



Departamento de Química Analítica
Instituto de Química
Universidade Estadual de Campinas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Preparação de Fases Estacionárias para CLAE com uma Mistura de
Poli(dimetilsiloxano) e Poli(metiloctadecilsiloxano) Sorvidos e Imobilizados
por Tratamento Térmico sobre Sílica.**

Autor: Elias Severo da Silva Júnior
Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

Campinas
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

Si38p Silva Júnior, Elias Severo da.
Preparação de fases estacionárias para CLAE com
uma mistura de poli(dimetilsiloxano) e
poli(metiloctadecilsiloxano) sorvidos e imobilizados por
tratamento térmico sobre sílica / Elias Severo da Silva
Júnior. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientadora: Carol Hollingworth Collins.

Mestrado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Poli(dimetilsiloxano). 2. CLAE-FR.
3. Poli(metiloctadecilsiloxano). I. Collins, Carol
Hollingworth. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Synthesis of stationary phases for HPLC with a poly(dimethylsiloxane)
- poly(methyloctadecylsiloxane) mixture sorbed and immobilized by thermal treatment
onto silica

Palavras-chaves em inglês: Poly(dimethylsiloxane), Poly(methyloctadecylsiloxane),
RP-HPLC

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na Área de Química Analítica

Banca examinadora: Carol Hollingworth Collins (orientadora), Lourdes Campaner dos
Santos (UNESP-IQ), Fabio Augusto (UNICAMP-IQ)

Data de defesa: 16/05/2007

*“Por tanto amor, por tanta emoção
A vida me fez assim
Doce ou atroz, manso ou feroz
Eu caçador de mim.*

*Preso a canções, entregue a paixões
Que nunca tiveram fim
Vou me encontrar longe do meu lugar
Eu caçador de mim.*

*Nada a temer se não o correr da luta
Nada a fazer se não esquecer o medo
Abrir o peito a força numa procura
Fugir às armadilhas da mata escura*

*Longe se vai sonhando demais
Mas onde se chega assim
Vou descobrir o que me faz sentir
Eu caçador de mim.”*

Sérgio Magrão e Luiz Carlos de Sá

Dedico este trabalho aos meus amados pais Elias e Maria por terem fornecido uma base sólida, princípios de vida e muito amor. Ao Carlos por ser motivo de alegria e cumplicidade, por compartilhar todas as etapas deste trabalho nos bons e maus momentos, sendo parte integrante. Aos meus irmãos Edvaldo e Gleice pelo carinho, amizade e apoio.

CURRICULUM VITAE

2007

FORMAÇÃO ACADÊMICA / TITULAÇÃO

1999-2003 Licenciado em Química

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP.

ESTÁGIOS

2001-2003 Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

ATIVIDADES PROFISSIONAIS

2004 - Atual Químico de Pesquisa e Desenvolvimento – Bann Química (Unidade de Paulínia)

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos Publicados

Santini, A.O.; Silva Júnior, E.S.; Pezza, H.R.; Pezza, L. Determinação de parâmetros físico-químicos com um sensor potenciométrico sensível ao íon p-aminobenzoato. *Eclética Química*, vol.29, 2004.

Trabalhos Resumidos em Eventos

1 Determinação espectrofotométrica de paracetamol em medicamentos.

26ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Poços de Caldas, 2003.

2 Determinação potenciométrica de captopril em formulações farmacêuticas.

26ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, Poços de Caldas, 2003.

3 Estudo de extração da fase estacionária composta por poli(dimetilsiloxano) e poli(metiloctadecilsiloxano) sobre sílica. 10º CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CROMATOGRAFIA E TÉCNICAS AFINS, Campos do Jordão, 2004.

4 Otimização da imobilização térmica da mistura de PMODS e PDMS sobre sílica como fase estacionária para CLAE-FR. II Simpósio Brasileiro de Cromatografia, São Pedro, 2006.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2001-2001 Cromatografia Líquida de Alto Desempenho. (Carga horária: 6h) - UNESP.

2001-2001 Materiais Derivados de Carbono e Silício: Caracterização, Aplicações e Processamento. (Carga horária: 30h) - UNICAMP.

2002-2002 Separação e Purificação de Compostos Orgânicos. (Carga horária: 16h) - UNESP.

Agradecimentos

- ✓ À Deus, pelo ânimo, força de vontade e paciência.
- ✓ À Profa. Carol H. Collins pela participação constante neste trabalho, pela liberdade na orientação, pelas conversas e discussões e, principalmente, pela acolhida, carinho, respeito e entusiasmo com que sempre me tratou. É um privilégio ser aluno desta grande profissional.
- ✓ Ao Prof. Kenneth e à Profa. Isabel Jardim pelo suporte e sugestões.
- ✓ Ao Anízio, pela fundamental colaboração técnica e intelectual, pelas sugestões e correções e pela disposição em colaborar durante todo o trabalho.
- ✓ À Lais, pela ajuda nos equipamentos e sugestões relevantes
- ✓ À Profa Carla e Dr. César pela convivência.
- ✓ Aos amigos e colegas do LabCrom: Priscila Andrade, Louise, Mariza, Vanessa, Liane, Camila, Cristien, Marcelo, Lívia, Márcia, Paulo, Adriana, André, Daniela, Fernanda, Patrícia, Priscila Micaroni, Rafaela, Marcel, Rosely, Thais, Daniel, Josimara, Alessandra, Dione, Karen, Zahra, Lika, Roberta, Nilva, Lúcia e Wilker pela convivência.
- ✓ Aos funcionários do Instituto de Química por toda colaboração
- ✓ À UNICAMP e ao Instituto de Química pela estrutura e oportunidades.

Índice Geral

Dedicatória _____	vii
Curriculum Vitae _____	ix
Agradecimentos _____	xi
Índice Geral _____	xiii
Lista de Símbolos e Abreviaturas _____	xvii
Lista de Tabelas _____	xxi
Lista de Figuras _____	xxiii
Resumo _____	xxvii
Abstract _____	xxix
1. Introdução _____	1
1.1 Suportes Cromatográficos e Fases Estacionárias _____	2
1.1.1 Suportes Cromatográficos _____	2
1.1.2 Suportes Alternativos _____	5
1.1.3 Fases Estacionárias baseadas em reações químicas _____	6
1.2 Sorção e Imobilização de Polímeros em Sílica _____	10
1.3 Tratamento Térmico _____	12
1.4 Avaliação das Colunas _____	14
1.4.1 Testes Cromatográficos de Caracterização _____	20
1.5 Planejamento e Otimização de Experimentos _____	21
1.5.1 Análise de Variância e o Teste de Hipóteses _____	23
1.5.2 Planejamento Fatorial Fracionário _____	25
1.5.3 Metodologia da Superfície de Resposta _____	26
2. Objetivos _____	27
3. Parte Experimental _____	29
3.1 Reagentes e Solventes _____	29
3.2 Equipamentos _____	30
3.3 Colunas Cromatográficas _____	32
3.4 Polimento Interno das Colunas _____	33
3.5 Preparo de Fase Estacionária _____	34
3.6 Imobilização por tratamento térmico _____	35

3.7 Processo de extração do excesso de PDMS e PMODS _____	36
3.8 Processo de extração do excesso de PDMS e PMODS através da Bomba de Enchimento. _____	36
3.9 Caracterização química e física das FE. _____	37
3.9.1 Análise Elementar _____	37
3.9.2 Análise Termogravimétrica (ATG) _____	38
3.9.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV) _____	39
3.9.4 Medidas de área superficial, volume e tamanho de poros das FE _____	39
3.9.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Aplicada a Sólidos _____	39
3.10 Preparo da suspensão _____	39
3.11 Enchimento das colunas cromatográficas _____	40
3.12 Condicionamento das colunas cromatográficas _____	41
3.13 Avaliação das colunas cromatográficas _____	42
3.14 Teste de Estabilidade Química das FE _____	44
3.14.1 Teste Básico _____	44
3.14.2 Teste Ácido _____	45
4. Resultados e Discussões _____	47
4.1 Caracterização Química e Física da Sílica Kromasil _____	48
4.2 Estudo do Método de Extração de FE _____	51
4.3 Otimização da Quantidade de Polímero no Preparo de FE _____	53
4.4 Planejamento Fatorial _____	54
4.4.1 Planejamento Fatorial 2 ² com Ponto Central _____	54
4.4.2 Planejamento Estrela _____	56
4.5 Caracterizações Físicas e Químicas das Fases Estacionárias _____	61
4.5.1 Medidas de Área Superficial, Volume Específico e diâmetro de Médio de Poros _____	61
4.5.2 Análise Elementar (CHN) e Termogravimétrica (TGA) _____	62
4.5.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV) _____	67
4.5.4 Ressonância Magnética Nuclear de ²⁹ Si _____	70
4.6 Avaliação Cromatográfica _____	71
4.6.1 Definição da Vazão de Trabalho _____	71

4.6.2 Análises Cromatográficas _____	72
4.7 Caracterização Cromatográfica das Fases Estacionárias _____	78
4.7.1 Misturas-teste de Tanaka _____	78
4.8 Teste de Estabilidade da Fase Estacionária _____	82
4.8.1 Teste de Estabilidade em Fase Móvel Alcalina _____	82
4.8.2 Teste de Estabilidade em Fase Móvel Ácida _____	85
5.0 Conclusões _____	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____	91

Lista de Símbolos e Abreviaturas

- A – Angstrom = 10^{-10} m
- As – Assimetria do pico
- ANOVA – Análise de variância
- ATG – Análise termogravimétrica
- CHN – Análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-FR – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
- CP / MAS / NRM – Técnica de polarização cruzada e rotação ao ângulo mágico em ressonância magnética nuclear
- C-8 – Fase estacionária com 8 átomos de carbono em sua cadeia
- C-18 – Fase estacionária com 18 átomos de carbono em sua cadeia
- d – Diâmetro médio de poros
- d_p – Diâmetro médio de partículas
- Ef – Efeito de uma variável
- F – Fração de PMODS imobilizado sobre sílica
- faj – Falta de ajuste
- FE – Fase estacionária
- FEQL – Fase estacionária quimicamente ligada
- FM – Fase móvel
- FV – Fonte de variação
- H – Altura do prato
- I – Função geradora
- IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês, International Union Pure and Applied Chemistry .
- IV – Espectroscopia no infravermelho
- k – Fator de retenção
- L – Comprimento da coluna
- Labcrom – Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida do Instituto de Química da Unicamp

\bar{m}_{PMODS} – Massa específica de PMODS (g_{PMODS} / g_{silica})

$\bar{m}_{PMODSretido}$ – Massa específica de PMODS retido

MT1 – Mistura teste 1

MT2 – Mistura teste 2

MT3 – Mistura teste 3

MT4 – Mistura teste 4

MT5a – Mistura teste 5a

MT5b – Mistura teste 5b

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MQ – Média quadrática

N/m – Eficiência de coluna cromatográfica, em pratos por metro

PDMS – Poli(dimetilsiloxano)

PMODS – Poli(metiloctadecilsiloxano)

RMN – Ressonância magnética nuclear

Rs – Resolução

s – Desvio padrão de um efeito

s^2 – Estimativa da variância para cada observação individual

s^2_p – Estimativa conjunta de variância

S_{BET} – Área superficial

s_{efeito} – Desvio padrão de um efeito

SQ – Soma quadrática

t_i – Distribuição de Student

t_M – Tempo de retenção de um composto não retido

t_R – Tempo de retenção do analito

v_{col} – Volume de coluna

V_{efeito} – Variância de um efeito

v_p – Volume de poro

\bar{y} – Média das respostas

\bar{y}_+ – Média das respostas no nível (+)

\bar{y}_- – Média das respostas no nível (-)

- ρ – Densidade do poli(metiloctadecilsiloxano)
- τ – Espessura de camada polimérica
- μ – Velocidade linear da fase móvel
- ν – Graus de liberdade
- $\alpha_{B/P_{pH2,7}}$ – Capacidade de troca iônica em meio ácido
- $\alpha_{B/P_{pH7,6}}$ – Capacidade de troca iônica total
- $\alpha_{C/P}$ – Capacidade de formação de ligação de hidrogênio
- α_{CH2} – Seletividade metilênica ou hidrofóbica
- $\alpha_{T/O}$ – Seletividade estérica ou espacial
- % C – Porcentagem de carbono
- % perda de massa – Porcentagem de perda de massa
- % PMODS inicial – Porcentagem de PMODS inicial

Lista de Tabelas

Tabela 1: Intervalos de eficiência de colunas disponíveis comercialmente, recheadas com fase reversa porosa. _____	17
Tabela 2: Relações de sinais para um planejamento fatorial 2^2 . _____	22
Tabela 3: Relação entre as colunas de sinais. _____	26
Tabela 4: Medidas de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros da sílica Kromasil. _____	48
Tabela 5: Resultados cromatográficos obtidos nos dois testes de extração. Os parâmetros são calculados para o naftaleno e o par tolueno-naftaleno (MT1). Os valores apresentados são médias de duas injeções. _____	51
Tabela 6: Resultados das caracterizações por análise elementar e termogravimetria (ATG) obtidos nos dois testes de extração. _____	53
Tabela 7: Estudo da quantidade de polímero. Os parâmetros calculados para o naftaleno e o par tolueno-naftaleno (MT1) _____	53
Tabela 8: Representação do planejamento fatorial 2^2 para otimização das condições de imobilização das fases estacionárias e a eficiência dos resultados calculado para o naftaleno. Fatores obtidos através das fórmulas $x_1 = (t-12)/4$ e $x_2 = (T-110)/10$. _____	55
Tabela 9: ANOVA para o modelo linear do planejamento fatorial 2^2 para otimização das condições de imobilização das fases estacionárias, sendo SQ a soma quadrática, v o número de graus de liberdade e MQ a média quadrática. _____	56
Tabela 10: Níveis para o planejamento estrela (pontos adjacentes ao planejamento fatorial 2^2) para otimização das condições de imobilização das fases estacionárias e os resultados de eficiência calculados para o composto naftaleno. Fatores obtidos através das fórmulas $x_1 = (t-12)/4$ e $x_2 = (T-110)/10$. _____	57
Tabela 11: ANOVA para o modelo quadrático do planejamento estrela para a otimização das condições de imobilização das fases estacionárias. _____	58
Tabela 12: Médias (\bar{y}) e desvios padrões (s) para os planejamentos realizados. _____	58

Tabela 13: Área superficial, volume e diâmetro de poros da sílica pura e com polímeros (PDMS e PMODS) sorvidos e imobilizados, após extração. _____	61
Tabela 14: %C, % perda massa obtida por TGA, quantidade de PMODS retido e espessura da camada formada (τ) de FE preparadas para planejamento fatorial. _____	66
Tabela 15: Resultados cromatográficos obtidos através das FE preparadas em cada experimento do planejamento fatorial. Os parâmetros são calculados para o naftaleno (MT1) e o par tolueno-naftaleno. _____	73
Tabela 16: Resultados cromatográficos obtidos com as FE preparadas pelas condições ótimas. _____	76
Tabela 17: Parâmetros cromatográficos obtidos pela separação dos compostos da mistura teste de Tanaka nas FE ótimas usando diferentes composições de FM. Condições: vazão 0,5 mL min ⁻¹ , temperatura 40 °C, detector UV a 254 nm. _____	79
Tabela 18: Valores obtidos pelas FE ótimas para seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$), capacidade para formar ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/F}$), seletividade hidrofóbica ($\alpha_{B/P}$) e capacidade de troca iônica a pH 2,7 ($\alpha_{B/FapH2,7}$) e 7,6 ($\alpha_{B/FapH7,6}$). _____	79
Tabela 19: Parâmetros cromatográficos: fator de retenção, assimetria e eficiência do composto acenafteno e assimetria para o composto N,N-dimetilanilina obtidos através do teste básico de estabilidade em diferentes volumes de coluna. _____	82
Tabela 20: Parâmetros cromatográficos: fator de retenção, assimetria e eficiência do composto naftaleno obtidos através do teste ácido de estabilidade em diferentes volumes de coluna. _____	85
Tabela 21: Resultados das análises de %C e ATG das FE submetidas aos testes de estabilidade básico e ácido. _____	88

Lista de Figuras

Figura 1: Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica. _____	3
Figura 2: Reação geral para ilustrar a síntese de fases quimicamente ligadas. ____	7
Figura 3: Fase estacionária após capeamento. _____	7
Figura 4: Polimerização horizontal. _____	8
Figura 5: Fases não protegidas e estericamente protegidas. _____	8
Figura 6: Fase estacionária com grupos polares embutidos. _____	9
Figura 7 Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos. _____	14
Figura 8 Medida e cálculo do fator de assimetria do pico. _____	18
Figura 9: Curva da equação de van Deemter. _____	19
Figura 10: Peças de uma coluna cromatográfica. _____	32
Figura 11: Configuração do sistema utilizado no polimento das colunas cromatográficas. _____	33
Figura 12: Sistema para tratamento térmico das FE. _____	35
Figura 13: Sistema de extração dos excessos de PMODS e PDMS da FE ____	36
Figura 14: Esquema do sistema de recheio das colunas. _____	41
Figura 15: Estruturas moleculares dos polímeros poli(dimetilsiloxano), A , e poli(metiloctadecilsiloxano), B . _____	47
Figura 16: Espectro de absorção no IV do PMODS. _____	47
Figura 17: Espectro de absorção no IV da sílica Kromasil. _____	49
Figura 18: Espectro de CP / MAS ²⁹ Si RMN da sílica Kromasil ⁶⁷ . Acima de cada pico encontra-se a estrutura representada. _____	49
Figura 19: MEV da sílica Kromasil com aumento de 1000 vezes. _____	50
Figura 20: MEV da sílica Kromasil com aumento de 5000 vezes. _____	50
Figura 21: Cromatogramas para MT1 com as FE submetidas aos dois métodos de extração: convencional (A) e pela bomba de enchimento (B). As condições cromatográficas foram FM: MeOH/H ₂ O (50:50 v/v), vazão 0,3 mL min ⁻¹ . MT1: (1) uracil, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno. _____	52

Figura 22: Superfície das eficiências para o composto naftaleno (MT1) obtidas das FE submetidas as condições de imobilização térmica estudadas.	60
Figura 23: Termogramas das FE preparadas nos experimentos A-D (estudo da quantidade de polímero).	63
Figura 24 A: Termogramas das FE preparadas nos experimentos 1-6 (planejamento fatorial).	64
Figura 24 B: Termogramas das FE preparadas nos experimentos 7-9 (planejamento fatorial) e na melhor condição de imobilização térmica.	65
Figura 25: Espectro de absorção no infravermelho da FE preparada nas melhores condições de imobilização térmica.	67
Figura 26 A: Espectros de absorção no Infravermelho das FE 1-5 preparadas para o planejamento fatorial.	68
Figura 26 B: Espectros de absorção no Infravermelho das FE 6-9 preparadas para o planejamento fatorial.	69
Figura 27: Espectro de RMN CP/MAS de ²⁹ Si para FE preparada em condições ótimas de imobilização térmica.	70
Figura 28: Espécies de silício presentes na fase estacionária.	71
Figura 29: Curva de van Deemter para FE preparada nas melhores condições de imobilização térmica. Condição cromatográfica: FM: MeOH/H ₂ O (60:40 v/v), detecção a 254 nm, mistura teste 1. H calculado para o naftaleno.	72
Figura 30 A: Cromatogramas da MT1 obtidos dos ensaios dos planejamentos 2 ² e estrela (1-4). Os cromatogramas estão identificados pelo número do ensaio do planejamento. FM MeOH/H ₂ O (50:50 v/v), vazão: 0,3 mL/min. MT1: (1) uracil, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.	74
Figura 30 B: Cromatogramas da MT1 obtidos dos ensaios dos planejamentos 2 ² e estrela (5-8). Os cromatogramas estão identificados pelo número do ensaio do planejamento. FM MeOH/H ₂ O (50:50 v/v), vazão 0,3 mL/min. MT1: (1) uracil, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.	75

Figura 31: Cromatogramas obtidos através de análises da FE nas condições ótimas para imobilização térmica. Condições de análise: Vazão 0,5 mL min⁻¹ e detector UV em 254 nm. As fases móveis e misturas testes são:

Mistura Teste 1 - FM MeOH/H₂O (60:40 v/v) (1. uracil; 2. benzonitrila; 3. benzeno; 4. tolueno; 5. naftaleno);

Mistura Teste 2 - FM MeOH/H₂O (70:30 v/v) (1. uracil; 6. fenol; 7. N,N-dimetilanilina; 5. naftaleno; 8. acenafteno). _____ **77**

Figura 32: Cromatogramas obtidos através de análises da FE nas condições ótimas para imobilização térmica. Condições de análise: Vazão 0,5 mL min⁻¹; temperatura 40 °C e detector UV em 254 nm. As fases móveis e misturas testes são:

Mistura Teste de Tanaka 3 - FM MeOH/H₂O (80:20 v/v) (1. uracil; 9. butilbenzeno; 10. pentilbenzeno; 11. o-terfenil; 12. trifenileno)

Mistura Teste de Tanaka 4 - FM MeOH/H₂O (30:70 v/v) (1. uracil; 6. fenol; 13. cafeína)

Mistura Teste de Tanaka 5a - FM MeOH/H₂O (30:70 v/v) (1. uracil; 6. fenol; 14. benzilamina), em pH 7,6.

Mistura Teste de Tanaka 5b - FM MeOH/H₂O (30:70 v/v) (1. uracil; 6. fenol; 14. benzilamina), em pH 2,7. _____ **80**

Figura 33: Avaliação da estabilidade da FE preparada nas melhores condições de imobilização térmica FM MeOH/tampão 0,1 mol L⁻¹ Na₂CO₃ / NaHCO₃ a pH 8,0 (70:30 v/v), à 40 °C, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹ em função dos parâmetros cromatográficos de eficiência (A), assimetria (B) e fator de retenção (C) para o composto acenafteno e assimetria para o composto N,N-dimetilanilina (D). ____ **83**

Figura 34: Cromatogramas da separação dos compostos da mistura teste 2, antes e depois do teste de estabilidade. Condições cromatográficas: MT2: (1) uracil, (6) fenol, (7) N,N-dimetilanilina, (8) Acenafteno; FM MeOH/tampão 0,1 mol L⁻¹ Na₂CO₃ / NaHCO₃ a pH 8,0 (70:30 v/v), à 40 °C, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹, detecção UV-Vis a 254 nm. _____ **84**

Figura 35: Avaliação da estabilidade da FE preparada nas melhores condições de imobilização térmica FM MeOH/tampão 0,1 mol L⁻¹ KH₂PO₄ / H₃PO₄ a pH 5,0 (60:40 v/v), à 40 °C, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹ em função dos parâmetros cromatográficos de eficiência (A), assimetria (B) e fator de retenção (C) para o composto naftaleno. _____ **86**

Figura 36: Cromatogramas da separação dos compostos da mistura teste 1, antes e depois do teste de estabilidade. Condições cromatográficas: MT1: (1) uracil, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno; FM MeOH/tampão 0,1 mol L⁻¹ KH₂PO₄ / H₃PO₄ a pH 5,0 (60:40 v/v), à 40 °C, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹, detecção UV-Vis a 254 nm. _____ **87**

RESUMO

Preparação de Fases Estacionárias para CLAE com uma Mistura de Poli(dimetilsiloxano) e Poli(metiloctadecilsiloxano) Sorvidos e Imobilizados por Tratamento Térmico sobre Sílica.

Autor: Elias Severo da Silva Júnior

Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

Neste trabalho foram feitos estudos de otimização das condições de preparo de fases estacionárias para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (CLAE-FR) da mistura de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) e poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS), sorvidos e imobilizados por tratamento térmico (em atmosfera inerte) na superfície de sílica Kromasil (esférica, 5 μm). As fases estacionárias foram avaliadas por testes químicos, físicos, cromatográficos e de estabilidade em fases móveis em condições agressivas. As melhores condições de preparo das fases estacionárias foram: sorção de 25 % PMODS e 25 % PDMS sobre sílica, mantendo 15 dias de repouso, e imobilizados a 128 °C durante 8 horas e 40 minutos. As fases estacionárias preparadas nas melhores condições apresentaram eficiências de 60000 e 38000 pratos m^{-1} , respectivamente, para os compostos naftaleno e N,N-dimetilanilina, além de picos simétricos mesmo para compostos ácidos (fenol) e básicos (N,N-dimetilanilina). O estudo de caracterização através das misturas-teste de Tanaka indicou a presença de silanóis residuais, mas os resultados dos parâmetros avaliados foram razoáveis, principalmente comparados à fases PMODS, PDMS e algumas comerciais. Quanto aos testes de estabilidade, a FE manteve-se estável durante 250 volumes de coluna para o teste básico apresentando queda significativa da eficiência (60%) para o naftaleno e pequena variação na assimetria para os compostos naftaleno e N,N-dimetilanilina, já no teste ácido a FE manteve-se estável por 950 volumes de coluna apresentando uma queda suave na eficiência (10%) e variações na assimetria a partir de 400 volumes de coluna, ambos para o acenafteno, porém o fator de retenção caiu nos dois testes indicando a perda de parte da mistura polimérica.

ABSTRACT

Synthesis of stationary phases for HPLC with a mixture of poly(dimethylsiloxane) and poly(methyloctadecilsiloxane) sorbed and immobilized by thermal treatment on to Silica.

Student: Elias Severo da Silva Júnior

Supervisor: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

In this work the conditions for the preparation of a stationary phase of use in reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with a mixture of poly(dimethylsiloxane) (PDMS) and poly(methyloctadecilsiloxane) (PMODS) sorbed and immobilized by thermal treatment (in an inert atmosphere) on Kromasil silica (spherical, 5 μm) were optimized. The stationary phases were evaluated by chemical, physical and chromatographic tests and for stability in mobile phases having aggressive conditions. The best conditions for preparation of the stationary phases were: sorption of 25 % PMODS and 25 % PDMS on to the silica, storing for 15 days and then immobilizing at 128 $^{\circ}\text{C}$ for 8 hours and 40 minutes. The stationary phases from these conditions showed efficiencies of 60000 and 38000 plates m^{-1} for naphthalene and N,N-dimethylaniline and symmetrical peaks for acidic (phenol) and basic (N,N-dimethylaniline) compounds. A characterization study using Tanaka's test-mixture indicated the presence of residual silanols, but evaluation parameters were still reasonable, compared to PMODS, PDMS and some commercial phases. In the stability tests the stationary phase was for stable 250 column volumes in the basic test, showing a decrease of efficiency (60 %) for naphthalene but little change in asymmetry for naphthalene and N,N-dimethylaniline. In the acid test the stationary phase maintained efficiency for 950 column volumes with some decrease in efficiency (10 %) but showed a small change in asymmetry after 400 column volumes for acenaphthene. However, the retention factor fell in both tests, showing partial loss of the polymeric mixture without changing the coverage of the support.

1. Introdução

O objetivo final de toda técnica empregada em química analítica é fornecer algum tipo de informação, seja qualitativa, seja quantitativa, sobre sistemas submetidos à investigações que vão explorar suas propriedades químicas e físicas.

Em muitos laboratórios, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se tornou uma técnica indispensável para obter-se informações sobre amostras, determinação de constantes físicas e o isolamento de componentes purificados de misturas complexas. Atualmente, a CLAE encontrou uma ampla aceitação em muitas áreas científicas e de aplicação, tais como: ciências da vida, alimentos, polímeros sintéticos e química ambiental. O desenvolvimento ainda contínuo e a disponibilidade de fases estacionárias (FE) de alta qualidade e equipamentos de alto desempenho se apresentam como fatores primordiais para o crescente interesse de pesquisas e aplicações em CLAE.

O processo cromatográfico consiste, essencialmente, na passagem de uma fase móvel (FM) sobre uma fase estacionária (FE), ocorrendo a distribuição dos componentes da mistura entre as duas fases, de tal forma que cada componente é seletivamente retido pela fase estacionária¹. A fase móvel é bombeada sob alta pressão e uma vazão controlada. Uma pequena quantidade de amostra é introduzida através de uma válvula de injeção, sendo arrastada pela fase móvel através da coluna e do detector.

As separações em CLAE dependem fundamentalmente das composições das fases móvel e estacionária. A fase estacionária, devido às suas propriedades de superfície, exerce papel decisivo nos mecanismos de separação de componentes químicos e é o desenvolvimento destes materiais que irá resultar em avanços tanto em eficiência quanto em especificidade das separações. O desenvolvimento da CLAE como método eficaz de separação sempre esteve relacionado à síntese de materiais adequados para o enchimento de colunas cromatográficas.

Os mecanismos de retenção em cromatografia líquida consistem de repetidas etapas de sorção e dessorção, que acontecem ao longo da coluna cromatográfica. A separação ocorre graças a diferença entre os coeficientes de distribuição de componentes distintos entre fase estacionária e fase móvel. Os processos físicos de adsorção são baseados, principalmente em atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals), incluindo a formação de ligações de hidrogênio, e os de partição baseiam-se na diferença de solubilidade dos componentes da amostra na fase estacionária e na fase móvel.

