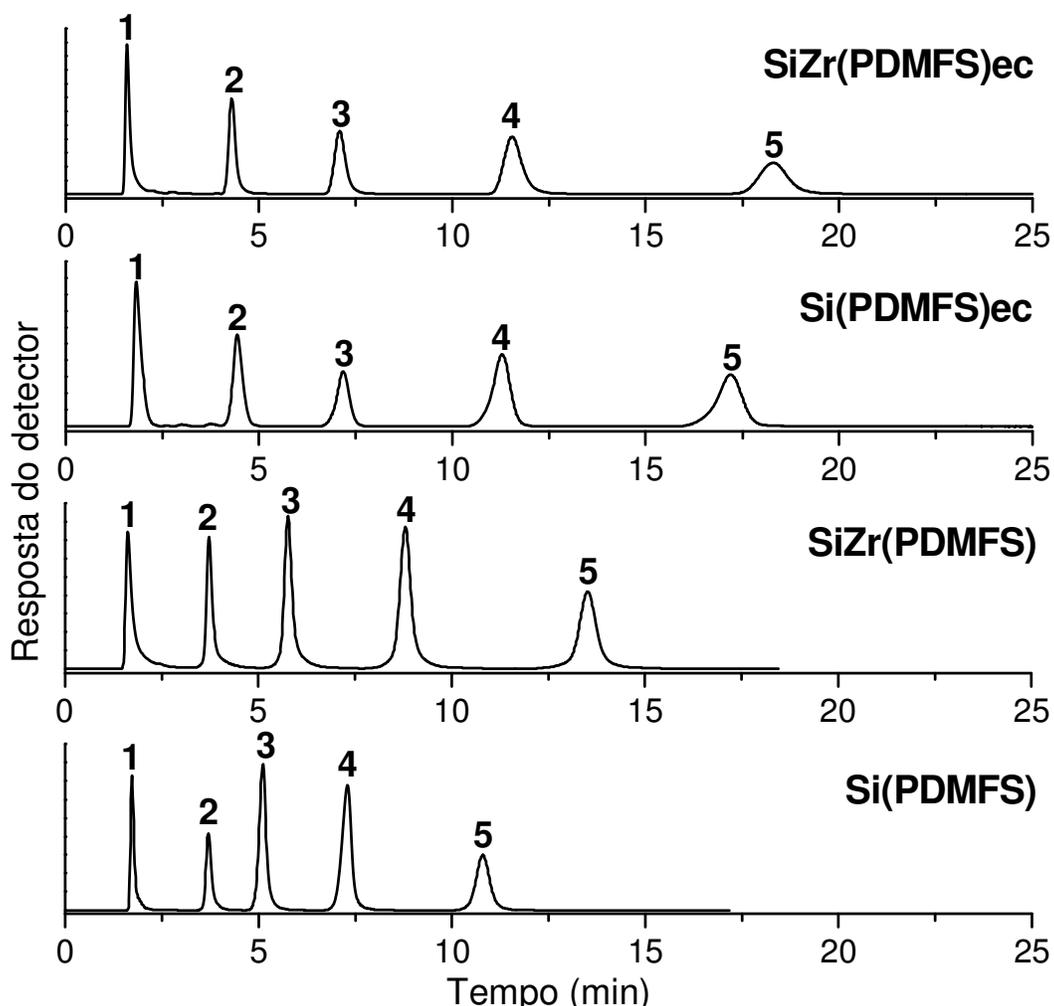


Figura 35. Cromatogramas obtidos na separação dos compostos da MT-1 utilizando as FE Si(PDMFS), SiZr(PDMFS), Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}$ C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

Os compostos que constituem a mistura teste 1 são compostos neutros de diferentes polaridades, cuja separação é considerada simples, por isto esta mistura é empregada como uma forma de se avaliar a qualidade do enchimento da coluna, principalmente com relação à eficiência e à assimetria dos picos.

As FE preparadas apresentaram resolução acima de 1,5 para todos os picos da MT-1 e os valores de eficiência obtidos para o composto mais retido, o naftaleno, foram maiores que 56000 pratos m^{-1} , conforme apresentado na Tabela 6. Com relação à assimetria do naftaleno, as FE apresentaram valores entre 1,1 e 0,8 (Tabela 6), dentro

da faixa aceitável. O procedimento de capeamento aumentou a retenção das FE para todos os compostos, principalmente para os compostos menos polares, decorrente da incorporação dos grupos metila, que atribuíram maior hidrofobicidade às FE. Além desta mudança, o capeamento parece ter reduzido a eficiência das colunas, mas esta é uma observação que deve ser analisada com cuidado, pois o recheio das colunas com as FE capeadas foi feito empregando-se as mesmas condições experimentais das FE sem o capeamento, inclusive o mesmo solvente de suspensão, e talvez fosse necessária a otimização das condições de enchimento para as fases capeadas. Além disso, deve-se considerar o fato de que o enchimento das colunas é uma variável aleatória.

Na Figura 36 estão apresentados os cromatogramas obtidos a partir da separação da mistura teste 2, empregando-se as FE Si(PDMFS), SiZr(PDMFS), Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec.

A mistura teste 2 contém compostos neutros (naftaleno e acenafteno), ácido (fenol) e básico (N,N-dimetilanilina), de diferentes polaridades, portanto, a análise desta mistura fornece informações com relação à acidez e polaridade da fase estacionária empregada.

As fases estacionárias analisadas empregando FM metanol:H₂O 55:45 (v/v) apresentaram resolução acima de 1,3 para todos os picos da MT-2, com exceção da FE SiZr(PDMFS), na qual a N,N-dimetilanilina ficou muito retida, coeludindo com o acenafteno em torno de 28 min. As FE preparadas sobre o suporte de sílica não modificada apresentaram melhor desempenho na separação da MT-2 com relação aos valores de fator de assimetria de pico da N,N-dimetilanilina, que foram 1,6 e 0,9 (Tabela 6) para as fases Si(PDMFS) e Si(PDMFS)ec, respectivamente, e acima de 4 para a FE SiZr(PDMFS) (não apresentado na Tabela 6) e 2,8 para a SiZr(PDMFS)ec. Esta forte retenção da N,N-dimetilanilina na FE SiZr(PDMFS) indica que este composto está interagindo com o suporte zirconizado da fase não capeada por meio de troca iônica.

O suporte de sílica apresenta em sua estrutura os grupos silanóis que são ácidos e após a incorporação do zircônio, que é um ácido de Lewis e dos grupos zirconóis, houve um aumento da acidez do suporte cromatográfico¹⁸ e, apesar de a

N,N-dimetilanilina ser uma base fraca, a amina protonada (pKa 5,1) deve interagir por troca iônica com os sítios ácidos do suporte cromatográfico (silanóis e zirconóis).

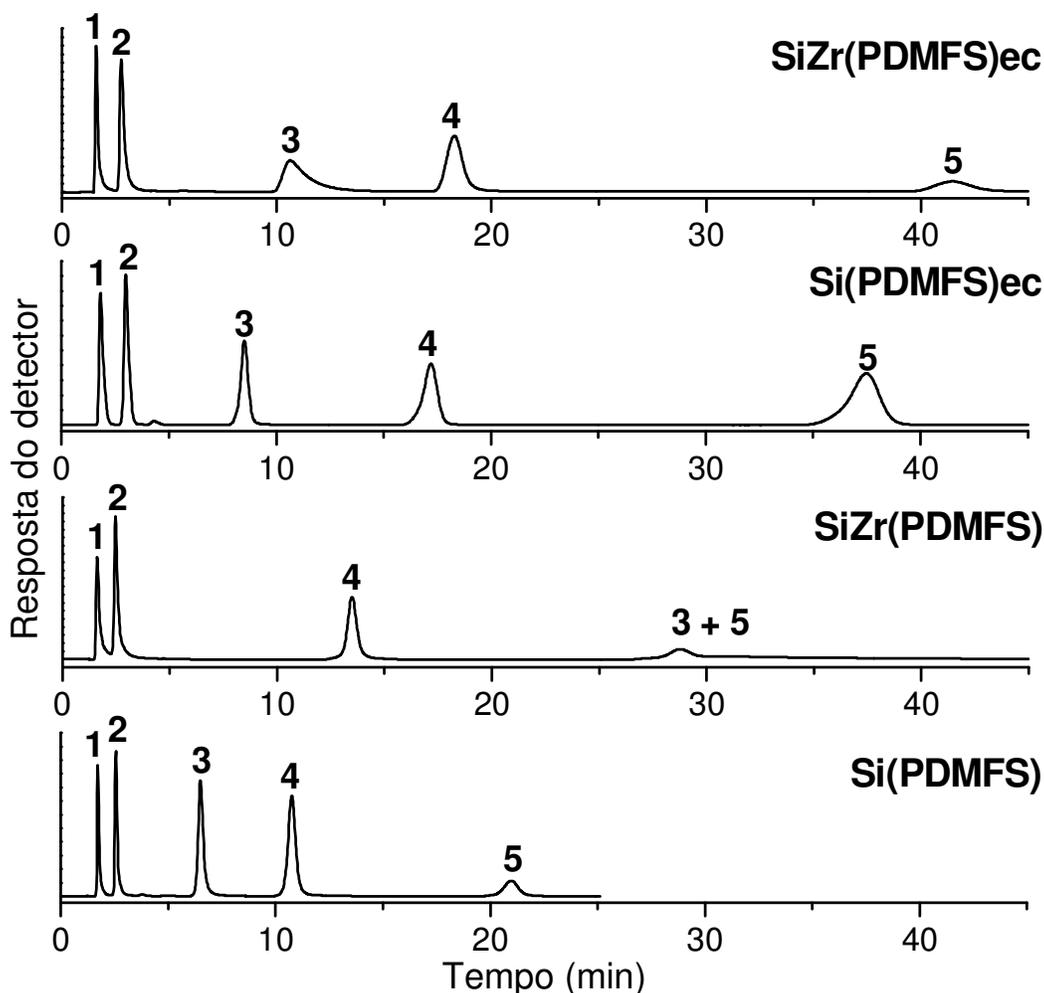


Figura 36. Cromatogramas obtidos na separação dos compostos da MT-2 utilizando as FE Si(PDMFS), SiZr(PDMFS), Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: metanol:água 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Após o capeamento, FE SiZr(PDMFS)ec, houve uma diminuição significativa da retenção da N,N-dimetilanilina, de aproximadamente 28 min na SiZr(PDMFS) para pouco mais de 10 min na fase capeada, mostrando que os grupos metila recobriram grande parte dos sítios ativos do suporte. Apesar disto, o fator de assimetria de pico nesta fase ainda é alto, 2,8, indicando que as interações por troca iônica não foram totalmente anuladas.

