

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

*“PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE DIFERENTES
FASES ESTACIONÁRIAS REVERSAS, TIPO C8, PARA CLAE”*

TANIA AKIKO ANAZAWA

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADORA: PROF^A DR^A ISABEL CRISTINA SALES FONTES JARDIM

CAMPINAS

1996



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

Anazawa, Tania Akiko
An18p Preparação, caracterização e avaliação de diferentes fa-
ses estacionárias reversas, tipo C8, para CLAE. / Tania Aki-
ko Anazawa. -- Campinas, [SP : s.n.], 1996.

Orientadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química,

1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). 2.
2. Preparação de fases estacionárias reversas. 3. Fases
estacionárias sorvidas e imobilizadas. I. Jardim, Isabel
Cristina Sales Fontes. II. Universidade Estadual de Campi-
nas. Instituto de Química. III. Título.

UNIDADE	BC
CATEGORIA:	
T/UNICAMP	
An18p	
27887	
667/96	
0 X	
R\$ 11,00	
03/07/96	
CPD	

CM-00089548-0

À minha família, por todo amor, apoio e compreensão.

Dedico esta tese.

Agradecimento especial

À Prof^ª Dr^ª Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, com quem tive o privilégio de conviver cotidianamente, pela excelente orientação, pela liberdade concedida no desenvolver do projeto de tese, intervindo nos momentos adequados com segurança e senso crítico apurado e por sua inquebrantável determinação e esforço em proporcionar o melhor de si em prol da formação e aprimoramento de seus alunos no campo da cromatografia. Fica expresso o meu mais profundo agradecimento e admiração por sua competência, disponibilidade, paciência e, principalmente, pela amizade.

Agradecimentos

- Aos Profs. Drs. Kenneth e Carol Collins, portadores de um conhecimento e uma capacidade de ensinar, pela valiosa colaboração, discussões e convivência alegre.
- Ao Prof. José Salvador Barone pelas análises de absorção atômica, esclarecimento das dúvidas e pela amizade.
- À Prof^a Dr^a Anita Marsaioli pela ajuda na interpretação dos espectros de RMN.
- Às amigas Helena e Maria Amélia pela amizade e convivência.
- Ao Joãozinho pelo auxílio prestado no laboratório e pela amizade.
- Ao Walter (Waltinho) pela amizade, confecção de peças para colunas e bomba de enchimento, sem a qual este trabalho não seria realizado.
- Aos amigos e colegas do laboratório Pezzin, Anderson, Chico, Emerson, Rose, Kátia, Marcelo², Zuin, Rodrigo, Lúcio, Gláucia, Adriana, Daniela, Leticia, Maurício, Adrien, Dênisson e Romeu pela convivência alegre.
- À Sônia pela amizade e análise de GPC.
- À Raquel e Daniela pela amizade sincera.
- Ao Prof. Antonio Alonso, do Instituto de Física, UNICAMP, pela análise de espectroscopia paramagnética eletrônica.
- Ao Prof. Arana Varela, UNESP, pelas medidas de volume específico dos poros.
- Ao Iveraldo pela execução dos desenhos e por sua simpatia.
- À D. Iara e Paula pelo atendimento sempre atencioso dos serviços de xerox.
- À IBRAS-CBO pela irradiação das fases estacionárias utilizadas neste trabalho.
- À Neura pelas amostras de colesterol.
- Aos professores e funcionários do Instituto de Química da UNICAMP que, direta ou indiretamente ajudaram no decorrer deste trabalho.
- À CAPES pelo apoio financeiro.
- Ao Instituto de Química pela oportunidade concedida.
- À todas as pessoas que, de alguma maneira, contribuíram para que este trabalho se realizasse.

Obrigada!

	página
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
Capítulo I - INTRODUÇÃO.....	1
I.1. Considerações gerais sobre Cromatografia Líquida de Alta Eficiência...	2
I.2. Definições de alguns termos cromatográficos.....	3
I.3. Fases estacionárias empregadas na CLAE.....	3
I.4. Fase estacionária do tipo reversa.....	5
I.4.1. Suporte cromatográfico.....	5
I.4.2. Fase estacionária líquida.....	8
I.5. Fases estacionárias quimicamente ligadas.....	10
I.6. Influência de grupos silanóis residuais.....	10
I.7. Fases estacionárias sorvidas e imobilizadas.....	12
I.8. Distribuição do polímero sobre a sílica.....	12
I.9. Tendências atuais em utilização de colunas para CLAE.....	15
I.10. Colunas C8: todas são iguais?.....	17
I.11. Radiação gama.....	17
I.12. Enchimento de colunas cromatográficas.....	19
I.12.1. Fatores envolvidos no enchimento de colunas.....	19
I.12.2. Métodos de enchimento.....	22
I.13. Avaliação de colunas.....	23
Capítulo II - OBJETIVOS E METODOLOGIA.....	29
Capítulo III - PARTE EXPERIMENTAL.....	32
III.1. Materiais.....	33
III.1.1. Reagentes e solventes.....	33
III.1.2. Gás empregado.....	33
III.1.3. Fase estacionária líquida.....	33
III.1.4. Suportes cromatográficos.....	34
III.1.5. Coluna comercial.....	34
III.1.6. Coluna empregada para CLAE.....	35

III.1.6.1. Confecção e polimento da superfície interna do corpo das colunas cromatográficas.....	35
III.2. Equipamentos.....	35
III.3. Preparação das fases estacionárias.....	36
A - FASES ESTACIONÁRIAS SORVIDAS.....	36
III.3.1. Recobrimento do suporte.....	36
III.3.2. Quantidade de PMOS sobre o suporte.....	36
B - FASES ESTACIONÁRIAS IMOBILIZADAS.....	37
III.4. Técnicas empregadas para avaliação das FEs.....	38
III.4.1. Testes químicos com as FEs.....	38
III.4.1.1. Extração por solventes.....	38
III.4.2.2. Análise elementar.....	38
III.4.1.3. Titulação potenciométrica.....	39
III.4.2. Testes físicos com as FEs.....	39
III.4.2.1. Espectroscopia no infravermelho.....	39
III.4.2.2. Medidas de área superficial específica (S).....	40
III.4.2.3. Medidas de volume específico dos poros (V_p).....	40
III.4.2.4. Análise termogravimétrica (ATG).....	40
III.4.2.5. Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	41
III.4.2.6. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	41
III.4.2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	41
III.4.3. Testes cromatográficos.....	42
III.4.3.1. Enchimento de colunas.....	42
III.4.3.1.1. Preparação da bomba de enchimento.....	42
III.4.3.1.2. Procedimento de enchimento.....	44
III.4.3.1.3. Escolha da concentração da suspensão.....	45
III.4.3.2. Escolha dos componentes da fase móvel e da proporção destes na mistura.....	45
III.4.3.3. Condicionamento das colunas.....	46
III.4.3.4. Avaliação das colunas.....	46
III.4.3.4.1. Misturas testes utilizadas.....	46
III.4.3.4.2. Cálculos dos parâmetros cromatográficos.....	47