1.1 Suportes Cromatográficos e Fases Estacionárias

1.1.1 Suportes Cromatográficos

A sílica é atualmente o material mais utilizado como suporte cromatográfico de fases reversas², pois é disponível comercialmente em larga faixa de tamanho de partículas esféricas e irregulares, com estrutura de poros bem controlada através dos procedimentos de síntese (1 a 400 nm), diâmetros de partícula em uma faixa restrita (1 a 20 μm) e grande área superficial (100 a 500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$), permitindo melhor distribuição das fases líquidas em sua superfície, força mecânica adequada para resistir altas pressões e facilidade de modificação de sua superfície, devido a presença de grupos silanóis reativos³⁻⁵.

Quanto as desvantagens⁶, pode-se destacar dois aspectos. O primeiro é a não homogeneidade da superfície da sílica e a presença de impurezas metálicas, além da falha de reação de todos os silanóis^{7,8}, que influenciam o mecanismo de retenção de maneira indesejável⁹. A superfície da sílica apresenta 3 tipos de grupos silanóis: *vicinais* (dois grupos hidroxila sobre dois átomos de silício vizinhos), *geminais* (dois grupos hidroxila originários do mesmo átomo de silício) e *isolados* (um grupo hidroxila sobre o átomo de silício), como mostra a figura 1.

O segundo aspecto desfavorável ao uso da sílica como suporte é a instabilidade da superfície, principalmente a altas temperaturas e frente a fases

móveis alcalinas, que reagem lentamente com a superfície da sílica, dissolvendo-a, causando perda da fase cromatográfica e até o colapso do leito da coluna⁶. Isso pode levar a alterações na retenção, seletividade e formato dos picos. A estabilidade de fases estacionárias baseadas em sílica modificada com grupo alquila é também limitada em soluções ácidas, devido à hidrólise catalizada por ácidos das ligações silício-carbono ($\equiv\text{Si}-\text{C}\equiv$), que sustentam as fases ligadas à superfície¹⁰. A literatura descreve que fases estacionárias quimicamente ligadas, preparadas com sílica como suporte, devem ser utilizadas com fases móveis no intervalo de pH entre 2 e 8¹¹.

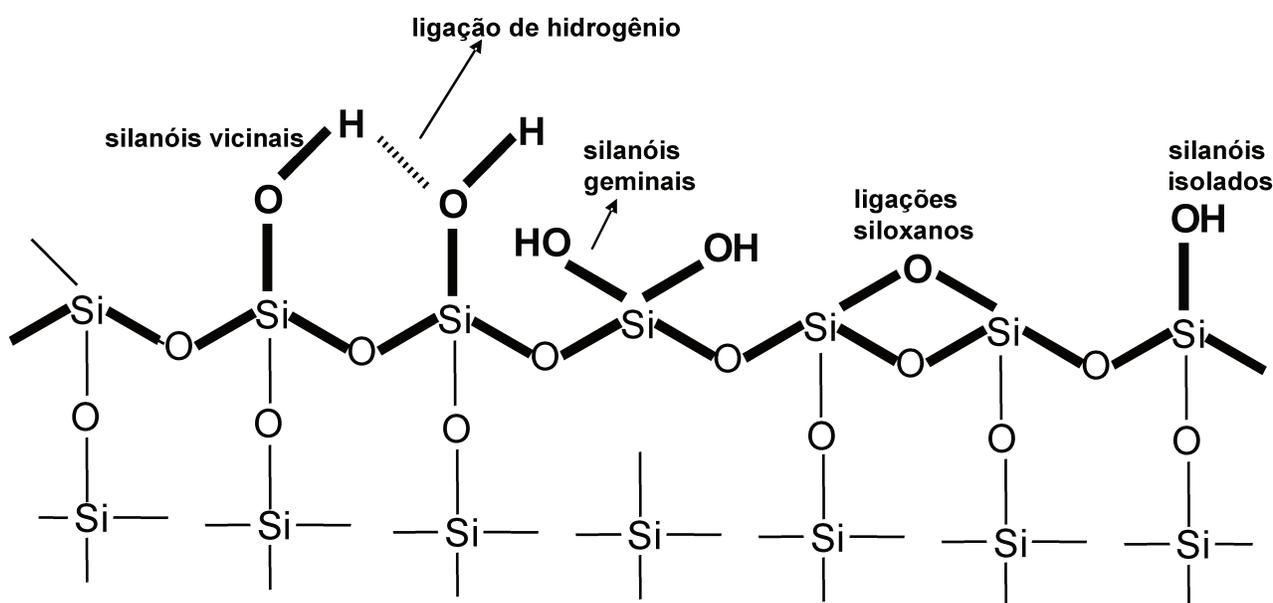


Figura 1: Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica

Quando o pH da fase móvel é menor que 2, a hidrólise catalizada por ácido das ligações Si-C entre a superfície da sílica e o material ligado quimicamente torna-se significativa. Isto resulta em contínua perda da fase ligada, simultânea com a perda de retenção cromatográfica. Em fases móveis básicas, com valores de pH acima de 8, ocorre rápida dissolução da sílica devido à exposição de parte do suporte que não reagiu com o modificador orgânico (silanóis residuais) e, conseqüentemente, a fase ligada é clivada do suporte¹².

A concentração superficial de grupos silanóis na sílica pode ser determinada por métodos químicos como: troca isotópica por deutério¹³ ou trítio⁶, titulação com NaOH¹⁴ na presença de sal, reação com alquillítio¹⁴, entre outros. Os métodos mais confiáveis de determinação da concentração dos grupos silanóis totais, principalmente a troca isotópica por D₂O, indicam $8,0 \pm 1,0 \mu\text{mol m}^{-2}$, sendo este o valor mais aceito para concentração de OH na superfície da sílica^{3,5}. A concentração e distribuição dos diferentes grupos silanóis é altamente dependente do tipo de pré-tratamento (ácido¹⁵, básico¹⁶, ou térmico³) pelo qual a sílica foi submetida. Em especial tratamentos térmicos foram amplamente discutidos por Zhuravlev³, que sugeriu um modelo físico-químico para a superfície da sílica. Em resumo, o modelo descreve etapas ocorridas a partir da desidratação até uma completa desidroxilação da sílica, indicando os principais tipos de silanóis presentes em cada estágio do modelo. Segundo o modelo, a faixa de temperatura em que a superfície apresenta um grau máximo de hidroxilação é, após tratamento, de 25 a 190 °C sob vácuo.

A elevada atividade química da superfície é tida como vantagem, pois facilita a interação com diversas moléculas apolares, proporcionando FE de diferentes seletividades, mas esta característica pode gerar impedimento estérico, pois apenas 50 % dos grupos silanóis são capazes de se ligar quimicamente aos modificadores orgânicos¹⁷, restando muitos silanóis residuais.

Estes grupos (caráter polar) podem interagir fortemente de maneira irreversível, diminuindo a eficiência cromatográfica e podendo deteriorar o leito da coluna. A adsorção pode ocorrer de forma reversível, gerando baixas eficiências para compostos básicos, picos largos, assimétricos e com cauda.

1.1.2 Suportes Alternativos

As limitações apresentadas pela sílica tentam ser solucionadas através:

1. Modificação química da superfície da sílica. Sílicas mais estáveis têm sido preparadas por redução significativa das impurezas inorgânicas através do tratamento ácido^{18,19} ou modificando-se a superfície do suporte, por reação química, adicionando na sua superfície átomos de um metal de transição, como zircônio ou titânio (Zr ou Ti), através dos óxidos correspondentes. Ambos são óxidos básicos, sendo assim, insolúveis em pH alcalino e estáveis em pH ácido²⁰.
2. Substituição por outro tipo de suporte com diferentes características químicas. Como exemplo, tem-se a utilização de fases estacionárias baseadas em polímeros semi-rígidos como poliestireno-divinilbenzeno²¹ e outras resinas baseadas em poliacrilatos, copolímeros de poliésteres hidroxilados ou polivinilálcool, que embora possuam estabilidade química sob larga faixa de pH e forneçam picos simétricos para compostos básicos devido ausência de grupos reativos em sua superfície, têm menor estabilidade mecânica que a sílica²², restringindo a sua utilização em pressões elevadas. Além disso, ocorre alargamento de pico devido a não homogeneidade do fluxo da fase móvel nestes materiais^{4,21,23}. Outros suportes utilizados são os óxidos inorgânicos alumina (Al_2O_3), titânia (TiO_2) e zircônia (ZrO_2), que apresentam estabilidade em uma faixa mais ampla de pH que a sílica^{10,20,24-29}.

1.1.2 Fases Estacionárias baseadas em Reações Químicas

O desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência está ligado à evolução da tecnologia do preparo de fases estacionárias. Na CLAE-FR, este desenvolvimento foi resultado da introdução das fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL). Anteriormente, o recheio da fase estacionária era constituído de um líquido estacionário de baixa massa molar apenas sorvido ao suporte cromatográfico. A manutenção da concentração constante do líquido estacionário no suporte se mostrava difícil e ineficaz para o emprego de vazões mais altas da fase móvel. Para a condução das separações cromatográficas fazia-se necessário a pré-saturação da FM com a FE líquida e o controle rígido da temperatura da coluna cromatográfica³⁰. Tais necessidades impossibilitaram separações no modo de eluição por gradiente, as quais eram freqüentemente desejadas para separação de misturas complexas. A eliminação de muitos destes problemas tornou-se possível com o advento das FEQL para CLAE-FR, na qual cadeias orgânicas foram ligadas covalentemente à superfície do suporte, fornecendo alta estabilidade hidrolítica ao líquido estacionário³¹.

As fases reversas apresentam vantagens como o uso de fases móveis de menor custo e menos tóxicas, como metanol e água; estabilidade frente a solventes; rápido equilíbrio da coluna após a troca da fase móvel; facilidade em se empregar eluição por gradiente; maior rapidez de análises e reprodutibilidade dos tempos de retenção. Além disso, são muito aplicadas à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas.

Diversos procedimentos são relatados na literatura para a obtenção de fases estacionárias reversas de maior estabilidade, minimizando as interações indesejáveis dos silanóis, tais como:

- **Fases poliméricas quimicamente ligadas**³²⁻³⁴: as FE são obtidas pela reação de agente silano bi ou trifuncional (figura 2) na presença de traços de água. Apesar da maior estabilidade hidrolítica desta fase, a dificuldade de controlar a reação de entrecruzamento e a espessura da camada resultante torna o processo pouco reprodutível, sendo raramente formada uma camada uniforme;

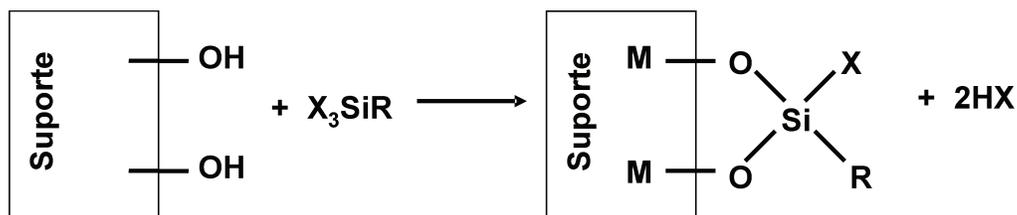


Figura 2: Reação geral para ilustrar a síntese de fases quimicamente ligadas.

- **Capeamento**^{35,36}: após a ligação das espécies químicas (C_8H_{17} ou $C_{18}H_{37}$) na superfície da sílica, a FE é submetida a uma segunda reação com um agente sililante apropriado, normalmente trimetilclorosilano e/ou hexametildisilazano, proporcionando melhor proteção do suporte cromatográfico e maior estabilidade à FE (figura 3);

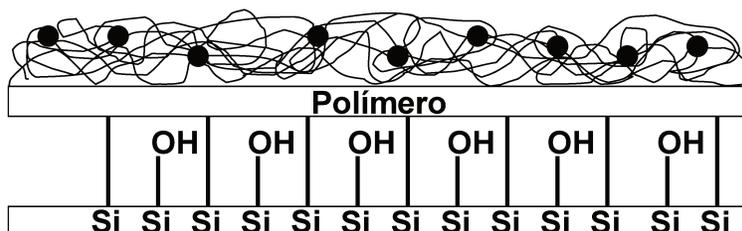


Figura 3: Fase estacionária após capeamento

- **Fases com polimerização horizontal**³⁷⁻⁴⁰: neste método, monocamadas auto-organizadas de silanos trifuncionais de cadeias longas (C_8H_{17} ou $C_{18}H_{37}$) e curtas (CH_3) são obtidas sobre partículas de sílica, melhorando a estabilidade hidrolítica das fases com substancial redução do acesso aos silanóis residuais (figura 4). Além disso, o processo de obtenção destas fases é mais reprodutível, principalmente se comparado as fases poliméricas convencionais;

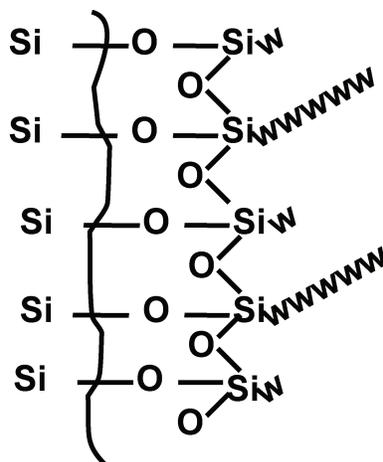


Figura 4: Polimerização horizontal

- **Fases estericamente protegidas**⁴¹⁻⁴³: são obtidas pela reação de reagente organossilano contendo a espécie química (C_8H_{17} ou $C_{18}H_{37}$) na cadeia lateral e dois grupos alquila volumosos (isopropil ou isobutil) que restringem o acesso de solutos básicos aos grupos silanóis residuais (figura 5). Desta forma, há um aumento da estabilidade química das fases. Comparativamente às fases de mesma cadeia alquila lateral sem proteção, as estericamente protegidas apresentam menor densidade de ligação, devido a limitação estérica durante o processo de silanização⁴⁴;

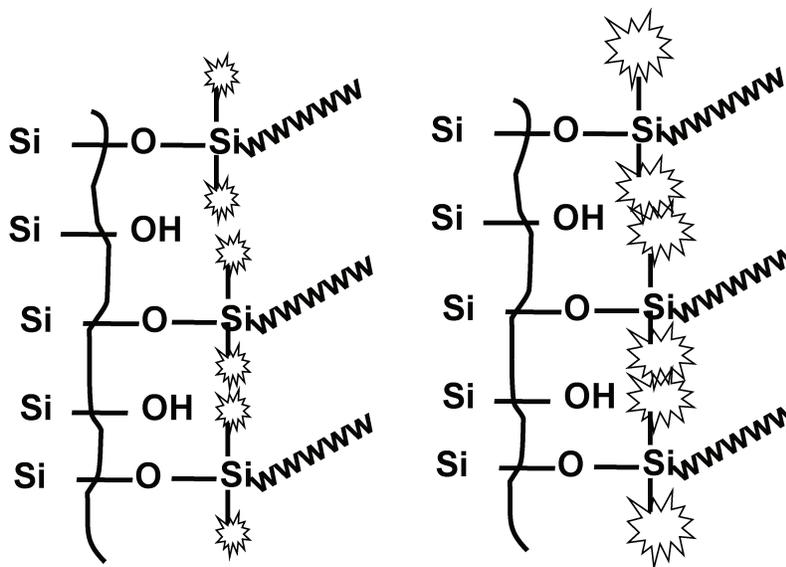


Figura 5: Fases não protegidas e estericamente protegidas

- **Fases estacionárias com grupos polares embutidos**⁴⁵⁻⁴⁸: trata-se de um método alternativo para a redução da atividade silanofílica das FE, pois a inserção de grupos polares (como amida, amina, uréia, carbamato) promovem uma competição destes com solutos básicos pelos silanóis residuais (figura 6);

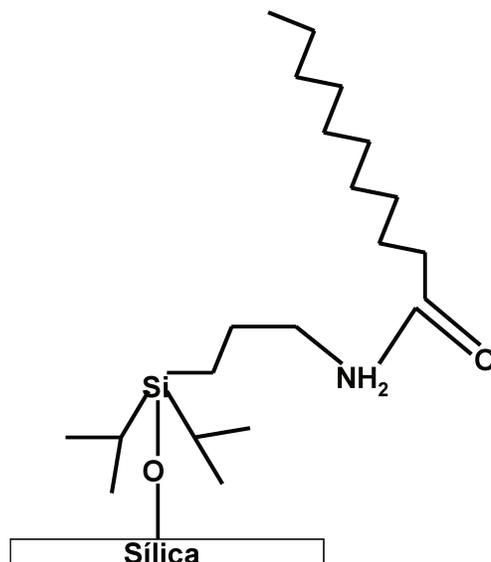


Figura 6: Fase estacionária com grupos polares embutidos

- **Fases estacionárias bidentadas**^{41,49,50}: preparadas a partir de silanos bifuncionais, proporcionam maior restrição do acesso de componentes da amostra aos silanóis residuais e maior estabilidade química quando empregadas fases móveis ácidas ou básicas;

- **Suportes Híbridos**^{51,52}: apresentam em sua estrutura um correto balanço orgânico / inorgânico, com propriedades intermediárias a grupos orgânicos e inorgânicos a forma pura. Estes suportes são comercializados com o nome de X-Terra. O suporte mais comum contém unidades de metilsiloxano, tanto na estrutura interna quanto na superfície, de partículas de sílica. Este material apresenta uma boa estabilidade entre pH 1 e 12, com aumento do recobrimento superficial nas fases quimicamente ligadas e redução da atividade silanofílica;

- **Uso de sílicas mais puras**⁵³: conhecidas como sílicas tipo B, que apresentam apenas traços de impurezas metálicas, tornando os silanóis residuais menos ácidos⁵⁴. Em aplicações cromatográficas, estas sílicas promovem separações de melhor desempenho, principalmente para compostos básicos. Atualmente, quase todas as fases estacionárias disponíveis comercialmente são preparadas a partir da sílica tipo B, exceto os que partiram dos suportes híbridos.

Embora alguns destes procedimentos tenham oferecido melhor proteção do suporte cromatográfico, resultando em maior estabilidade química em fases móveis alcalinas, as fases estacionárias preparadas, aplicando estas estratégias, não resolveram completamente o problema dos grupos silanóis residuais.

1.2 Sorção e Imobilização de Polímeros em Sílica

Na tentativa de se obter FE com uma maior blindagem dos grupos silanóis da superfície da sílica e maior estabilidade frente à passagem de FM neutras ou básicas, foi desenvolvido um novo tipo de FE para CLAE-FR, que consiste em sorver e/ou imobilizar polímeros como polissiloxanos ou polibutadienos, dentre outros, sobre sílica “nua” ou modificada com óxidos metálicos.

Um grupo de pesquisa que explorou a imobilização de polímeros sobre o suporte de sílica durante os anos 80 foi coordenado por Schomburg. Este grupo preparou diversas FE para CLAE através do entrecruzamento de polissiloxanos sobre sílica, induzidos por aquecimento com peróxido, decomposição térmica e radiação gama. Eles investigaram as propriedades físicas e cromatográficas dessas FE e chegaram a conclusão que elas são razoavelmente estáveis e capazes de produzir excelentes separações em CLAE⁵⁵⁻⁵⁷.

Schomburg et al.⁵⁷ também investigaram polissiloxanos imobilizados por tratamento térmico a 180 °C, sem a presença de reagentes indutores de entrecruzamento. Os tratamentos térmicos de imobilização a baixas temperaturas não foram extensivamente estudados porque os polissiloxanos adsorvidos na sílica podiam ser completamente arrastados pelos solventes da FM⁵⁵.

Nos últimos 15 anos, desenvolveu-se no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LabCrom) do Instituto de Química da Unicamp, um tipo de FE que contém uma camada de polissiloxano ou polibutadieno adsorvida e imobilizada nas paredes dos poros da sílica (ou sílica modificada com óxidos metálicos) sem nenhum tratamento específico, com boas propriedades cromatográficas e de estabilidade para CLAE-FR⁵⁸⁻⁶⁸.

A forma mais simples de preparo das fases recobertas com polímeros é realizada pelo método de evaporação estática do solvente sem etapas posteriores de imobilização da camada polimérica no suporte cromatográfico^{58,60}. Para isto, o polímero é apropriadamente dissolvido em um solvente, no qual seja completamente solúvel e a esta solução com polímero é adicionada a matriz do óxido inorgânico. Em seguida, evapora-se o solvente obtendo a fase estacionária sorvida. A química da superfície do suporte tem uma influência significativa na sorção dos polímeros, pois os grupos reativos superficiais agem como pontos de ancoragem, nos quais os polímeros podem apenas interagir fracamente ou se ligar covalentemente^{64,65,68-70}.

As fases estacionárias sorvidas, e imobilizada, são normalmente preparadas utilizando algum procedimento de imobilização, que lhes confere maior estabilidade. Os principais métodos de estabilização utilizados para fases estacionárias sorvidas são o tratamento térmico, a irradiação por microondas, ultravioleta ou raios gama.

Estudos recentes de cinética de adsorção de um polímero sobre a sílica mostraram que a sua retenção nos poros do suporte aumenta com o tempo sem nenhum tratamento específico, apenas deixando a FE em repouso após seu preparo. Este processo foi denominado de “auto-imobilização”^{63,64}. O primeiro passo da auto-imobilização é um processo rápido, enquanto que o rearranjo para estruturar a formação de uma camada uniforme é lento. Sendo assim, o controle do tempo durante o preparo da FE sorvida e imobilizada é um fator importante para obtenção de colunas com parâmetros cromatográficos reprodutíveis⁶³.

Imobilização por tratamento térmico do polímero sobre a sílica aceleraram o rearranjo do polímero nos poros da sílica, principalmente quando a camada do

polímero ainda não está distribuída de maneira uniforme nas paredes dos poros da sílica. Quando o polímero já se encontra no estágio de uma configuração uniforme, obtido pela auto-imobilização, o tratamento térmico não altera esta configuração e os parâmetros cromatográficos permanecem constantes após o tratamento^{63,68}.

Outro ponto a ser destacado é a quantidade de polímero depositado na superfície do suporte. Se, por um lado, uma quantidade maior de polímero fornecerá um material com maior proteção dos silanóis ou sítios ácidos de Lewis contra interações indesejáveis com a amostra, por outro, resultará em uma camada mais espessa, bloqueando os poros do suporte. Desta forma, resultará em um processo de transferência de massa mais lento e, portanto, fases estacionárias com baixo desempenho cromatográfico. Portanto, a preparação das fases recobertas com polímeros é uma etapa crítica que tem por finalidade a obtenção de duas propriedades idealizadas:

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

1.3 Tratamento Térmico

O tratamento térmico é uma fonte de energia empregada para as mais diversas finalidades. Este vem sendo o principal procedimento para a obtenção de fases reversas imobilizadas com⁷² ou sem^{63,64,73-76} o uso de agentes químicos de entrecruzamento. O princípio da imobilização térmica baseia-se no aquecimento da amostra por condução de calor, onde o recipiente contendo a amostra é aquecido e ocorre a transferência de calor para a amostra. O tratamento térmico é empregado para acelerar a imobilização do polímero nos suportes cromatográficos, auxiliando no processo de auto-imobilização⁷⁵.

Bottoli et al.⁷⁴ prepararam fases de PMOS e de PMODS termicamente imobilizadas em partículas de sílica, empregando temperaturas na faixa de 80 a 220 °C. Os autores observaram que, em temperaturas mais baixas, 120 °C para o PMOS e na faixa de 80 a 100 °C para o PMODS, as fases apresentam melhores desempenhos cromatográficos devido à formação de uma monocamada polimérica. Em temperaturas mais elevadas, o desempenho cromatográfico é inferior, devido à formação de uma monocamada polimérica mais espessa, resultando em um processo mais lento de transferência de massa⁷³.

Fases estacionárias imobilizadas termicamente a temperaturas mais elevadas também já foram descritas na literatura. Ohmacht et al.⁷² imobilizaram PMOS em partículas de sílica empregando temperaturas superiores a 300 °C na presença de peróxido de benzoíla para promover a reticulação do polímero sobre o suporte. As fases preparadas a 400 °C apresentaram o melhor desempenho cromatográfico e boa estabilidade química em fase móvel a pH 9,0. por outro lado, os resultados não foram confirmados na ausência do catalisador⁶⁸.

A principal desvantagem das fases recobertas (sorvidas ou imobilizadas) com polímeros é a dificuldade de se obter uma camada polimérica uniforme ou bem definida na superfície dos poros do suporte cromatográfico. Nawrocki et al.¹² sugeriram que o recobrimento polimérico resultante, de uma forma geral, é invariavelmente retalhado e desigual (não homogêneo). Collins et al.⁷⁷ mostraram que a deposição na forma de um filme polimérico fino e uniforme ao longo de uma área superficial muito grande é energeticamente desfavorável e que, preferencialmente, ocorrerá a formação de “plugs” dispersos ao longo de toda a extensão da superfície da sílica. Desta forma, a não homogeneidade do recobrimento resultará em exposição dos grupos silanóis residuais e, conseqüentemente, haverá interação indesejável do suporte com solutos da amostra e locais suscetíveis ao ataque químico de fases móveis alcalinas, acelerando a dissolução da sílica. O grande desafio do preparo de fases recobertas com polímeros é a obtenção de fases estacionárias com poucos sítios de interações residuais, e o desenvolvimento de um suporte estável numa larga faixa de pH.

1.4 Avaliação das Colunas

As colunas cromatográficas recheadas são avaliadas através de parâmetros calculados a partir de medidas obtidas nos cromatogramas.

A figura 7 mostra um cromatograma típico com as principais medidas obtidas.

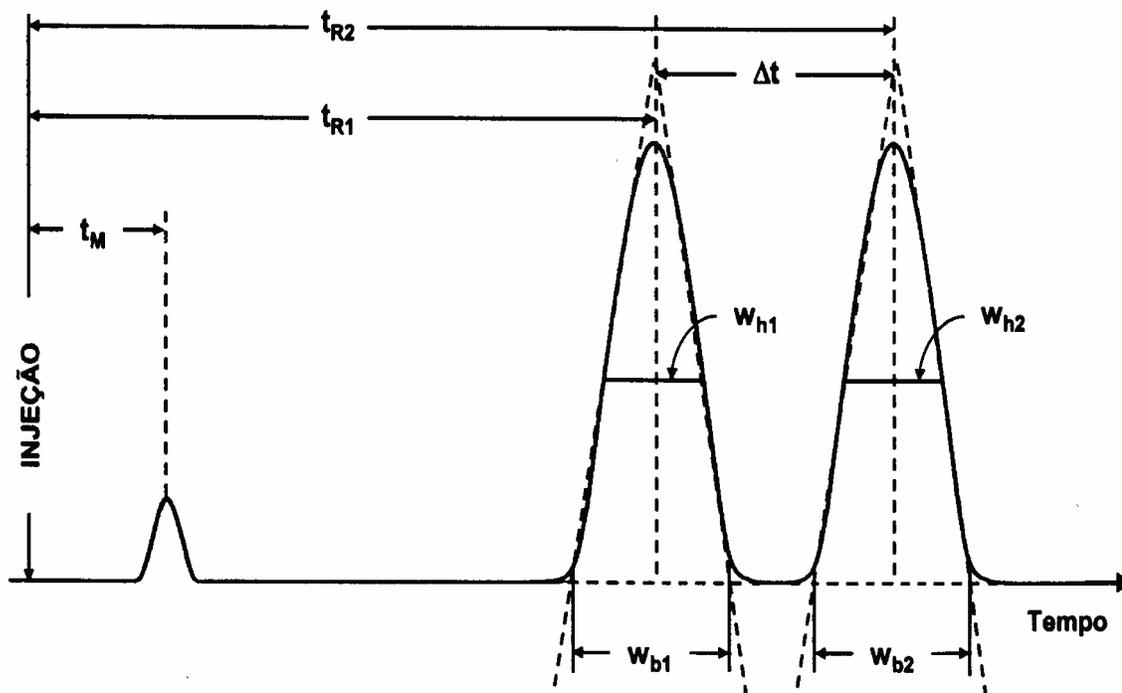


Figura 7 Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.

A cromatografia em coluna ocorre com fluxo contínuo de fase móvel até que todos os componentes tenham saído da coluna. Os componentes que vão sendo eluídos passam pelo detector, cuja resposta é indicada graficamente. No cromatograma, a linha de base representa a passagem somente da fase móvel pelo detector e os picos representam o registro dos componentes eluídos.

O **tempo de retenção** de um soluto, t_R , é o tempo gasto desde a injeção da amostra até a saída do componente do sistema. O t_M é o tempo de retenção de um soluto não retido ou tempo de retenção da fase móvel. Tanto t_R quanto t_M podem ser obtidos diretamente do cromatograma quando se utiliza um integrador

eletrônico, ou convertendo as medidas de distância de retenção (d_R ou d_M) para tempo, através da velocidade do papel em registrador potenciométrico. Esta conversão é feita pelas seguintes relações:

$$\text{(Eq. 1)} \quad t_R = \frac{d_R}{f} ; t_M = \frac{d_M}{f}$$

onde: f é a velocidade do papel do registrador;

d_R é a distância de retenção do soluto;

d_M é a distância de retenção de um soluto não retido ou da fase móvel.