Como o pKa da N,N-dimetilanilina protonada é 5,1, sabe-se que em pH acima de 6,1, a amina encontra-se na forma neutra, e as interações por troca iônica com os sítios ativos do suporte devem ser minimizadas. Para se verificar este efeito, foi feita a separação da MT-2 empregando-se a FE SiZr(PDMFS) e ajustou-se o pH da fase móvel em 7,0, com tampão fosfato, mantendo-se a força cromatográfica, assim, a FM empregada foi metanol: tampão fosfato 20 mmol L⁻¹, pH 7,0, 55:45 (v/v). O cromatograma obtido a partir da separação da MT-2 empregando a FE SiZr(PDMFS) está apresentado na Figura 37.

Com o ajuste do pH da fase móvel em 7,0, houve uma diminuição significativa do fator de assimetria, de > 4 para 1,4, e do tempo de retenção de 28 min para 6 min, mostrando que esta é uma maneira simples de se proceder a análise de bases fracas, sem causar danos à coluna cromatográfica.

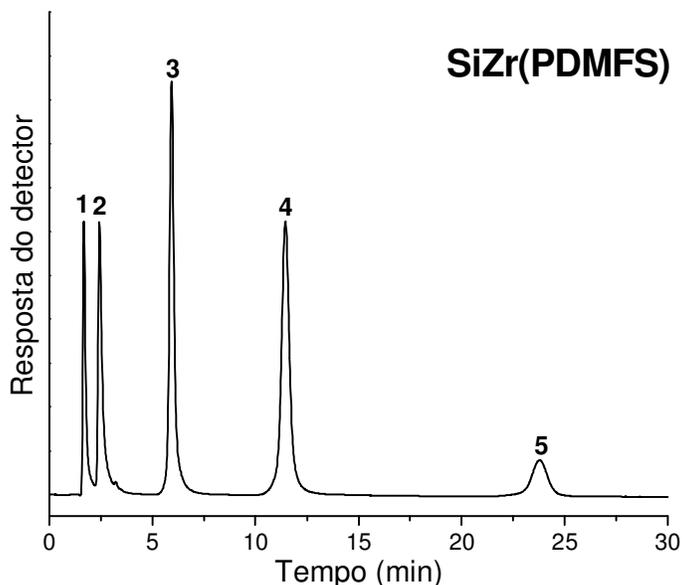


Figura 37. Cromatograma obtido a partir da separação da MT-2 empregando a FE SiZr(PDMFS). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm; temperatura de 25 °C, FM: metanol:tampão fosfato 20 mmol L⁻¹ pH 7 (55:45) (v/v). Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Tabela 6. Parâmetros cromatográficos obtidos para o naftaleno (MT-1), para o acenafteno e para a N,N-dimetilanilina (MT-2), a partir da separação dos compostos das MT-1 e MT-2 utilizando as FE Si(PDMFS), SiZr(PDMFS), Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec

Fases Estacionárias	Compostos	Parâmetros Cromatográficos		
		N/L (pratos m ⁻¹)	As _{10%}	k
Si(PDMFS)	Naftaleno	72712	1,1	5,3
	Acenafteno	74071	1,0	11,2
	N,N-dimetilanilina	61524	1,6	2,8
SiZr(PDMFS)	Naftaleno	73639	1,1	7,3
	Acenafteno ^a	73386	0,9	13,2
	N,N-dimetilanilina ^a	61618	1,4	2,6
Si(PDMFS)ec	Naftaleno	56500	0,8	8,4
	Acenafteno	57478	0,8	19,7
	N,N-dimetilanilina	47200	0,9	3,7
SiZr(PDMFS)ec	Naftaleno	56177	1,1	10,5
	Acenafteno	57145	1,0	25,1
	N,N-dimetilanilina	15322	2,8	5,7

^avalores obtidos da separação da MT-2 com pH da FM ajustado com tampão fosfato em 7,0.

4.6.2 Misturas teste de Tanaka

As misturas teste de Tanaka⁸⁸ foram empregadas para avaliar as diferentes propriedades das FE. A hidrofobicidade ($k_{\text{pentilbenzeno}}$), a seletividade hidrofóbica ($\alpha_{\text{CH}_2} = k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{\text{butilbenzeno}}$), a seletividade estérica ($\alpha_{\text{T/O}} = k_{\text{trifenileno}}/k_{\text{o-terfenila}}$) e a seletividade aromática⁹² ($\alpha_{\text{PB/O}} = k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{\text{o-terfenila}}$) foram obtidas pela eluição da mistura A do protocolo de Tanaka (uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, trifenileno e o-terfenila). Os cromatogramas obtidos na separação desta mistura estão apresentados na Figura 38.

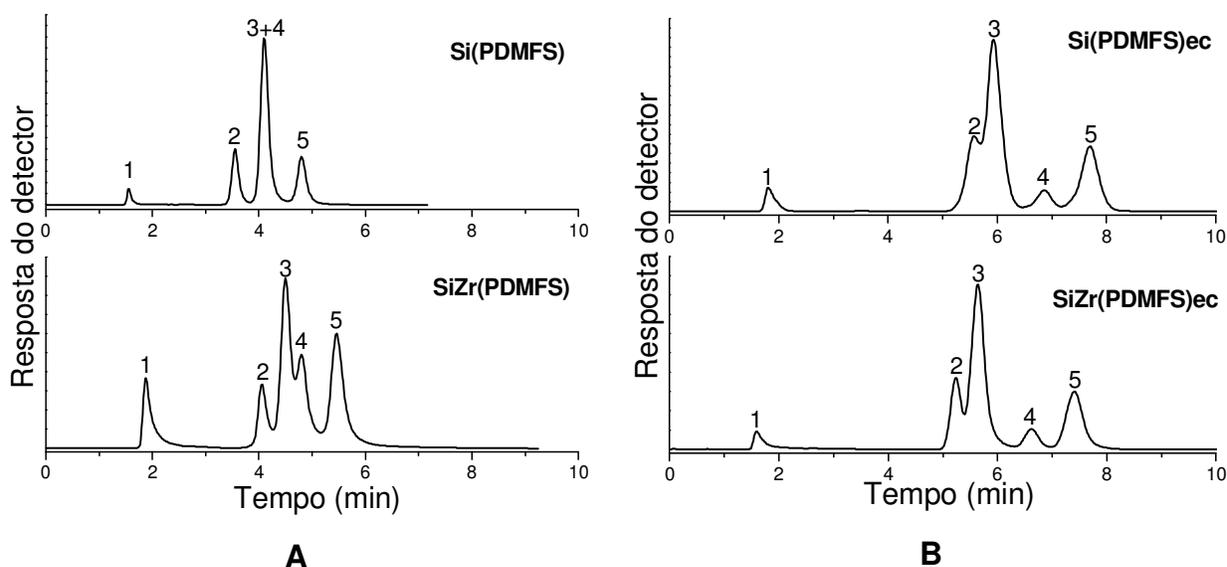


Figura 38. Cromatogramas obtidos na separação da mistura A do protocolo de Tanaka, utilizando as FE (A) Si(PDMFS) e SiZr(PDMFS) e (B) Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: metanol:água 80:20 (v/v); vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 30 $^{\circ}$ C. Compostos teste: (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) trifenileno, (4) pentilbenzeno e (5) *o*-terfenila.

Nos cromatogramas obtidos na separação da mistura A, observa-se que todas as FE apresentaram aproximadamente a mesma separação para o par butilbenzeno e pentilbenzeno, e conseqüentemente, a seletividade hidrofóbica (α_{CH_2}) das fases é bastante similar, conforme consta na Tabela 7. Este valor está na faixa dos obtidos para as FE C18 testadas por Tanaka e colaboradores⁸⁸, que estão entre 1,3 e 1,5. As FE apresentaram hidrofobicidade ($k_{\text{pentilbenzeno}}$) baixa quando comparadas com as FE C18 testadas por Tanaka⁸⁸ (1,3 – 8,0), sendo semelhante aos valores obtidos para FE do tipo fenil, testadas por Euerby *et al.*⁶⁸. Após o capeamento, houve um melhor recobrimento superficial, conforme demonstrado pelo aumento dos valores de $k_{\text{pentilbenzeno}}$, que passou de 1,6 na FE Si(PDMFS) para 2,8 na Si(PDMFS)ec, e de 1,6 da SiZr(PDMFS) para 3,2 da SiZr(PDMFS)ec. Ainda assim, estes valores são baixos em relação aos obtidos nas fases C18, o que é justificável pelo fato do polímero empregado ser do tipo metil-fenil, ou seja, não apresenta cadeias longas de carbono em sua estrutura, contendo apenas grupos metil e fenil.

Com relação à separação dos compostos trifenileno e *o*-terfenila, os valores de seletividade estérica ($\alpha_{\text{T/O}} = k_{\text{trifenileno}}/k_{\text{o-terfenila}}$) das FE preparadas estiveram entre 0,70

e 0,78, sendo que os menores valores foram obtidos com as FE capeadas, ou seja, estas fases apresentaram maior seletividade estérica que as fases não capeadas (a diferença entre os valores de $k_{\text{trifenileno}}$ e $k_{o\text{-terfenila}}$ é maior no caso das fases capeadas). Além disso, os compostos apresentaram inversão na ordem de eluição nas FE em estudo em relação à separação nas FE do tipo C18⁸⁸, por isso o valor de $\alpha_{T/O}$ foi menor que 1. A inversão na ordem de eluição pode ser devido à maior interação π - π entre os grupos fenil das FE e a *o*-terfenila, por esta apresentar estrutura menos rígida que o trifenileno⁶⁸. Apesar da inversão na ordem de eluição, as FE preparadas apresentaram seletividade estérica, de acordo com os valores encontrados na literatura^{68,88}. Corroborando com este resultado, os valores de seletividade aromática das FE ($\alpha_{PB/O}$) foram similares aos obtidos por Euerby *et al.*⁶⁸ durante a caracterização das FE comerciais do tipo fenil ($\alpha_{PB/O} < 1$).