III.4.3.5. Estabilidade química das colunas recheadas com FEs sorvida e imobilizada.....	48
III.4.3.6. Cromatografia de permeação em gel (GPC).....	49
III.5. Aplicação das FEs preparadas.....	49
Capítulo IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
IV.1. Escolha da concentração da suspensão de FE preparada a partir de sílicas esféricas.....	51
IV.2. Escolha da proporção dos solventes da fase móvel.....	52
IV.3. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FEs SORVIDAS.....	56
IV.3.1. Escolha da quantidade ideal de PMOS sobre sílica.....	56
IV.3.2. Teste físico: espectroscopia no infravermelho.....	63
IV.3.3. Teste químico: titulação potenciométrica.....	67
IV.3.4. Comparação das diferentes FEs na sua melhor porcentagem de PMOS.....	68
IV.3.5. Curvas de van Deemter das colunas recheadas com FE na sua melhor porcentagem de PMOS.....	69
IV.3.6. Testes cromatográficos com as misturas II, III e IV.....	72
IV.3.7. Estabilidade química das colunas cromatográficas recheadas com FEs sorvidas.....	78
IV.4. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FEs IMOBILIZADAS POR RADIAÇÃO GAMA.....	85
IV.4.1. Escolha da melhor dose de radiação gama.....	85
IV.4.2. Testes físicos, químicos e cromatográficos.....	87
IV.4.3. Testes cromatográficos com as misturas II, III e IV.....	92
IV.4.4. Testes físicos.....	95
IV.4.4.1. Espectroscopia no infravermelho.....	95
IV.4.4.2. Análise termogravimétrica.....	98
IV.4.4.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear.....	101
IV.4.4.4. Microscopia eletrônica de varredura.....	104
IV.4.4.5. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).....	108
IV.4.5. Teste químico: titulação potenciométrica.....	109
IV.4.6. Teste cromatográfico: cromatografia de permeação em gel.....	109
IV.4.7. Estabilidade química das colunas cromatográficas recheadas	

com FEs imobilizadas.....	111
IV.5. Comparação entre coluna recheada com FE preparada e coluna comercial.....	117
IV.6. Aplicação das FEs preparadas.....	119
Capítulo V - COMENTÁRIOS FINAIS.....	122
Capítulo VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	128

1- Estrutura da sílica gel.....	7
2- Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica gel amorfa: (1) vicinais, (2) geminais e (3) isolado.....	7
3- Sílica gel recoberta com camada de polímero: (a) sem entrecruzamento e sem ligação à superfície da sílica - FE sorvida, (b) densamente entrecruzada - FE imobilizada e (c) ligada covalentemente à superfície da sílica - FE quimicamente ligada.....	13
4- Sílica gel com poros preenchidos com polímero: (a) sem entrecruzamento e sem ligação à superfície da sílica - FE sorvida, (b) polímero entrecruzado homogeneamente - FE imobilizada e (c) ligado covalentemente à superfície da sílica - FE quimicamente ligada.....	13
5- Esquema representativo do entrecruzamento.....	19
6- Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.....	24
7- Medida e cálculo do fator de assimetria do pico.....	26
8- Curva de equação de van Deemter mostrando a contribuição dos termos e a velocidade linear ótima.....	28
9- Esquema da aparelhagem utilizada para a extração.....	39
10- Esquema completo do sistema de enchimento: (A) coluna, reservatório de suspensão e reservatório de CCl ₄ e (B) bomba de enchimento, Haskel.....	43
11- Esquema detalhado da coluna, do reservatório de suspensão e de CCl ₄	44
12- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com 40% PMOS-Spherisorb, 5 µm, a partir de concentração de suspensão: (A) 10 e (B) 20%. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H ₂ O (70: 30, v/v), vazão: 0,2 mL.min ⁻¹ , volume de amostra injetado: 10 µL, detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm.min ⁻¹	52
13- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com 30, 40 e 50% PMOS-Davisil, 10 µm, e FM MeOH/H ₂ O, A, B, C, D, respectivamente, nas proporções 70:30, 60:40, 55:45 e 50:50 (v/v). Condições cromatográficas: vazão: 0,2 mL min ⁻¹ , volume de amostra	

- injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min^{-1} 55
- 14- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com: (A) 30, (B) 40 e (C) 50% de PMOS sobre sílica Davisil. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL.min^{-1} , volume injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm.min^{-1} 60
- 15- Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com: (A) 30, (B) 40 e (C) 50% de PMOS sobre sílica Sigma. Condições idênticas às da Figura 14..... 61
- 16- Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com: (A) 40 e (B) 50% de PMOS sobre sílica Lichrosorb Si-100, 10 μm , (C) 40 e (D) 50% de PMOS sobre sílica Lichrosorb Si-60, 10 μm . Condições idênticas às da Figura 14..... 61
- 17- Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com: (A) 40 e (B) 50% de PMOS sobre sílica Lichrosorb Si-60, 7 μm , (C) 40 e (D) 50% de PMOS sobre sílica Lichrosorb Si-60, 5 μm . Condições idênticas às da Figura 14..... 62
- 18- Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com: (A) 30 e (B) 40% de PMOS sobre sílica Spherisorb, 8 μm , (C) 30 e (D) 40% de PMOS sobre sílica Spherisorb, 5 μm . Condições idênticas às da Figura 14..... 62
- 19- Espectros no infravermelho de: (A e F) PMOS, (B e G) sílica Davisil e Sigma, respectivamente, (C, D e E) 30, 40 e 50% de PMOS sobre sílica Davisil, (H, I e J) 30, 40 e 50% de PMOS sobre sílica Sigma..... 64
- 20- Espectros no infravermelho de: (K e O) PMOS, (L e P) sílica Lichrosorb Si-100 e Si-60, respectivamente, (M e N) 40 e 50% de PMOS sobre Lichrosorb Si-100 e (Q e R) 40 e 50% de PMOS sobre Lichrosorb Si-60, 10 μm 65
- 21- Espectros no infravermelho de: (S e T) 40 e 50% de PMOS sobre sílica Lichrosorb Si-60, 7 μm , (U e V) 40 e 50% de PMOS sobre sílica Lichrosorb Si-60, 5 μm , (W e X) 30 e 40% de PMOS sobre sílica

Spherisorb, 8 μm , (Y e Z) 30 e 40% de PMOS sobre sílica Spherisorb, 5 μm	66
22- Curvas de van Deemter das colunas recheadas com: 40% PMOS-Davisil, 50% PMOS-Sigma, 50% PMOS-Lichrosorb Si-100 e 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm	70
23- Curvas de van Deemter das colunas recheadas com: 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10, 7 e 5 μm	71
24- Curvas de van Deemter das colunas recheadas com: 40 PMOS-Spherisorb, 8 e 5 μm	71
25- Cromatogramas da mistura II: 1= acetilacetona, 2= nitronaftaleno e 3= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com: (A) 40% PMOS-Davisil, (B) 50% PMOS-Sigma, (C) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100 e (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm . Condições cromatográficas: FM: MeOH/H ₂ O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL.min ⁻¹ , volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm.min ⁻¹	73
26- Cromatogramas da mistura II obtidos com as colunas recheadas com: (E e F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 e 5 μm , respectivamente e (G e H) 40% PMOS-Spherisorb, 8 e 5 μm . Condições cromatográficas idem às da Figura 25.....	73
27- Cromatogramas da mistura III: 1= anilina, 2, 3 e 4= o-, m- e p-toluidina, 5= N, N-DMA, obtidos com as colunas recheadas com: (A) 40% PMOS-Davisil, (B) 50% PMOS-Sigma, (C) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100 e (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm . Condições cromatográficas: FM: MeOH/H ₂ O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL.min ⁻¹ , volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm.min ⁻¹	77
28- Cromatogramas da mistura III obtidos com as colunas recheadas com: (E e F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 e 5 μm e (G e H) 40% PMOS-Spherisorb, 8 e 5 μm . Condições cromatográficas idem às da Figura 27.....	77
29- (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H ₂ O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 40% PMOS-	