A retenção de um componente é determinada pela razão entre os tempos em que as moléculas ficam retidas na fase estacionária (t'_R) e percorrendo a coluna na fase móvel (t_M) e é representada pelo **fator de retenção (k)**:

$$\text{(Eq. 2)} \quad k = \frac{t'_R}{t_M}$$

onde: $t'_R = t_R - t_M$ é o tempo de retenção ajustado.

O valor de k , idealmente, deve estar entre 2 e 10, sendo que valores abaixo de 2 significam pouca interação do soluto com a fase estacionária e acima de 10 forte interação e, conseqüentemente, alto tempo de análise¹¹.

O parâmetro que avalia a separação entre dois picos adjacentes é a **resolução (R_s)** e é calculada a partir da diferença entre os tempos de retenção divididos pela média das larguras de suas respectivas bases (W_b):

$$\text{(Eq. 3)} \quad R_s = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right) = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{h1} + W_{h2}} \right)$$

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

W_{b1} e W_{b2} são larguras dos picos na base, em unidades de tempo;

W_{h1} e W_{h2} são larguras dos picos à meia-altura, em unidades de tempo.

Os valores de R_s acima de 1,5 são considerados ideais, pois indicam uma separação entre os picos até a linha de base.

Outro parâmetro relacionado com a separação de dois picos adjacentes é o **fator de separação (α)**, que é calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que são, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, segundo a equação 4.

$$\text{(Eq. 4)} \quad \alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}}$$

O fator de separação mede a seletividade de um sistema cromatográfico. Quanto mais seletivamente a fase estacionária reter o segundo componente, maior será o fator de separação. Porém, apenas o fator de separação pode não ser suficiente para avaliar a separação, pois é uma medida baseada nos tempos de retenção dos máximos dos picos e não considera a largura dos mesmos.

A **eficiência** apresentada pela coluna é medida em termos do número de pratos, N . Um prato é equivalente a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel e é calculado pela expressão:

$$\text{(Eq. 5)} \quad N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2$$

Isto significa que quanto mais estreito for o pico cromatográfico, maior será a eficiência.

A **altura do prato, H** , é a razão entre o comprimento da coluna (L) expressa em metros e o número de pratos (N), que pode ser calculado por:

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

O número de pratos obtidos pode ser afetado por vários fatores, incluindo o tamanho das partículas da fase estacionária, as condições de enchimento da coluna, as condições de análise, o tamanho da amostra, o tipo de soluto e, principalmente, o comprimento da coluna. Para efeitos de comparação entre colunas, em CLAE, a eficiência é expressa em termos de número de pratos por metro (N/m), calculado através da divisão do número de pratos da coluna pelo seu comprimento em metros.

O tamanho das partículas de recheio é decisivo para a eficiência das colunas. Os limites de eficiência em função do tamanho das partículas são mostrados na tabela 1.

Tabela 1: Intervalos de eficiência de colunas disponíveis comercialmente, recheadas com fase reversa porosa⁷⁸.

Tamanho da Partícula (μm)	Intervalos de Eficiência (pratos/m)
10	12000 - 20000
5	35000 - 45000
3	80000 - 100000

A expressão para o cálculo do número de pratos só é válida para picos simétricos. Isso faz com que a medida de simetria seja um parâmetro cromatográfico de relevância.

A simetria dos picos é avaliada pelo **fator de assimetria dos picos (A_s)**, a 10 % da altura do pico, como mostra a figura 8.

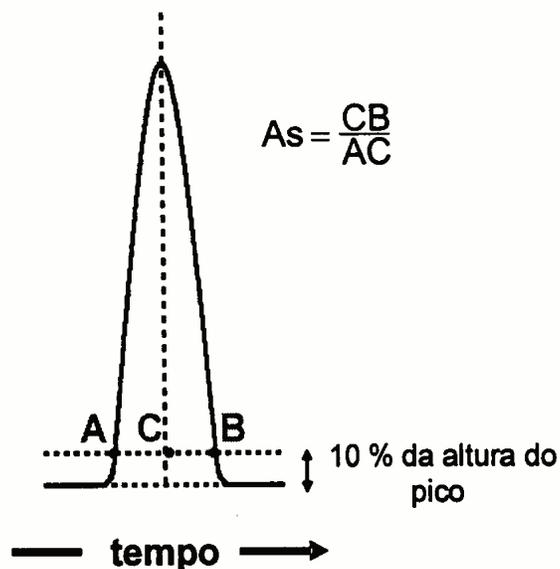


Figura 8 Medida e cálculo do fator de assimetria do pico.

O valor de A_s deve estar entre 0,9 e 1,2, sendo admitidos valores até 1,6³².

A **vazão (F)** ótima de trabalho pode ser determinada pela equação de van Deemter:

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

onde: **H** é a altura de um prato;

$\mu = \frac{L}{t_M}$ é a velocidade linear da fase móvel, sendo L o comprimento da

coluna.

O termo A, difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos, devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do soluto. Este termo pode ser minimizado usando colunas com diâmetro interno reduzido, bem recheadas e partículas com tamanho pequeno e uniforme.

O termo B, difusão longitudinal, está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares da fase móvel. Este termo é mais importante em cromatografia gasosa que em CLAE, já que o coeficiente de difusão no líquido é muito menor que no gás.

O termo C, transferência de massa, está relacionado com a facilidade de transferência das moléculas do soluto da fase estacionária para a fase móvel. Um fator que minimiza o termo C é a espessura do filme líquido que recobre as partículas do suporte. Quanto maior for esta espessura, maior será o termo C e menor a eficiência da coluna.

A figura 9 mostra uma curva de van Deemter típica e a contribuição dos termos da equação 7. A curva mostra que existe uma vazão (F) ótima que está diretamente relacionada com a velocidade linear da fase móvel (μ), na qual H terá um valor mínimo e, conseqüentemente, a eficiência será máxima.

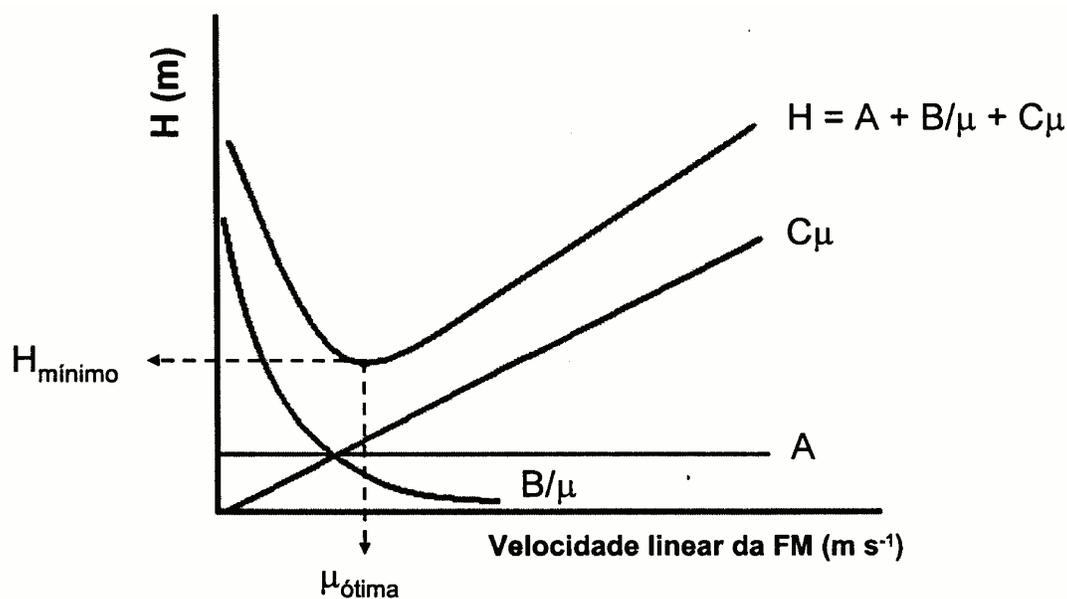


Figura 9: Curva da equação de Van Deemter⁷⁹

A completa avaliação de uma coluna cromatográfica passa pela análise de todos os parâmetros citados, com cuidado para que haja coerência entre os parâmetros calculados e o composto que está relacionado a estes dados. Deve-se ainda escolher compostos que caracterizem as propriedades de resolução, de retenção, de seletividade estérica, hidrofobicidade, de troca iônica e de interação silanofílica da coluna cromatográfica⁸⁰.

1.4.1 Testes Cromatográficos de Caracterização

A grande utilização de fases reversas levou a introdução de uma ampla faixa de diferentes fases estacionárias de alta qualidade que, juntamente com um grande número de ferramentas para controle e otimização das separações, contribuíram para a sólida popularização da CLAE-FR. Entretanto, as várias centenas de fases reversas, em muitos casos nominalmente idênticas, disponíveis atualmente dificultam a seleção de uma melhor coluna para um problema específico de separação. Este problema se estende tanto às fases quimicamente ligadas quanto às fases recobertas por polímeros. Desta forma, para que a seleção da coluna contendo a fase estacionária apropriada, para a separação em questão, não se torne um problema, uma completa caracterização da fase estacionária é extremamente desejável para diferenciar características aparentemente similares⁸¹. Métodos espectroscópicos⁸², termogravimétricos⁸³ e físico-químicos⁸¹ para a caracterização são freqüentemente empregados. Porém, estes métodos destroem a fase estacionária durante a análise. Uma alternativa mais apropriada é o uso de testes cromatográficos que avaliam a qualidade, as características e a viabilidade analítica das fases com base em interações intermoleculares entre o analito, a fase estacionária e a fase móvel, sem a destruição da coluna⁸⁴.

Um grande número de testes cromatográficos tem sido discutido na literatura. Apesar da maioria dos testes sugeridos fornecerem apenas um sistema de qualificação interna das próprias fases, que em nada contribuem para um sistema objetivo de caracterização geral, alguns testes simples para avaliação de

fases estacionárias reversas foram sugeridos para tal propósito. Estes testes permitem a comparação das propriedades (tais como: retenção, hidrofobicidade, seletividade estérica, atividade silanofílica, capacidade de troca iônica e habilidade de formar ligações de hidrogênio, além da eficiência da coluna) de uma determinada fase em relação a uma outra em específico, ou, em relação a valores encontrados na literatura^{85,86}. Os mais conhecidos e empregados foram sugeridos por Tanaka e colaboradores⁸⁷, Engelhardt e Jungheim⁸⁸ e Neue et al.^{89,90}. Além da simplicidade e da possibilidade de uma comparação geral entre fases aparentemente idênticas, também contribuem para um entendimento mais detalhado da retenção e seletividade em CLAE-FR.

1.5 Planejamento e Otimização de Experimentos

O planejamento e a otimização de experimentos são ferramentas usadas para examinar sistematicamente diferentes tipos de problemas nos mais diversos setores de pesquisa, desenvolvimento e produção. Quando os experimentos são realizados de forma aleatória é de se esperar que os resultados também sejam obtidos de forma aleatória. Por isso, faz-se necessário o planejamento de experimentos para que a informação de interesse possa ser obtida.

No planejamento, os **fatores** são tipos de tratamento e as diferentes categorias de um fator são os **níveis**, o experimento é chamado **fatorial** e o que se está interessado em descobrir é a **resposta**^{91,92}. Sendo assim, a primeira etapa é decidir quais os fatores e as respostas de interesse. Os fatores, em geral, são variáveis que o pesquisador tem condições de controlar, salvo experimentos onde os fatores que afetam as respostas não podem ser controlados ou são de pouco interesse⁹².

Para fazer um **planejamento fatorial completo**, devem-se realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Para k fatores (variáveis controladas pelo pesquisador) um planejamento completo de dois níveis exige a realização de 2^k experimentos. O tipo mais simples de

experimento fatorial é o 2^2 (lê-se dois por dois). Nestes experimentos são analisados dois fatores, em dois níveis e realizados quatro ensaios⁹².

A lista desta combinação de níveis e fatores é chamada de **matriz de planejamento**, sendo representada pelas combinações de sinais (-, nível inferior) e (+, nível superior). A tabela 2 mostra um exemplo de como são colocados os sinais numa matriz de planejamento 2^2 . Os sinais dos níveis dos fatores se alternam na primeira coluna, sempre começando com o nível (-), sendo que na segunda coluna as alternâncias são de pares. Os sinais para calcular a interação de dois fatores (12) são obtidos multiplicando-se os sinais das correspondentes colunas, pertencentes aos fatores principais.

Tabela 2: Relações de sinais para um planejamento fatorial 2^2 ⁹².

Ensaio	Fatores			Resposta
	1	2	12	
1	-1	-1	1	y_1
2	1	-1	-1	y_2
3	-1	1	-1	y_3
4	1	1	1	y_4

A partir da matriz de planejamento e as respostas dos ensaios pode-se estudar os efeitos de qualquer fator sobre uma dada resposta. Quando o efeito de uma variável depende do nível de outra ou de outras, diz-se que essas variáveis interagem e pode-se calcular o **efeito de interação** sobre a resposta. O efeito de um fator sem interações é chamado de **efeito principal**. Os efeitos são calculados a partir da equação 8, onde \bar{y}_+ é a média das respostas no nível (+) e \bar{y}_- é a média das respostas no nível (-).

(Eq. 8)
$$Efeito = (\bar{y}_+ - \bar{y}_-)$$

Por exemplo, a partir da matriz de planejamento da tabela 2, o efeito do fator principal 1 é dado por:

$$(Eq. 9) \quad \text{Efeito fator 1} = \left(\frac{\bar{y}_2 + \bar{y}_4}{2} \right) - \left(\frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_3}{2} \right)$$

onde os valores de \bar{y}_2 e \bar{y}_4 são as respostas nos níveis (+) do fator 1 e \bar{y}_1 e \bar{y}_3 são as respostas nos níveis (-) do mesmo fator.

1.5.1 Análise de Variância e o Teste de Hipóteses

Normalmente, para se fazer uma **análise de variância** é preciso proceder uma série de cálculos e saber interpretar as fórmulas, que exigem o conhecimento da notação. Na análise de variância, a idéia é comparar a variação nos valores das respostas devido aos tratamentos ou a variação devido ao acaso. Para decidir qual dessas duas hipóteses é a mais provável, é necessário submeter os dados aos **testes estatísticos de significância**⁹¹.

A partir das repetições feitas nos ensaios dos planejamentos fatoriais pode-se obter uma estimativa do **desvio padrão experimental** e, também, de acordo com a extensão desse desvio padrão, decidir se existem ou não efeitos estatisticamente significativos dos fatores sobre a resposta. Para obter as estimativas do desvio padrão experimental, primeiramente calcula-se a **estimativa da variância para cada observação individual**, s^2 , dada por:

$$(Eq. 10) \quad s^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1}$$

onde y_i = resposta, \bar{y} = média das respostas e n = número de respostas.

Seguidamente, calcula-se a **estimativa conjunta de variância**, s_p^2 pela equação 11:

$$(Eq. 11) \quad s_p^2 = \frac{(v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_n s_n^2)}{(v_1 + v_2 + \dots + v_n)}$$

onde $v_i = n - 1$ é o número de graus de liberdade de s_i^2 , a estimativa de variância do i -ésimo ensaio.

A raiz quadrada de s_p^2 fornece a estimativa do **desvio padrão experimental** das respostas, s .

$$(Eq. 12) \quad s = (s_p^2)^{1/2}$$

Para verificar quais os efeitos calculados são estatisticamente significativos (diferentes de zero), pode-se empregar o **teste t de Student**, o qual possui valores tabelados, considerando o nível de 95 % de confiança, com os graus de liberdade dado por $\sum v_i$ (soma do número de graus de liberdade para cada ensaio). Para isto, é necessário calcular o desvio padrão de um efeito, através da raiz quadrada da **variância de um efeito**, ou seja:

$$(Eq. 13) \quad \text{Variância de um efeito: } V_{efeito} = a_i^2 s_p^2$$

onde $a_i^2 =$ constante que depende do número de ensaios.

$$(Eq. 14) \quad \text{Desvio padrão de um efeito: } s_{efeito} = (V_{efeito})^{1/2}$$

Os efeitos cujas estimativas forem superiores em valor absoluto ao produto do desvio padrão de um efeito pelo valor de distribuição de Student $(s_{efeito} \times t_{v_i})$ serão estatisticamente significativos⁹².

1.5.2 Planejamento Fatorial Fracionário

O número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial 2^k completo aumenta rapidamente com o aumento de k , o número de fatores investigados. Quando o número de fatores aumenta, crescem as chances de um ou mais deles não afetarem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais ou por meio de efeitos de interação. Mas, para não excluir fatores que possam ser importantes, é possível, através de **planejamentos fatoriais fracionários**, estudar o maior número de fatores sem aumentar o número de ensaios. Isso é possível porque no jogo de sinais da matriz de planejamento há fatores e interações que se confundem, ou seja, tem os mesmos sinais⁹².

Num planejamento fatorial 2^4 completo (4 fatores sendo estudados em dois níveis) o número de ensaios é de 16. É possível diminuir o número de ensaios pela metade através de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , que é uma **fração meia** de um planejamento fatorial 2^4 completo. Essa fração meia foi obtida a partir da igualdade $4 = 123$, ou seja, os sinais do fator 4 é o produto dos sinais dos três primeiros fatores, seguindo a mesma relação de sinais de um planejamento fatorial 2^3 . A literatura costuma apresentar essa relação na forma equivalente $I = 1234$, que é a relação geradora do fatorial fracionário. Através dela é possível obter todos os sinais da matriz de planejamento. A tabela 3 mostra a relação entre as colunas com os mesmos sinais para este planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

⁹².

Tabela 3: Relação entre as colunas de sinais.

Relação entre as colunas de sinais
I = 1234
1 = 234
2 = 134
3 = 124
4 = 123
12 = 34
13 = 24
14 = 23

Um **planejamento fatorial saturado** é aquele que permite um máximo de fatores a serem investigados com um mínimo de ensaios⁹².

1.5.3 Metodologia da Superfície de Resposta

A metodologia da superfície de resposta tem duas etapas distintas: a modelagem e o deslocamento, que são repetidas quantas vezes forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples, em geral, lineares ou quadráticos, às respostas obtidas com planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada. Através da análise de variância dos dados é possível verificar se o modelo ajustado tem ou não falta de ajuste, ou seja, se ele é estatisticamente significativo⁹².

2. Objetivos

Considerando o exposto, o objetivo deste trabalho é preparar fases estacionárias do tipo fase reversa para utilização em colunas de CLAE. Para isto, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- 1.** Otimizar as condições de preparo de FE usando PDMS e PMODS sorvidos e imobilizados por meio do tratamento térmico em sílica Kromasil.
- 2.** Preparar FE usando PDMS e PMODS sorvidos e imobilizados por tratamento térmico sobre sílica nas melhores condições de preparo encontradas.
- 3.** Caracterizar as FE preparadas por meio de testes químicos, físicos e cromatográficos.
- 4.** Testar a estabilidade química das FE preparadas através da passagem de fases móveis (FM) básica e ácida.

3. Parte Experimental

3.1 Reagentes e Solventes

- ✓ Acenafteno, Merck
- ✓ Acetona P.A., Merck
- ✓ Ácido Fosfórico, Synth
- ✓ Água deionizada, sistema Milli-Q, Millipore
- ✓ Benzeno P.A., Nuclear
- ✓ Benzilamina, 99%, Merck
- ✓ Benzonitrila P.A., Riedel-de Haen
- ✓ Bicarbonato de sódio, Synth
- ✓ Butilbenzeno, Merck
- ✓ Cafeína 100% USP, Aldrich
- ✓ Carbonato de sódio, Synth
- ✓ Clorofórmio P.A., Tedia
- ✓ Dihidrogenofosfato de potássio, Synth
- ✓ Etanol P.A., Merck
- ✓ Fenol 99%, Aldrich
- ✓ Hexano, grau cromatográfico, Tedia
- ✓ Hidrogenofosfato de potássio, Synth
- ✓ Isopropanol P.A., Tedia
- ✓ Metanol para cromatografia, Mallinckrodt
- ✓ N,N-Dimetilanilina P.A., Quimex
- ✓ Naftaleno P.A., Carlo Erba
- ✓ o-Terfenila 99%, Merck
- ✓ Pentilbenzeno 98%, Merck
- ✓ Poli(dimetilsiloxano), United Technologies
- ✓ Poli(metiloctadecilsiloxano), United Technologies
- ✓ Sílica Kromasil, partículas 5 µm, Akzo Nobel
- ✓ Tolueno P.A., Merck
- ✓ Trifenileno 98%, Fluka

- ✓ Uracil 98%, Aldrich

3.2 Equipamentos

- ✓ Agitador magnético, Corning modelo PC351
- ✓ Agitador roto-torque, Cole-Parmer modelo 7637-01
- ✓ Agitador Vórtex, Phoenix modelo AP56
- ✓ Analizador de superfície e poros, Micromeritic, modelo ASAP 2010
- ✓ Analisador elementar, Perkin-Elmer modelo 2400
- ✓ Analisador termogravimétrico, TA Instruments modelo TGA-2050
- ✓ Balança analítica, Fischer Scientific modelo A-250, precisão de 0,0001 g
- ✓ Bomba para enchimento de coluna, Haskel modelo 51769
- ✓ Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, composto de uma bomba de alta pressão, Shimadzu modelo LC-10 AD; detector UV-Vis, Shimadzu modelo SPD-10 AV utilizado em $\lambda = 254$ nm; válvula de injeção (alça de 5 μ L), Rheodyne modelo 8125; softwares usados para aquisição de dados – ChromPerfect for Windows 3.52.
- ✓ Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, equipado com uma bomba de alta pressão, Shimadzu modelo LC-10 AD; detector UV-Vis, Shimadzu modelo SPD-10 A utilizado em $\lambda = 254$ nm; forno de coluna CTO-10 AS; injetor automático SIL-10 AD e um sistema controlador SCL-10 A. Os dados foram adquiridos e processados empregando o software CLASS-VP da Shimadzu.
- ✓ Espectrômetro de Infravermelho, Perkin-Elmer modelo FTIR 1600
- ✓ Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian, modelo INOVA 300
- ✓ Estufa a vácuo, Yamato modelo ADP 21
- ✓ Forno tubular, EDG modelo 10P-S
- ✓ pHmetro, Digimed modelo DM 21
- ✓ Sistema de deionização de água, Milli-Q plus, Millipore

- ✓ Sistema para extração e purificação do excesso de polímero, composto por uma bomba cromatográfica Waters modelo 510 e um forno com controle de temperatura, Eldex Laboratories modelo CH-150
- ✓ Sistema ultra-som, Thornton modelo T14

3.3 Colunas Cromatográficas

Neste trabalho, foram usadas colunas de aço inoxidável 316 no formato de um tubo cilíndrico de comprimento de 60 mm com 3,9 mm de diâmetro interno. Além do corpo de aço inoxidável, a coluna é composta por outros acessórios que ficam conectados em suas extremidades: o anel de aço inoxidável, filtro sinterizado poroso de 0,5 μm , redutor de fluxo de aço inoxidável, tubo de alinhamento de aço inoxidável, terminal e tampa para coluna. A figura 10 mostra uma coluna cromatográfica. As colunas e os acessórios foram confeccionados na oficina mecânica do Instituto de Química da Unicamp.

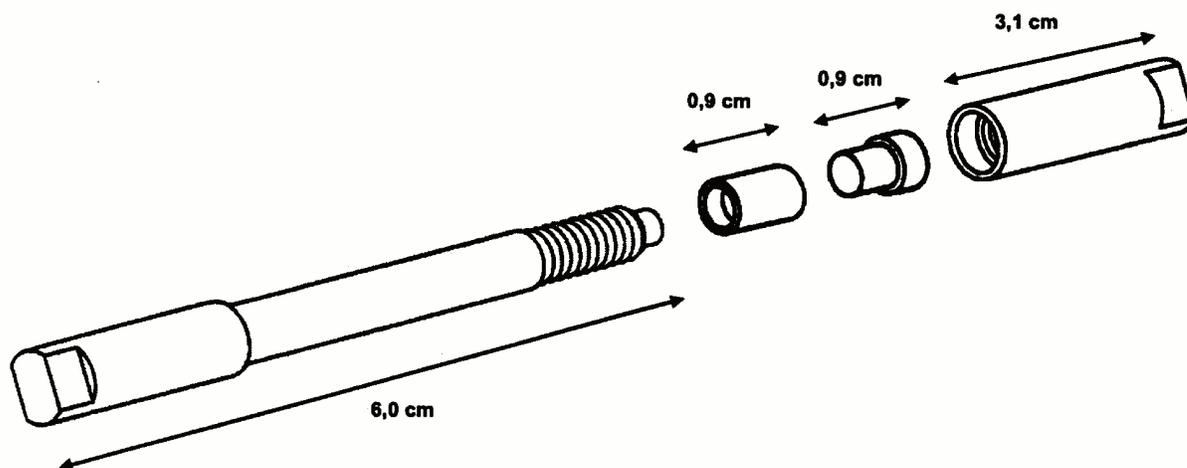


Figura 10: Peças de uma coluna cromatográfica

3.4 Polimento Interno das Colunas

A superfície interna da coluna deve estar muito bem polida para não oferecer qualquer tipo de resistência ao escoamento do líquido e assim conseguir a máxima eficiência. Para isso, as colunas foram polidas de acordo com um método desenvolvido no LabCrom⁹³. Neste procedimento, a coluna é polida de acordo com o esquema apresentado na figura 11.

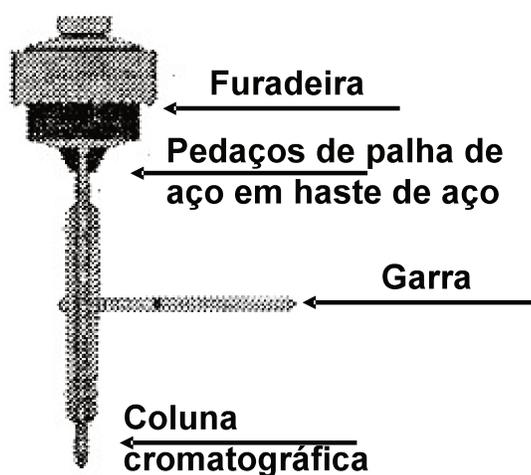


Figura 11: Configuração do sistema utilizado no polimento das colunas cromatográficas⁹³.

O procedimento consiste na passagem através do interior do tubo de aço de uma haste de metal giratória, fixada em uma furadeira de bancada, envolvida em palha de aço e pasta de polimento. Após o polimento, os tubos foram mantidos em ácido nítrico 30 % por 15 horas e depois lavados com detergente, água, acetona, água deionizada e metanol várias vezes até limpeza completa.

3.5 Preparo de Fase Estacionária

O preparo de FE consistiu em ativar 1,0 ou 2,0 gramas de sílica Kromasil (tamanho de partícula de 5 µm e forma esférica) na estufa a temperatura de 150 °C por 24 h e a seguir suspendê-la em 30 mL de hexano (solvente escolhido devido sua volatilidade e a solubilidade dos polímeros nele) com agitação magnética por, aproximadamente, 10 min. Uma massa de PMODS (fator otimizado) foi solubilizada em 50 mL de hexano e submetida à agitação magnética por, aproximadamente, 10 min. A suspensão de sílica foi transferida para o béquer contendo a solução de PMODS já sob agitação magnética, coberto com papel alumínio e deixado sob agitação por mais 3 h. Logo após, o béquer foi coberto com papel alumínio furado e deixado na capela para evaporação do solvente por um período de 4 dias.

A mistura obtida (sílica + PMODS) foi suspendida em 40 mL de hexano com agitação magnética. Uma quantidade de PDMS (fator otimizado) foi solubilizada em 30 mL de hexano e submetida à agitação magnética por, aproximadamente, 10 min. A suspensão da mistura (sílica + PMODS) foi acrescida à solução de PDMS sob agitação magnética, coberta com papel alumínio e deixada sob agitação por 3 h. Logo após, o béquer foi coberto com papel alumínio furado e deixado na capela para evaporação do solvente por um período de 10 dias.

3.6 Imobilização por tratamento térmico

Neste trabalho, utilizou-se um forno de aquecimento conectado a uma linha de gás inerte, o nitrogênio, como fonte geradora de calor para acelerar o processo de imobilização de PDMS e PMODS nos poros da sílica, figura 12. Colocou-se a FE sorvida, preparada seguindo o procedimento descrito no item anterior, em um tubo de aço inoxidável. Uma de suas extremidades foi conectada à linha de gás N_2 e a outra foi conectada para fora do forno. Depois, fez-se a programação do forno, iniciando na temperatura ambiente e elevando, segundo uma rampa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, até a temperatura programada. As condições de imobilização de temperatura e tempo de reação foram otimizadas seguindo um planejamento fatorial, utilizado também para determinar o fator quantidade de PDMS e PMODS para sílica Kromasil.