Na Tabela 7 estão apresentados os parâmetros cromatográficos obtidos a partir dos testes de Tanaka.

Tabela 7. Parâmetros cromatográficos obtidos a partir da separação dos compostos das misturas de Tanaka empregando as FE preparadas

FE	$k_{\text{pentilbenzeno}}$	α_{CH_2} ^a	$\alpha_{T/O}$ ^b	$\alpha_{PB/O}$ ^c	$\alpha_{C/F}$ ^d	$\alpha_{B/F}$ ^e 7,6	$\alpha_{B/F}$ ^e 2,7
Si(PDMFS)	1,6	1,32	0,78	0,79	2,10	3,81	0,07
SiZr(PDMFS)	1,6	1,34	0,73	0,82	1,08	46,27	17,22
Si(PDMFS)ec	2,8	1,34	0,70	0,86	0,63	0,30	0,10
SiZr(PDMFS)ec	3,2	1,38	0,70	0,87	0,49	11,70	2,63

^a $\alpha_{CH_2} = k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{\text{butilbenzeno}}$; ^b $\alpha_{T/O} = k_{\text{trifenileno}}/k_{o\text{-terfenila}}$; ^c $\alpha_{PB/O} = k_{\text{pentilbenzeno}}/k_{o\text{-terfenila}}$; ^d $\alpha_{C/F} = k_{\text{cafeína}}/k_{\text{fenol}}$; ^e $\alpha_{B/F} = k_{\text{benzilamina}}/k_{\text{fenol}}$

A partir da separação dos compostos da mistura teste B de Tanaka (Figura 39) pôde-se avaliar a capacidade de formação de ligação de hidrogênio das FE, obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol ($\alpha_{C/F}$). Na separação da mistura B obtida com a FE Si(PDMFS), a cafeína eluiu depois do fenol, e o valor de $\alpha_{C/F}$ foi 2,1, considerado elevado em comparação aos obtidos por Tanaka para as FE C18⁸⁸, nas quais a cafeína elui antes do fenol ($\alpha_{C/F} < 0,9$), devido à baixa interação por ligações de hidrogênio destas FE. Na separação obtida com a FE SiZr(PDMFS), a cafeína praticamente coeluiu com o fenol, indicando que a capacidade de formação de

ligações de hidrogênio em ambas as FE é alta, em especial na FE preparada sobre sílica não modificada, que deve conter um maior número de silanóis residuais, ou seja, que não foram recobertos pelo PDMFS. Após o capeamento, houve inversão da ordem de eluição, e a cafeína eluiu antes do fenol nas FE Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec, com valores de $\alpha_{C/F}$ igual a 0,63 para a fase preparada sobre sílica e 0,45 para a FE zirconizada, indicando que os grupos metila recobriram grande parte dos silanóis e/ou zirconóis do suporte cromatográfico.

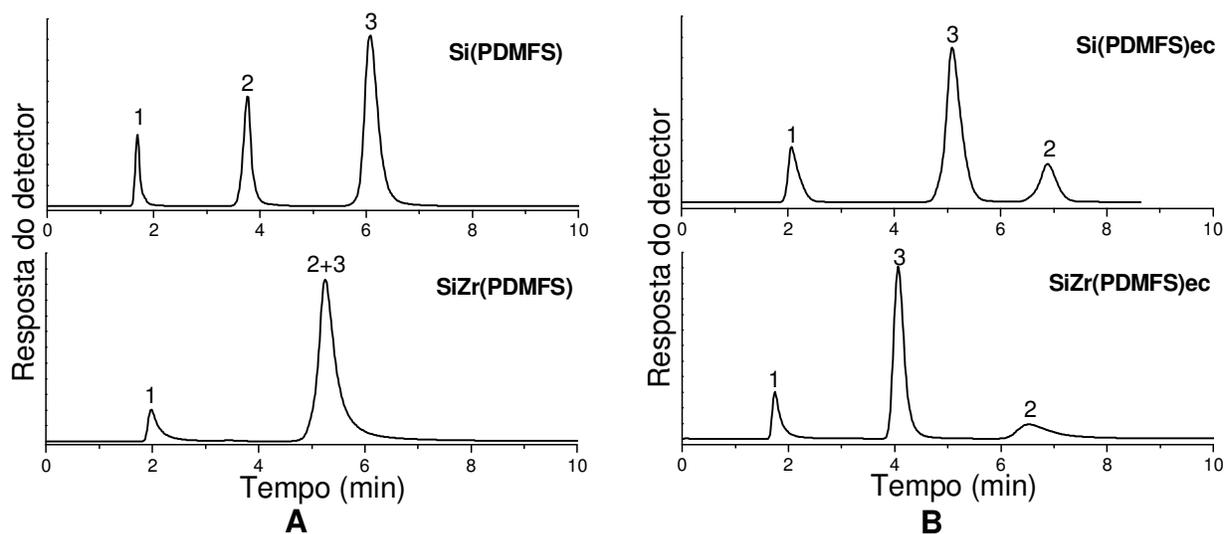


Figura 39. Cromatogramas obtidos na separação da mistura B do protocolo de Tanaka, utilizando as FE (A) Si(PDMFS) e SiZr(PDMFS) e (B) Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: metanol:água 30:70 (v/v); vazão:0,3 mL min^{-1} ; detecção a 254 nm e temperatura de 30 $^{\circ}$ C. Compostos teste: (1) uracila, (2) fenol e (3) cafeína.

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

Na FM a pH 7,6, a maioria dos grupos silanóis está na forma desprotonada (Si-O $^{-}$), e assim, deve interagir com a benzilamina por meio do mecanismo de troca iônica, restando-a fortemente ou até mesmo irreversivelmente. Como pode ser

observado na Figura 40, o pico da benzilamina eluiu em 10,8 min, com $\alpha_{B/F}$ igual a 3,8 para a FE Si(PDMFS), e em 71,7 min, com $\alpha_{B/F}$ igual a 46,3 para a FE SiZr(PDMFS). Deste modo, pode-se concluir que a FE SiZr(PDMFS) apresentou capacidade de troca iônica total extremamente elevada em relação a FE Si(PDMFS) e as FE analisadas por Tanaka⁸⁸, cujos valores de $\alpha_{B/F}$ estão abaixo de 2. Esta capacidade de troca iônica alta é resultante do aumento da acidez dos grupos silanóis do suporte após a incorporação do zircônio (ácido de Lewis), e o recobrimento polimérico não é suficiente para suprimir esta atividade silanofílica elevada.

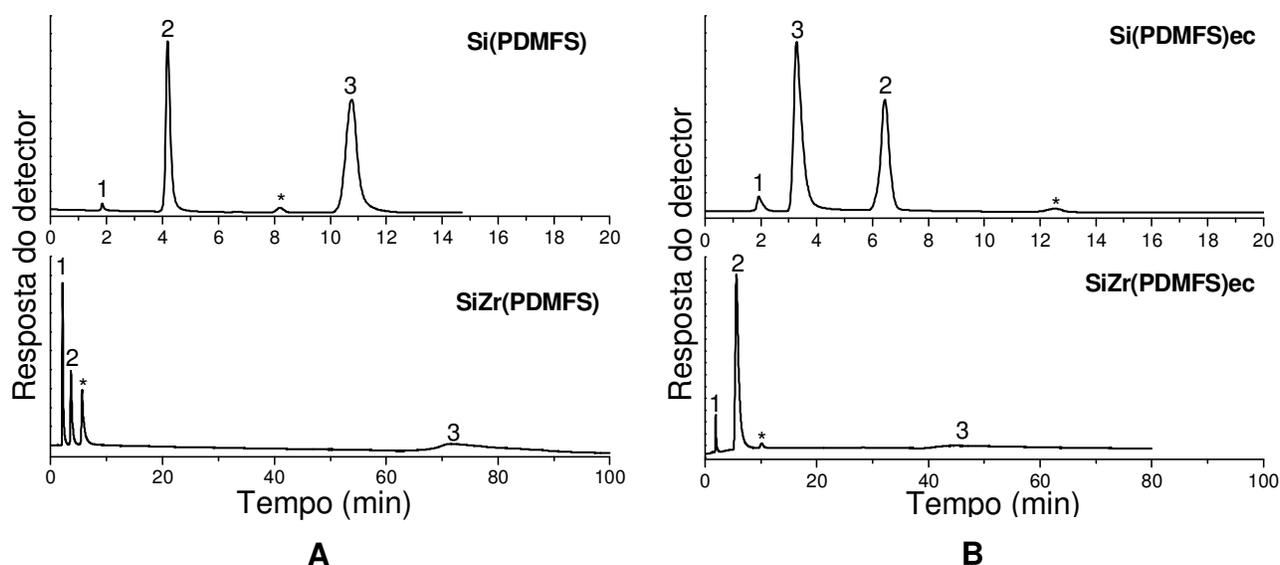


Figura 40. Cromatogramas obtidos na separação da mistura C do protocolo de Tanaka, utilizando as FE (A) Si(PDMFS) e SiZr(PDMFS) e (B) Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol: metanol: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,02 mol L^{-1} 30:70 (v/v) pH 7,6; vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 220 nm e temperatura de 30 $^\circ\text{C}$. Compostos teste: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas.

Após o capeamento, a atividade silanofílica total das FE diminuiu de maneira expressiva, principalmente para a FE preparada sobre sílica não modificada, cujo valor de $\alpha_{B/F}$ passou de 3,8 para 0,3, com a benzilamina eluindo em menos de 4 min, antes do fenol. A FE SiZr(PDMFS)ec apresentou menor retenção para a benzilamina que a fase SiZr(PDMFS), e o valor de $\alpha_{B/F}$ caiu de 46,3 para 11,7, ainda considerado alto em comparação com a maioria das fases comerciais preparadas sobre suporte de sílica.