- Davisil, sorvida..... 79
- 30- (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α), como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida..... 80
- 31- (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 2 passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida..... 81
- 32- (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 9 passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida..... 82
- 33- (A) fator de retenção (k) e (B) fator de assimetria (A_s) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida..... 83
- 34- (A) fator de retenção (k) e (B) fator de assimetria (A_s) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 9 passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida..... 84
- 35- Cromatogramas de compostos básicos: 1= anilina e 2= N,N-DMA, obtidos com a coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida, após passagem de volume de FM nas seguintes condições: (A) MeOH/H₂O (70:30, v/v) à 0 x V_c e à 20.000 x V_c e (B) MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 2 à 2.000 x V_c. Condições cromatográficas: vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μ L, detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹..... 84
- 36- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com (A) 40% PMOS-Davisil, sorvida e imobilizada (80 kGy) e (B) 50% PMOS-Sigma, sorvida e imobilizada (80 kGy). Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μ L, detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹..... 90
- 37- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com (C) 50%

- PMOS-Lichrosorb Si-100, sorvida e imobilizada (120 kGy) e (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm , sorvida e imobilizada (120 kGy). Condições cromatográficas idênticas às da Figura 36..... 90
- 38- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com (E) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 μm , sorvida e imobilizada (120 kGy) e (F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm , sorvida e imobilizada (120 kGy). Condições cromatográficas idênticas às da Figura 36..... 91
- 39- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com (G) 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm , sorvida e imobilizada (20 kGy) e (H) 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , sorvida e imobilizada (20 kGy). Condições cromatográficas idênticas às da Figura 36..... 91
- 40- Cromatogramas da mistura II: 1= acetilacetona, 2= nitronaftaleno e 3= naftaleno, obtidos com a coluna recheada com 50% PMOS-Lichrosorb Si-100. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹..... 93
- 41- Cromatogramas da mistura II obtidos com a coluna recheada com 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm . Condições cromatográficas idênticas às da Figura 40..... 93
- 42- Espectros no infravermelho de FEs sorvidas e imobilizadas, respectivamente, de: (A e B) 40% PMOS-Davisil, 10 μm , (C e D) 50% PMOS-Sigma, 10 μm , (E e F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, 10 μm e (G e H) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm 96
- 43- Espectros no infravermelho de FEs sorvidas e imobilizadas, respectivamente, de: (I e J) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 μm , (K e L) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm , (M e N) 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm e (O e P) 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm 97
- 44- Curvas termogravimétricas de FEs sorvidas: (A) 40% PMOS-Davisil, 10 μm , (B) 50% PMOS-Sigma, 10 μm , (C) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, 10 μm , (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm , (E) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 μm , (F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm , (G) 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm e (H) 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm 99

45- Curvas termogravimétricas de FEs imobilizadas: (I) 40% PMOS-Davisil, 10 μm , 80 kGy, (J) 50% PMOS-Sigma, 10 μm , 80 kGy, (K) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, 10 μm , 120 kGy, (L) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm , 120 kGy, (M) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 μm , 120 kGy, (N) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm , 120 kGy, (O) 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm , 20 kGy e (P) 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , 20 kGy.....	100
46- Espectros de ^{29}Si CP-MAS-NMR de: (A) sílica Sigma, (B-D) 30, 40 e 50% PMOS-Sigma, sorvida e (E) 50% PMOS-Sigma, imobilizada (80 kGy).....	102
47- Espectros de ^{13}C NMR de (A) PMOS e (A') espectro A expandido e de ^{13}C CP-MAS-NMR de (B-D) 30, 40 e 50% PMOS-Sigma, sorvida e (E) 50% PMOS-Sigma, imobilizada (80 kGy).....	103
48- Esquema da possível disposição do PMOS sobre o suporte de sílica.....	103
49- Microscopia eletrônica de varredura: (A) sílica Davisil e 40% PMOS-Davisil, sorvida, (B) antes do enchimento e (C) após enchimento.....	105
50- Microscopia eletrônica de varredura de 40% PMOS-Davisil, imobilizada (80 kGy), (D) antes do enchimento e (E) após enchimento.....	106
51- Microscopia eletrônica de varredura de (F) sílica Spherisorb, 5 μm e 40% PMOS-Spherisorb, sorvida (G) antes do enchimento e (H) após enchimento.....	107
52- Espectro de EPR da FE 40% PMOS-Davisil, irradiada à 80 kGy.....	108
53- Cromatogramas de PMOS: (A) não irradiado e (B) irradiado à 80 kGy. Colunas: 3 x Ultrastyrigel linear, 7,8 x 300 mm. Condições cromatográficas: FM: tolueno, vazão: 1,0 mL min ⁻¹ , temperatura da coluna: 40°C e temperatura do detector de índice de refração: 40°C.....	110
54- (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H ₂ O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 40% PMOS-Davisil, imobilizada	112
55- (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H ₂ O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, imobilizada.....	113
56- (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H ₂ O (70:30, v/v) à pH 2, passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, imobilizada.....	114

- 57- (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 9, passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, imobilizada..... 115
- 58- (A e C) fator de retenção (k) e (B e D) fator de assimetria (A_s) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) e à pH 9, respectivamente, passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, imobilizada 116
- 59- Cromatogramas da mistura I: 1=acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com: (A e B) coluna recheada com a FE 40% PMOS-Spherisorb, 5 μ m, sorvida e imobilizada, respectivamente (125 x 3,4 mm d.i.), e (B) coluna comercial Hypersil MOS, 5 μ m, quimicamente ligada (100 x 4,6 mm d.i.). Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μ L, detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹..... 117
- 60- Cromatogramas de: (A) padrão de colesterol e (B) em amostra de camarão 7 barbas obtidos com a coluna recheada com 50% PMOS-Lichrosorb Si-60 , 5 μ m, sorvida (125 x 3,4 mm d.i.), e com a coluna comercial C18, 5 μ m (150 x 4,6 mm d.i.). Condições cromatográficas: FM: acetonitrila/isopropanol (70:30, v/v), vazão: 0,5 mL min⁻¹ (sorvida) e 1,0 mL min⁻¹ (comercial), volume de amostra injetado: 10 μ L, velocidade do papel: (A) 0,2 cm min⁻¹ e (B) 0,5 cm min⁻¹ e detecção: UV, 210 nm..... 120
- 61- Cromatogramas de colesterol em amostra de carne suína (pernil) obtidos com a coluna recheada com 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μ m, imobilizada (125 x 3,4 mm d.i.) e com a coluna comercial C18, 5 μ m (150 x 4,6 mm d.i.). Condições cromatográficas: FM: acetonitrila/isopropanol (70:30, v/v), vazão: 0,5 mL min⁻¹ (imobilizada) e 1,0 mL min⁻¹ (comercial), volume de amostra injetado: 10 μ L, velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹ (imobilizada) e 0,5 cm min⁻¹ (comercial) e detecção: UV, 210 nm..... 121
- 62- Sílica gel com poros semi-preenchidos com polímero e superfície recoberta com filme fino de PMOS.
- a) sem entrecruzamento e sem ligação à superfície da sílica – FE sorvida
- b) polímero entrecruzado – FE imobilizada..... 126