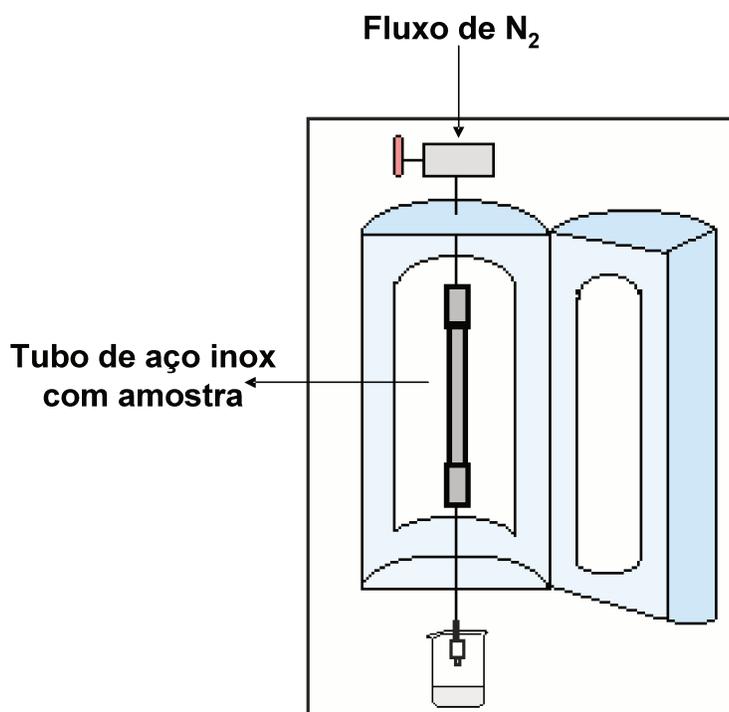


Figura 12: Sistema para tratamento térmico das FE.

3.7 Processo de extração do excesso de PDMS e PMODS^{63,64}

No tubo de aço inoxidável foi colocada a FE sorvida e imobilizada, sendo este colocado dentro de um forno de aquecimento para colunas cromatográficas a uma temperatura de 50 °C (figura 13). Em seguida, conectou-se o tubo a uma bomba de um cromatógrafo. O solvente extrator utilizado foi o hexano, numa vazão de 0,6 mL min⁻¹ por 3 h. Após a extração, o tubo foi aberto em uma de suas extremidades, coberto com papel alumínio furado e mantido na capela para evaporação do solvente por 48 horas.

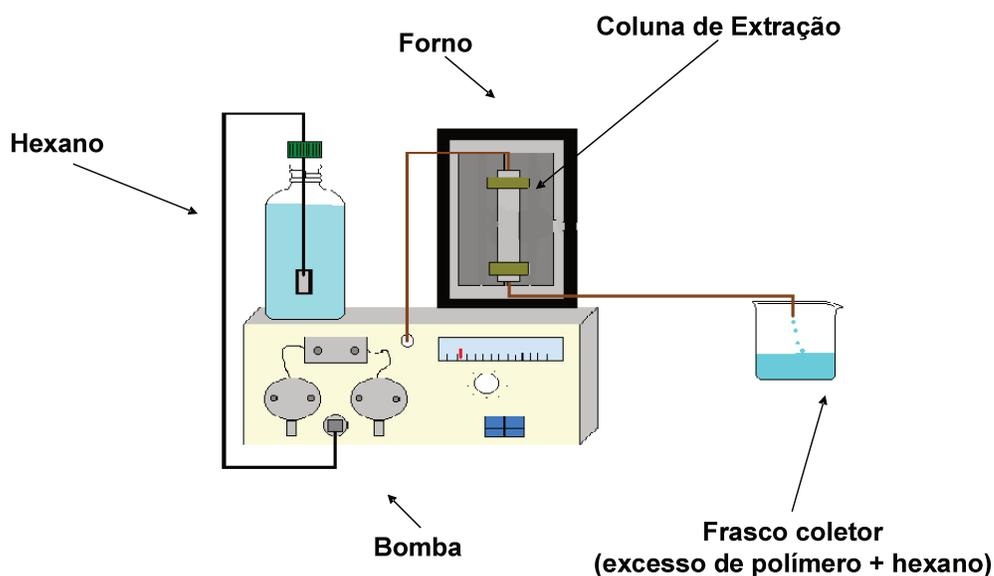


Figura 13: Sistema de extração dos excessos de PMODS e PDMS da FE

3.8 Processo de extração do excesso de PDMS e PMODS através da Bomba de Enchimento

O procedimento para extração de FE simultânea ao enchimento da coluna cromatográfica, realizado a temperatura ambiente, utilizou o sistema Haskel preenchendo seu reservatório com solvente propulsor hexano, previamente filtrado, sob pressão fixa de 5000 psi (34,5 MPa), pois assim, o solvente responsável pela eliminação do excesso de polímero também poderia atuar no

recheio da coluna submetido a alta pressão. O procedimento completo para o recheio da coluna cromatográfica está descrito no item 3.11.

3.9 Caracterização química e física das FE.

3.9.1 Análise Elementar: A análise elementar consistiu em determinar o teor total de carbono, hidrogênio e nitrogênio nas amostras de FE. O método empregado utiliza a combustão para converter o carbono em CO₂, que é medido em função de sua condutividade térmica. O aparelho utilizado foi o analisador Perkin Elmer, modelo 2400.

Sabendo-se que o PMODS contém 73% (m/m) de carbono, as percentagens de carbono obtidas pela análise elementar foram convertidas em percentagens de PMODS pela equação 15:

$$\text{(Eq. 15)} \quad \%PMODS = \frac{\%C}{73} \times 100$$

Além disso, as percentagens de carbono também foram convertidas em massa de polímero (m_{PMODS}) por grama do suporte ($m_{suporte}$), denominada de massa específica (\bar{m}_{PMODS}), de acordo com a equação 16:

$$\text{(Eq. 16)} \quad \bar{m}_{PMODS} = \frac{m_{PMODS}}{m_{suporte}} = \frac{\%C}{73 - \%C}$$

Através dos resultados obtidos com a massa específica, pode-se estimar o grau do recobrimento de PMODS no suporte de sílica. Para tal, determinou-se a espessura da camada polimérica (τ) depositada na superfície e paredes dos poros do suporte cromatográfico, empregando a equação 17:

$$\text{(Eq. 17)} \quad \tau = - \left(\frac{\sqrt{d^2 - Fd} - d}{2} \right)$$

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 é determinado pela equação 18.

$$(Eq. 18) \quad F = \frac{\overline{m}_{PMODS\text{imobilizado}}}{\overline{m}_{PMODS\text{poroscheios}}}$$

A massa de PMODS necessária para encher os poros do suporte, $\overline{m}_{PMODS\text{poroscheios}}$, foi determinada a partir do volume específico de poro da sílica Kromasil ($0,89 \text{ mL g}^{-1}$) e da densidade do PMODS, $\rho = 0,89 \text{ g mL}^{-1}$, conforme equação 19:

$$(Eq. 19) \quad \overline{m}_{PMODS\text{poroscheios}} = v_{p\text{suporte}} (\text{mLg}^{-1}) \times \rho_{PMODS} (\text{gmL}^{-1})$$

Logo para sílica Kromasil, a $\overline{m}_{PMODS\text{poroscheios}} = 0,792 \text{ g}$ de PMODS por g de suporte.

3.9.2 Análise Termogravimétrica (ATG): A análise termogravimétrica (ATG) das FE foi realizada utilizando-se um analisador térmico 2050 em que, através de uma microbalança, obteve-se a percentagem de perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. Neste teste, utilizou-se, aproximadamente, 10 mg de amostra. A análise foi feita em atmosfera de nitrogênio, com velocidade de aquecimento constante de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, desde a temperatura de 25 até $1000 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.9.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV): O objetivo desta análise era avaliar qualitativamente o grau de recobrimento pelo PMODS e PDMS dos grupos hidroxilas da sílica, através de bandas características destes grupos funcionais.

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos no intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . Todas as amostras foram prensadas, sob forma de pastilhas, com brometo de potássio, em razão de massa 1,0 g de amostra para 10,0 g de KBr previamente seco.

3.9.4 Medidas de área superficial, volume e tamanho de poros das FE: Estas medidas foram calculadas através da isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K, obtida no analisador ASAP 2010.

3.9.5 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) Aplicada a Sólidos: Os espectros de RMN no estado sólido de ^{29}Si para as FE foram obtidas no espectrômetro Varian, modelo INOVA 300, utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação ao ângulo mágico (CP / MAS). Foi utilizado um tempo de contato de 5 ms e um intervalo de pulso de 1,5 s, numa frequência de 59,6 MHz.

3.10 Preparo da suspensão

Com o material devidamente seco, preparou-se uma suspensão da fase estacionária em clorofórmio, cuja função era evitar a sedimentação rápida e / ou aglomeração das partículas, pois a FE teria seu desempenho cromatográfico afetado negativamente.

O preparo da suspensão consistiu em pesar 0,8 g de FE em um tubo de ensaio com tampa e adicionar 16 mL de clorofórmio (suspensão 5 % m/v). O tubo foi colocado no agitador roto-torque e a suspensão foi mantida sob agitação constante por um período mínimo de 16 h, até o momento do enchimento da coluna cromatográfica.

3.11 Enchimento das colunas cromatográficas

A coluna cromatográfica consiste em um tubo de aço inoxidável 316L formato cilíndrico de comprimento de 60 mm e 3,9 mm de diâmetro interno, as superfícies internas foram polidas utilizando método desenvolvido no laboratório⁹³.

O procedimento de enchimento de colunas cromatográficas utilizando o sistema Haskel (figura 14) consiste em preencher o reservatório de solvente com o solvente propulsor, metanol ou hexano previamente filtrado, e pressurizar o sistema em pressão fixa de 5000 psi (34,5 MPa). Depois, conecta-se a coluna cromatográfica ao reservatório de suspensão, transfere-se a suspensão para o reservatório e completa-o com clorofórmio. Após abrir a válvula da bomba Haskel para permitir que o metanol empurrasse a suspensão à coluna. O sistema é mantido sob pressão até coletarem 80 mL de solvente. Terminando o enchimento, a coluna permanece conectada por um período de 20 min e em seguida o sistema é despressurizado, a coluna é retirada e são colocadas as conexões da coluna (filtro, redutor de vazão e terminal). O excesso de FE que sobra no reservatório é coletado em um frasco para posteriores análises químicas e físicas.

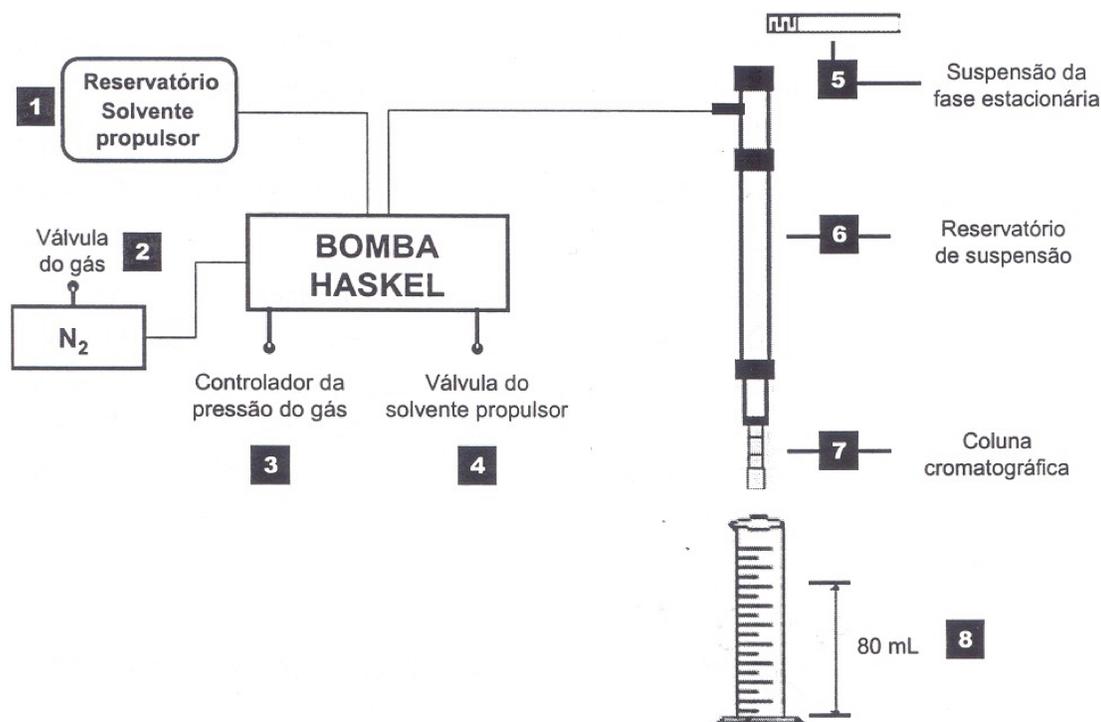


Figura 14: Esquema do sistema de recheio das colunas

3.12 Condicionamento das colunas cromatográficas

Esta etapa é feita antes da utilização da coluna para que ocorra um equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel, evitando a flutuação na linha de base e não reprodutibilidade dos tempos de retenção dos compostos eluídos. O condicionamento das colunas foi realizado durante 3 h, com FM metanol / água (MeOH:H₂O) nas proporções 60:40 (v/v), para análise da mistura teste 1, e 70:30 (v/v), para análise da mistura teste 2, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹ em um cromatógrafo a líquido, composto de uma bomba de alta pressão LC-10AD da Shimadzu, detector espectrofotométrico UV/Vis modelo SPD-10AV ($\lambda = 254$ nm) e válvula de injeção Rheodyne 8125 com alça de amostragem de 5 μ L.

3.13 Avaliação das colunas cromatográficas

A avaliação cromatográfica foi feita em uma vazão ótima de 0,5 mL min⁻¹ determinado através da curva de van Deemter.

Cinco misturas testes foram usadas para a avaliação das colunas:

- ✓ **Mistura teste 1 (MT1):** contendo os compostos uracil, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno (compostos neutros de diferentes polaridades), utilizando FM metanol / água (60:40, v/v);
- ✓ **Mistura teste 2 (MT2):** contendo uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno (compostos ácidos e básicos), utilizando FM metanol / água (70:30, v/v).

Em cada análise foram injetados 5 μ L de amostra, em duplicata. O comprimento de onda do detector foi fixado em 254 nm. Os parâmetros cromatográficos utilizados para caracterizar as colunas foram a eficiência e a assimetria.

No teste de Tanaka e colaboradores⁸⁷, quatro misturas-teste foram avaliadas empregando uma determinada composição de fase móvel para cada uma destas misturas. Todas as misturas foram analisadas a 40 °C, empregando uma vazão de fase móvel ótima de 0,5 mL min⁻¹ e detecção a 254 nm. Com a realização deste teste foi possível avaliar cinco diferentes propriedades cromatográficas das FE:

- ✓ *Hidrofobicidade ou 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 ($\alpha_{C/P}$):* esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/P} = k_C / k_P$. O $\alpha_{C/P}$ é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com constituintes da amostra;
- ✓ *Capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/P \text{ pH } 7,6}$):* propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol a pH 7,6, $\alpha_{B/P \text{ pH } 7,6} = k_B / k_P$. O valor obtido é uma estimativa da atividade silanofílica total da fase estacionária;
- ✓ *Capacidade de troca iônica em meio ácido ($\alpha_{B/P \text{ pH } 2,7}$):* propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol a pH 2,7, $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,7} = k_B / k_P$. O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais.

As misturas e suas respectivas fases móveis utilizadas foram:

- ✓ **Mistura teste 3 (MT3):** contendo uracil, butilbenzeno, pentilbenzeno, *o*-terfenil e trifenileno (compostos como *o*-terfenil e trifenileno avaliam a

seletividade estérica e os dois alquilbenzenos indicam a hidrofobicidade), utilizando FM metanol / água (80:20, v/v);

- ✓ **Mistura teste 4 (MT4):** contendo uracil, cafeína e fenol (estima o número de silanóis livres e o grau de capeamento da sílica pelos PMODS e PDMS), utilizando FM metanol / água (30:70, v/v);
- ✓ **Mistura teste 5a (MT5a):** contendo uracil, fenol e benzilamina, utilizada em FM MeOH / 0,020mol L⁻¹ de KH₂PO₄ / H₃PO₄, pH = 2,7 (30:70, v/v);

Mistura teste 5b (MT5b): contendo uracil, fenol e benzilamina, utilizada em FM MeOH / 0,020mol L⁻¹ de KH₂PO₄ / K₂HPO₄, pH = 7,6 (30:70, v/v). As **MT5 a e b** estimam a atividade dos silanóis residuais na FE.

3.14 Teste de Estabilidade Química das FE

As melhores FE obtidas foram submetidas ao teste de estabilidade, a fim de se avaliar a evolução do comportamento cromatográfico com a passagem de fase móvel pela coluna e durante sucessivas injeções da mistura teste empregada.

A estabilidade foi determinada em função do número de volumes de coluna eluído através de cada coluna cromatográfica. O volume de coluna (v_{col}) corresponde ao volume de fase móvel que ocupa os espaços dentro da coluna, os quais não são ocupados pelo recheio cromatográfico. O volume de coluna foi calculado a partir do t_M (t_R da uracil) e da vazão da fase móvel, conforme a equação 20:

(Eq. 20)

$$v_{col} = f \times t_M$$

onde f é a vazão da fase móvel e t_M é o tempo de retenção do composto não retido (uracil). O valor de v_{col} calculado foi igual a 0,50 mL para o teste básico e 0,56 mL para o teste ácido de fase movel, sendo cada teste realizado em colunas dierentes.

3.14.1 Teste Básico

A estabilidade química em condição alcalina foi avaliada pelo monitoramento de parâmetros como: eficiência (acenafteno), fator de assimetria calculado a 10 % da altura do pico (acenafteno e N,N-dimetilanilina) e fator de retenção (acenafteno) da mistura teste 2. Sendo assim, a fase móvel metanol:0,10 mol L⁻¹ Na₂CO₃ / NaHCO₃ a pH 8,0 (70:30, v/v) foi eluída através da coluna cromatográfica contendo a fase estacionária a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, empregando uma temperatura de 40 °C. O pH do componente aquoso da fase móvel foi ajustado com uma solução de NaOH diluída antes de ser adicionado ao componente orgânico. A FE foi avaliada quanto ao comportamento cromatográfico pela mistura teste 2 (uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno, e acenafteno), empregando a mesma fase móvel na vazão ótima de 0,5 mL min⁻¹.

3.14.2 Teste Ácido

A estabilidade química em condição ácida foi avaliada pelo monitoramento de parâmetros como: eficiência, fator de assimetria calculado a 10 % da altura do pico e fator de retenção do naftaleno da mistura teste 1. Sendo assim, a fase móvel metanol:0,10 mol L⁻¹ KH₂PO₄ / H₃PO₄ a pH 5,0 (60:40, v/v) foi eluída através da coluna cromatográfica contendo a fase estacionária a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, empregando uma temperatura de 40 °C. O pH do componente aquoso da fase móvel foi ajustado com uma solução de HCl diluída antes de ser adicionado ao componente orgânico. A FE foi avaliada quanto ao comportamento cromatográfico pela mistura teste 1 (uracil, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno), empregando a mesma fase móvel na vazão ótima de 0,5 mL min⁻¹.

4. Resultados e Discussões

A ideia da mistura entre um polímero de cadeia lateral longa (PMODS, C-18) com um polímero de cadeia lateral curta (PDMS, C-1) visava melhorar os resultados, já satisfatórios, das FE preparadas apenas com PMODS. A expectativa era que o PDMS ocupasse os espaços vazios deixados pelo PMODS, sendo assim, pretendia-se dar origem a uma FE com maior cobertura da superfície de sílica e melhor desempenho cromatográfico. As estruturas moleculares dos polímeros estão apresentadas na figura 15.

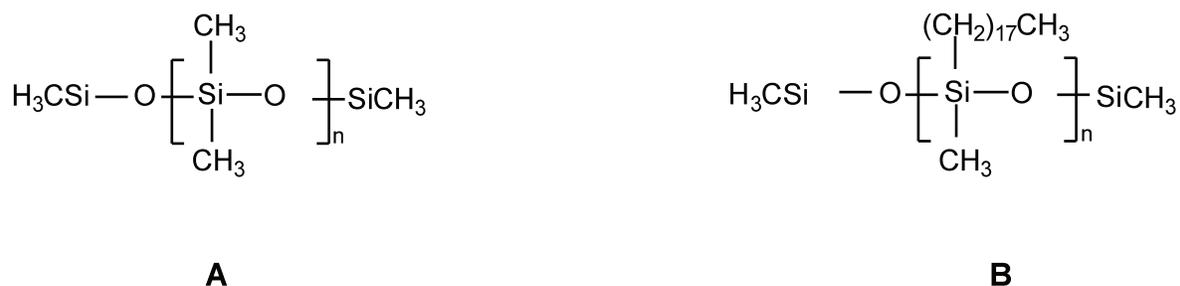


Figura 15: Estruturas moleculares dos polímeros poli(dimetilsiloxano), **A**, e poli(metiloctadecilsiloxano), **B**.

O espectro infravermelho (IV) do PMODS, figura 16, apresenta bandas relativas aos grupos metileno e metila (triplete em 2900 cm^{-1}) e aos grupos siloxano (forte duplete em 1100 e 1015 cm^{-1}).

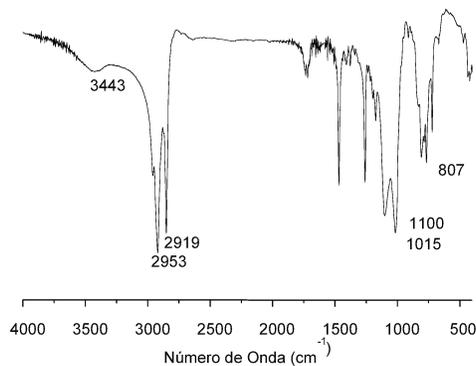


Figura 16: Espectro de absorção no IV do PMODS.

4.1 Caracterização Química e Física da Sílica Kromasil

Neste trabalho, utilizou-se a sílica Kromasil (esférica e com diâmetro de partícula 5 μm). O tamanho de partícula desta sílica proporciona um leito cromatográfico mais eficiente, possibilitando pressões mais adequadas e melhor transferência de massa entre o analito, a FM e a FE. As medidas de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros podem ser verificadas na tabela 4.

Tabela 4: Medidas de área superficial, volume de poro e tamanho médio de poros da sílica Kromasil⁶⁵.

Amostra	Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volume de poros ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Diâmetro de poros (nm)
Sílica Kromasil	309,0	0,89	11,7

A sílica Kromasil é classificada pelo fabricante como do Tipo B, ou seja, altamente pura e com menor acidez.

A superfície da sílica pode ser caracterizada através da espectroscopia de absorção no infravermelho (IV). Os silanóis isolados e geminas são indicados pela presença das bandas de 3760-3735 cm^{-1} . Já os silanóis vicinais ou ligados por ligação de hidrogênio são representados pelas bandas em 3680 cm^{-1} . Entretanto, há a sobreposição dos silanóis vicinais e isolados característicos das bandas de 3620-3200 cm^{-1} , centradas em 3500 cm^{-1} ⁵.

As principais bandas observadas nos espectros de IV da sílica Kromasil, figura 17, podem ser atribuídas às vibrações dos grupos hidroxilas da superfície da sílica ligados por ligações de hidrogênio à água fisicamente adsorvida e também aos grupos silanóis vicinais (sobreposição de bandas citado anteriormente), ao estiramento das ligações siloxano (1115 cm^{-1}), aos grupos silanóis isolados (975 cm^{-1}) e a banda em 1640 cm^{-1} que indica a presença de absorções de moléculas de água⁹⁴.

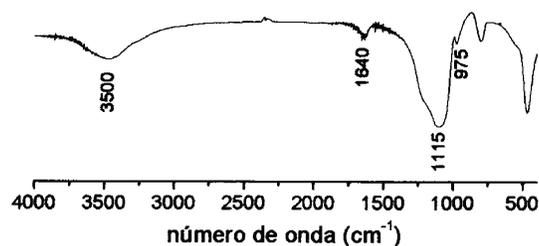


Figura 17: Espectro de absorção no IV da sílica Kromasil⁶⁷

O espectro de CP / MAS ²⁹Si RMN da sílica Kromasil é apresentado na figura 18. O sítio Q2 em -89 ppm é atribuído aos silanóis geminais, o Q3 em -100 ppm aos silanóis isolados e vicinais (não é possível distinguir os dois sítios por esta técnica) e o Q4 em -109 ppm às ligações siloxanos⁹⁵.

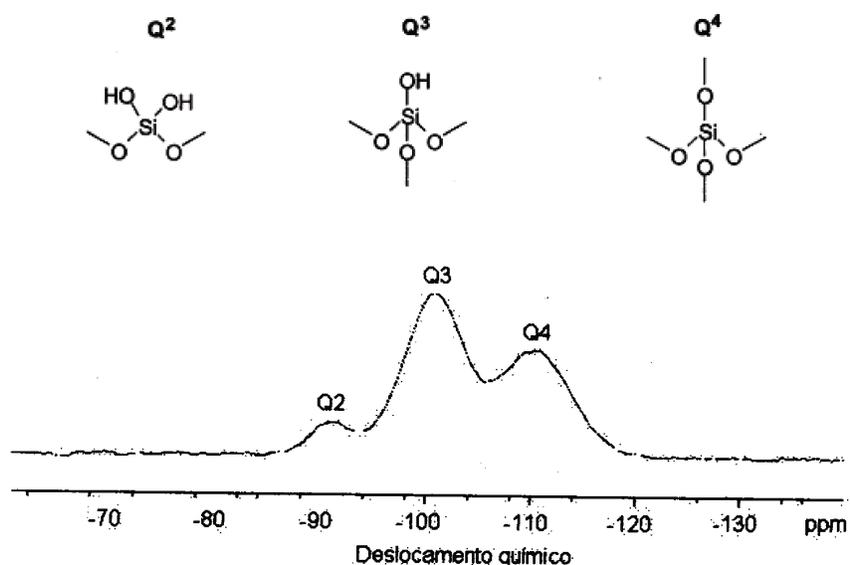


Figura 18: Espectro de CP / MAS ²⁹Si RMN da sílica Kromasil⁶⁷. Acima de cada pico encontra-se a estrutura representada.

As micrografias eletrônicas (MEV) da sílica Kromasil feitas por microscopia eletrônica de varredura, figuras 19 e 20, mostram que a sílica Kromasil apresenta pequena variação de tamanho das partículas e poucas partículas quebradas ou com imperfeições. Estas características resultam numa boa coluna cromatográfica, baseado no recheio, pois será composta por partículas mais regulares³⁵.

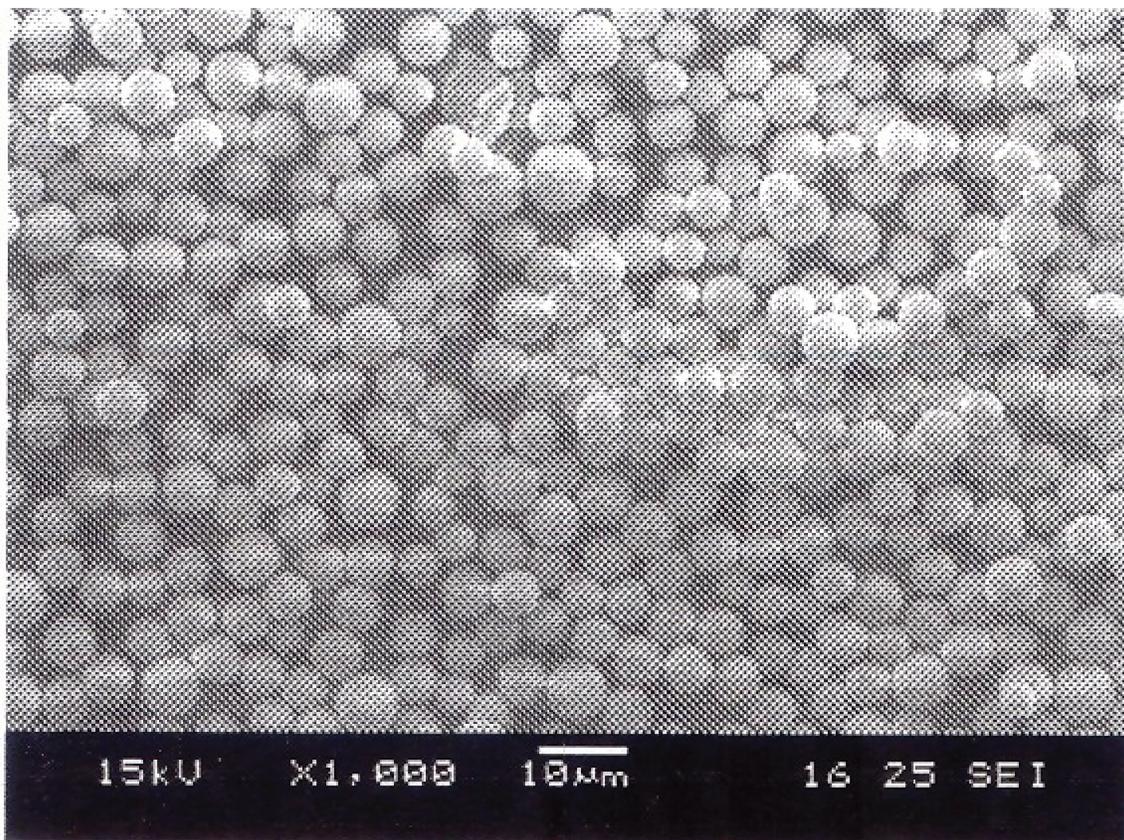


Figura 19: MEV da sílica Kromasil com aumento de 1000 vezes⁶⁷.