A acidez dos grupos silanóis residuais das FE foi avaliada a partir da separação da mistura D do protocolo de Tanaka. Em meio ácido (pH 2,7), a benzilamina, protonada neste valor de pH, eluiu praticamente junto com a uracila na separação empregando a FE Si(PDMFS) (Figura 41), mostrando que os grupos silanóis residuais apresentam baixa acidez, sendo o pH 2,7 suficiente para protoná-los. Em contrapartida, a FE SiZr(PDMFS) apresentou retenção elevada para a benzilamina, mesmo em pH 2,7, com $\alpha_{B/F}$ igual a 17,2, confirmando que os silanóis e zirconóis presentes na superfície do suporte zirconizado apresentam acidez bastante elevada, conforme havia sido evidenciado nas separações em meio neutro.

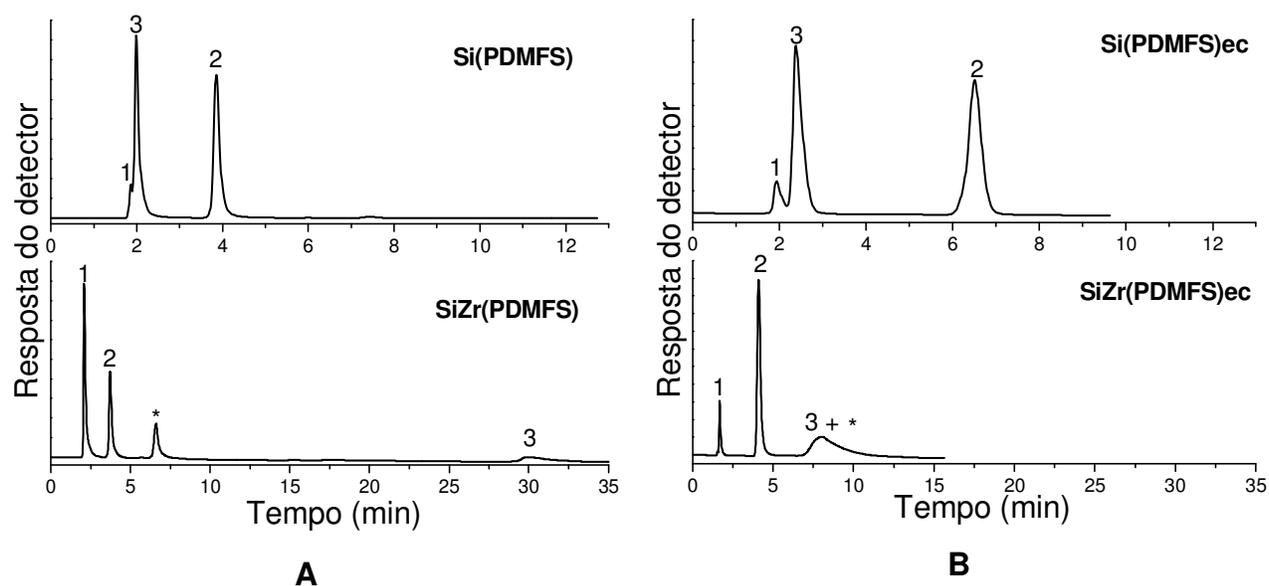


Figura 41. Cromatogramas obtidos na separação da mistura D do protocolo de Tanaka, utilizando as FE (A) Si(PDMFS) e SiZr(PDMFS) e (B) Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS)ec. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ 0,02 mol L^{-1} 30:70 (v/v) pH 2,7; vazão: 0,3 mL min^{-1} ; detecção a 220 nm e temperatura de 30 $^\circ\text{C}$. Compostos teste: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas.

Em meio ácido, não foi observada mudança significativa no comportamento das FE preparadas sobre sílica não modificada antes e após o capeamento, apenas um aumento da retenção de todos os compostos, e os valores de $\alpha_{B/F}$ foram bastante próximos, sendo 0,07 para a FE Si(PDMFS) e 0,10 para a Si(PDMFS)ec. O valor de

$\alpha_{B/F}$ igual a 2,63 obtido para a FE SiZr(PDMFS)ec mostra que o capeamento recobriu alguns sítios ativos do suporte zirconizado, mas este ainda é considerado ácido em comparação com as FE preparadas sobre sílica não modificada.

4.6.3 Avaliação da aplicabilidade das FE preparadas - comparação com colunas comerciais

As FE preparadas foram empregadas na separação de uma mistura de compostos aromáticos, sugerida por Szabó *et al.*⁷⁷, e seu desempenho foi comparado ao de duas colunas comerciais, coluna 1) C18 Nova Pak[®], Waters, 4 μm , 150 mm x 3,9 mm d.i.; coluna 2) fenil-hexil Zorbax[®] Eclipse Plus, Agilent, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm d.i.. Os compostos que constituem esta mistura são: uracila, fenol, *m*-cresol, acetofenona, benzoato de metila, tolueno, *p*-xileno e propilbenzeno, e a separação foi feita no modo de eluição isocrático, empregando as mesmas condições cromatográficas para todas as colunas, com exceção da vazão, que foi 1,0 mL min⁻¹ para as colunas comerciais e 0,3 mL min⁻¹ para as colunas preparadas no laboratório. Os cromatogramas estão apresentados na Figura 42.

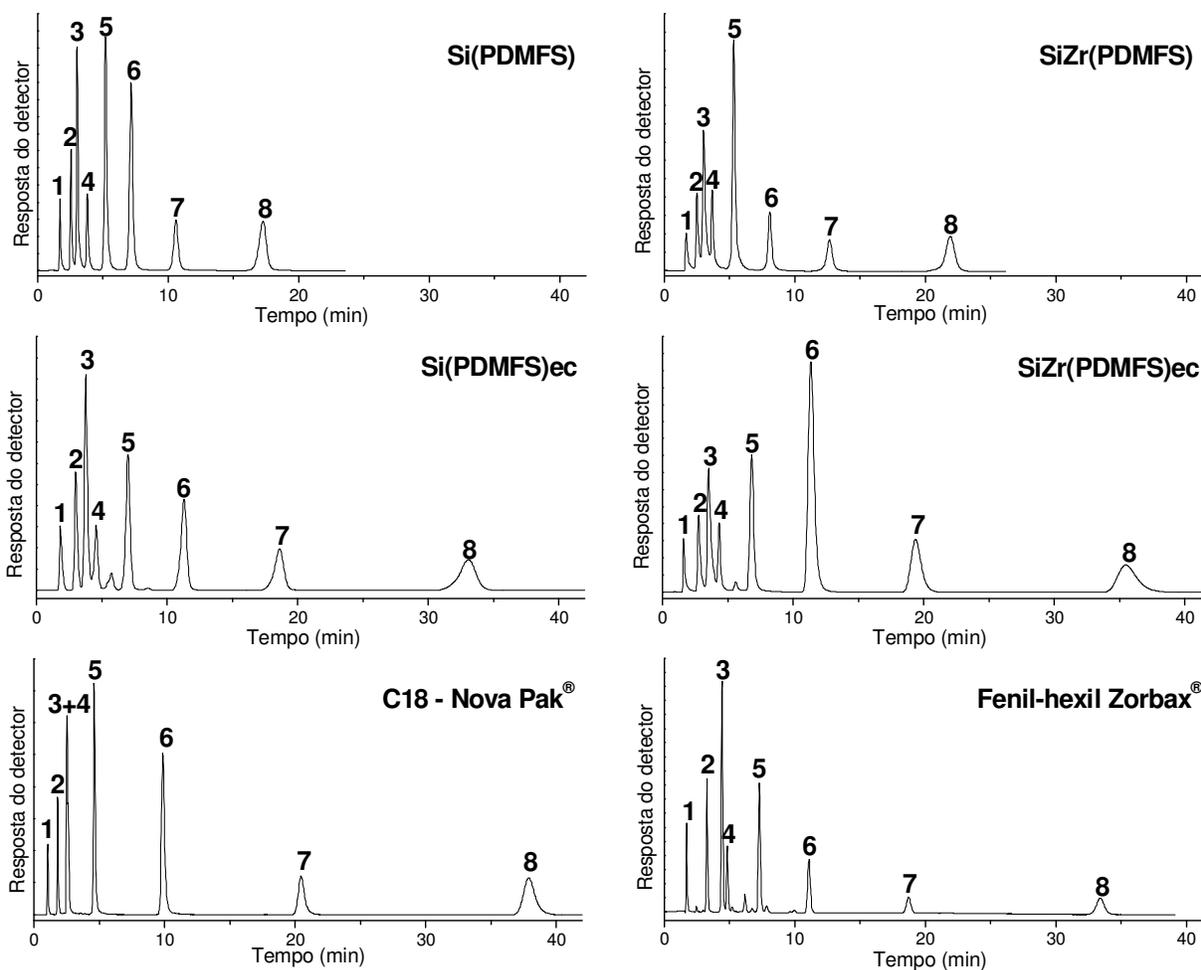


Figura 42. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de compostos aromáticos empregando as colunas preparadas no laboratório, 5 μm , 60 mm x 4 mm, Si(PDMFS), SiZr(PDMFS), Si(PDMFS)ec, SiZr(PDMFS)ec e as colunas comerciais C18 Nova Pak[®], 4 μm , 150 mm x 3,9 mm, e fenil-hexil Zorbax[®], 5 μm , 150 mm x 4,6 mm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:H₂O 55:45 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹ nas colunas preparadas no laboratório e 1,0 mL min⁻¹ nas colunas comerciais; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) fenol, (3) *m*-cresol, (4) acetofenona, (5) benzoato de metila, (6) tolueno, (7) *p*-xileno e (8) propilbenzeno.

As FE desenvolvidas neste trabalho apresentaram resolução acima de 1,2 para todos os picos na separação dos compostos aromáticos escolhidos, assim como a coluna comercial fenil-hexil Zorbax[®], cuja menor resolução foi de 2,0 para o par *m*-cresol (3) e acetofenona (4). Já a coluna comercial C18 Nova Pak[®] não foi capaz de

separar este par de compostos polares nas mesmas condições experimentais das demais colunas.

Dentre as colunas desenvolvidas, a que apresentou o melhor desempenho para esta aplicação foi a coluna recheada com a FE Si(PDMFS), que foi capaz de separar todos os compostos em um tempo de análise inferior a 20 min, com resolução acima de 1,5 para o par *m*-cresol e acetofenona.

O bom desempenho da coluna comercial fenil-hexil Zorbax[®] e das FE preparadas no laboratório é resultado das interações π - π entre os anéis aromáticos do grupo fenil das FE e dos analitos, e embora apresentem polaridade semelhante, como é o caso do *m*-cresol e da acetofenona, as interações adicionais presentes nas fases fenil possibilitam sua separação.