1- Suportes inorgânicos utilizados na cromatografia líquida.....	6
2- Polímeros usados em CLAE-FR.....	9
3- Modalidades diferentes de CLAE com suas respectivas porcentagem de uso em 1994.....	16
4- Fases estacionárias usadas em CLAE-FR.....	16
5- Porcentagem de pesquisadores entrevistados que utilizam recheio de forma esférica e irregular em CLAE analítica.....	17
6- Variáveis que provocam possíveis diferenças em colunas com fase ligada.....	18
7- Variáveis que afetam o enchimento de colunas.....	21
8- Eficiência de colunas disponíveis comercialmente, recheadas com fase reversa porosa.....	27
9- Caracterização das sílicas: fabricante ou fornecedor, forma da partícula (irregular ou esférica), tamanho médio das partículas (t_p), diâmetro médio dos poros (d_p), área superficial específica (S) e volume específico dos poros (V_p).	34
10- Fases estacionárias preparadas para a escolha da quantidade ideal de PMOS sobre sílica.....	37
11- Parâmetros cromatográficos obtidos no estudo da influência da concentração de suspensão no enchimento de colunas com FE com 40% PMOS-Spherisorb, de 8 e 5 μm	51
12- Influência da composição da FM MeOH/H ₂ O nos parâmetros cromatográficos calculados para a mistura I, após injeção em colunas recheadas com fases preparadas a partir de sílicas Davisil e Sigma.....	53
13- Influência da composição da FM MeOH/H ₂ O nos parâmetros cromatográficos calculados para a mistura I, após injeção em colunas recheadas com fases preparadas a partir de sílicas Lichrosorb Si-100 e Si-60.....	54
14- Caracterização das sílicas: forma da partícula [(irregular (I) ou esférica (E)], fabricante, valores de tamanho das partículas (t_p), diâmetro dos poros (d_p), área superficial específica (S) e volume específico dos poros (V_p), e resultados obtidos com as FEs através de testes químicos e físicos.....	57

15- Caracterização das FEs através dos testes cromatográficos feitos injetando-se a mistura I.....	59
16- Quantidades de silanóis presentes nas sílicas e nas FEs sorvidas, determinadas por titulação potenciométrica.....	67
17- Comparação das diferentes FEs preparadas na sua melhor porcentagem de PMOS.....	68
18- Valores de A_s e α obtidos ao se injetar a mistura II em colunas recheadas com FEs sorvidas.....	72
19- Teor de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) presentes nas sílicas Davisil e Sigma, tratadas ou não com HCl, obtidos por absorção atômica.....	74
20- Valores de A_s da acetilacetona para as FEs preparadas a partir de sílicas sem e com tratamento ácido.....	75
21- Parâmetros cromatográficos obtidos utilizando a mistura III e diferentes FEs sorvidas.....	76
22- Valores de A_s dos compostos da mistura IV em colunas recheadas com as FEs sorvidas.....	78
23- Influência da dose de radiação gama nas FEs.....	86
24- Influência da dose de radiação gama nas FEs.....	86
25- Resultados obtidos por testes químicos e físicos com as FEs imobilizadas na sua melhor dose de radiação e com as FEs sorvidas.....	87
26- Caracterização através de testes cromatográficos realizados injetando-se a mistura I, nas colunas recheadas com FEs imobilizadas na sua melhor dose de radiação e comparação com as FEs sorvidas.....	89
27- Valores de tempo de retenção(t_R), fator de assimetria (A_s) e fator de separação (α) para as FEs sorvidas e imobilizadas, após injeção da mistura II.....	92
28- Valores dos parâmetros cromatográficos obtidos ao se injetar a mistura III nas FEs.....	94
29- Valores de A_s dos compostos da mistura IV em colunas recheadas com as FEs imobilizadas.....	95
30- Análise termogravimétrica das FEs sorvidas e imobilizadas.....	98
31- Atribuições dos deslocamentos químicos obtidos por ^{13}C CP-MAS-NMR....	104
32- Quantidade de silanóis residuais nas FEs imobilizadas e sorvidas, determinadas por titulação potenciométrica.....	109

33- Resultados de massa molecular numérica média (M_n) e polidispersividade obtidos por GPC.....	111
34- Parâmetros cromatográficos obtidos com as colunas recheadas com 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , sorvida e imobilizada, e com a coluna comercial Hypersil MOS, 5 μm , após a injeção da mistura	118

Título: *Preparação, caracterização e avaliação de diferentes fases estacionárias reversas, tipo C8, para CLAE*

Autora: *Tania Akiko Anazawa*

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

Este trabalho visa o desenvolvimento de dois tipos de fase estacionária (FE), sorvida e imobilizada, para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a partir da fase estacionária líquida poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) e de oito suportes de sílica com diferentes formas (irregular ou esférica), tamanho de partículas (10, 8, 7 e 5 μm), diâmetro de poros (15, 10, 8 e 6 nm) e fabricantes (Davisil, Merck, Sigma e Phase Separations). As FEs sorvidas consistem no PMOS sorvido nos poros da sílica, sem ligação covalente e as imobilizadas no PMOS imobilizado, por meio de radiação gama. Estas fases foram caracterizadas e avaliadas por testes físicos (espectroscopia no infravermelho, área superficial específica, volume específico dos poros, análise termogravimétrica, espectrometria de ressonância magnética nuclear), químicos (extração por solventes, análise elementar, titulação potenciométrica) e cromatográficos (avaliação das colunas recheadas com as diferentes FEs através da injeção de várias misturas orgânicas sintéticas e estabilidade frente a solvente).

Os testes mostraram que a maioria dos grupos silanóis da sílica foram blindados pelo PMOS, que existem características adequadas de suporte para obtenção de colunas eficientes e que, ao contrário do que se tem na literatura, as FEs sorvidas podem ter uma estabilidade excelente desde que se use uma fase estacionária líquida, de alta massa molecular, como é o caso dos polissiloxanos. Ambas as FEs desenvolvidas competem em qualidade e estabilidade com as comerciais, com a vantagem da nossa preparação ser mais simples e de menor custo.

Title: Preparation, characterization and evaluation of different reversed phases, type C8, for HPLC.

Author: Tania Akiko Anazawa

Supervisor: Prof^a Dr^a Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

The objective of this project is the development of two different types of stationary phases (SP), sorbed and immobilized, for High Performance Liquid Chromatography (HPLC), using the liquid stationary phase poli(methyloctylsiloxane) (PMOS) and eight silica supports with different shapes (irregular or spherical), particle sizes (10, 8, 7 and 5 μm), pore diameters (15, 10, 8 and 6 nm) and sources (Davisil, Merck, Sigma and Phase Separations). The sorbed SP consists of PMOS sorbed in the pores of the silica, without covalent bonding, while the immobilized SP have the PMOS immobilized by gamma radiation. These phases were characterized and evaluated by physical tests (infrared spectroscopy, specific surface area, specific pore volume, thermogravimetric analysis, nuclear magnetic resonance spectrometry), chemical tests (solvent extraction, elemental analysis, potentiometric titulation) and chromatographic tests (evaluation of columns packed with the different SP through injection of various synthetic mixtures and evaluation of stability to the mobile phase).