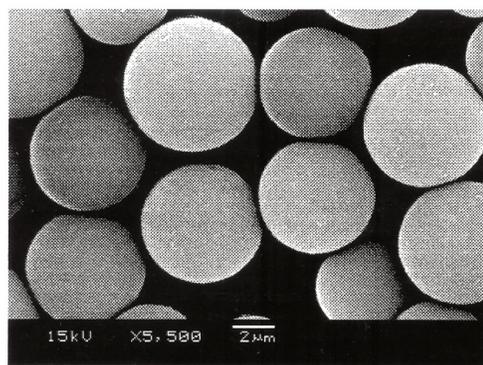
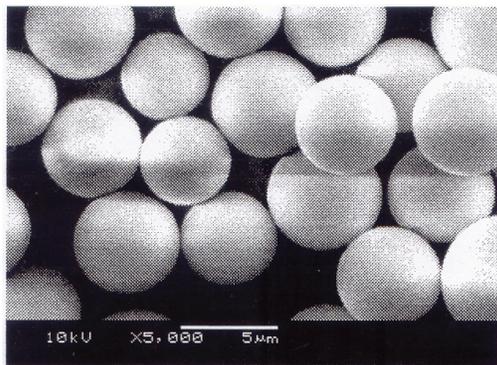


Figura 20: MEV da sílica Kromasil com aumento de 5000 vezes⁶⁷.

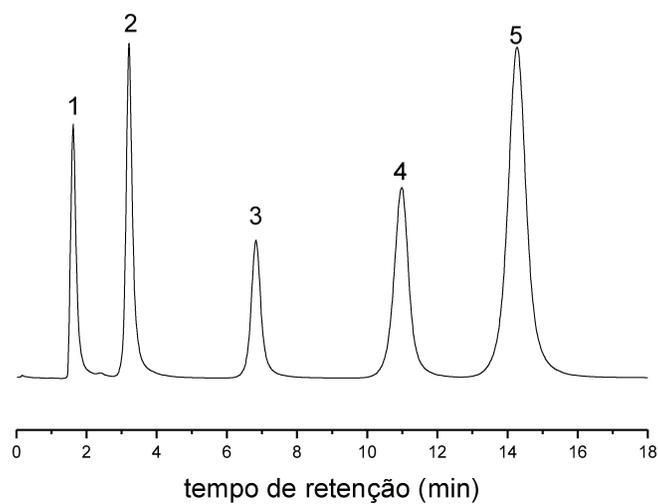
4.2 Estudo do Método de Extração de FE

Visando avaliar o melhor método para extração da FE, preparou-se uma FE carregada com 35 % PMODS e 15 % PDMS, efetuando-se duas extrações cada uma com porção diferente, a primeira usando o método descrito no item 3.7, no qual a extração foi feita usando solvente hexano, numa vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, numa temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por 3 h e o segundo método, descrito no ítem 3.8, no qual se realizou a extração da FE simultaneamente ao recheio da coluna, sendo diferente o solvente propulsor utilizado, já que no lugar do metanol (solvente de um enchimento convencional) empregou-se o hexano. Os cromatogramas e os resultados cromatográficos obtidos nas duas extrações podem ser observados, respectivamente, na figura 21 e na tabela 5.

Tabela 5: Resultados cromatográficos obtidos nos dois testes de extração. Os parâmetros são calculados para o naftaleno e o par tolueno-naftaleno (MT1). Os valores apresentados são médias de duas injeções.

Teste	t_R	R_s	A_s	(N/m)	k
Extração convencional	14,3	3,8	1,1	59000	7,8
Extração pela bomba de enchimento	15,7	3,8	0,7	52100	9,1

A



B

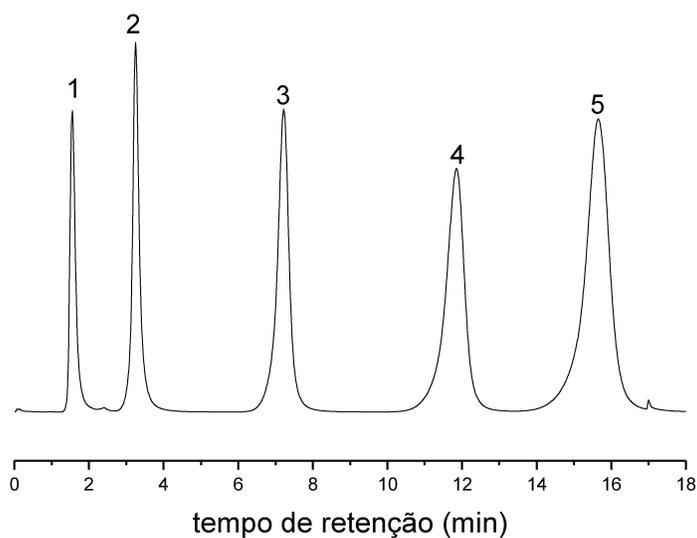


Figura 21: Cromatogramas para MT1 com as FE submetidas aos dois métodos de extração: convencional (A) e pela bomba de enchimento (B). As condições cromatográficas foram FM: MeOH/H₂O (50:50 v/v), vazão 0,3 mL min⁻¹. MT1: (1) uracil, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno.

Os resultados indicam que a extração prévia ao enchimento, experimento 1, seria a mais adequada para a preparação da fase estacionária proposta por apresentar melhores resultados de eficiência e assimetria para o pico de naftaleno, segundo análise cromatográfica, e eliminar com maior eficácia o excesso de polímero não imobilizado, como mostram os resultados de caracterização por análise elementar e termogravimetria (tabela 6).

Tabela 6: Resultados das caracterizações por análise elementar e termogravimetria (ATG) obtidos nos dois testes de extração.

Amostras	% C ^a	$\bar{m} i_{\text{PMODS}}$ ^b	$m_{\text{PMODS retido}}$ ^c	% PMODS _{retido} ^d	τ (nm) ^e	% TG ^f
Extração convencional	12.9	0.7	0.22	30.0	2.9	17.4
Extração pela bomba de enchimento	13.8	0.7	0.23	32.9	3.0	20.0

a percentagem de carbono de análise elementar;

b massa específica ($\text{g}_{\text{PMODS}} / \text{g}_{\text{Silica}}$) de PMODS inicial;

c massa específica de PMODS retido;

d % de PMODS retido;

e espessura do filme;

f orgânico perdido em ATG.

4.3 Otimização da Quantidade de Polímero no Preparo de FE

Para determinar a percentagem de carregamento de cada polímero foram feitos quatro experimentos variando em cada um a quantidade dos polímeros na preparação das FE e avaliando o desempenho cromatográfico das FE preparadas. As quantidades dos polímeros e os resultados cromatográficos obtidos pelas FE formadas pode ser observado na tabela 7.

Tabela 7: Estudo da quantidade de polímero. Os parâmetros calculados para o naftaleno e o par tolueno-naftaleno (MT1)

Teste	% SiO ₂	% PMODS		t_R	Rs	As	(N/m)	k
		C-1	C-18					
Exp A	50,0	10,0	40,0	15,4	4,7	0,5	51600	8,1
Exp B	50,0	25,0	25,0	14,9	2,6	0,7	52000	8,3
Exp C	50,0	40,0	10,0	20,3	2,9	0,5	44300	10,7
Exp D	50,0	0,0	50,0	13,8	6,5	0,7	57500	6,7

Analisando os resultados apresentados na tabela 7 pode-se definir como melhores quantidades de polímeros aquelas utilizadas no experimento B, pois aproximam-se dos resultados obtidos com a coluna recheada apenas com PMODS imobilizado na sílica (experimento D, referência), além de fornecerem de modo geral os melhores resultados para os parâmetros cromatográficos avaliados (tempo de retenção e eficiência). Sendo assim, as fases preparadas neste trabalho apresentam carga de 25,0 % PMODS e 25,0 % PDMS sobre massa igual total da sílica.

4.4 Planejamento Fatorial

4.4.1 Planejamento Fatorial 2² com Ponto Central

Realizou-se o planejamento para otimizar as condições de preparo das fases estacionárias com PDMS e PMODS sorvidos e imobilizados sobre a sílica. Para isto usou-se o planejamento fatorial 2² com ponto central. Em trabalhos anteriores do LabCrom, com um polímero sorvido e imobilizado por tratamento térmico em atmosfera de N₂, observou-se que, para atender o objetivo, a temperatura de imobilização térmica deveria variar entre 80 °C e 150 °C para formação de uma monocamada do polímero sobre a sílica, obtendo colunas com bons resultados cromatográficos⁷⁴. Portanto, neste estudo, partiu-se das condições conforme apresentados na tabela 8.

Tabela 8: Representação do planejamento fatorial 2^2 para otimização das condições de imobilização das fases estacionárias e a eficiência dos resultados calculado para o naftaleno. Fatores obtidos através das fórmulas $x_1 = (t-12)/4$ e $x_2 = (T-110)/10$.

Experimentos	t (h)	T (°C)	x_1	x_2	Eficiência (N/m)
Exp 1	8	100	-1	-1	44700
Exp 2	16	100	1	-1	49400
Exp 3	8	120	-1	1	41500
Exp 4	16	120	1	1	46100

x_1 = tempo de imobilização térmica

x_2 = temperatura para imobilização térmica

Admitindo que a superfície de resposta na região investigada é uma função linear dos fatores, as respostas poderão ser estimadas por uma equação linear do tipo $y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2$, onde x_1 e x_2 representam os fatores codificados e b_0 , b_1 e b_2 são estimadores dos parâmetros do modelo.

O modelo linear pode ser descrito através da equação 21:

$$(Eq. 21) \quad y = 47,1 + 2,325 x_1 - 1,625 x_2$$

$$(\pm 2,08) \quad (\pm 2,75) \quad (\pm 2,75)$$

Pela análise da equação linear ajustada para as eficiências obtidas através das FE submetidas a diferentes condições de imobilização térmica, equação 21, pode-se observar que os parâmetros b_1 e b_{12} não são estatisticamente significativos no nível de 95% de confiança. Isto pode ser confirmado pela análise dos intervalos de confiança (IC).

$$IC_{95\%}(b_0) = [38; 56]$$

$$IC_{95\%}(\text{curvatura}) = [-21,98; 14,16]$$

$$IC_{95\%}(b_1) = [-9,5; 14,2]$$

$$\text{Efeito interação } (b_{12}) = -0,05$$

$$IC_{95\%}(b_2) = [-13,5; 10,21]$$

$$IC_{95\%}(b_{12}) = [-16,8; 16,7]$$

Para verificar a validade do ajuste deste modelo, equação 22, às eficiências obtidas, também foi realizada a análise da variância (ANOVA) através de um programa estatístico. Os resultados da ANOVA estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9: ANOVA para o modelo linear do planejamento fatorial 2^2 para otimização das condições de imobilização das fases estacionárias, sendo SQ a soma quadrática, ν o número de graus de liberdade e MQ a média quadrática.

Fonte de Variação	SQ	ν	MQ
Regressão	32,2	2	16,1
Resíduos	86,9	4	21,7
Falta de ajuste	26,2	2	13,1
Erro puro	60,7	2	30,3
Total	119,0	6	
% de variação explicada	27,0		
% de variação explicável	49,0		

Analisando o modelo proposto pôde-se verificar que não é adequado para ajustar os dados experimentais. Entretanto, é preciso destacar que o modelo não apresenta falta de ajuste pela ANOVA, pois a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e o erro puro experimental ($MQ_{faj} / MQ_{ep} = 0,43$) foi menor que $F_{2,2,95\%} = 19,0$ (valor tabelado). Porém a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos ($MQ_R / MQ_r = 0,74$) é menor que o valor do teste F tabelado ($F_{2,4,95\%} = 6,94$). Por isso, o modelo não explica bem as variações ocorridas nos resultados (49%). Decidiu-se realizar mais alguns experimentos, usando o planejamento estrela, para verificar a possibilidade de um modelo mais adequado.

4.4.2 Planejamento Estrela

Este planejamento é chamado de estrela (ou axial), pois os novos experimentos são realizados em pontos axiais, localizados a 45° dos pontos iniciais do planejamento fatorial 2^2 com ponto central em triplicata. Desta forma, quatro experimentos foram realizados nestes pontos. Estes valores são codificados para os fatores tempo e temperatura de imobilização apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Níveis para o planejamento estrela (pontos adjacentes ao planejamento fatorial 2^2) para otimização das condições de imobilização das fases estacionárias e os resultados de eficiência calculados para o composto naftaleno. Fatores obtidos através das fórmulas $x_1 = (t-12)/4$ e $x_2 = (T-110)/10$.

Experimentos	t (h)	T (°C)	x_1	x_2	Eficiência (N/m)
Exp 5	6,4	110	-1,4	0	50100
Exp 6	17,6	110	1,4	0	52600
Exp 7	12	96	0	-1,4	52100
Exp 8	12	124	0	1,4	49600
Exp 9a	12	110	0	0	55000
Exp 9b	12	110	0	0	49000
Exp 9c	12	110	0	0	44000

x_1 = tempo de imobilização térmica

x_2 = temperatura para imobilização térmica

Ajustou-se um modelo quadrático para verificar se a explicação é mais adequada para as variações das respostas de eficiência obtidas para os fatores de tempo e temperatura de imobilização térmica estudados.

O modelo quadrático pode ser descrito através da equação 22:

$$\text{(Eq. 22)} \quad y = 49,4095 + 1,6162 x_1 - 1,2626 x_2 - 0,4661 x_1^2 - 0,7212 x_2^2 - 0,0250 x_1 x_2$$

Para verificar a validade do ajuste deste modelo às eficiências das fases estacionárias recorreu-se, mais uma vez, a ANOVA. Os valores estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11: ANOVA para o modelo quadrático do planejamento estrela para a otimização das condições de imobilização das fases estacionárias.

Fonte de Variação	SQ	ν	MQ
Regressão	36,6	5	7,3
Resíduos	129,7	5	25,9
Falta de ajuste	69,0	3	23,0
Erro puro	60,7	2	30,3
Total	166,3	10	
% de variação explicada	22,0		
% de variação explicável	63,5		

Ao chegar nesses resultados resolveu-se calcular a média e o desvio padrão das eficiências, do planejamento estrela, dos pontos fatoriais e centrais mostrados na tabela 12.

Tabela 12: Médias (\bar{y}) e desvios padrões (s) para os planejamentos realizados.

Planejamento	\bar{y}	s
Fatorial 2^2	45,4	3,3
Estrela	51,1	1,5
Ponto Central	49,3	5,5

Assim, nota-se que a média e o desvio da triplicata realizadas no ponto central apresentam valores relativamente altos. Isso pode indicar, a princípio, que a temperatura e o tempo não são efeitos significativos ou que há outro efeito tão importante quanto ambos, mas que não está sendo controlado adequadamente. De acordo com trabalhos anteriores do LabCrom a segunda hipótese é a mais adequada.

O modelo quadrático não apresenta falta de ajuste pela ANOVA, pois a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e o erro puro experimental ($MQ_{faj} / MQ_{ep} = 0,75$) foi menor que o $F_{3,2,95\%} = 19,16$ (valor tabelado), conforme sugerido pelas regras estatísticas para se confirmar a validade de um determinado modelo polinomial⁹². Porém, a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos ($MQ_R / MQ_r = 0,28$) é menor que o valor do teste $F_{5,5,95\%} =$

5,05. Todavia, o modelo quadrático explica 63,5% das variações ocorridas nos resultados, enquanto o modelo linear só explica 49,0%.

O resultado da análise obtido do planejamento levou a conclusão de que há fatores importantes sendo variados e influenciando na eficiência do processo. Analisando todas as etapas de trabalho percebeu-se que fatores externos como: as colunas utilizadas com características físicas diversificadas; a vazão do nitrogênio, com controle impreciso; o sistema de recheio da coluna, que é um processo artesanal, e erros experimentais, provavelmente tenham influenciado o sistema.

Em resumo, a variância (dispersão dos resultados) é grande e apresenta baixa qualidade, mas comparando os modelos construídos o quadrático é mais adequado.

O modelo quadrático ajustado pode ser representado graficamente através de uma superfície de resposta para as eficiências do composto naftaleno (MT1) obtidas pelos experimentos do planejamento realizado. A figura 22 apresenta a superfície da eficiência para as variáveis estudadas, tempo e temperatura de imobilização térmica.

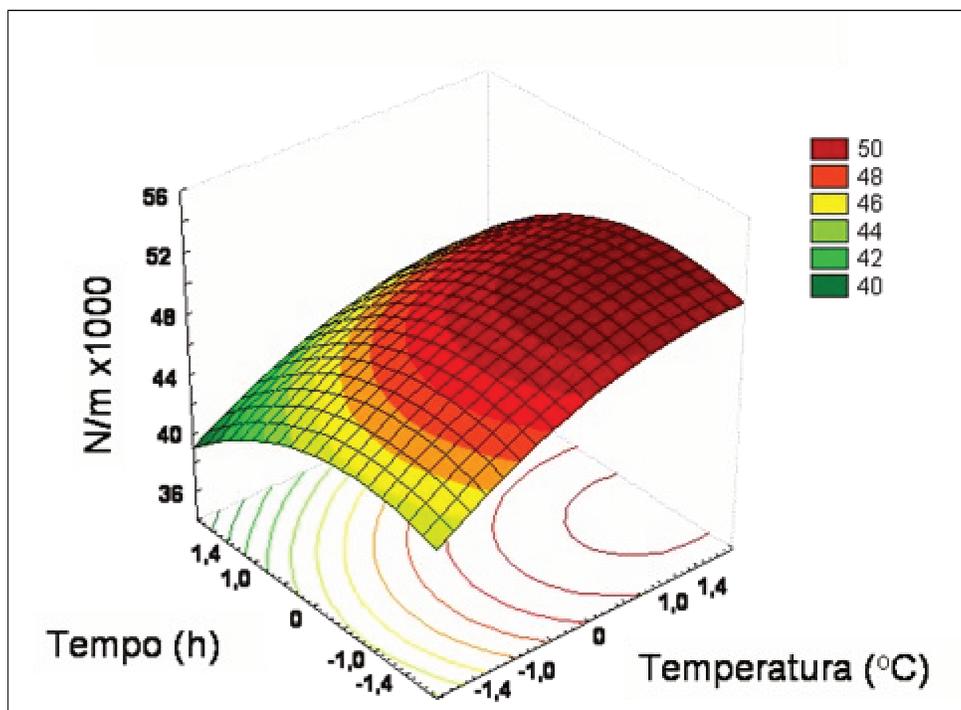


Figura 22: Superfície das eficiências para o composto naftaleno (MT1) obtidas das FE submetidas as condições de imobilização térmica estudadas.

Através da superfície de respostas, apresentada na figura 21, pode-se observar que o ápice (ponto ótimo) está dentro da região investigada. A partir do ápice é possível determinar as melhores condições de tempo e temperatura para imobilização térmica, sendo possível obter as melhores FE. Os valores nestas condições de reação podem ser determinados pela derivada da equação

quadrática 22, $\frac{\partial y}{\partial x_1}$ e $\frac{\partial y}{\partial x_2}$. Efetuando a derivada encontram-se as condições

ótimas em valores codificados para o tempo e a temperatura de imobilização térmica: $x_1 = 1,76$ e $x_2 = -0,91$. Substituindo os valores codificados de x_1 e x_2 na equação 22, obtém-se um valor de 52600 para a eficiência (N/m) do composto naftaleno (MT1), valor máximo previsto pelo modelo. Estes valores codificados correspondem a 8 horas e 36 minutos de tempo e 127,6 °C de temperatura para imobilização térmica.

Após a determinação das condições ótimas de imobilização térmica fez-se o preparo de FE, em duplicata. As análises cromatográficas apresentaram eficiências para o composto naftaleno de 60000, acima do esperado pelo modelo 52000.

4.5 Caracterizações Físicas e Químicas das Fases Estacionárias

As caracterizações físico-química das fases preparadas foram realizadas para as FE submetidas ao estudo da quantidade de polímero (experimentos A-D), planejamento fatorial (experimentos 1-9) e às melhores condições de imobilização térmica (experimento condição ótima).

4.5.1 Medidas de Área Superficial, Volume Específico e Diâmetro de Médio de Poros

Os valores de área superficial (S_{BET}), volume de poros (v_p) e diâmetro de poros (d_p) foram obtidos pelas medidas de adsorção e dessorção de N_2 a 150 °C. Os resultados obtidos para sílica pura⁶⁵ e sílica com polímeros (PDMS e PMODS) sorvidos e imobilizados são apresentados na tabela 13. Estas amostras são representativas dentro de um grupo, cujo o preparo foi realizado com a mesma carga de polímero variando apenas as condições de imobilização térmica.

Tabela 13: Área superficial, volume e diâmetro de poros da sílica pura e com polímeros (PDMS e PMODS) sorvidos e imobilizados, após extração.

Amostra	Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volume de poros ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Diâmetro de poros (nm)
Sílica Kromasil	309,0	0,89	11,7
Exp 4	83,1	0,16	7,8
Exp 7	125,9	0,24	7,8

Pode-se verificar a redução de todos os parâmetros da sílica sorvida e imobilizada em relação à sílica pura. A área superficial específica e o volume de

poro das partículas de sílica sorvida e imobilizada apresentou redução de, aproximadamente, 80 % e 70 %, respectivamente para os experimentos 4 e 7. Apenas o diâmetro de poros apresenta uma redução menor na faixa de 40 %. A diferença de resultados entre os experimentos preparados com a mesma carga de polímeros deve-se à eficiência na imobilização térmica.

4.5.2 Análise Elementar (CHN) e Termogravimétrica (ATG)

A estabilidade térmica das FE obtidas da mistura de PMODS e PDMS foram avaliada pela análise termogravimétrica, na faixa de temperatura de 25 °C a 1000 °C. A estabilidade das fases apresentou início de degradação (perdas de massas) em aproximadamente 500 °C. Os termogramas estão mostrados nas figuras 23 e 24 A e B.

A partir dos dados de % C, foi possível determinar a massa específica de PMODS retidos sobre a sílica, $\bar{m}_{iPMODSretido}$, após o preparo das FE, dado em % PMODS retido e a espessura da camada de polímero formada nas paredes dos poros das sílicas, τ assumindo que os poros da sílica tenham diâmetro constante e que PMODS imobilizado seja caracterizado por uma espessura de camada constante nos poros.

As análises de % C e % perda de massa por TGA das FE estão apresentadas na tabela 14.

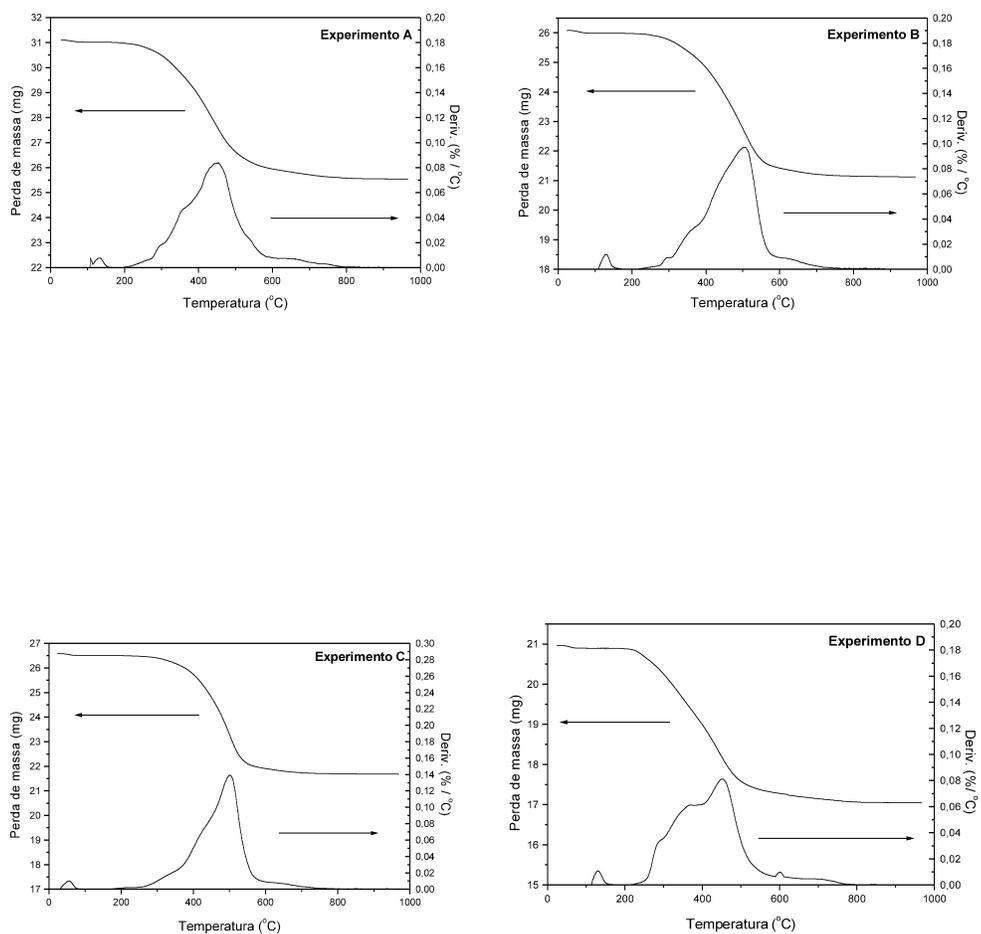


Figura 23: Termogramas das FE preparadas nos experimentos A-D (estudo da quantidade de polímero)

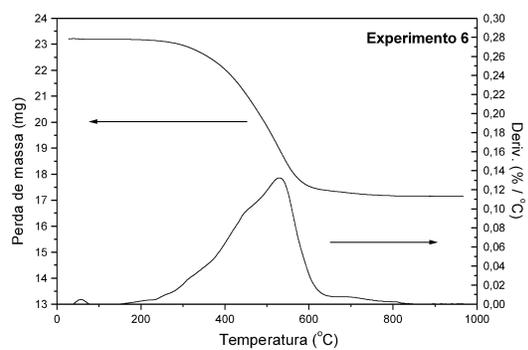
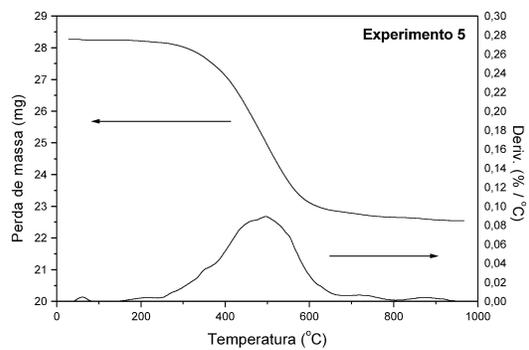
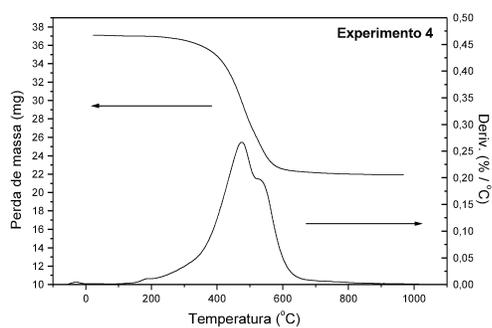
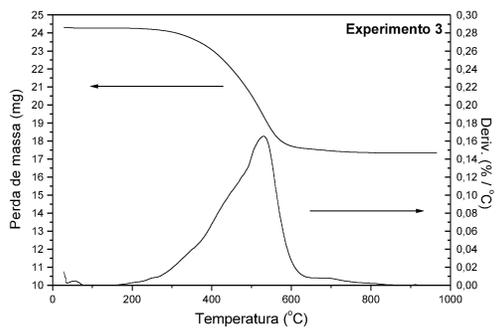
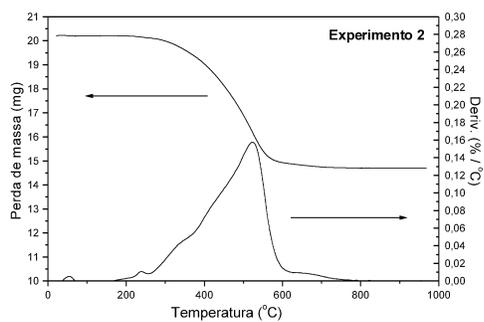
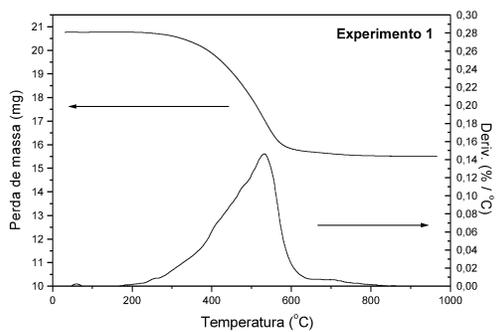


Figura 24 A: Termogramas das FE preparadas nos experimentos 1-6 (planejamento fatorial).