A FE SiZr(PDMFS)_{ec} e a coluna comercial fenil-hexil Zorbax[®] foram empregadas na separação de uma mistura de agrotóxicos para avaliação da potencialidade da nova fase estacionária para este tipo de aplicação. Os cromatogramas obtidos nestas separações estão apresentados na Figura 43.

A coluna comercial fenil-hexil Zorbax[®] apresentou melhor resolução para todos os agrotóxicos analisados, no entanto, a análise teve duração superior a 60 min, devido ao maior comprimento desta coluna e à presença da cadeia hexil, que confere maior retenção para os agrotóxicos menos polares. Deve-se considerar que esta análise foi feita no modo isocrático e o tempo de análise empregando a coluna fenil-hexil Zorbax[®] pode ser reduzido empregando-se eluição por gradiente. A coluna SiZr(PDMFS)_{ec}, apesar do menor comprimento, foi capaz de separar todos os agrotóxicos com resolução mínima de 1,3 e tempo de análise em torno de 20 min, mantendo a ordem de eluição da coluna fenil comercial. O bom desempenho da coluna SiZr(PDMFS)_{ec} demonstra que a separação de agrotóxicos é uma aplicação potencial das fases estacionárias desenvolvidas neste trabalho.

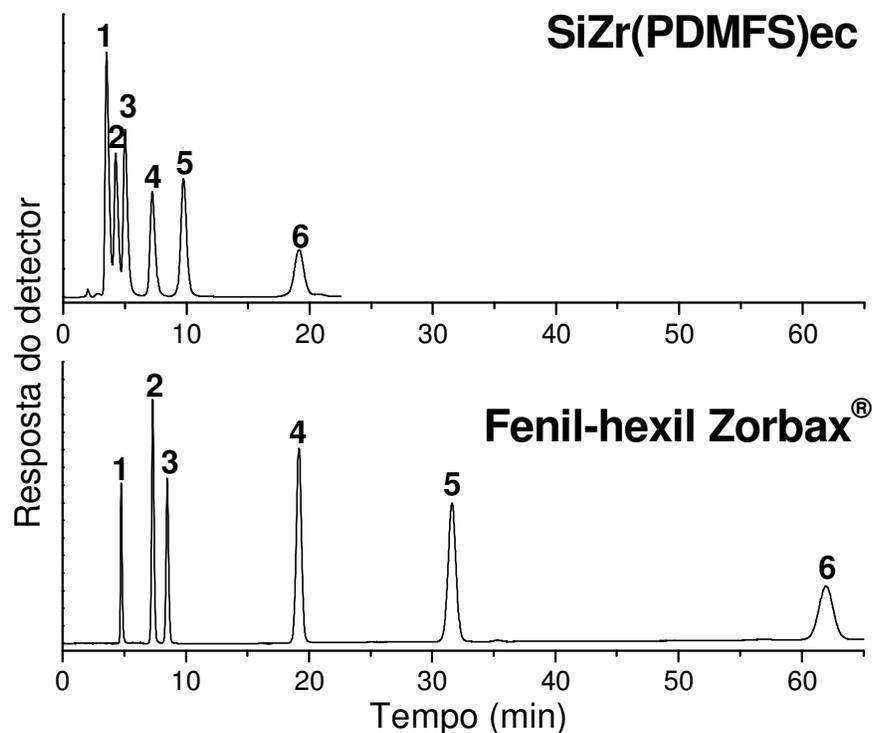


Figura 43. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de agrotóxicos empregando a coluna SiZr(PDMFS)ec preparada no laboratório, 5 μm , 60 mm x 4 mm, SiZr(PDMFS)ec e a coluna comercial fenil-hexil Zorbax[®], 5 μm , 150 mm x 4,6 mm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:H₂O 50:50 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹ na coluna SiZr(PDMFS)ec e 1,0 mL min⁻¹ na coluna comercial; detecção a 220 nm e temperatura de 25 °C. Compostos teste: (1) benomil, (2) cianazina, (3) tebutiurum, (4) paratiom, (5) linurom e (6) diurom.

As colunas SiZr(PDMFS)ec e a comercial fenil-hexil Zorbax[®] também foram empregadas na separação de uma mistura contendo benzeno e 8 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Os cromatogramas obtidos para esta separação estão apresentados na Figura 44.

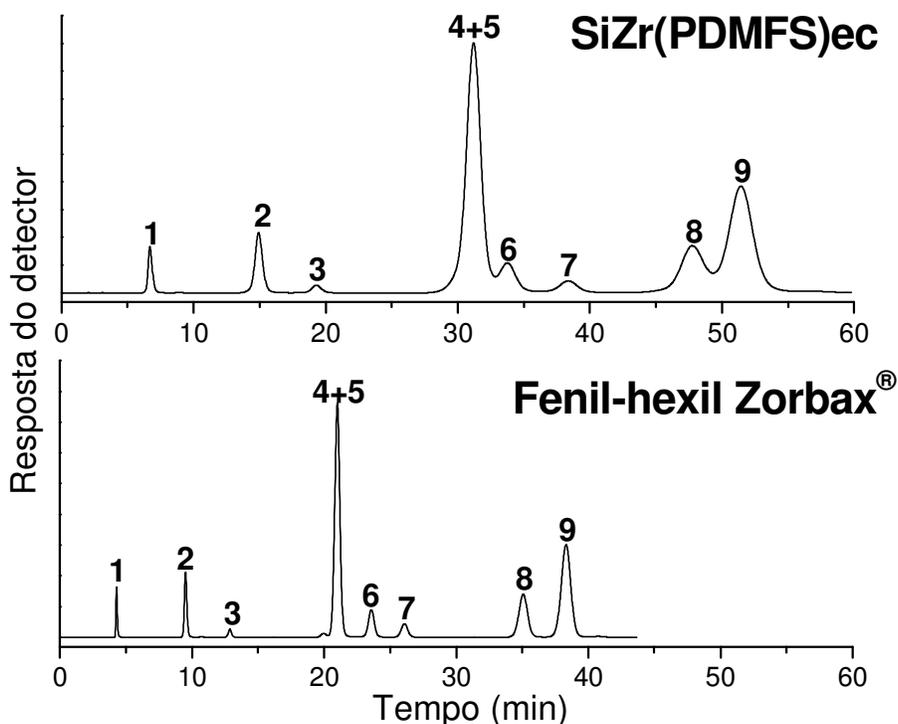


Figura 44. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura contendo benzeno e alguns hidrocarbonetos policíclicos aromáticos empregando a coluna SiZr(PDMFS)ec preparada no laboratório, 5 μm , 60 mm x 4 mm, e a coluna comercial Fenil-hexil Zorbax®, 5 μm , 150 mm x 4,6 mm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel e vazão: metanol:H₂O 55:45 (v/v) a 0,3 mL min⁻¹ na coluna SiZr(PDMFS)ec e metanol:H₂O 65:35 (v/v) a 1,0 mL min⁻¹ na coluna comercial; detecção a 262 nm e temperatura de 25 °C. Compostos teste: (1) benzeno, (2) naftaleno, (3) acenaftileno, (4) acenafteno, (5) fluoreno, (6) fenantreno, (7) antraceno, (8) fluoranteno e (9) pireno.

Quando a separação dos HPA foi feita na coluna fenil-hexil Zorbax® e na coluna SiZr(PDMFS)ec empregando-se FM com a mesma força cromatográfica, a coluna comercial apresentou maior retenção que a coluna SiZr(PDMFS)ec para os compostos analisados, devido à cadeia hexil entre o anel aromático e a superfície da sílica, que confere maior seletividade hidrofóbica, e também devido ao maior comprimento da coluna comercial. No entanto, empregando-se uma fase móvel de menor força cromatográfica com a coluna SiZr(PDMFS)ec, a seletividade das duas colunas foi a mesma, havendo coeluição do acenafteno e do fluoreno em ambas, conforme apresentado na Figura 44.

A partir dos testes de Tanaka, concluiu-se que as FE preparadas sobre suporte de sílica não modificada apresentam menor atividade silanofílica tanto em meio ácido como neutro, portanto, estas fases foram empregadas na separação de uma mistura contendo alguns fármacos de características básicas, que normalmente são muito retidos nas fases estacionárias a base de sílica devido às interações por troca iônica com os silanóis residuais. Esta mesma mistura foi analisada empregando-se as colunas comerciais C18 Nova Pak[®] e fenil-hexil Zorbax[®] para comparação com o desempenho das FE Si(PDMFS) e Si(PDMFS)ec. Os cromatogramas obtidos para estas análises estão apresentados na Figura 45.

A FE Si(PDMFS) apresentou melhor desempenho cromatográfico que as demais colunas na separação dos fármacos selecionados, e ainda houve inversão na ordem de eluição de alguns compostos (dizempam, amitriptilina e nortriptilina), sugerindo que o tipo de interação entre as FE e os analitos são diferentes. De acordo com o resultado obtido nas separações anteriores, esperava-se que o desempenho da coluna comercial fenil-hexil Zorbax[®] fosse equivalente ao desempenho das FE desenvolvidas, mas no caso dos fármacos com características básicas, esta coluna apresentou maior retenção e menor seletividade que as colunas preparadas neste trabalho.

Como as condições cromatográficas empregadas foram as mesmas para todas as FE, com exceção da vazão e das dimensões das colunas, suspeita-se que o capeamento, a diferença do tipo de sílica de cada fase e a presença de cadeias longas de carbono (hexil e octadecil) sejam os responsáveis pelas seletividades diferentes. No caso das colunas Si(PDMFS)ec e fenil-hexil Zorbax[®], o capeamento e a cadeia hexil devem diminuir o caráter polar das fases. Com relação ao tipo de sílica, como foi empregada fase móvel em meio ácido, esperava-se que as possíveis interações por troca iônica entre os compostos básicos e o suporte fossem minimizadas, mas a partir das assimetrias elevadas ($As_{10\%} > 3$) para o pico do dextrometorfano, amitriptilina e nortriptilina na coluna C18 Nova Pak[®], pode-se supor que a acidez da sílica empregada nesta coluna seja alta.