The tests showed that the silanol groups of the silica were shielded by PMOS, efficient columns are obtained and that, contrary to indications in the literature, the sorbed SP have excellent stability due to use of a high molecular weight, liquid SP, such as the polysiloxanes. Both the SP developed in this work compete in quality and stability with commercial phases, with the advantage that our preparations are simpler and of lower cost.

Capítulo I

INTRODUÇÃO

I.1. Considerações gerais sobre Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma amostra através da distribuição destes entre duas fases, uma que permanece estacionária e a outra que se move através dela. O desenvolvimento cromatográfico se dá através das diferentes interações dos componentes das amostras com a fase estacionária e, dependendo do tipo de cromatografia, com a fase móvel. Desta forma, cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes ¹.

Diversas são as técnicas cromatográficas, sendo que dentre elas, a **Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)** vem se destacando cada vez mais e o seu emprego em vários laboratórios é considerado, atualmente, indispensável.

As razões para o crescimento explosivo podem ser atribuídas a sensibilidade do método, sua pronta adaptabilidade para determinações quantitativas, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis e a sua grande aplicabilidade às substâncias que são de interesses industriais e de muitos campos da ciência. Além disso, a CLAE possui uma maior variedade de mecanismos de separação possíveis, desta forma, pode ser aplicada tanto para compostos orgânicos como para inorgânicos. A única exigência para a CLAE é que a amostra seja solúvel na fase móvel (FM), assim sendo, amostras líquidas ou sólidas, iônicas ou covalentes, como também sólidos de alta ou baixa massa molecular podem ser separados por esta técnica. No entanto, a CLAE utiliza instrumentos sofisticados e caros. Também não é desprezível o custo elevado das fases móveis, de alto grau de pureza, das fases estacionárias (FEs) ou das colunas prontas e da reposição periódica de componentes diversos da coluna ou do aparelho, que se constituem em despesas contínuas.

Na CLAE, a FM é bombeada sob alta pressão (até 40 MPa) e a uma vazão controlada. Uma pequena quantidade de amostra é introduzida por meio de uma válvula de injeção, sendo arrastada pela FM através da coluna e do detector.

As colunas utilizadas em CLAE geralmente são recheadas com FEs que consistem de pequenas partículas de sílica porosa, cujas superfícies são recobertas com uma fina camada de fase ligada. A FM, contendo os componentes da amostra, ao sair da coluna chega ao detector onde um sinal, proporcional à concentração do soluto, é enviado ao registrador ou integrador.

A Cromatografia Líquido-Sólido (CLS) e a Cromatografia Líquido-Líquido (CLL) resultam, respectivamente, de repetidas etapas de adsorções e dessorções ou partições que ocorrem durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da coluna contendo a FE, alcançando-se a separação graças às diferenças entre os coeficientes de distribuição dos componentes distintos da amostra entre a FE e a FM².

1.2. Definições de alguns termos cromatográficos

A seguir estão descritas definições de alguns termos cromatográficos:

- **Fase Estacionária (FE):** é a fase imóvel responsável pelas retenções diferenciais dos solutos. Em CLAE, a FE pode ser um sólido ou um líquido depositado sobre um suporte: sorvido ou imobilizado ou quimicamente ligado a ele.
- **Suporte:** sólido (poroso ou não) que retem a fase estacionária líquida .
- **Fase Estacionária Líquida:** é um líquido, depositado sobre um suporte, que separa os solutos através de interações diferenciais com ele, tanto na sua superfície quanto no seu interior. Tais interações dependem diretamente da quantidade do líquido depositado sobre o suporte.
- **Fase Estacionária Sorvida:** é um líquido que se encontra sorvido sobre um suporte devido a forças físicas do tipo van der Waals.
- **Fase Estacionária Quimicamente Ligada:** é uma FE resultante de uma reação química entre grupos presentes na superfície do suporte e um reagente contendo grupos reativos apropriados que modifica as propriedades iniciais do suporte.
- **Fase Estacionária Imobilizada:** é uma FE onde existem ligações químicas entre as moléculas individuais da fase estacionária líquida sorvida, induzidas por processos de entrecruzamento, sendo que ligações entre a fase estacionária líquida e o suporte também podem existir.
- **Fase Estacionária Sólida:** é um sólido, com a sua superfície modificada ou não, que separa os solutos através de interações diferenciais diretamente na sua superfície.
- **Recheio:** é o material que compõe o leito da coluna cromatográfica.

1.3. Fases estacionárias empregadas na CLAE

Na **Cromatografia Líquido-Sólido (CLS)**, a FE é um sólido que na sua maioria, é a alumina ou a sílica. Empregam-se partículas de tamanho que variam de 5 a 40 μm , as maiores podendo ser peliculares ou porosas e as menores totalmente porosas ¹.

A **Cromatografia Líquido-Líquido (CLL)**, introduzida em 1941 ³, consiste de uma FE adsorvida nos poros das partículas do suporte cromatográfico através de forças eletrostáticas ou forças de van der Waals. Este tipo de fase é obtido por um processo dinâmico, onde moléculas da FE, dissolvidas na FM, entram nos poros do suporte para compensar as moléculas que são solubilizadas pela fase móvel.

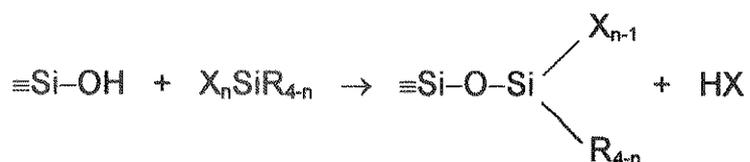
Os líquidos usados no passado como fase estacionária líquida consistiam em moléculas de baixa massa molecular ⁴, já que as tentativas para usar moléculas maiores, menos solúveis na fase móvel, resultaram em separações de poucas aplicações.

Devido a isso, a CLL, muito usada nas décadas de 60 e 70, quase desapareceu com a chegada, no mercado, das FEs quimicamente ligadas, pois apresentavam como desvantagem, a necessidade de um controle rigoroso de temperatura e solubilidade, para que se obtivesse uma fase estacionária que resultasse em uma cromatografia confiável e reprodutível.

A introdução das FEs quimicamente ligadas permitiu um desenvolvimento fantástico de novos materiais para CLAE.

Na **cromatografia líquida com fase ligada (CLFQL)**, a FE é um líquido ligado quimicamente ao suporte ou às paredes do tubo cromatográfico, o que lhe confere maior estabilidade térmica e mecânica, eliminando as desvantagens ou os inconvenientes que a CLL apresenta.

As fases quimicamente ligadas podem ser preparadas por quatro tipos de reações que originam fases com características diferentes, das quais as mais usadas e mais disponíveis comercialmente são as fases tipo siloxano. Elas são preparadas por reação dos grupos silanóis do suporte com um organosilano halogenado ou um organoalcoxissilano, que pode ser mono (XSiR_3), di (X_2SiR_2) ou trifuncional (X_3SiR), de acordo com o esquema abaixo:



onde X = halogênio ou grupo alcóxido

As fases ligadas tipo siloxano são as mais estáveis hidroliticamente em um intervalo de pH 2 a 8.