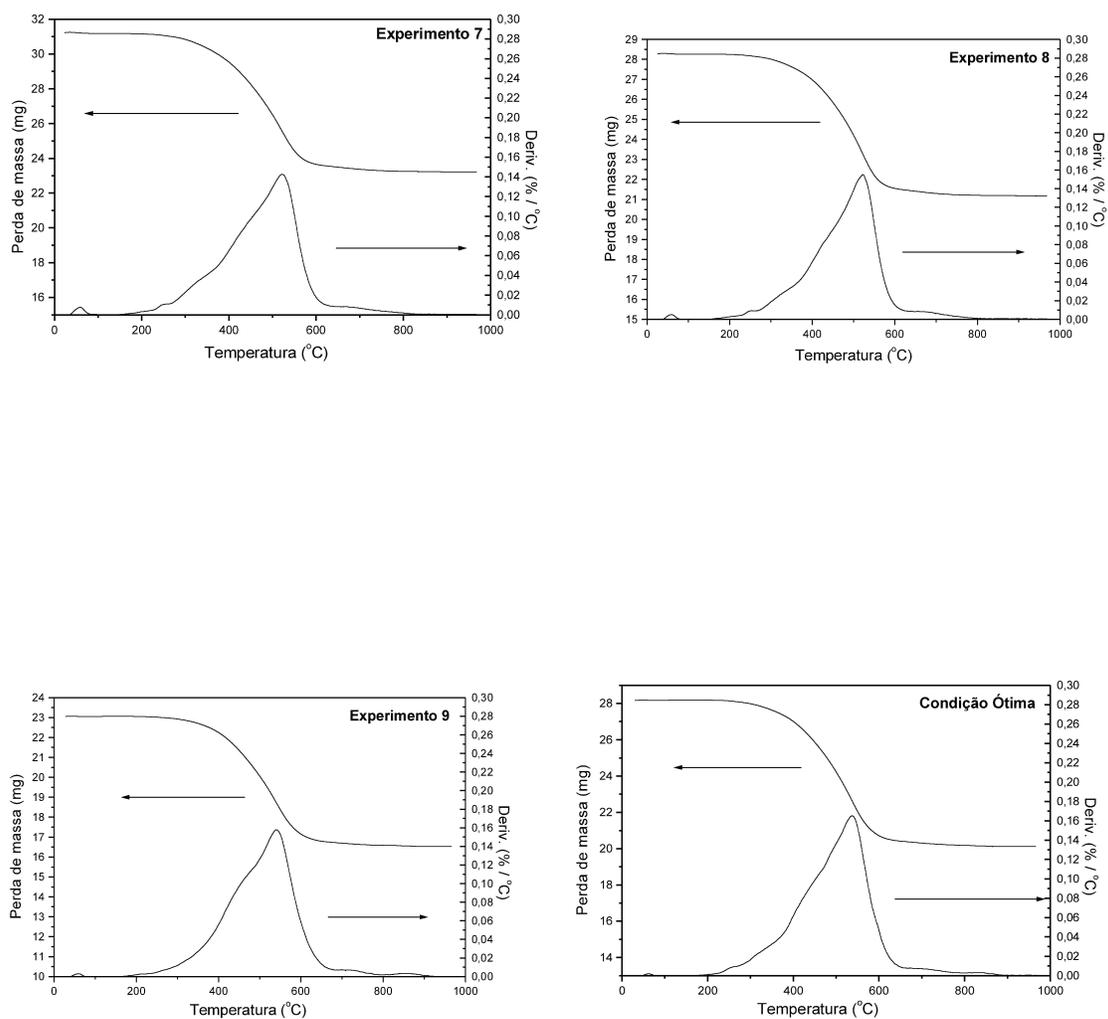


Figura 24 B: Termogramas das FE preparadas nos experimentos 7-9 (planejamento fatorial) e na melhor condição de imobilização térmica.

Tabela 14: %C, % perda massa obtida por TGA, quantidade de PMODS retido e espessura da camada formada (τ) de FE preparadas para planejamento fatorial.

Amostras	%C	m_{iPMDS} (g _{PMDS} /g _{silica})	\bar{m}_{iPMDS} (g _{PMODS} /g _{silica})	$\bar{m}_{PMODS \text{ retido}}^1$ (g _{PMODS} /g _{silica})	% PMODS retido	τ nm	% perda massa (TGA)
Exp A	14.1	0.2	0.8	0.24	24.0	0.97	17.7
Exp B	15.2	0.5	0.5	0.26	26.0	1.05	18.7
Exp C	28.5	0.7	0.3	0.64	64.0	3.29	40.9
Exp D	13.2	0.0	1.0	0.22	22.0	0.88	18.5
Exp 1	15.3	0.5	0.5	0.27	27.0	1.10	25.3
Exp 2	15.1	0.5	0.5	0.26	26.0	1.10	27.3
Exp 3	15.3	0.5	0.5	0.27	27.0	1.10	28.6
Exp 4	13.6	0.5	0.5	0.22	22.0	0.88	18.2
Exp 5	12.1	0.5	0.5	0.20	20.0	0.79	20.3
Exp 6	14.3	0.5	0.5	0.24	24.0	0.97	26.1
Exp 7	13.6	0.5	0.5	0.22	22.0	0.88	25.7
Exp 8	13.2	0.5	0.5	0.22	22.0	0.88	25.2
Exp 9	14.2	0.5	0.5	0.24	24.0	0.97	28.4
FE_ótima	15.0	0.5	0.5	0.25	25.0	1.00	28.6

a - $\bar{m}_{PMODSretido} = \frac{\%C}{73 - \%C}$, considerando que 73% da massa de PMODS é referente à carbono;

b - $\bar{m}_{PMODSporoscheios} = v_p \rho_{SILICA} (mLg^{-1}) x \rho_{PMODS} (gmL^{-1}) / m_{PMODSporoscheios} = 0,792$; $F = \frac{\bar{m}_{PMODSretido}}{m_{PMODSporoscheios}}$; $\tau = - \left(\frac{\sqrt{d^2 - Fd^2} - d}{2} \right)$, para

o cálculo da espessura da camada considerou-se a densidade (ρ) 0,89gmL⁻¹, o volume de poro da sílica (v_p) 0,89mLg⁻¹ e diâmetro de poro (d_p) 11,7 nm;

Analisando os dados da tabela 14, observa-se que a espessura da camada de polímero, τ , formada nas FE preparadas, fica em torno de 1,0 nm. Os valores de % de perda de massa ficam em torno de 19,0 % (para o estudo da carga de polímero) e 27,0 % (para o estudo do tempo e temperatura de imobilização térmica). Pode-se considerar estes resultados coerentes, mesmo para o experimento C, pois deve-se levar em consideração que esta FE foi preparada com maior quantidade de PDMS.

De acordo com os estudos feitos por Bottoli et al.^{63,64}, a incorporação do polímero depende dos silanóis da superfície da sílica, ou seja, o processo de sorção e imobilização do polímero nas paredes dos poros da sílica acontece devido às interações entre as cadeias do polímero e os grupos silanóis da superfície da sílica.

4.5.3 Espectroscopia de Absorção no Infravermelho (IV)

As FE obtidas no planejamento fatorial e nas melhores condições de imobilização térmica foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho para a determinação da presença de grupos funcionais característicos. Os espectros são mostrados nas figuras 25 e 26 A e B.

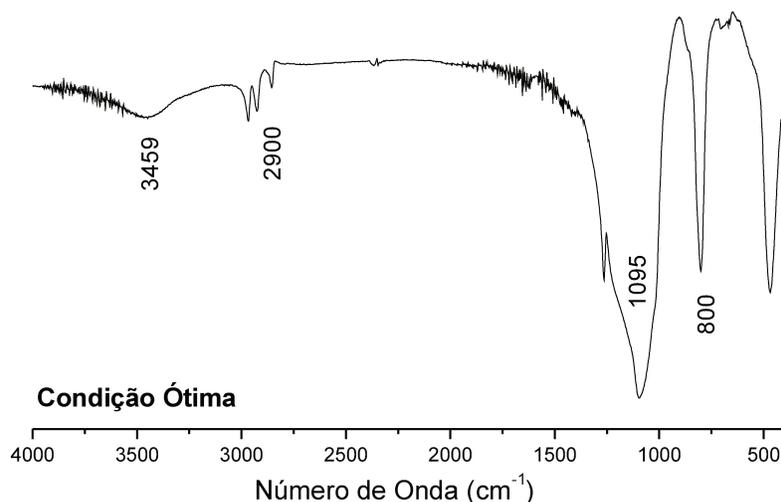


Figura 25: Espectro de absorção no infravermelho da FE preparada nas melhores condições de imobilização térmica.

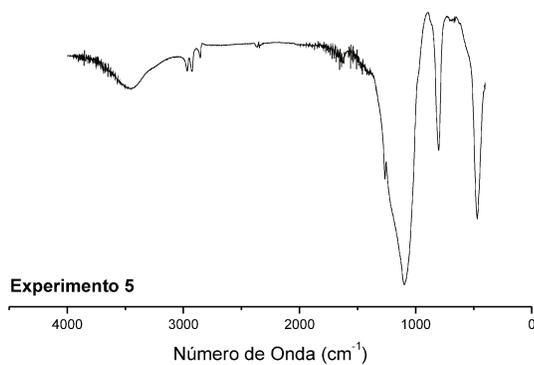
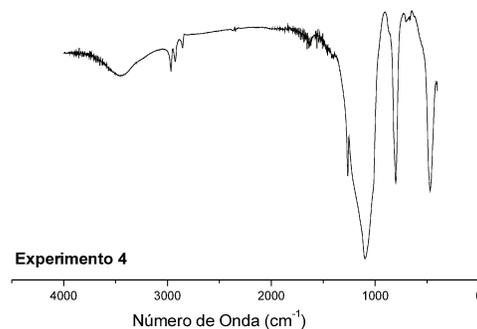
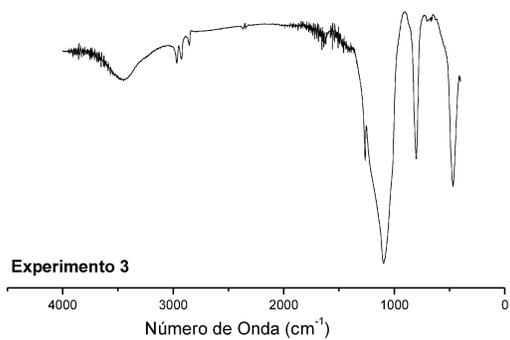
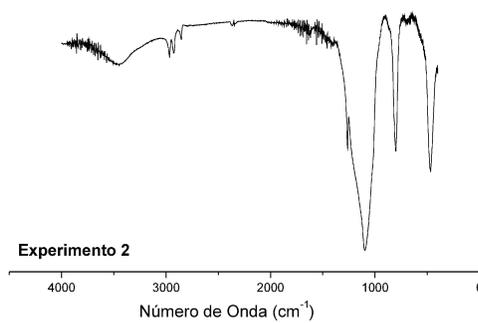
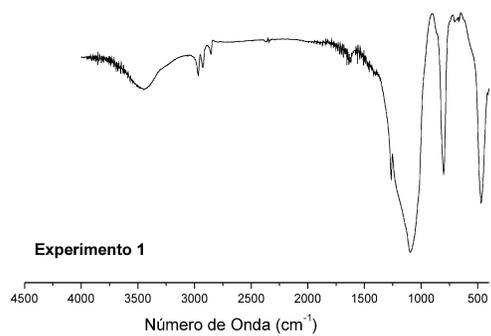


Figura 26 A: Espectros de absorção no Infravermelho das FE 1-5 preparadas para o planejamento fatorial.

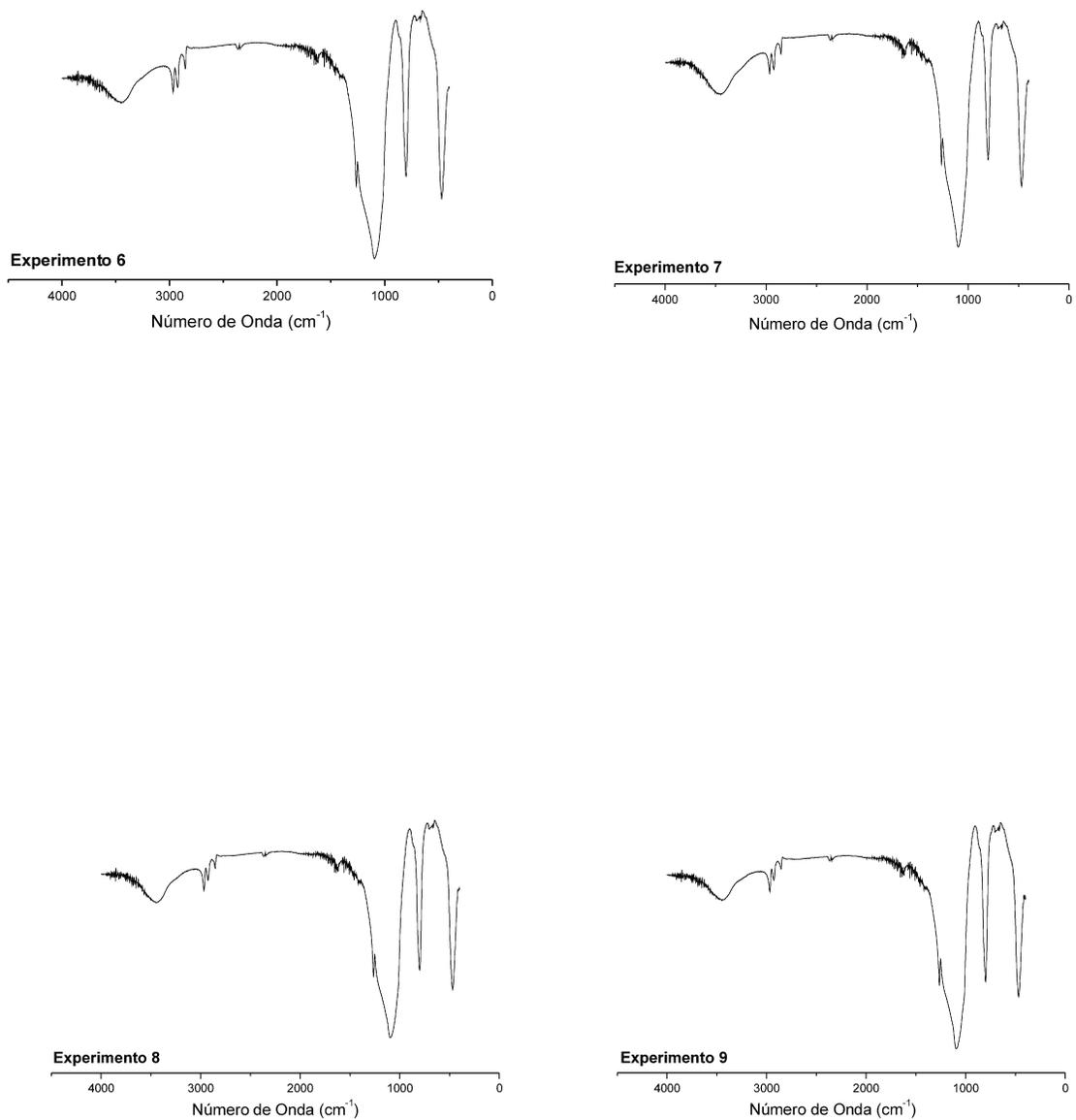


Figura 26 B: Espectros de absorção no Infravermelho das FE 6-9 preparadas para o planejamento fatorial.

As principais bandas em todos os espectros estão indicadas nos números de onda próximos a 3500 cm^{-1} que representa bandas correspondentes aos grupos hidroxilas ligados por ligações de hidrogênio à água fisicamente adsorvida e aos grupos hidroxilas geminais, estiramento -O-H ; próximos a 2900 cm^{-1} que são tripletes relativos aos grupos metila, estiramento ≡C-H ; próximos a 1100 e 1030 cm^{-1} são os dupletes relativos aos grupos siloxanos, estiramento ≡Si-O-Si e próximos a 800 cm^{-1} são bandas indicadoras dos grupos metila, deformação assimétrica -CH_3 . Através dos espectros obtidos é possível analisar qualitativamente as FE preparadas e observar que não há alterações na sua estrutura, apresentando os mesmos grupos característicos.

4.5.4 Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si

As espécies de silício presentes na FE preparada nas melhores condições de imobilização térmica foram determinada por espectroscopia de RMN de ^{29}Si empregando rotação em ângulo mágico com polarização cruzada (CP / MAS). A figura 27 mostra o espectro de RMN CP/MAS de ^{29}Si para a FE preparada nas condições ótimas.

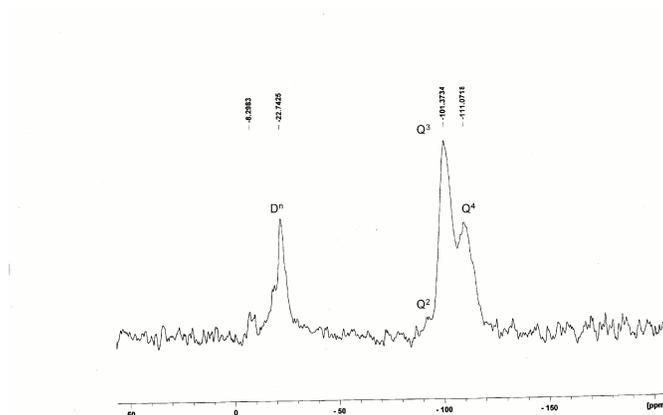


Figura 27: Espectro de RMN CP/MAS de ^{29}Si para FE preparada em condições ótimas de imobilização térmica.

Observa-se nesse espectro os sinais característicos da sílica pura em -90 ppm (Q^2 = silanóis geminais), -100 ppm (Q^3 = silanóis isolados ou vicinais) e -110 ppm (Q^4 = ligações siloxano) e o grupo de sinais D^n (D^1 , D^1_H , D^2 , $D^{2'}$), que é a sobreposição de vários sinais atribuídos ao PMODS e PDMS imobilizados (quimicamente ligados) sobre a sílica (figura 28).

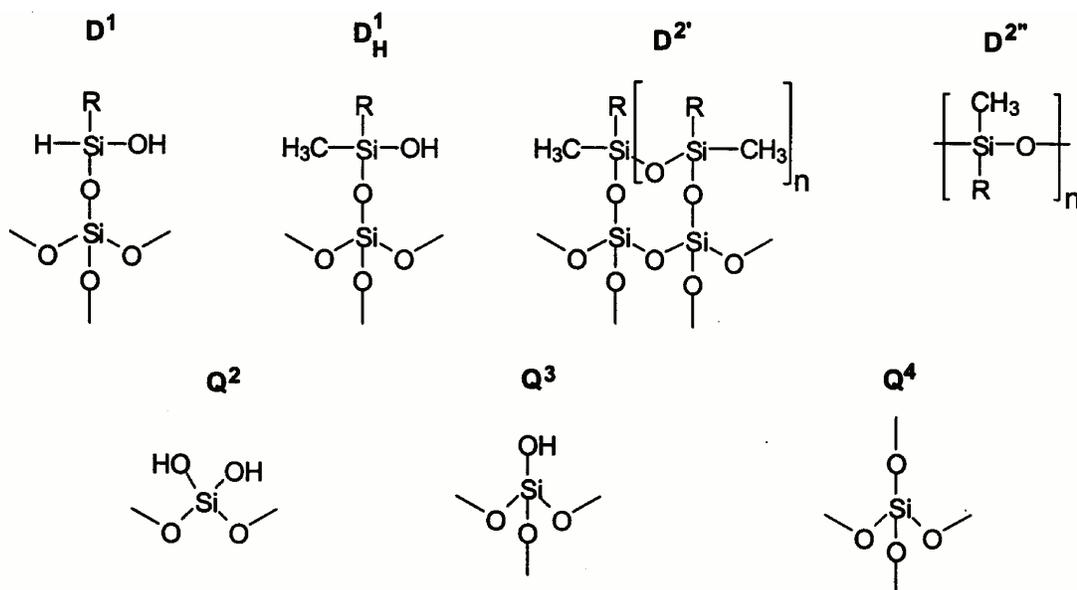


Figura 28: Espécies de silício presentes na fase estacionária.

4.6 Avaliação Cromatográfica

4.6.1 Definição da Vazão de Trabalho

A vazão de trabalho foi definida com base nas curvas de van Deemter, onde foram plotados os valores de altura de um prato (H) vs. velocidade linear da fase móvel (μ), extraídos dos cromatogramas obtidos em vazões de fase móvel que variaram de 0,1 a 0,9 mL min^{-1} . A curva está apresentada na figura 29.

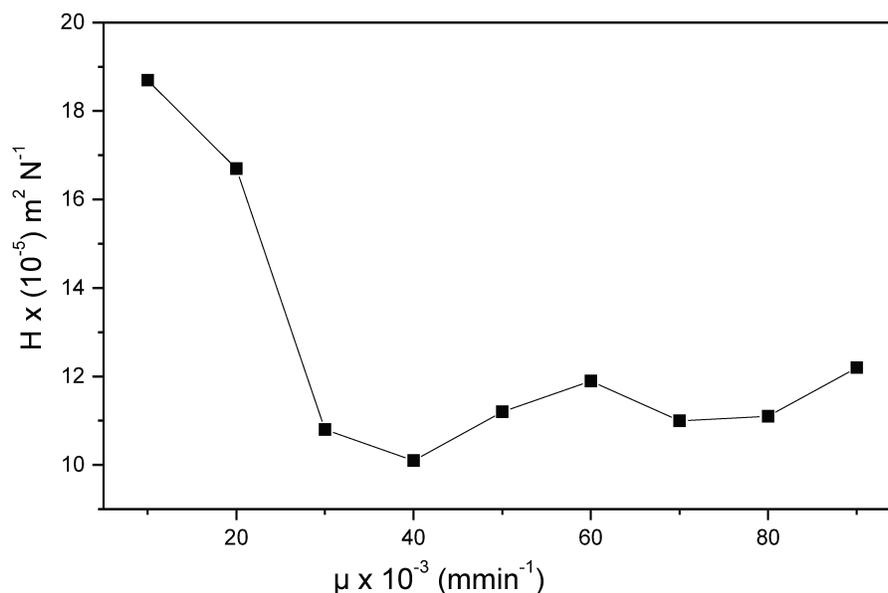


Figura 29: Curva de van Deemter para FE preparada nas melhores condições de imobilização térmica. Condição cromatográfica: FM: MeOH/H₂O (60:40 v/v), detecção a 254 nm, mistura teste 1. H calculado para o naftaleno.

Antes de determinar a melhor vazão realizou-se um pequeno estudo para verificar qual a melhor composição de fase móvel. Com isto, foram definidas para as análises da MT1 a composição 60:40 metanol / água (v/v) e para MT2 a composição 70:30 metanol / água (v/v).

Existe uma vazão ótima na qual a coluna irá apresentar uma eficiência máxima, identificada pelo mínimo da curva de van Deemter. Para a FE estudada esta vazão foi de 0,4 mL min⁻¹, porém foi na vazão 0,5 mL min⁻¹ que notou-se uma eficiência significativa associada a uma análise mais rápida, por isso, escolheu-se a última como a vazão a ser utilizada.

4.6.2 Análises Cromatográficas

Os resultados cromatográficos obtidos durante o planejamento (item 4.4), correspondem à media de duas colunas cromatográficas, sendo que para cada

coluna foram feitas duas ou três injeções da mistura teste 1 (MT1), como mostra a tabela 15 e a figura 30 A e B.

Tabela 15: Parâmetros cromatográficos obtidos com as FE preparadas em cada experimento do planejamento fatorial. Os parâmetros foram calculados para o naftaleno (MT1) e o par tolueno-naftaleno.

Experimento	Coluna 1					Coluna 2				
	t_R (min)	Rs	As	(N/m)	k	t_R (min)	Rs	As	(N/m)	k
Exp 1	42,4	4,3	0,6	44700	34,9	42,9	4,0	0,5	44700	29,9
Exp 2	37,2	2,1	1,0	49600	26,1	49,9	3,1	0,9	49250	28,0
Exp 3	37,1	3,8	1,0	40200	27,4	32,7	2,0	0,8	42800	23,2
Exp 4	42,4	3,0	0,7	46400	31,9	40,6	3,3	0,9	45800	31,2
Exp 5	28,6	2,3	0,9	50200	16,5	26,6	2,3	1,0	50000	15,4
Exp 6	35,0	3,1	0,8	53900	23,8	33,4	3,7	1,0	51300	22,7
Exp 7	33,1	3,5	0,6	53200	22,0	33,1	3,8	0,7	51000	22,7
Exp 8	34,3	3,2	1,0	48400	23,0	25,2	4,1	0,6	50800	23,6
Exp 9a	35,8	3,0	0,8	54500	24,7	36,0	4,1	0,9	55500	24,1
Exp 9b	35,1	3,1	1,3	48200	22,9	32,8	3,6	1,2	49800	23,4
Exp 9c	34,4	3,3	1,4	44400	23,7	34,9	3,0	1,4	43600	24,0

Os parâmetros cromatográficos evidenciam que as colunas recheadas com as fases estacionárias preparadas em diferentes condições de imobilização térmica, necessário para otimização destas condições, apresentaram tempos de retenção altos para o composto naftaleno (deve-se destacar que o planejamento foi realizado antes da determinação da vazão ótima). A resolução apresenta valores aquém dos ideais variando de 2,0 a 4,0, sendo que com 1,25 ocorre uma separação adequada de dois compostos adjacentes, sem nenhuma superposição dos picos simétricos. A assimetria fornece valores aceitáveis, pois a maioria dos picos apresentou valores entre 0,9 e 1,2, indicando alta simetria³⁰. As colunas apresentam bons valores de eficiência comparados com colunas recheadas com FE preparadas apenas com PMODS, a faixa de eficiência varia de 40000 a 56000 N/m. O fator de retenção (k) ideal compreende valores de 2 a 10, portanto os números apresentados estão muito altos, mas isto deve-se ao longo tempo de análise resultado da vazão (0,3 mL min⁻¹) e composição de fase móvel (50:50 metanol / água) usadas nesta otimização.