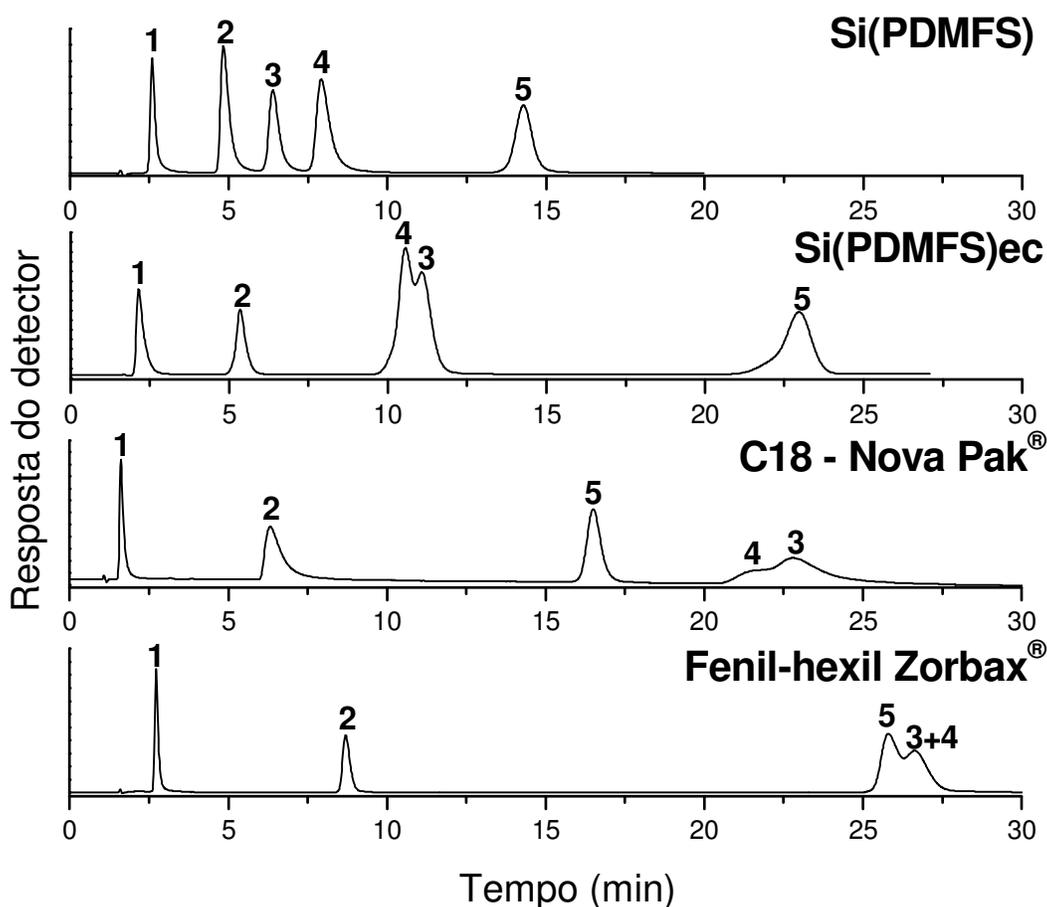


Figura 45. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de fármacos empregando as colunas preparadas no laboratório, 5 μm , 60 mm x 4 mm, Si(PDMFS) e Si(PDMFS)ec e as colunas comerciais C18 Nova Pak[®], 4 μm , 150 mm x 3,9 mm, e fenil-hexil Zorbax[®], 5 μm , 150 mm x 4,6 mm. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μL ; fase móvel: metanol:KH₂PO₄/H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹ pH 2,7 50:50 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹ nas colunas preparadas no laboratório e 1,0 mL min⁻¹ nas colunas comerciais; detecção a 220 nm e temperatura de 25 °C. Compostos teste: (1) levofloxacina, (2) dextrometorfano, (3) nortriptilina, (4) amitriptilina e (5) diazepam.

Deve-se levar em consideração que a coluna Si(PDMFS) apresentou melhor desempenho apesar de seu comprimento e diâmetro interno serem menores que das colunas comerciais, o que proporciona um custo reduzido por análises, uma vez que os gastos com fase estacionária e solventes são minimizados. Além disso, a fase Si(PDMFS) apresenta menor custo que a FE Si(PDMFS)ec, a qual inclui os gastos relacionados ao capeamento.

4.7 Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias

A estabilidade química das fases estacionárias foi avaliada em condições drásticas de análise. Para isto, empregou-se a fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (55:45, v/v) eluída através das colunas contendo as fases estacionárias a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ sob temperatura de 50 °C. A avaliação periódica do desempenho cromatográfico das colunas foi feita por meio da separação da mistura teste 2.

A estabilidade das fases estacionárias foi avaliada a partir de medidas periódicas da eficiência das colunas (número de pratos/metro) obtida para o pico do acenafteno com a passagem contínua da fase móvel a pH 10. Para facilitar a comparação entre os resultados obtidos para cada fase estacionária, a variação da eficiência do pico acenafteno foi expressa em termos de volumes de coluna (V_{col}) e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 46. Cada volume de coluna corresponde à quantidade de fase móvel necessária para preencher os espaços não ocupados pela fase estacionária no interior da coluna cromatográfica. Para as colunas preparadas neste trabalho um volume de coluna corresponde a 0,57 mL de fase móvel.

Quando a fase estacionária é submetida a condições mais drásticas de fase móvel, em um determinado momento ocorre uma queda brusca de sua eficiência, o que sugere que mudanças significativas estão acontecendo no leito cromatográfico, tornando-o ineficiente para separações. Normalmente, esta queda brusca ocorre quando a eficiência da coluna atinge 50 % de seu valor inicial¹⁰¹.

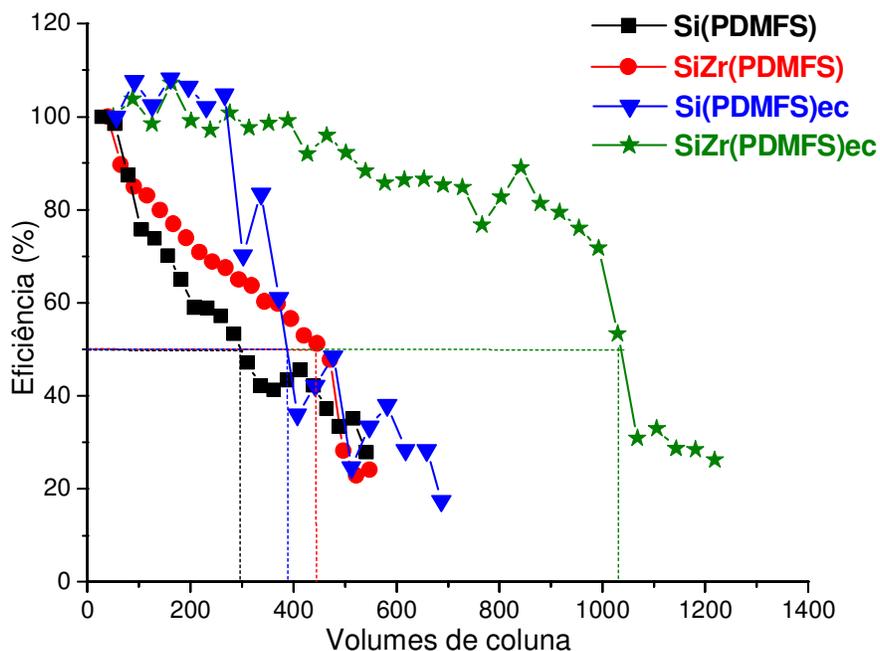


Figura 46. Variação da porcentagem de eficiência das colunas recheadas com as fases Si(PDMFS), Si(PDMFS)ec, SiZr(PDMFS) e SiZr(PDMFS)ec em função da passagem da fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (55:45, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; temperatura de 50 °C e detecção a 254 nm.

A partir da Figura 46, observa-se que a fase estacionária que apresenta a maior estabilidade é a SiZr(PDMFS)ec, resistindo à passagem de aproximadamente 1000 volumes de colunas ou seja, 570 mL de fase móvel em condições drásticas de análise. As demais colunas apresentaram estabilidade inferior a 500 volumes de coluna, variando na seguinte ordem: SiZr(PDMFS) > Si(PDMFS)ec > Si(PDMFS). A FE Si(PDMFS) apresentou estabilidade equivalente às demais FE preparadas no LabCrom empregando suporte de sílica não modificada e não capeadas^{33,94}. Ao contrário do esperado, as FE Si(PDMFS)ec e SiZr(PDMFS) apresentaram estabilidades muito baixas. De acordo com estes resultados, podem-se inferir o seguinte: 1) o PDMFS não recobre perfeitamente a superfície dos suportes, conforme havia sido evidenciado pelas propriedades cromatográficas determinadas anteriormente; 2) o recobrimento metálico da superfície da sílica não é homogêneo, apesar de aumentar muito a acidez dos sítios ativos do suporte; e 3) o capeamento da FE preparada sobre sílica não

modificada parece não ser muito efetivo, e pode ser devido à menor reatividade dos sítios do suporte de sílica não metalizada. Portanto, é necessária a combinação do suporte zirconizado com o capeamento para que as FE de PDMFS sejam tão estáveis quanto às fases estacionárias preparadas recentemente no LabCrom a partir de poli(metiltetradecilsiloxano) imobilizado termicamente e por radiação gama sobre suporte de sílica zirconizada¹⁸. Estas FE foram avaliadas sob as mesmas condições experimentais empregadas neste trabalho e os valores de estabilidade obtidos estão entre 1100 e 1300 V_{col} .

Algumas FE comerciais contendo grupos C18 quimicamente ligado à sílica também foram avaliadas no LabCrom com relação à sua estabilidade térmica^{6,18}, para isso, foram empregadas as mesmas condições drásticas de análise citadas anteriormente. As FE comerciais avaliadas foram: Kromasil-C18, Spherisorb ODS, Rainin ODS e Lichrosorb RP18. A FE Kromasil-C18 apresentou a maior resistência química nas condições avaliadas, sendo estável a eluição de mais de 2000 V_{col} . Esta estabilidade extremamente elevada é resultado da melhor proteção do suporte proporcionada pelo capeamento da FE com grupos CH_3 . As demais FE comerciais avaliadas, não capeadas, apresentaram-se estáveis durante a eluição de aproximadamente 750 V_{col} , sendo menos estáveis que a FE SiZr(PDMFS)ec.