De acordo com a polaridade do grupo R ligado, obtêm-se dois tipos de FE: **normal ou polar**, quando R é um alquil com um grupo $-NH_2$ ou $-CN$ ou diol, e **reversa ou apolar**, quando R é um hidrocarboneto alquil ou aril, sem grupos quimicamente ativos. Os grupos alquil mais populares são n-octil e n-octadecil, mas cadeias pequenas tais como metil e n-butil são também usadas. Os grupos cíclicos mais usados são fenil e cicloexil.

1.4. Fase estacionária do tipo reversa

As FEs mais comumente utilizadas em CLAE são as **fases reversas**, onde a FE é mais apolar e a FM é mais polar ⁵. Estas fases consistem de um suporte cromatográfico e de uma fase estacionária líquida, que pode estar sorvida ou imobilizada ou quimicamente ligada ao suporte.

As fases reversas apresentam várias vantagens ^{6,7}, tais como: uso de FM de menor custo e menos tóxica como metanol e água; estabilidade das FEs frente a solventes; o equilíbrio da coluna é conseguido rapidamente após a mudança da FM; técnicas de programação, incluindo eluição por gradiente, podem ser facilmente empregadas; análises rápidas; reprodutibilidade dos tempos de retenção e campo de aplicação amplo.

As desvantagens apresentadas por estas fases, quando se utiliza como suporte a sílica, são o intervalo restrito de pH na utilização da FE e a presença de grupos silanóis residuais ^{8,9}, que contribue para o mecanismo de retenção (interação hidrofóbica) de uma maneira indesejável.

1.4.1. Suporte cromatográfico

Um suporte ideal deve ter uma área superficial grande para permitir uma distribuição homogênea da fase estacionária líquida na sua superfície, ter uma alta força mecânica de modo a não sofrer quebras e nem deformações quando submetido a altas pressões, ter muitos grupos ativos na superfície que possam ser quimicamente modificados para gerarem materiais de recheio com propriedades específicas e ser quimicamente inerte para não interferir no processo de separação.

Os suportes inorgânicos que podem ser utilizados na cromatografia líquida estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Suportes inorgânicos utilizados na cromatografia líquida.

Suporte	Referências
Sílica	10 – 18
Vidro	19, 20
Alumina	21 – 25
Sílica recoberta com zircônia	26
Sílica recoberta com titânio	26
Sílica recoberta com magnésio	26
Carbono vitrificado	27

Atualmente, mais de 90% das FEs utilizadas em CLAE de fase reversa ou normal são baseadas em **silica**²⁸, que são disponíveis comercialmente em uma faixa larga de tamanho de partículas e poros. A sílica é mecanicamente estável às pressões utilizadas no enchimento de colunas bem como nas separações cromatográficas. Ela pode ser facilmente modificada para produzir materiais com diferentes tipos de seletividade e existe uma grande literatura disponível sobre a sílica. Estas qualidades explicam o seu largo uso na preparação de FEs para cromatografia líquida de alta eficiência.

A superfície da sílica é composta de grupos hidroxilas (grupos silanóis), aos quais se encontram ligadas moléculas de água através de diferentes tipos de interação, enquanto o interior do sólido apresenta ligações do tipo siloxano, conforme é mostrado na Figura 1²⁹.

A Figura 2 mostra os **tipos de silanóis** presentes na superfície da sílica²⁸. Dois grupos hidroxilas sobre dois átomos de silício vizinhos são chamados de **ilanóis vicinais** (região 1). Quando eles originam do mesmo átomo de silício, os dois grupos são denominados de **silanóis geminais** (região 2). A região 3 mostra um grupo **silanol isolado ou livre**²⁸.

Os grupos silanóis são responsáveis pelo caráter polar dos recheios de sílica usados em cromatografia líquida com fase normal e pela modificação da superfície

da sílica, permitindo obter as fases ligadas, sorvidas ou imobilizadas em fase reversa e em outras modalidades de cromatografia líquida.

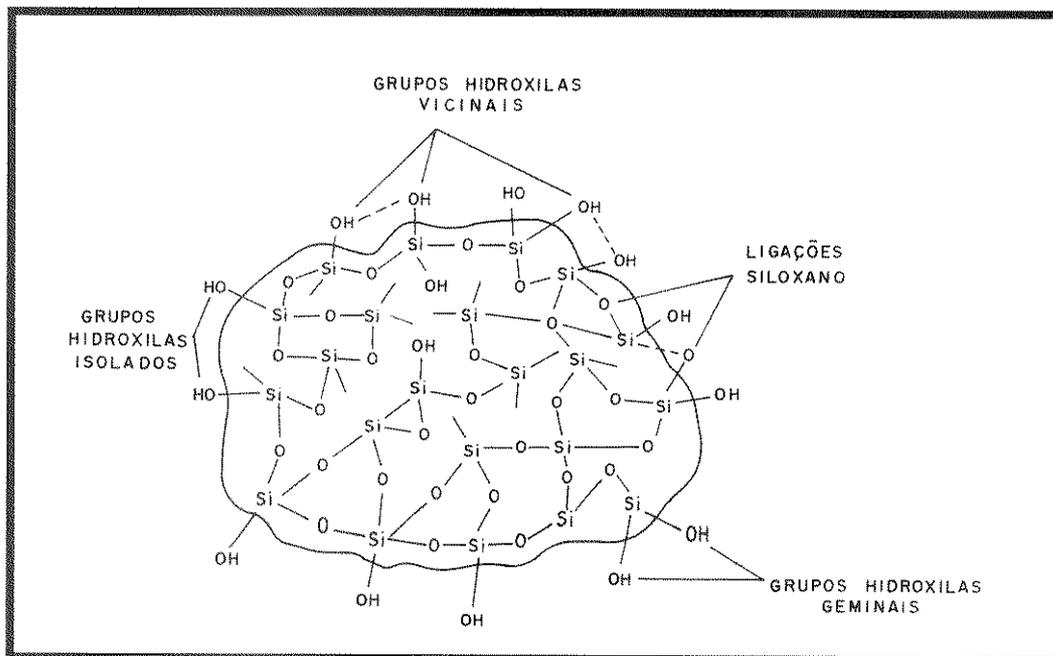


Figura 1 - Estrutura da sílica gel ²⁸.

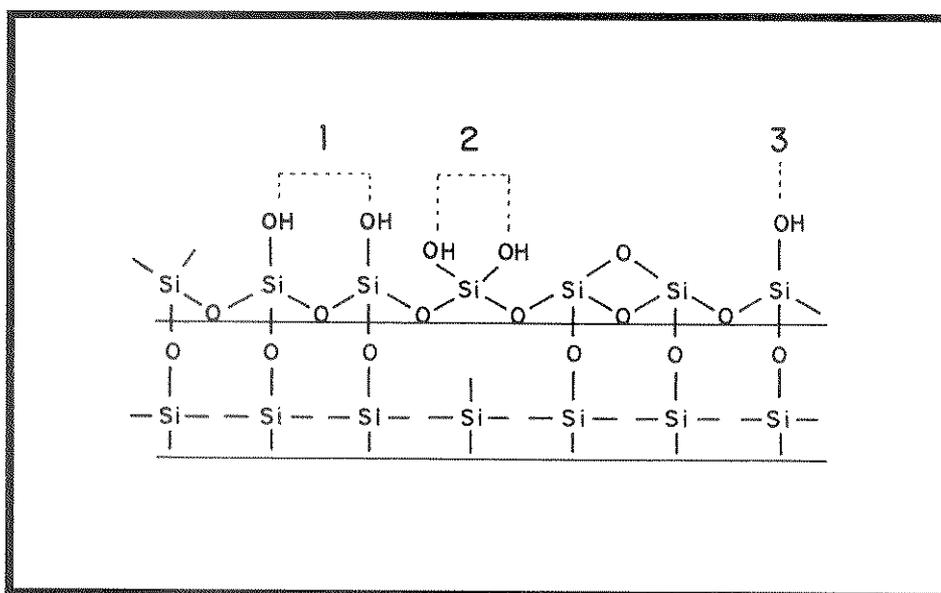


Figura 2 - Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica gel amorfa: (1) vicinais, (2) geminais e (3) isolado ²⁸.