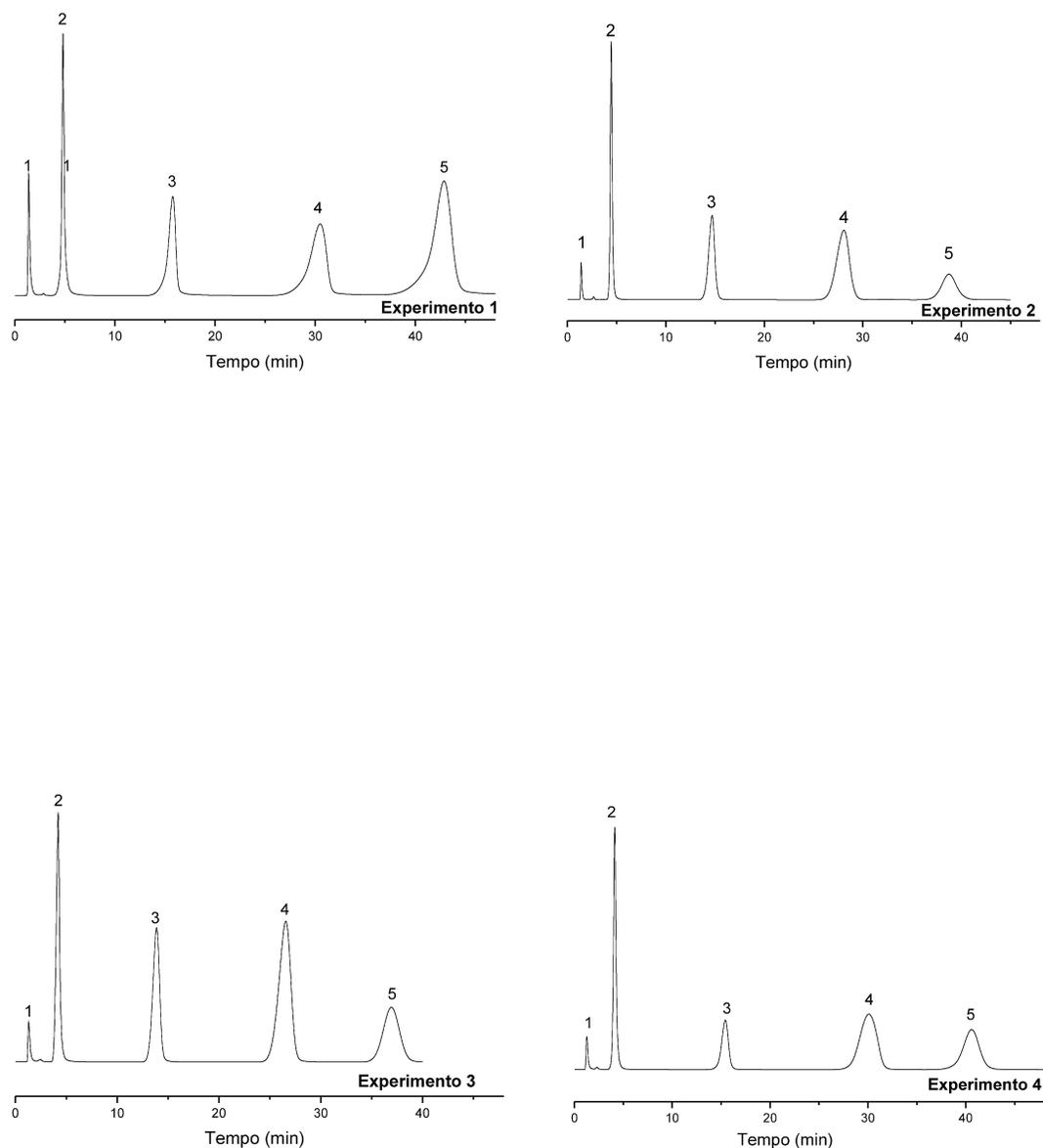


Figura 30 A: Cromatogramas da MT1 obtidos dos ensaios dos planejamentos 2² e estrela (1-4). Os cromatogramas estão identificados pelo número do ensaio do planejamento. FM MeOH/H₂O (50:50 v/v), vazão: 0,3 mL/min. MT1: (1) uracil, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

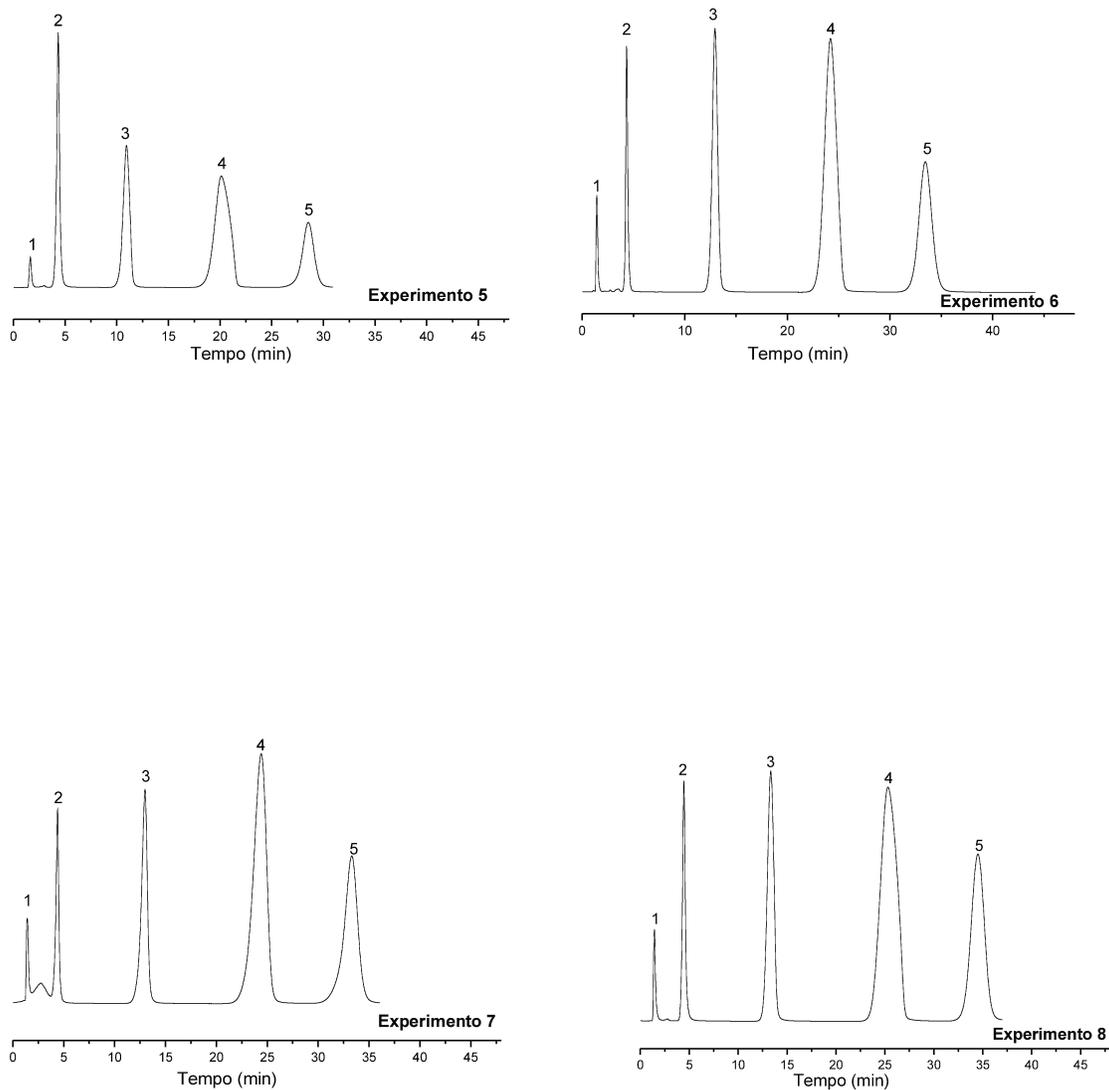


Figura 30 B: Cromatogramas da MT1 obtidos dos ensaios dos planejamentos 2² e estrela (5-8). Os cromatogramas estão identificados pelo número do ensaio do planejamento. FM MeOH/H₂O (50:50 v/v), vazão 0,3 mL/min. MT1: (1) uracil, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

Após o término do planejamento fatorial foram determinadas as condições ótimas para imobilização por tratamento térmico (8 horas e 36 minutos e 127,6 °C) e foram realizadas análises cromatográficas em uma FE preparada nestas condições utilizando a mistura teste 1 (MT1) e a mistura teste 2 (MT2). Os resultados cromatográficos e os cromatogramas estão na tabela 16 e na figura 31.

Tabela 16: Resultados cromatográficos obtidos com as FE preparadas pelas condições ótimas.

Mistura Teste	Coluna 1					Coluna 2				
	t_R (min)	Rs	As	N/m	k	t_R (min)	Rs	As	N/m	k
MT1 ^a	8,4	1,8	0,9	61800	9,4	8,3	1,8	1,0	60800	9,4
MT2 ^b	3,2	9,3	1,6	37400	3,0	3,3	9,2	1,4	37700	2,9

a Parâmetros calculados para o naftaleno e o par tolueno-naftaleno (MT1);

b Parâmetros calculados para a N,N-dimetilanilina e o par fenol-N,N-dimetilanilina (MT2).

Os parâmetros cromatográficos para análise das colunas preparadas nas melhores condições de imobilização térmica mostram que o tempo de retenção diminuiu para o composto naftaleno (MT1), principalmente devido à mudança da fase móvel. A resolução apresenta valores próximos dos ideais, sendo 1,8 para o par tolueno-naftaleno e 9,3 para o par fenol-N,N-dimetilanilina (deve-se destacar que o composto que a antecede é o fenol, composto ácido). A assimetria fornece ótimos valores, sendo 1,0 para o naftaleno e 1,4 para N,N-dimetilanilina. As colunas apresentam bons valores de eficiência, na faixa de 60000 N/m para o naftaleno e 38000 N/m para a N,N-dimetilanilina. O tempo de retenção encontra-se dentro da faixa aceitável, sendo 9,4 para o naftaleno e 3,0 para N,N-dimetilanilina.

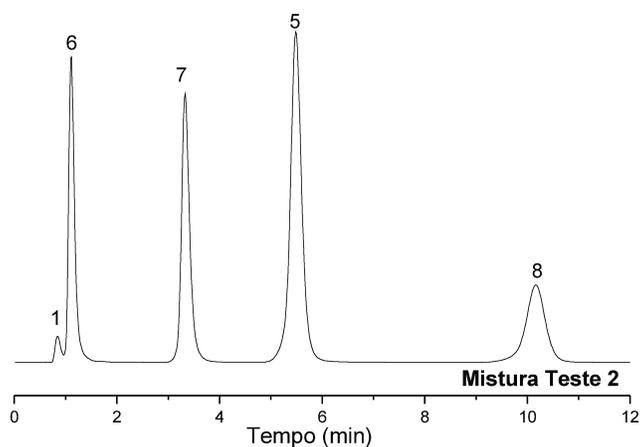
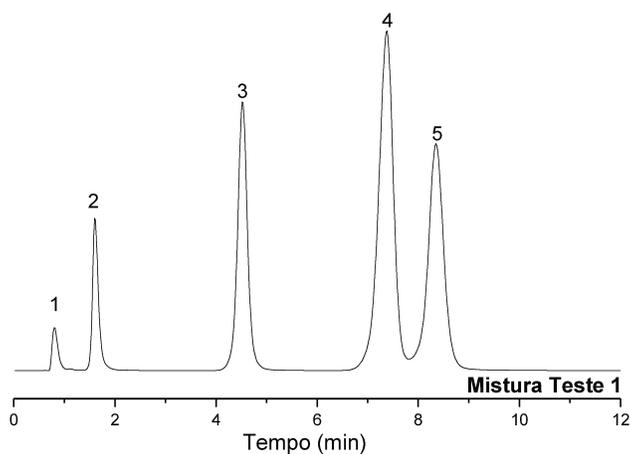


Figura 31: Cromatogramas obtidos através de análises da FE nas condições ótimas de imobilização térmica. Condições de análise: vazão $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e detector UV em 254 nm . As fases móveis e misturas testes são:

Mistura Teste 1 - FM MeOH/H₂O (60:40 v/v) (1. uracil; 2. benzonitrila; 3. benzeno; 4. tolueno; 5. naftaleno);

Mistura Teste 2 - FM MeOH/H₂O (70:30 v/v) (1. uracil; 6. fenol; 7. N,N-dimetilanilina; 5. naftaleno; 8. acenafteo)

4.7 Caracterização Cromatográfica das Fases Estacionárias

Alguns testes foram desenvolvidos por Tanaka e colaboradores⁸⁷, que propõem misturas-teste simples a serem analisadas em fases móveis adequadas, fornecendo informações sobre as propriedades e a conveniência analítica da fase estacionária.

4.7.1 Misturas-teste de Tanaka

O protocolo de caracterização desenvolvido por Tanaka e colaboradores⁸⁷ é um método bem estabelecido, o qual tem sido estudado por diversos grupos acadêmicos e muitos fabricantes para avaliar a qualidade de suas fases estacionárias. Dentre as propriedades avaliadas incluem-se: a cobertura superficial, a seletividade hidrofóbica, a seletividade espacial, a capacidade de ligação de hidrogênio e a capacidade de troca iônica em pH 2,7 e 7,6.

As FE preparadas nas melhores condições de imobilização térmica foram submetidas à caracterização através dos testes de Tanaka (MT3, MT4, MT5a e MT5b). Os resultados cromatográficos obtidos estão apresentados nas tabelas 17 e 18. Os cromatogramas estão na figura 32. Estes resultados foram comparados com bases de dados na literatura^{85,86}, onde foram expostas as propriedades de mais de 130 fases estacionárias comerciais diferentes, à base de sílica e zircônia.

Tabela 17: Parâmetros cromatográficos obtidos pela separação dos compostos da mistura teste de Tanaka nas FE ótimas usando diferentes composições de FM. Condições: vazão 0,5 mL min⁻¹, temperatura 40 °C, detector UV a 254 nm.

Composto	Coluna 1			Coluna 2		
	k	(N/m)	As	k	(N/m)	As
Benzilamina ^c	4,9	41300	1,0	4,9	43300	1,0
Benzilamina ^d	5,3	9900	1,9	5,3	11400	1,7
Cafeína ^b	2,3	10000	1,1	2,4	9400	1,1
Fenol ^b	1,9	23800	0,9	2,0	22900	0,9
Fenol ^c	1,6	28500	1,5	1,6	29000	1,5
Fenol ^d	1,8	31400	1,5	1,8	31500	1,4
o-terfenil ^a	5,4	60900	0,9	5,4	60000	0,8
trifenileno ^a	7,6	67900	1,0	7,6	67300	1,1
butilbenzeno ^a	4,0	48200	6,4	4,0	47200	6,2
pentilbenzeno ^a	4,5	51800	1,4	4,6	52400	1,4

^a MeOH/H₂O (80 : 20 v/v);

^b MeOH/H₂O (30 : 70 v/v);

^c MeOH/tampão H₃PO₄/KH₂PO₄ 20 mmol L⁻¹ (30 : 70 v/v) a pH 2,7;

^d MeOH/tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ 20 mmol L⁻¹ (30 : 70 v/v) a pH 7,6.

Tabela 18: Valores obtidos pelas FE ótimas para seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$), capacidade para formar ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/F}$), seletividade hidrofóbica ($\alpha_{B/P}$) e capacidade de troca iônica a pH 2,7 ($\alpha_{B/FapH2,7}$) e 7,6 ($\alpha_{B/FapH7,6}$).

	$\alpha_{T/O}$	$\alpha_{C/F}$	$\alpha_{B/P}$	$\alpha_{B/F}$	$\alpha_{B/F}$
			pH 2,7		pH 7,6
FE PMODS	1,2	0,6	1,2	0,1	1,0
FE ótima	1,4	1,2	1,2	3,1	2,9

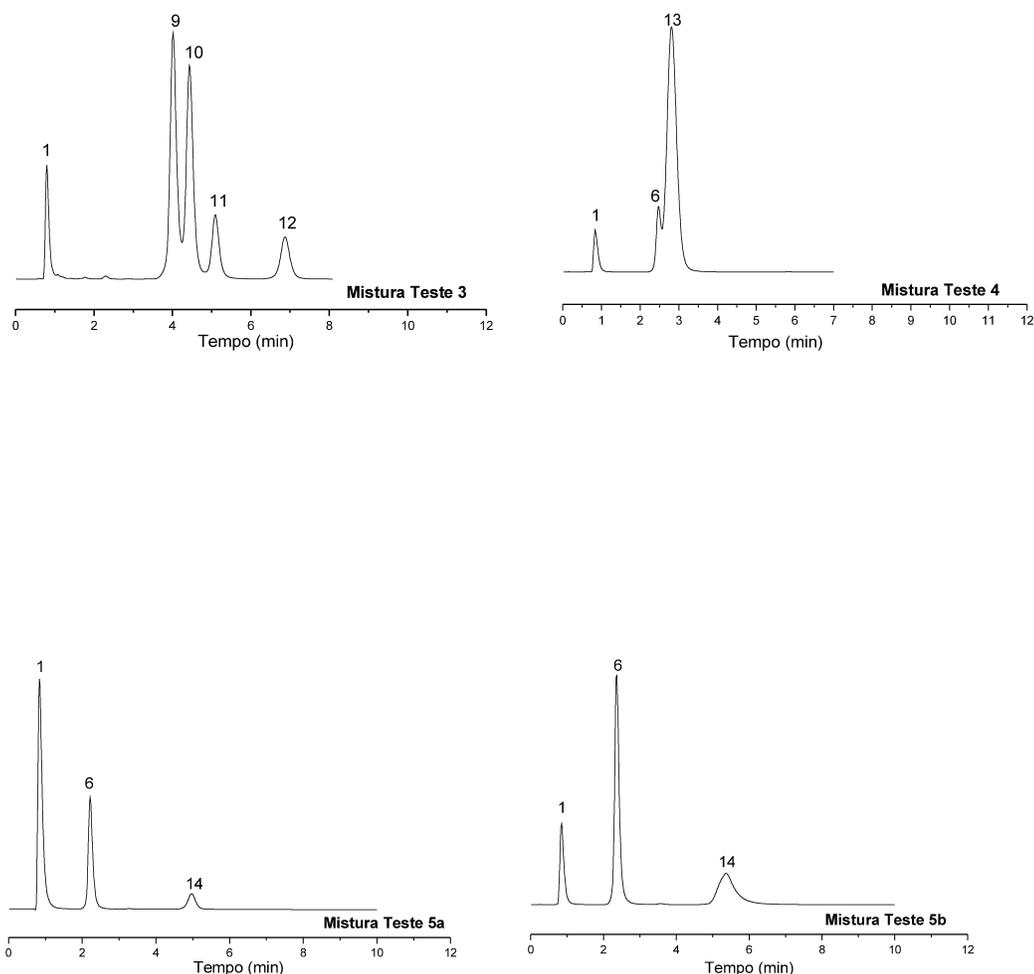


Figura 32: Cromatogramas obtidos através de análises da FE nas condições ótimas para imobilização térmica. Condições de análise: vazão $0,5 \text{ mL min}^{-1}$; temperatura $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e detector UV em 254 nm . As fases móveis e misturas testes são:

Mistura Teste de Tanaka 3 - FM MeOH/H₂O (80:20 v/v) (1. uracil; 9. butilbenzeno; 10. pentilbenzeno; 11. o-terfenil; 12. trifenileno)

Mistura Teste de Tanaka 4 - FM MeOH/H₂O (30:70 v/v) (1. uracil; 6. fenol; 13. cafeína)

Mistura Teste de Tanaka 5a - FM MeOH/H₂O (30:70 v/v) (1. uracil; 6. fenol; 14. benzilamina), em pH 7,6.

Mistura Teste de Tanaka 5b - FM MeOH/H₂O (30:70 v/v) (1. uracil; 6. fenol; 14. benzilamina), em pH 2,7.

Os resultados apresentados na tabela 17 indicam valores razoáveis para eficiência e na maioria excelentes valores de assimetria. Já na tabela 18 pode-se observar uma comparação entre a FE ótima (PMODS + PDMS nas melhores condições de imobilização térmica) e a FE 100 % PMODS. Os resultados mostram que há uma boa seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$) devido à resolução entre os picos do o-terfenil e trifenileno (Mistura 3). Os valores obtidos de seletividade hidrofóbica ($\alpha_{B/P}$) estão dentro da faixa obtida para fases estacionárias comerciais à base de C8 e C18 quimicamente ligados à superfície de sílica nua^{85,86}. A FE estudada apresenta o dobro da capacidade para formar ligação de hidrogênio, determinada pela mínima separação entre os picos da cafeína e do fenol (Mistura 4).

As misturas 5a e 5b mostram, respectivamente, a atividade silanofílica total e da acidez dos grupos silanóis residuais das fases. Estas misturas são compostas por benzilamina (básico) e fenol (ácido) analisadas em FM tamponadas com diferentes valores de pH. A atividade silanofílica total é mais alta na FE estudada. Em pH 2,7 ($\alpha_{B/F \text{ a pH } 2,7}$) é definida a atividade ácida dos grupos silanóis residuais, pois neste pH os grupos silanóis estão na forma protonada. Já em pH 7,6 ($\alpha_{B/F \text{ a pH } 7,6}$), estima-se a atividade total de silanóis residuais, pois neste pH os grupos silanóis estão na forma desprotonada, podendo interagir através do mecanismo de troca iônica com aminas protonadas.

Sendo assim, pode-se descrever esta FE como similar a uma PMODS com seletividades estérica e hidrofóbica idênticas, porém com maior capacidade em formar ligação de hidrogênio e conseqüentemente maior atividade silanofílica indicando a presença de silanóis residuais.

4.8 Teste de Estabilidade da Fase Estacionária

4.8.1 Teste de Estabilidade em Fase Móvel Alcalina

Para avaliar a estabilidade da FE em FM básica, utilizou-se uma coluna preparada com sílica Kromasil imobilizada a 127,6 °C durante 8 horas e 36 minutos com 25 % PMODS e 25 % PDMS iniciais, que forneceu bons resultados cromatográficos. O teste foi realizado passando-se através da coluna cromatográfica FM metanol / tampão 0,1 mol L⁻¹ Na₂CO₃ / NaHCO₃ a pH 8,0 (70:30 v/v), à 40 °C, numa vazão de 1,0 mL min⁻¹. As análises cromatográficas foram feitas injetando-se a MT2 a volumes determinados de FM passada, diminuindo a vazão para 0,5 mL min⁻¹. Foram então monitorados os parâmetros de eficiência, assimetria e o fator de retenção do acenafteno e assimetria da N,N - dimetilanilina. A tabela 19 e as figuras 33 e 34 mostram os resultados deste teste.

Tabela 19: Parâmetros cromatográficos: fator de retenção, assimetria e eficiência do composto acenafteno e assimetria para o composto N,N-dimetilanilina obtidos através do teste básico de estabilidade em diferentes volumes de coluna.

Vc	Acenafteno		N,N -DMA	
	k	As	N/m	As
11	1,9	0,9	42400	1,1
106	1,2	0,8	29200	1,1
211	1,1	0,9	24900	1,1
316	1,0	1,1	16300	1,2
359	1,0	1,1	15000	1,3

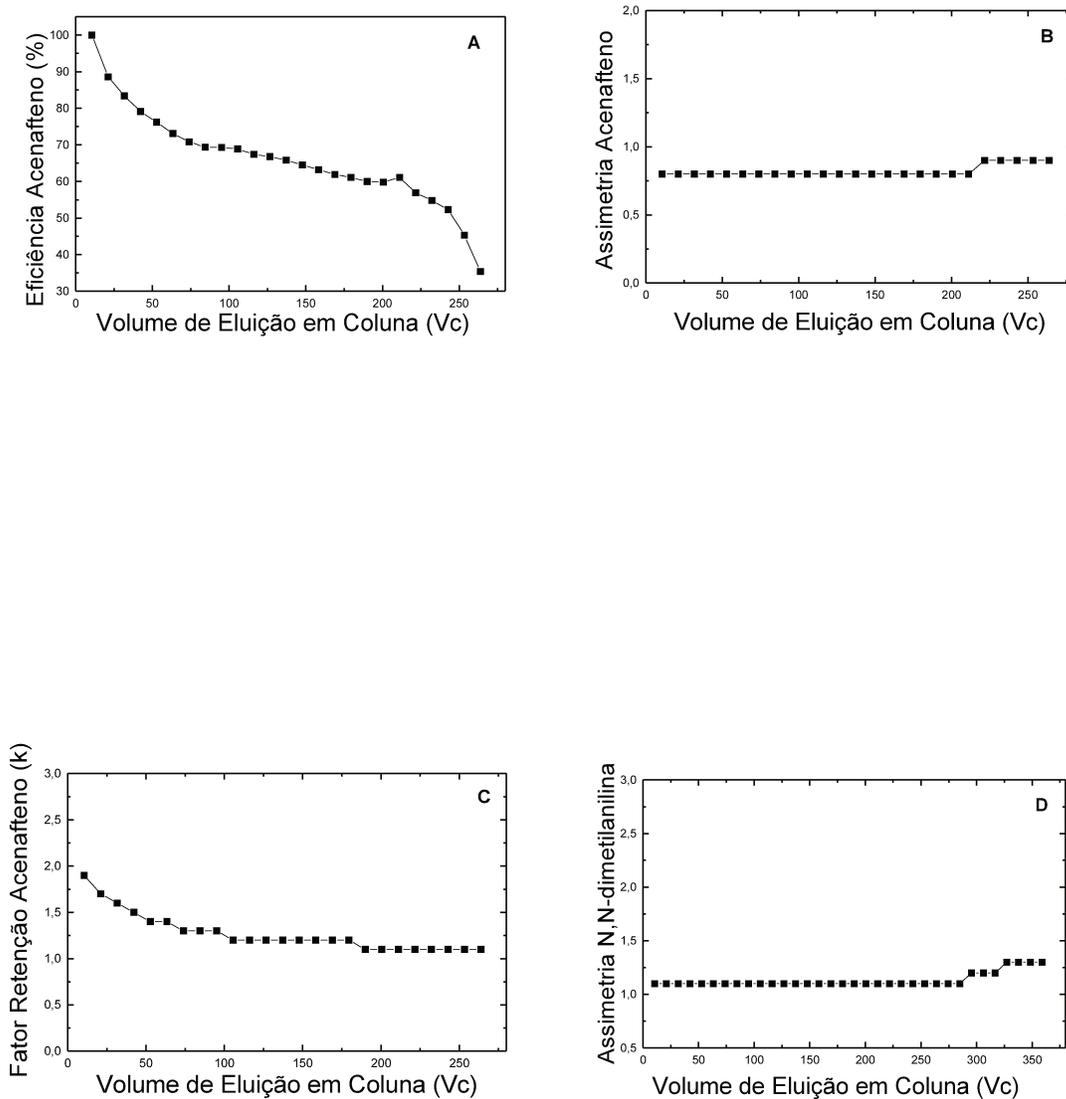


Figura 33: Avaliação da estabilidade da FE preparada nas melhores condições de imobilização térmica FM MeOH/tampão 0,1 mol L⁻¹ Na₂CO₃ / NaHCO₃ a pH 8,0 (70:30 v/v), à 40 °C, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹ em função dos parâmetros cromatográficos de eficiência (A), assimetria (B) e fator de retenção (C) para o composto acenafteño e assimetria para o composto N,N-dimetilanilina (D).

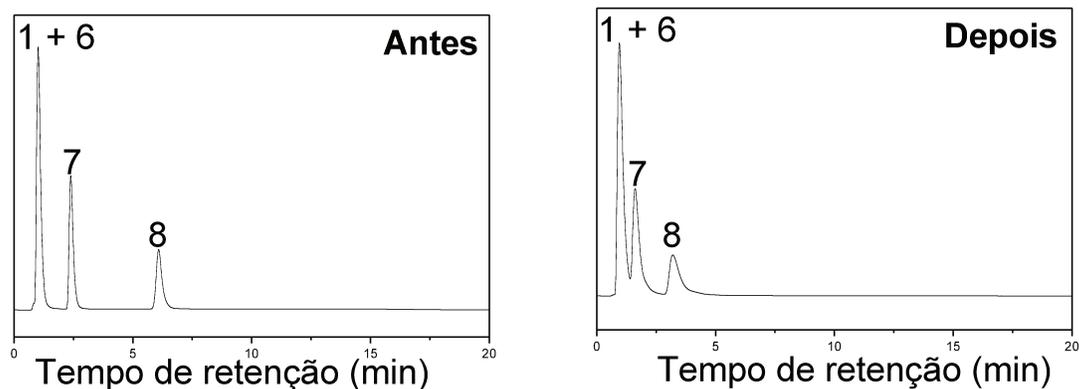


Figura 34: Cromatogramas da separação dos compostos da mistura teste 2, antes e depois do teste de estabilidade. Condições cromatográficas: MT2: (1) uracil, (6) fenol, (7) N,N-dimetilanilina, (8) Acenafteno; FM MeOH/tampão 0,1 mol L⁻¹ Na₂CO₃ / NaHCO₃ a pH 8,0 (70:30 v/v), à 40 °C, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹, detecção UV-Vis a 254 nm.

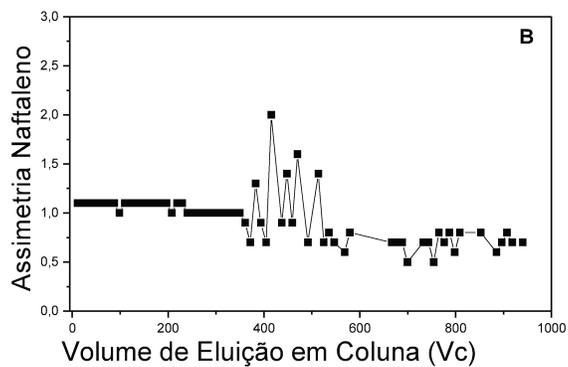
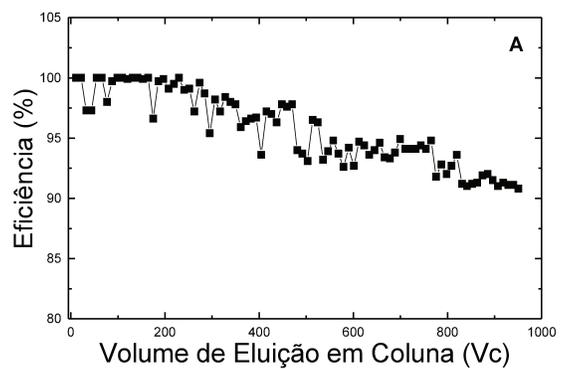
Através da tabela 19 e figura 32, pode-se observar que a coluna resistiu à passagem de 250 volumes de coluna, neste estágio a eficiência havia caído para 40% em relação a inicial, a assimetria manteve-se constante variando, levemente, após 200 volumes de coluna e o fator de retenção apresentou queda de 50% estes dados referem-se ao composto acenafteno. Já a assimetria para o composto N,N-dimetilanilina manteve-se constante até 300 volumes de coluna.