A Figura 47 apresenta o comportamento do fator de assimetria do acenafteno nas FE preparadas, em função da passagem de fase móvel em condições drásticas de análise.

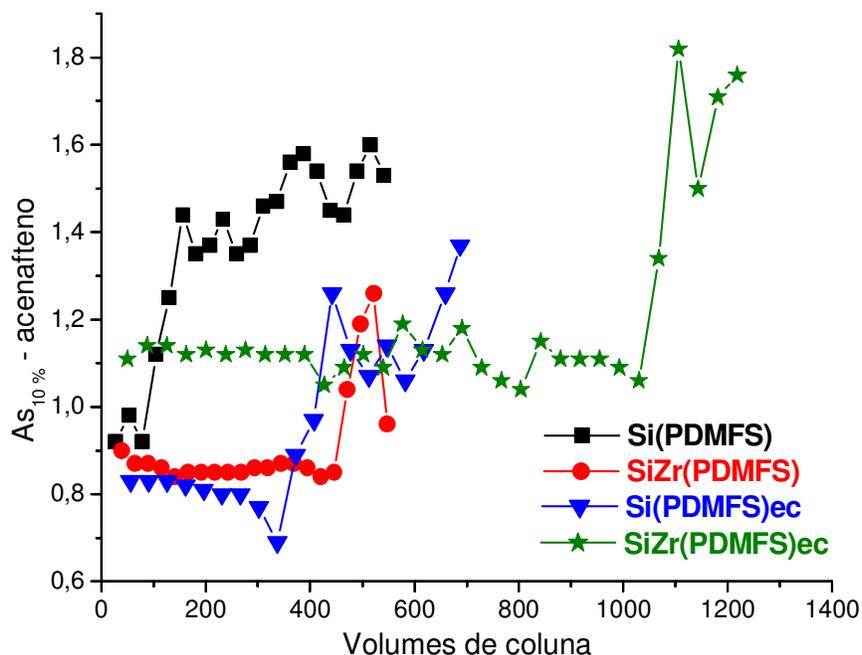


Figura 47. Variação do fator de assimetria ($As_{10\%}$) do acenafteno obtido pelas FE Si(PDMFS), Si(PDMFS)ec, SiZr(PDMFS) e SiZr(PDMFS)ec em função da passagem de fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (55:45, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; temperatura de 50 °C e detecção a 254 nm.

A variação do fator de assimetria para as quatro FE preparadas foi similar à obtida para a eficiência. Para as FE Si(PDMFS)ec, SiZr(PDMFS) e SiZr(PDMFS)ec verifica-se que o fator de assimetria permaneceu praticamente constante até ocorrer a perda de 50 % da eficiência das respectivas colunas, quando se observou uma variação aleatória do valor de fator de assimetria. No caso da coluna contendo a fase Si(PDMFS), a desordem do fator de assimetria ocorreu praticamente desde o início do teste, seguindo o comportamento da eficiência da coluna, que apresentou uma queda mais acentuada que as demais colunas avaliadas, comprovando a menor estabilidade desta FE frente à fases móveis alcalinas.

5. Conclusões

O procedimento de metalização da superfície da sílica incorporou uma quantidade significativa de zircônio ao suporte e provocou aumento do valor de área superficial específica e diminuição do volume e diâmetro de poros com relação às partículas de sílica não modificada e, apesar destas mudanças, as características físico-químicas da sílica metalizada são consideradas adequadas para a aplicação como suporte cromatográfico.

Os testes iniciais envolvendo o preparo de fases estacionárias a partir do poli(metilfenilsiloxano) (PMFS) mostraram que as interações entre este polímero e o suporte de sílica não ocorrem de maneira repetitiva, possivelmente devido ao impedimento estérico entre as cadeias do PMFS. Ao contrário, as FE preparadas a partir do copolímero poli(dimetilsiloxano-*co*-metilfenilsiloxano) (PDMFS) apresentaram boa repetibilidade de preparo e de comportamento cromatográfico, o que pode ser atribuído à presença da cadeia de dimetilsiloxano, que evita o impedimento estérico entre grupos fenil e facilita as interações com o suporte cromatográfico.

A otimização das condições de imobilização térmica do PDMFS sobre a sílica mostrou que as FE com melhor desempenho cromatográfico foram obtidas em temperatura de 140 °C e 6 h de tratamento térmico. A caracterização físico-química das FE preparadas nestas condições, sobre os suportes de sílica não modificada e zirconizada, sugere que o PDMFS está fisicamente adsorvido e quimicamente ligado aos suportes, sendo que as interações com o suporte metalizado apresentam maior intensidade, o que pode ser decorrente do aumento da atividade dos silanóis da superfície da sílica após a incorporação do zircônio. Após o capeamento, houve um aumento de cerca de 2 % na porcentagem de carbono e redução do número de silanóis livres e vicinais dos suportes cromatográficos.

O desempenho cromatográfico das FE foi adequado, sendo similar ao de colunas comerciais tradicionais, com eficiência superior a 70000 pratos m^{-1} para o acenafteno no caso das FE não capeadas e acima de 56000 pratos m^{-1} nas FE capeadas. As características cromatográficas das fases estacionárias foram similares no que diz respeito às seletividades hidrofóbica, estérica e aromática, o que já era esperado, pois estes parâmetros estão relacionados aos grupos presentes na cadeia

polimérica. As FE capeadas apresentaram maior hidrofobicidade que as FE não capeadas, devido à incorporação dos grupos metila na superfície do suporte. A FE Si(PDMFS) apresentou maior capacidade de formação de ligações de hidrogênio que a FE SiZr(PDMFS), e isto pode ser resultado de um maior número de silanóis residuais na FE preparada sobre sílica não modificada, ou seja, houve um recobrimento melhor do suporte zirconizado, uma vez que as interações do PDMFS foram maiores com este tipo de suporte. As FE capeadas apresentaram capacidade de formação de ligações de hidrogênio significativamente menores que as fases não capeadas, por causa do melhor recobrimento dos sítios ativos do suporte. Com relação à atividade silanofílica total e em meio ácido, concluiu-se que o procedimento de zirconização aumentou a acidez dos grupos silanóis da sílica, além de incorporar os grupos zirconóis, que são ácidos de Lewis, e isto conferiu à FE SiZr(PDMFS) atividade silanofílica extremamente elevada, inclusive em meio ácido, uma vez que o pH 2,7 não foi suficiente para a protonação dos sítios ativos desta FE. O capeamento foi capaz de recobrir alguns sítios ativos do suporte, diminuindo a atividade silanofílica das fases preparadas sobre sílica não metalizada, por outro lado, para as FE preparadas sobre sílica zirconizada o capeamento não teve um efeito muito expressivo sobre a acidez do suporte.

As FE apresentaram aplicabilidade potencial para a separação de compostos aromáticos de diferentes polaridades, alguns HPA e agrotóxicos. A FE Si(PDMFS) apresentou desempenho cromatográfico superior às colunas comerciais C18 Nova Pak[®] e fenil-hexil Zorbax[®] na análise de alguns fármacos de caráter básico, cuja separação no modo de eluição isocrático e em colunas C18 tradicionais é problemática.

A estabilidade das FE, em condições drásticas de análise, aumenta na seguinte ordem: Si(PDMFS) < Si(PDMFS)_{ec} < SiZr(PDMFS) < SiZr(PDMFS)_{ec}. A FE SiZr(PDMFS)_{ec} é de 2 a 3 vezes mais estável que as demais em termos de volumes de coluna, mostrando que a combinação do suporte zirconizado com o capeamento é uma estratégia importante para a obtenção de fases de PDMFS com estabilidade elevada.

6. Referências Bibliográficas

1. C.H. Collins, G.L. Braga, P.S. Bonato, **Fundamentos de Cromatografia**, Editora da UNICAMP, Campinas, 2006.
2. E. Tonhi, **Preparação de Colunas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Recheadas com Polissiloxanos (C1, C8 e C14) Imobilizados sobre Partículas de Sílica Porosa de 5 µm**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2004.
3. V.R. Meyer, **Practical High Performance Liquid Chromatography**, 2^a.ed., John Wiley & Sons, New York, 1996.
4. E. Tonhi, K.E. Collins, I.C.S.F Jardim, C.H. Collins, **Quim. Nova**, 24, 616, 2002.
5. H.A. Claessens, M.A. van Straten, **J. Chromatogr. A**, 1060, 23, 2004.
6. A.M. Faria, C.H. Collins, I. C. S. F. Jardim, **J. Braz. Chem. Soc.**, 20, 1385, 2009.
7. R.E. Majors, **LC-GC Suppl.**, 28, S7, 2010.
8. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, **Practical HPLC Method Development**, 2^a.ed., John Wiley & Sons, New York, 1997.
9. A. Berthod, **J. Chromatogr.**, 549, 1, 1991.
10. J. Nawrocki, **J. Chromatogr. A**, 779, 29, 1997.
11. M. Petro, D. Berek, **Chromatographia**, 37, 549, 1993.
12. R.M. Smith, **J. Chromatogr.**, 291, 372, 1984.
13. J.V. Dawkins, L.L. Lloyd, F.P. Warner, **J. Chromatogr.**, 352, 157, 1986.
14. Y. Mao, B.M. Fung, **J. Chromatogr. A**, 790, 9, 1997.
15. J.J. Pesek, M.T. Matyska, **J. Chromatogr. A**, 952, 1, 2002.
16. J. Li, P.W. Carr, **Anal. Chem.**, 68, 2857, 1996.
17. J. Li, Y. Hue, P.W. Carr, **Anal. Chem.**, 69, 3884, 1997.
18. 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, SP, 2006.
19. U.D. Neue, T.H. Walter, B.A. Alden, Z. Jiang, R.P. Fisk, J.T. Cook, K.H. Glose, J.L. Carmody, J.M. Grassi, Y.F. Cheng, Z. Lu, R. Crowley, **Am. Lab.**, 31, 36, 1999.
 20. Y.F. Cheng, T.H. Walter, Z. Lu, P. Iraneta, B.A. Alden, C. Gendreau, U.D. Neue, J.M. Grassi, J.L. Carmody, J.R. O'Gara, R.P. Fisk, **LC-GC North Am.**, 18, 1162, 2000.
 21. K.D. Wyndhan, J.E. O'Gara, T.H. Walter, K.H. Glose, N.L. Lawrence, B.A. Alden, G.S. Izzo, C.J. Hudalla, P.C. Iraneta, **Anal. Chem.**, 75, 6781, 2003.
 22. L. Maldaner, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, **Quím. Nova**, 33, 1559, 2010.
 23. C. Stella, S. Rudaz, J.L. Veuthey, A. Tchaplá, **Chromatographia Suppl.**, 53, S113, 2001.
 24. E. Lesellier, C. West, **J. Chromatogr. A**, 1158, 329, 2007.
 25. J. Nawrocki, D.L. Moir, W. Szczepaniak, **Chromatographia**, 28, 143, 1989.
 26. R.B. Silva, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A**, 845, 417, 1999.
 27. R.B. Silva, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A**, 869, 137, 2000.
 28. R.B. Silva, Y. Gushikem, C.H. Collins, **J. Sep. Sci.**, 24, 49, 2001.
 29. L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim, **J. Chromatogr. A**, 845, 423, 1999.
 30. L.F.C. Melo, C.H. Collins, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, **J. Chromatogr. A**, 869, 129, 2000.
 31. A.M. Faria, D.R. Magalhães, K.E. Collins, C.H. Collins, **Anal. Chim. Acta**, 550, 137, 2005.
 32. A.M. Faria, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Sep. Sci.**, 29, 782, 2006.
 33. A.M. Faria, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A**, 1122, 114, 2006.
 34. C.J. Dunlap, C.V. McNeff, D. Stoll, P.W. Carr, **Anal. Chem.**, 73(21), A598, 2001.
 35. C.F. Zuin, **Preparação e Avaliação de Fases Estacionárias C8 a partir de Suporte de Sílica Modificada**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 1998.