Em temperatura ambiente, a sílica porosa sintética adsorve água reversivelmente. Esta água adsorvida está ligada à superfície da sílica e é removida por aquecimento a 150°C sob vácuo por várias horas ²⁸. Entre 200 e 800°C, o tratamento de temperatura sob vácuo de uma amostra de sílica induz a um decréscimo na concentração de grupos hidroxilas com formação de ligação

siloxano. Se a temperatura de calcinação não exceder 600°C, o grupo siloxano reativo reidroxila completamente quando exposto a água. Desidroxilação completa e sinterização ocorre com aquecimento acima de 1200°C. Nesta temperatura, o caráter amorfo da sílica pode ser lentamente perdido. A amostra cristaliza na forma estável de cristobalito. A superfície hidrofílica é convertida em uma superfície hidrofóbica.

A maioria das sílicas usadas em cromatografia não são puras devido a fonte a partir da qual elas são preparadas, ou seja sílica sol. Muitas sílicas são sintetizadas a partir de sílicas sol obtidas por acidificação de silicato de sódio sob condições controladas. Usualmente, o silicato de sódio é preparado através da dissolução de areia de sílica em hidróxido de sódio. A sílica inicial contém níveis significantes de impurezas, geralmente metais e alumina³⁰.

É difícil remover as impurezas da sílica depois da sua preparação. Somente uma certa quantidade dos metais pode ser removida da sílica por tratamentos prolongados com ácidos. Presumivelmente, isto ocorre devido a oclusão dos metais dentro da estrutura da sílica. Os traços de metais podem influenciar no processo cromatográfico, fornecendo picos com caudas para determinados compostos.

Além disso, os grupos silanóis livres, remanescentes na superfície da sílica, tornam-na susceptíveis à dissolução em meio básico, restringindo assim o pH das FM utilizadas com estas colunas, que pode atingir o limite máximo de 8,0³¹. Em soluções aquosas com pH abaixo de 9,0, a sílica dissolve formando o ácido monossilícico Si(OH)₄. Acima de pH 10,7, o ácido monossilícico se ioniza para formar silicato solúvel. Para valores de pH maiores que este, a formação de silicato solúvel é mais favorecida ainda, reduzindo a concentração de ácido monossilícico, o que leva à completa dissolução do sólido amorfo^{31,32}.

A estabilidade química da sílica em fases móveis alcalinas agressivas é restrita, portanto, FEs baseadas em sílica não devem ser usadas em pH maior que 8 por períodos prolongados. Também, o pH da fase móvel não deve estar abaixo de 2 porque as ligações Si-C podem ser hidrolisadas.

1.4.2. Fase estacionária líquida

A fase estacionária líquida deve ser quimicamente resistente aos componentes da amostra e da FM e possuir seletividade adequada para separação³³.

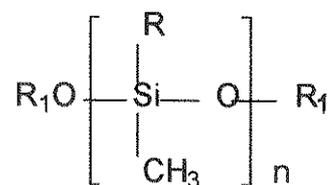
Uma grande variedade de polímeros usados como fase estacionária líquida para cromatografia líquida são mencionados na literatura. Os mais usados em CLAE-FR estão apresentados na tabela 2 ³⁴.

Tabela 2 - Polímeros usados em CLAE-FR.

Polímero	Referências
Polissiloxanos	35 – 50
Polibutadienos	16,23,25,35,39,51,52
Poliacrilatos	17,18,53,54
Poliestirenos	55,56
Polímero de tolueno	57
Polimetilglutamato	58
Poliamidas	59,60
Poliaminas	61,62
Poli(éter tipo coroa)	63
Poli(vinil tipo coroa)	64

A classe mais comum é a dos **polissiloxanos**, que são encontrados em uma faixa extensa de seletividade, de acordo com os grupos substituintes existentes nas diversas estruturas, como por exemplo: polietilmetilsiloxano, polimetiloctilsiloxano, polimetilfenilsiloxano, polimetiloctadecilsiloxano, etc.

Os polimetilalquilsiloxanos apresentam a fórmula geral ⁶⁵:



onde:

R = octil, dodecil, hexadecil ou octadecil

R₁ = trimetilsilil ou dimetilvinilsilil

1.5. Fases estacionárias quimicamente ligadas

O desenvolvimento destas fases permitiu uma expansão do emprego da CLAE e hoje elas dominam os recheios de colunas cromatográficas, devido as inúmeras vantagens que apresentam tais como:

- estabilidade frente aos solventes usados como FM – são praticamente insolúveis nos solventes normalmente usados em CLAE.
- não é necessário usar pré-coluna – em CLL é necessário o uso de uma pré-coluna para saturar a FM com a FE para que quando a FM atinja a coluna, ela estando saturada com a FE, diminua a solubilidade da FE, aumentando o tempo de vida da coluna.
- possibilidade de uso de vazões de FM alta – em CLL a vazão de FM alta pode causar perda da fase estacionária líquida e por outro lado, o aquecimento, de mais ou menos um grau, gerado pela fricção entre a FM em alta velocidade e o suporte pode aumentar a solubilidade da fase estacionária líquida na FM.
- eluição por gradiente pode ser utilizada.
- temperaturas moderadas, que muitas vezes são úteis quando se usa solventes viscosos como FM, também podem ser empregadas.

1.6. Influência de grupos silanóis residuais

Por utilizarem sílica gel como suporte, as fases ligadas tendem a ser limitadas em dois fatores. O primeiro é a instabilidade da superfície da sílica tanto frente as fases móveis ácidas como básicas, que reagem lentamente com estas superfícies até dissolvê-las, causando perda da fase cromatográfica e, em casos extremos, colapso da estrutura da coluna. Devido a isto as FEs quimicamente ligadas devem ser utilizadas no seguinte intervalo de pH: $2 \leq \text{pH} \leq 8$. O segundo fator está relacionado a não homogeneidade da superfície da sílica, isto é, a presença de grupos silanóis ²⁹ que afeta o mecanismo de retenção de uma maneira indesejável ⁶⁶⁻⁶⁸, ao interagir com moléculas bio-orgânicas ou solutos básicos, adsorvendo-os. Muitas vezes, a adsorção pode ser irreversível e os compostos depositados na superfície cromatográfica podem restringir o transporte de massa, bloquear sítios ativos de interação normal e criar sítios ativos não específicos, o que diminui o desempenho da coluna, podendo levá-la até a uma deterioração irreversível. Quando a adsorção é reversível, tem-se o problema de picos largos,

assimétricos e com cauda, que são difíceis de serem tratados quantitativamente, além de poderem se sobrepor ou interferirem nos picos dos solutos, que eluem em tempos similares.