4.8.2 Teste de Estabilidade em Fase Móvel Ácida

Para avaliar a estabilidade da FE em FM ácida, utilizou-se uma coluna preparada com sílica Kromasil imobilizada a 127,6 °C durante 8 horas e 36 minutos com 25 % PMODS e 25 % PDMS iniciais, que forneceu bons resultados cromatográficos. O teste foi realizado passando-se através da coluna cromatográfica FM metanol / tampão 0,1 mol L⁻¹ KH₂PO₄ / H₃PO₄ a pH 5,0 (60:40 v/v), à 40 °C, numa vazão de 1,0 mL min⁻¹. As análises cromatográficas foram feitas injetando-se a MT1 a cada volume determinado de FM passada, diminuindo a vazão para 0,5 mL min⁻¹. Foi então monitorado os parâmetros de eficiência, assimetria e o fator de retenção do naftaleno. A tabela 20 e as figura 35 e 36 mostram os resultados deste teste.

Tabela 20: Parâmetros cromatográficos: fator de retenção, assimetria e eficiência do composto naftaleno obtidos através do teste ácido de estabilidade em diferentes volumes de coluna.

Naftaleno			
Vc	k	As	N/m
11	5,1	1,1	59000
208	4,7	1,0	58500
404	4,5	1,3	57000
579	4,4	0,8	54700
940	4,3	0,7	53800



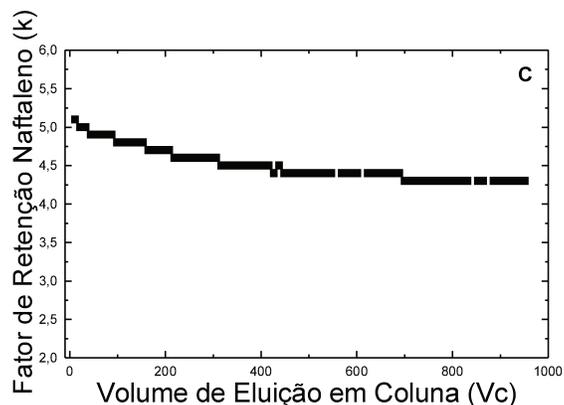


Figura 35: Avaliação da estabilidade da FE preparada nas melhores condições de imobilização térmica FM MeOH/tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$ a pH 5,0 (60:40 v/v), à $40 \text{ }^\circ\text{C}$, numa vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ em função dos parâmetros cromatográficos de eficiência (A), assimetria (B) e fator de retenção (C) para o composto naftaleno.

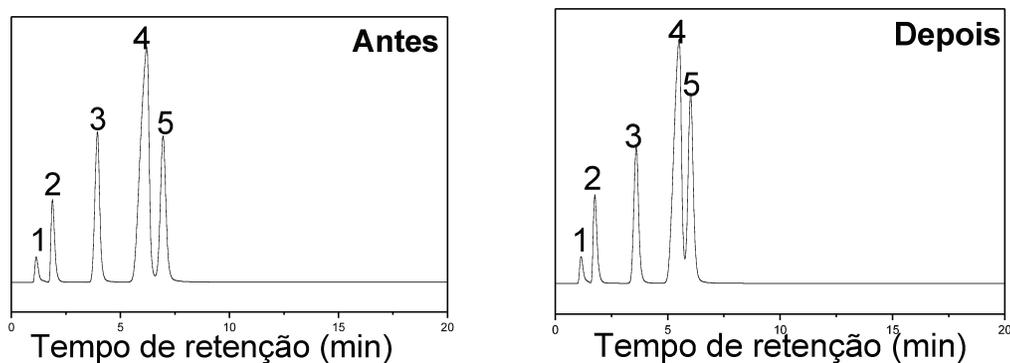


Figura 36: Cromatogramas da separação dos compostos da mistura teste 1, antes e depois do teste de estabilidade. Condições cromatográficas: MT1: (1) uracil, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno; FM MeOH/tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$ a pH 5,0 (60:40 v/v), à $40 \text{ }^\circ\text{C}$, numa vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, detecção UV-Vis a 254 nm.

Através da tabela 20 e figura 34, pode-se observar que a coluna resistiu à passagem de 950 volumes de coluna, neste estágio a eficiência havia caído apenas 10% em relação a inicial, a assimetria manteve-se constante até 400 volumes de coluna, onde começaram a ocorrer variações bruscas e o fator de

retenção apresentou queda de 16% ambos os dados referem-se ao composto naftaleno

Os resultados observados nos teste de estabilidade levantam a hipótese do fator de retenção, com sua queda significativa, estar ligado à perda de um dos polímeros sem afetar a cobertura do suporte, tendo em vista que a assimetria dos compostos manteve-se constante durante todo o teste. Isto foi comprovado através das análises elementares e termogravimétricas para as FE submetidas aos testes onde é visível que houve redução na camada polimérica das FE como mostra os valores obtidos de % PMODS, τ e % perda de massa na tabela 21.

Tabela 21: Resultados das análises de %C e ATG das FE submetidas aos testes de estabilidade básico e ácido.

Amostras	%C	m_{iPMDS}	\bar{m}_{iPMODS}	$\bar{m}_{PMODS \text{ retido}}$	% PMODS retido	τ nm	% perda massa (TGA)
		(g _{PMDS} /g _{silica})	(g _{PMODS} /g _{silica})	(g _{PMODS} /g _{silica})			
FE inicial	14.0	0.5	0.5	0.24	24.0	0.97	24.2
FE teste básico	12.3	0.5	0.5	0.20	20.0	0.79	25.0
FE teste ácido	13.6	0.5	0.5	0.23	23.0	0.92	24.2

5.0 Conclusões

O melhor método para extração da fase estacionária proposta é o convencional, ou seja, usando uma bomba de extração, durante 3 horas, numa temperatura de 50 °C, usando solvente hexano. Os resultados de análise elementar e termogravimetria mostraram maior eficiência neste método de extração comparado ao método de extração e enchimento simultâneos.

O estudo para a otimização da quantidade de polímeros determinou o uso de 25 % PMODS e 25 % PDMS como as melhores cargas para o preparo das fases utilizadas neste trabalho, pois os resultados cromatográficos obtidos com estas fases foram os mais próximos às fases com PMODS.

Os planejamentos fatorial 2² e estrela foram importantes para indicar as melhores condições de tempo e temperatura no processo de imobilização térmica, sendo estes, 8 horas e 36 minutos e 127,6 °C.

As fases submetidas aos experimentos dos planejamentos foram caracterizadas através das seguintes análises:

- ✓ *Análise elementar e termogravimétrica*: os resultados mostram a formação de uma monocamada polimérica sobre o suporte de sílica;
- ✓ *Área superficial, volume e diâmetro de poro*: através destas análises observa-se a diminuição destas propriedades em relação ao suporte, mostrando que os polímeros, realmente, estão ocupando espaços da sílica.
- ✓ *Infravermelho e ressonância magnética nuclear de ²⁹Si*: estas análises foram importantes para determinar qualitativamente a presença dos polímeros (PMODS e PDMS) e grupos característicos da sílica (silanóis) nas FE preparadas.

Os parâmetros cromatográficos para análise das colunas preparadas nas melhores condições demonstram que a assimetria fornece ótimos valores, sendo 1,0 para o naftaleno e 1,4 para N,N-dimetilanilina e valores de eficiência na faixa de 60000 N/m para o naftaleno e 38000 N/m para a N,N-dimetilanilina.

A caracterização através do teste de Tanaka definiu a FE proposta como similar a uma PMODS com seletividades estérica e hidrofóbica idênticas, porém com maior capacidade em formar ligação de hidrogênio e conseqüentemente maior atividade silanofílica, indicando que a cobertura polimérica poderia ser mais efetiva.

Os testes de estabilidade mostraram a resistência desta FE em condições básicas e ácidas. Os volumes de coluna obtidas foram bons, as assimetrias para os compostos analisados mantiveram-se constantes durante a maior parte dos testes, mas a eficiência mostrou queda significativa no teste básico, sendo esta com mínima variação no teste ácido. Quanto ao fator de retenção deve-se destacar o decréscimo significativo, em ambos os testes, devido à perda polimérica, comprovada pelo resultados de CHN e TGA.

A fase estacionária obtida através da sorção e imobilização térmica da mistura de polímeros PMODS e PDMS apresenta grande potencial analítico, tendo em vista os resultados cromatográficos obtidos com bons valores de eficiência e ótima simetria dos compostos analisados, especialmente para a N,N-dimetilanilina. Porém esta FE poderia apresentar melhores resultados através de uma cobertura polimérica mais efetiva, como mostra sua caracterização. Sendo assim, futuros trabalhos poderiam desenvolver novas fases utilizando a sorção e imobilização e propiciando a auto-imobilização, ou talvez, a imobilização por irradiação da mistura polimérica proposta (PMODS e PDMS) sobre um suporte metalizado (sílica com uma camada de Al, Ti ou Zr) a fim de gerar colunas com maior potencial cromatográfico e maior estabilidade a condições básicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. "Fundamentos de Cromatografia" 1ª. Edição, *Editora da Unicamp*, Campinas, 2006.
2. Berthod, A. "Silica Backbone Material of Liquid Chromatographic Column Packings", *J. Chromatogr.*, **549** (1991) 1.
3. Zhuravlev, L.T. "The Surface Chemistry of Amorphous Silica. Zhuravlev Model", *Colloid Surface A*, **173** (2000) 1-38.
4. Stella, C.; Rudaz, S.; Veuthey, J.L.; Tchaplá, A. "Silica and Other Materials as Supports in Liquid Chromatography. Chromatography tests and their Importance for Evaluating these Supports. Part I" *Chromatographia*, **53** (2001) S113-S131.
5. Nawrocki, J. "The Silanol Group and its Role in Liquid Chromatography" *J.Chromatogr. A.*, **779** (1997) 29-71.
6. Unger, K.K. "Porous Silica, its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography ", 3ª. impressão, *Elsevier*, New York, 1986.
7. Nahum, A., Horváth, C. "Surface Silanols in Silica Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases I – Dual Retention Mechanism in Reversed-Phase Chromatography", *J. Chromatogr.*, **203** (1981) 53.
8. Melander, W.; Stoveken, J.; Horváth, C."Stationary Phase Effects in Reversed-Phase Chromatography I – Comparasion of Energetics of Retention on Alkyl-Silica Bonded Phases", *J. Chromatogr.*, **199** (1980) 35.
9. By, K.E.; Horváth, C.; Melander, W.R.; Nahum, A. "Surface Silanols in Silica Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phase II – Irregular Retention Behavior and Effect of Silanol Masking", *J. Chromatogr.*, **203** (1981) 65.
10. Rigney, M.P.; Funkenbusch, E.F.; Carr, P.W. "Physical and Chemical Characterization of Microporous Zirconia", *J. Chromatogr.*, **499** (1990) 291.
11. Poole, C.F., Poole, S.K. "Chromatography Today", *Elsevier*, Amsterdam, 1991.
12. Nawrocki, J.; Dabrowska, A. "Nonpolar Stationary Phases for HPLC – Recent Achievements" *Chem. Anal. (Warsaw)*, **46** (2001) 781-811.
13. Fóti, G.; Martinez, C.; Kováts, E. sz. "Role of Unreacted Silanols in the Adsorption Properties of Derivatized Silica", *J. Chromatogr.*, **461** (1989) 243-258.

14. Khurana, A. .; Ho, C.T. "Determination of Surface Silanols of Silica-gels and HPLC Bonded phases" *J. Liq. Chromatogr. A*, **556** (1991) 395-406.
15. Unger, K. .; Lork, K.D.; Pfeleiderer, B.; Albert, K.; Bayer, E. "Impact of Acidic/hydrothermal Treatment on Pore Structure and Chromatographic Properties of Porous Silicas: I. The Conventional Approach" *J. Cromatogr. A*, **556** (1991) 395-406.
16. Nawrocki, J. "Silica Surface Controversies, Strong Adsorption Sites, Their Blockage and Removal. Part II", *Chromatographia*, **31** (1991) 193-205.
17. Nawrocki, J.; Dunlap, C.; McCormick, A.; Carr, P.W. "Part I. Chromatography Using Ultra-stable Metal Oxide-based Stationary Phases for HPLC" *J. Chromatogr. A*, **1028** (2004) 1-30.
18. Verzele, M. "Trace Metals in Silica Gel based HPLC Packing Materials", *G. C.*, **1** (1991) 217.
19. Hetem, M.J.J. "A Fundamental Study of Chemically Modified Silica Surfaces in Chromatography", Tese de Doutorado, Eindhoven University of Technology, 1990.
20. Trudinge, U.; Muller, G.; Unger K.K. "Porous Zirconia and Titania as Packing Materials for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **535** (1990) 111.
21. Smith, R.M. "Selectivity Comparisons of Polystyrene-divinylbenzene Columns", *J. Chromatogr.*, **291** (1984) 372-376.
22. Yu, J.; El Rassi, Z. "Reversed-Phase Liquid Chromatography with Microspherical Octadecyl-Zirconia Bonded Stationary Phases", *J. Chromatogr.*, **631** (1993) 91.
23. Dawkins, J.V.; Lloyd, L.L.; Warner, F.P. "Chromatographic Characteristics of Polymer-based High-Performance Liquid Chromatography Packings", *J. Chromatogr.*, **352** (1986) 157-167.
24. Rigney, M.P.; Weber, T.P.; Carr, P.W. "Preparation and Evaluation of a Polymer-Coated Zirconia Reversed-Phase Chromatographic Support", *J. Chromatogr.*, **484** (1989) 273.
25. Weber, T.P.; Carr, P.W.; Funkenbusch, E.F. "Evaluation of a Zirconia-Based Carbon-Polymer Composite Reversed-Phase Chromatographic Support", *J. Chromatogr.*, **519** (1990) 31.

26. Yu, J.; El Rassi, Z. "Reversed-Phase Liquid Chromatography of Dansyl Aminoacids with Microspherical Octadecyl-Silica and Octadecyl-Zirconia Bonded Stationary Phases", *J. Liq. Chromatogr.*, **16** (1993) 2931.
27. Schafer, W.A.; Carr, P.W.; Funkenbusch, E.F.; Parson, K.A. "Physical and Chemical Characterization of a Porous Phosphate-Modified Zirconia Substrate", *J. Chromatogr.*, **587** (1991) 137.
28. Kawahara, M.; Nakamura, H.; Nakajima, T. "Titânia and Zirconia: Possible New Ceramic Microparticulates for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **515** (1990) 149.
29. Elestad, O.H.; Blindheim, V. "Reaction of Titanium Tetrachloride with Sílica Gel Surfaces", *J. Mol. Catal.*, **33** (1985) 275.
30. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L. "Practical HPLC Method Development", 2a. ed., *Wiley*, New York, 1997.
31. Kirkland, J.J. "Development of Some Stationary Phases for Reversed-Phase HPLC", *J. Chromatogr. A*, **1060** (2004) 9-21.
32. Sander, L.C.; Wise, S.A. "Recent Advances in Bonded Phases for Liquid Chromatography" *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **18** (1987) 299-413.
33. Haky, J.E.; Dunn, A.R.B.M. "Comparision of Polybutadiene-coated Alumina and Octadecyl-bonded Silica for Separations of Proteins and Peptides by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **541** (1991) 303-315.
34. Unger, K.K., Becker, N., Roumellotis, P. "Recent Developments in the Evaluation of Chemically Bonded Silica Packings for Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **125** (1976) 115-127.
35. Meyer, V.R. "Practical High-performance Liquid Chromatography", 3^a. ed., *Wiley*, New York, 1999.
36. Heinemann, G.; Kohler, J.; Schomburg, G. "New Polymer Coated Anion-exchange HPLC-Phases – Immobilization of Poly(2-hydroxy,3N-ethylenediamino)butadiene on Silica and Alumina", *Chromatographia*, **23** (1987) 435-441.
37. Wirth, M.J.; Fatunmbi, H.O. "Horizontal Polymerization of Mixed Trifunctional Silanes on Silica. 2. Application to Chromatographic Silica Gel", *Anal. Chem.*, **64** (1992) 2783-2786.

38. Wirth, M.J.; Fatunmbi, H.O. "Horizontal Polymerization of Mixed Trifunctional Silanes on Silica: a Potential Chromatographic Stationary Phase", *Anal. Chem.*, **65** (1993) 822-826.
39. Fairbank, R.W.P., Wirth, M.J. "Role of Surface-adsorbed Water in the Horizontal Polymerization of Trichlorosilanes", *J. Chromatogr. A*, **830** (1999) 285-291.
40. Li, L.; Carr, P.W.; Evans, J.F. "Studies of Retention and Stability of a Horizontally Polymerized Bonded Phase for Reversed-Phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **868** (2000) 153-167.
41. Kirkland, J.J.; Glajch, J.L.; Farlee, R.D. "Synthesis and Characterization of Highly Stable Bonded Phases for High-Performance Liquid Chromatography Column Packings", *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2-11.
42. Glajch, J.L.; Kirkland, J.J. "Stable, Sterically Protected, Monofunctional-Silane Bonded-phase Column for High-Performance Liquid-Chromatography", *LC-CG N. Am.*, **8** (1990) 140-150.
43. Kirkland, J.J.; Dilks, C.H.; Henderson, J.W. "Technologies for an Improved C18 Stationary Phase in Reversed-Phase HPLC Separations", *LC-CG N. Am.*, **11** (1993) 290-297.
44. Akapo, S.O.; Matyska, M.T.; Pesek, J.J. "Retention characteristics and Selected Applications of Cyclic Siloxane-based Octadecylsilyl Bonded Phases in Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **773** (1998) 53-63.
45. O'Gara, J.E.; Alden, B.A.; Walter, T.H.; Petersen, J.S.; Niederlander, C.L.; Neue, U.D. "Simple Preparation of a C8 HPLC Stationary Phase with an Internal Polar Functional Group", *Anal. Chem.*, **67** (1995) 3809-3813.
46. O'Gara, J.E.; Walsh, D.P.; Alden, B.A.; Casellini, P.; Walter, T.H. "Systematic Study of Chromatography Behavior vs Alkyl Chain Length for HPLC Bonded Phases Containing an Embedded Carbamate Group", *Anal. Chem.*, **71** (1999) 2992-2997.
47. Layne, G. "Characterization and Comparison of the Chromatographic Performance of Conventional, Polar Embedded and Polar Endcapped Reversed-Phase Liquid Chromatographic Stationary Phases", *J. Chromatogr. A.*, **957** (2002) 149-164.
48. Silva, C.R.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F.; Airoidi, C. "Chromatographic and Column Stability at pH 7 of a C18 Dimethylurea Polar Stationary Phase", *J. Chromatogr. A.*, **1030** (2004) 157-166.

49. Kirkland, J.J.; van Straten, M.A.; Claessens, H.A. "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Basic Compounds at pH 11 with Silica-based Column Packings", *J. Chromatogr. A.*, **797** (1998) 111-120.
50. Kirkland, J.J.; Martosella, J.D.; Henderson, J.W.; Dilks Jr., C. H.; Adams Jr., J. B. "HPLC of Basic Compounds at High pH with a Silica-based Bidentate-C18 Bonded-phase Column", *Am. Lab.*, **31**, nº 22 (1999) 22-27.
51. Cheng, Y.F.; Walter, T.H.; Lu, Z.; Iraneta, P.; Alden, B.A.; Gendreau, C.; Neue, U.D.; Grassi, J.M.; Carmady, J.L.; O'Gara, J.R.; Fisk, R.P. "Hybrid Organic-inorganic Particle Technology: Breaking Through Tradicional Barriers of HPLC Separations", *LC-GC N. Am.*, **18** (2000) 1162-1172.
52. Medenica, M.; Jancic, C.; Ivanovic, D.; Malenovic, A. "Experimental Design in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Analysis of Imatinib Mesylate and its Impurity", *J. Chromatogr. A.*, **1031** (2004) 243-248.
53. Kirkland, J.J.; van Straten, M.A.; Claessens, H.A. "High pH Mobile Phase Effects on Silica-based Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Columns", *J. Chromatogr. A.*, **691** (1995) 3-19.
54. Nawrocki, J.W.; Szczepaniak, D.L. "Trace Metal Impurities in Silica as a Cause of Strongly Interacting Silanols", *Chromatographia*, **28** (1989) 143-147.
55. Schomburg, G.; Deege, A.; Kohler, J.; Bien-Vogelsang, U. "Immobilization of Stationary Liquids in Reversed and Normal Phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **282** (1983) 27.
56. Schomburg, G.; Kohler, J.; Figge, H.; Deege, A.; Bien-Vogelsang, U. "Immobilization of Stationary Liquids on Silica Particles by γ -Radiation", *Chromatographia.*, **18**(1984) 265.
57. Bien-Vogelsang, U.; Deege, A.; Figge, H.; Kohler, J.; "Synthesis of Stationary Phase for Reversed-Phase LC Using Silanization and Polymer Coating", *Chromatographia*, **19** (1984) 170.
58. Anazawa, T.A.; Jardim, I.C.S.F. "Polymethyloctylsiloxane Adsorbed on Porous Silica as a Packing Material for Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography" *J. Liq. Chromatogr.*, **17** (1994) 1265.
59. Anazawa, T.A.; Carraro, F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F. "Stability of High Performance Liquid Chromatography Columns Packed with C-1 and C-8

- Polysiloxanes Sorbed into Porous Sílica Particles” *J. Chromatogr. A.*, **697** (1995) 159.
60. Anazawa, T.A. “Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionárias Reversas, Tipo C-8, para CLAE”, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1996.
61. Anazawa, T.A.; Jardim, I.C.S.F. “The Chromatographic Behavior of Coated Stationary Phases with Different Silicas”, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **21** (1998) 645.
62. Silva, R.B. “Preparação de Fases Estacionárias para CLAE a Partir de Poli(methiloctilsiloxano) sobre Sílica Titanizada”, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2001.
63. Bottoli, C.B.G. “Sorção, Imobilização e Extração de Polissiloxanos em Sílicas Porosas para Uso em CLAE”, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2002.
64. Bottoli, C.B.G.; Collins, K.E.; Collins, C.H. “Chromatographic Evaluation of Self-immobilized Stationary Phases for Reversed-phase Liquid Chromatography”, *J. Chromatogr. A*, **987** (2003) 87.
65. Faria, A.M. “Desenvolvimento de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa a partir da Adsorção e Imobilização do Poli(metiltetradecilsiloxano) sobre Sílica Metalizada”, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2006.
66. Melo, L.F.C. “Desenvolvimento de Fases Estacionárias C-8 Sorvidas e Imobilizadas para CLAE a Partir de Sílica Zirconizada”, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1998.
67. Ogaya, C.L. “Fases Estacionárias para CLAE de Poli(metiloctilsiloxano) Sorvido e Imobilizado por Tratamento Térmico sobre Sílicas de Diferentes Purezas e com Diferentes Pré-tratamentos”, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.
68. Vigna, C.M. “Tratamento Térmico na Imobilização de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência”, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.
69. Kohler, J. “Poly(vinylpyrrolidone)-coated Silica – a Versatile, Polar Stationary Phase for HPLC”, *J. Chromatographia*, **21** (1986) 573-582.

70. Kurganov, A.; Puchkova, Y.; Davankov, V.; Eisenbeiss, F. "Polyvinylpyrrolidone-coated Sílica Packings for Chromatography of Proteins and Peptides", *J. Chromatogr. A*, **663** (1994) 163-174.
71. Mao, Y.; Fung, B.M. "Use of Alumina with Anchored Polymer Coating as Packing Material for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **918** (2001) 233-266.
72. Ohmacht, R.; Kele, M.; Matus, Z. "Polymer Coated Stationary Phases for Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **28** (1989) 19-23.
73. Collins, K.E.; Sá, A.L.A.; Bottoli, C.B.G. "Poly(alkylmethylsiloxanes) Thermally Immobilized on Silica as Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **53** (2001) 661.
74. Bottoli, C.B.G., Chaudhry, Z.F.; Fonseca, D.A.; Collins, K.E.; Collins, C.H. "Poly(alkylmethylsiloxane) Thermally Immobilized on Silica as Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. A*, **948** (2002) 121.
75. Bottoli, C.B.G.; Vigna, C.R.M.; Fischer, G.; Albert, K.; Collins, K.E.; Collins, C.H. "Self-immobilization and/or Thermal Treatment for Preparing Silica-Poly(methyloctylsiloxane) Stationary Phases", *J. Chromatogr. A*, **1030** (2004) 217.
76. Tonhi, E.; Collins, K.E.; Collins, C.H. "High-performance Liquid Chromatographic Stationary Phases Based on Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized on Silica: II. Chromatographic Evaluation", *J. Chromatogr. A*, **948** (2002) 109-119.
77. Collins, K.E.; Granja, M.L.M.M.; Pereira Filho, R.G.; Anazawa, T.A.; Jardim, I.C.S.F. "The Spatial Distribution of Poly(methyloctylsiloxane) Deposited by Solvent Evaporation in the Pores of HPLC Silica Particles", *Chromatographia*, **45** (1997) 99-103.
78. Poole, C.F.; Schuette, S.A. "Contemporary Practice of Chromatography", *Elsevier*, New York, 1984.
79. Braintwaite, A.; Smith, F.J. "Chromatographic Methods", 4ª. edição, *Chapman and Hall*, London, 1985.
80. Cabrera, K.; Arras, R.; Lubda, D.; Krebs, K.F.; Wieland, G.F. "Preparation and Chromatographic Characterization of a New Stationary Phase for Reversed-Phase HPLC Based on High-Purity Silica", *Am. Lab.*, **29**, n° 4 (1997) 44.

81. Claessens, H.A. "Trends and Progress in the Characterization of Stationary Phases for Reversed-phase Liquid Chromatography", *Trends Anal. Chem.*, **20** (2001) 563-583.
82. Doyle, C.A.; Vickers, T.J.; Mann, C.K.; Dorsey, J.G. "Characterization of Liquid Chromatographic Stationary Phases by Raman Spectroscopy. Effect of Ligand Type", *J. Chromatogr. A*, **779** (1997) 91-112.
83. Lumley, B.; Khong, T.M.; Perret, D. "The Characterization of Chemically Bonded Chromatographic Stationary Phases by Thermogravimetry", *Chromatographia*, **60** (2004) 59-62.
84. Krupczynska, K.; Buszewski, B.; Jandera, P. "Characterizing HPLC Stationary Phases", *Anal. Chem.*, **14** (2004) 226A-234A.
85. Cruz, E.; Eureby, M.R.; Johnson, C.M.; Hackett, C.A. "Chromatographic Classification of Commercially Available Reversed-phase HPLC columns", *Chromatographia*, **44** (1997) 151-161.
86. Eureby, M.R.; Petersson, P. "Chromatographic Classification and Comparison of Commercially Available Reversed-phase Liquid Chromatographic Columns Using Principal Component Analysis", *J. Chromatogr. A*, **994** (2003) 13-36.
87. Kimata, K.; Iwaguchi, K.; Onishi, S.; Jinno, K.; Eksteen, R.; Hosoya, K.; Araki, M.; Tanaka, N. "Chromatographic Characterization of Silica-C-18 Packing Materials – Correlation Between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase", *J. Chromatogr. Sci.*, **27** (1989) 721-728.
88. Engelhardt, H.; Jungheim, M. "Comparison and Characterization of Reversed Phases", *Chromatographia*, **29** (1990) 59-68.
89. Neue, U.D.; Serowik, E.; Iraneta, P.; Alden, B.A.; Walter, T.H. "Universal Procedure for the Assessment of the Reproducibility and the Classification of Silica-based Reversed-phase Packings: I. Assessment of the Reproducibility of Reversed-phase Packings", *J. Chromatogr. A*, **849** (1999) 87-100.
90. Neue, U.D.; Alden, B.A.; Walter, T.H. "Universal Procedure for the Assessment of the Reproducibility and the Classification of Silica-based Reversed-phase Packings: II. Classification of Reversed-phase Packings", *J. Chromatogr. A*, **849** (1999) 101-116.

91. Vieira, S.; Hoffmann, R. “ Estatística Experimental”, *Editora Atlas*, São Paulo, 1989.
92. Neto, B.B.; Scarmino, I.S.; Bruns, R.E. “Como Fazer Experimentos”, *Editora Unicamp*, Campinas, 2001.
93. Collins, K.E.; Franchon, Jardim, I.C.S.F.; Radovanovic, E.; Gonçalves, M.C. “The Effects of Inner Surface Roughness of Microbore Column Blanks on Column Performance, *LC-GC*, **18** (2000) 106.
94. Verzele, M.; Dewaele, C. “Stationary Phase Characterization in High-Performance Liquid Chromatography”, *J. Chromatogr.*, **217** (1981) 399.
95. Vansant, E.F.; Van der Voort, P.; Vrancken, K.C. “Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface”, *Elsevier*, Amsterdam, 1995.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver”*

Martin Luther King