-
36. U.D. Neue, **Columns: Theory, Technology and Practice**, Wiley-VCH, New York, 1997.
37. J.J. Kirkland, J.W. Henderson, J.J. DeStefano, M.A. van Straten, H.A. Claessens, **J. Chromatogr. A**, 762, 97, 1997.
38. J.J. Pesek, M.T. Matyska, R.J. Yu, **J. Chromatogr. A**, 947, 195, 2002.
39. L.C. Sander, S.A. Wise, **Crit. Rev. Anal. Chem.**, 18, 299, 1987.
40. J.E. Haky, A.R.B.M. Dunn, **J. Chromatogr. A**, 541, 303, 1991.
41. K.K. Unger, N. Becker, P. Roumellotis, **J. Chromatogr.**, 725, 115, 1978.
42. J.J. Kirkland, J.J. DeStefano, **J. Chromatogr. Sci.**, 8, 309, 1970.
43. L. Li, P.W. Carr, J.F. Evans, **J. Chromatogr. A**, 868, 153, 2000.
44. J.J. Kirkland, J. L. Glajch, R.D. Farlee, **Anal. Chem.**, 61, 2, 1989.
45. J.J. Kirkland, J.C.H. Dilks, J.W. Henderson, **LC-GC**, 11, 290, 1993.
46. C.R. Silva, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, **J. Chromatogr. A**, 1030, 157, 2004.
47. Hanson, M.; Unger, K. K.; **Trends Anal. Chem.**, 11, 368, 1992.
48. G. Schomburg, J. Köhler, H. Figge, A. Deege, U. Bien-Vogelsang, **Chromatographia**, 18, 265, 1984.
49. U. Bien-Vogelsang, A. Deege, H. Figge, J. Köhler, G. Schomburg, **Chromatographia**, 19, 170, 1984.
50. G. Schomburg, **Trends Anal. Chem.**, 10, 163, 1991.
51. J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, C.V. McNeff, A. McCormick, P.W. Carr, **J. Chromatogr. A**, 1028, 31, 2004.
52. R. Ohmacht, M. Kele, Z. Matus, **Chromatographia**, 28, 19, 1989.
53. L. Janus, B. Carbonnier, A. Deratani, M. Bacquet, G. Crini, J. Laureyns, M. Morcellet, **New J. Chem.**, 17, 307, 2003.

-
54. B. Carbonnier, L. Janus, Y. Lekchiri, M. Morcellet, **J. Appl. Polym. Sci.**, 91, 1419, 2004.
55. J. Kohler, **Chromatographia**, 21, 573, 1986.
56. A. Kurganov, Y. Puchkova, V. Davankov, F. Eisenbeiss, **J. Chromatogr. A**, 663, 163, 1994.
57. Y. Mao, B.M. Fung, **J. Chromatogr. A**, 790, 9 1997.
58. D.A. Fonseca, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A**, 1030, 209, 2004.
59. C.B.G. Botolli, C.R.M. Vigna, G. Fischer, K. Albert, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A**, 1030, 217, 2004.
60. T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, 17, 1265,1994.
61. T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, 21, 645, 1998.
62. 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.
63. C.B.G. Bottoli, **Sorção, Imobilização e Extração de Polissiloxanos em Sílicas Porosas para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2002.
64. R. Ohmacht, M. Kele, Z. Matus, **Chromatographia**, 28, 19, 1989.
65. L.R.S. Moraes, I.C.S.F. Jardim, **J. Chromatogr. A**, 1073, 127, 2005.
66. E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A**, 948, 109, 2002.
67. M.A. Kapor, **Preparação de Fases Estacionárias SiO₂(PMOS), Sorvidas e Imobilizadas por Microondas para Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.
68. M.R. Euerby, P. Petersson, W. Campbell, W. Roe, **J. Chromatogr. A**, 1154, 138, 2007.
69. L. Nondek, **J. Chromatogr.**, 372, 61, 1986.

-
70. L. Zhou, Y.Wu, B.D. Johnson, J.M. Wyvratt, **J. Chromatogr. A**, 866, 281, 2000.
71. S.L. Richhemier, M.C. Kent, M.W. Bernat, **J. Chromatogr. A**, 677, 75, 1994.
72. F. Dondi, Y.D. Kahie, **J. Chromatogr.**, 461, 281, 1989.
73. D.H. Marchand, K. Croes, J.W. Dolan, L.R. Snyder, R.A. Henry, K.M.R. Kallury, S. Waite, P.W. Carr, **J. Chromatogr. A**, 1062, 65, 2005.
74. United States Pharmacopeia – National Formulary (**USP-NF**).
75. I.E. Neimark, V.M. Chertov, **Dokl. Akad. Nauk. SSSR.**, 138, 877, 1961
76. G. Szabó, E. Csató, K. Offenmüller, M. Dévai, A. Borbély-Kuszmán, G. Liptai, **Chromatographia**, 26, 255, 1988.
77. G. Szabó, E. Csató, P. Keresztes, J.P. Pallos, **J. Chromatogr.**, 463, 345, 1989.
78. M.H. Yang, I.L. Chen, D.H. Wu, **J. Chromatogr. A**, 722, 97, 1996.
79. J.D. Goss, **J. Chromatogr. A**, 828, 267, 1998.
80. T. Letzel, U. Pöschl, R. Wissiack, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, R. Niessner, **Anal. Chem.**, 73, 1634, 2001.
81. M. Yang, S. Fazio, D. Munch, P. Drumm, **J. Chromatogr. A**, 1097 (2005) 124-129
82. S. Kayillo, G.R. Dennis, R.A. Shalliker, **J. Chromatogr. A**, 1126, 283, 2006.
83. S. Kayillo, G.R. Dennis, R.A. Shalliker, **J. Chromatogr. A**, 1145, 133, 2007.
84. S. Kayillo, G.R. Dennis, R.A. Shalliker, **J. Chromatogr. A**, 1148, 168, 2007.
85. K.E. Collins, A.C. Franchon, I.C.S.F. Jardim, E. Radanovic, M.C. Gonçalves, **LC-GC North Am.**, 18, 106, 2000.
86. J. Lourenço, **Preparação e Caracterização de Fases Estacionárias de Dimetilmetil-fenilsiloxano sobre Sílica para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2005.
87. S.J. Gregg, K.S.W. Sing, **Adsorption Surface Area and Porosity**, 2ed., Academic Press, London, 1982.
88. K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, **J. Chromatogr. Sci.**, 27, 721, 1989.

-
89. H. Engelhardt, M. Junghein, **Chromatographia**, 29, 59, 1990.
 90. U.D. Neue, E. Serowik, P. Iraneta, B.A. Alden, T.H. Walter, **J. Chromatogr. A**, 849, 87, 1999.
 91. U.D. Neue, B.A. Alden, T.H. Walter, **J. Chromatogr. A**, 849, 101, 1999.
 92. J. Horak, W. Lindner, **J. Chromatogr. A**, 1043, 177, 2004.
 93. K. Okusa, Y. Suita, Y. Otsuka, M. Tahara, T. Ikegami, N. Tanaka, M. Ohira, M. Takahashi, **J. Sep. Sci.**, 33, 348, 2010.
 94. D.A. Fonseca, H.R. Gutiérrez, K.E. Collins, C.H. Collins, **J. Chromatogr. A**, 1030, 149, 2004.
 95. B.L. Newalkar, J. Olanrewaju, S. Komarnemi, **J. Phys. Chem. B**, 105, 8356, 2001.
 96. M.S. Morey, G.D. Stucky, S. Schwarz, M. Fröba, **J. Phys. Chem. B**, 103, 2037, 1999.
 97. E.R. Castellón, A.J. Lopez, P.M. Torres, D.J. Jones, J. Rozière, M. Trombetta, G. Busca, M. Lenarda, L. Storato, **J. Solid State Chem.**, 175, 159, 2003.
 98. M.S. Wong, H.C. Huang, J.Y. Ying, **Chem. Mater.**, 14, 1961, 2002.
 99. F. Garbassi, L. Balducci, P. Chiurlo, L. Deiana, **Appl. Surf. Sci.**, 84, 145, 1995.
 100. S. Bachmann, L.F.C. Melo, R.B. Silva, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, K. Albert, **Chem. Mater.**, 13, 1874, 2001.
 101. D.A. Fonseca, **Desenvolvimento de um Novo Procedimento de Avaliação da Estabilidade de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, 2001.