Segundo Nawrocki⁶⁹, a forte e indesejável adsorção de bases orgânicas ou outros compostos nucleofílicos na superfície da sílica não é causada por todos os grupos silanóis livres, mas sim por um pequeno grupo de sítios fortemente reativos. Não existe um consenso sobre o fator que provoca a existência desses sítios, alguns atribuem às características estruturais da sílica, enquanto outros, à presença de traços de metais.

Atualmente, muitos esforços têm sido efetuados no sentido de minimizar a influência negativa dos grupos silanóis residuais no desempenho cromatográfico⁷⁰ e na baixa resistência da sílica em meios muito alcalinos⁶⁸. Os métodos usados para essa finalidade englobam desde tratamentos específicos voltados para a sílica propriamente dita, como por exemplo, purificação, ativação e síntese, até aqueles voltados para a síntese de fases ligadas: imobilização, capeamento, encapsulamento com polímeros, adsorção de polímeros, etc.

Verzele⁷¹ e Verzele e Dewaele⁷² atribuíram a obtenção de picos largos e assimétricos para algumas classes de compostos, como acetilacetona e antidepressivos tricíclicos, à presença de traços de metais na sílica. Entre estes metais destacam-se Fe, Ca, Cu, Mg, Al e Ti. Um procedimento que se mostrou eficiente para minimizar estes problemas consiste em ferver a sílica gel antes da imobilização da FE, por 2 horas com HCl 2 mol L⁻¹. Nawrocki⁶⁹ citou muitos outros métodos usados no tratamento da sílica.

Ohtsu et al.⁴⁶ investigaram a influência da pureza da sílica no desempenho cromatográfico de 3 tipos diferentes de fases: octadecilsilano (ODS), ODS-trimetilsililada e octadecil sobre sílica encapsulada. Independente do tipo de fase, aquelas preparadas com a sílica mais pura apresentaram melhor desempenho cromatográfico. Contudo, também foi observado que alguns tipos de fases se mostraram mais eficientes na atenuação das influências da sílica.

Alto grau de recobrimento da sílica com a fase líquida tem sido usado com o intuito de blindar os silanóis residuais. Nawrocki⁶⁹ citou diversos exemplos onde este artifício levou à supressão quase completa das fortes interações silanofílicas com compostos polares básicos. Sander e Wise⁷³ afirmaram que este artifício é efetivo quando a FE é monomérica, especialmente se constituída por cadeias curtas. Contudo, o mesmo não ocorreu com as FEs poliméricas, como por exemplo,

aqueles preparadas através da reação da sílica com silanos di ou trifuncionais na presença de água ou impurezas próticas. Nestes casos, houve uma melhora considerável no desempenho da coluna com a desativação dos grupos silanóis através de reações de silanização secundárias, que foram realizadas antes (pré-capeamento) ou depois (pós-capeamento) da imobilização da fase líquida. Para este propósito, reagentes pouco volumosos foram mais convenientes, uma vez que garantiram a desativação dos grupos silanóis menos acessíveis, tornando o processo mais efetivo. Normalmente são empregados trimetilclorosilano (TMS) e hexametildisilazano (HMDS). Sander e Wise ⁷³ descreveram trabalhos comparando os resultados obtidos com diferentes reagentes e condições para o capeamento.

1.7. Fases estacionárias sorvidas e imobilizadas

Na tentativa de obterem fases com uma maior blindagem dos grupos silanóis e estabilidade da superfície da sílica tanto frente a fases móveis ácidas quanto básicas, foi desenvolvido um novo tipo de fase estacionária para CLAE-FR, que consiste em **sorver ou imobilizar um polímero sobre a sílica**, fornecendo uma superfície mais homogênea, ou seja, um melhor bloqueio dos silanóis e, dessa forma, os solutos são mais protegidos de interações indesejáveis com a superfície da sílica ^{35-40, 45}.

1.8. Distribuição do polímero sobre a sílica

A preparação de FE a partir de polímeros sobre a sílica é um processo complexo, influenciado pelas contribuições dos tipos diferentes de interações adsorptivas, da ligação química de macromoléculas sobre a superfície da sílica ou da insolubilidade do polímero na FM. Não só as propriedades cromatográficas dos materiais à base de sílica-polímero, mas também o processo de estabilização do polímero são influenciados pelas características da sílica. A geometria das partículas influencia várias propriedades cromatográficas, tais como eficiência da coluna e vazão da FM. O tamanho das partículas, a forma delas e a distribuição do tamanho das partículas praticamente não mudam durante a modificação da sílica com polímeros orgânicos. Substancialmente, a estrutura do poro da sílica é que determina a possibilidade de estabilização do polímero e as propriedades resultantes da FE. Portanto, é muito importante a escolha do suporte de sílica na

preparação de FE à base de sílica-polímero, a fim de obterem recheios com as propriedades cromatográficas desejáveis.

As duas principais formas de como o polímero se encontra sobre a sílica são³³:

- 1) o polímero forma um filme fino sobre a superfície da sílica, que pode ser denominada de sílica gel recoberta com camada de polímero (Figura 3)
- 2) ou o polímero preenche o volume total dos poros, denominada de sílica gel com poros preenchidos com polímero (Figura 4).

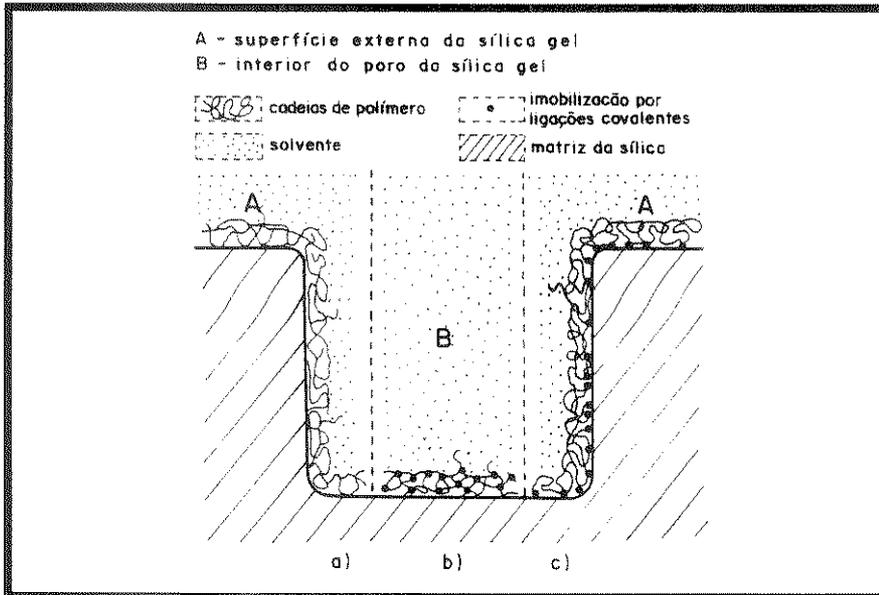


Figura 3 - Sílica gel recoberta com camada de polímero:

- a) sem entrecruzamentos e sem ligação à superfície da sílica - FE sorvida
- b) densamente entrecruzada - FE imobilizada
- c) ligada covalentemente à superfície da sílica - FE quimicamente ligada.

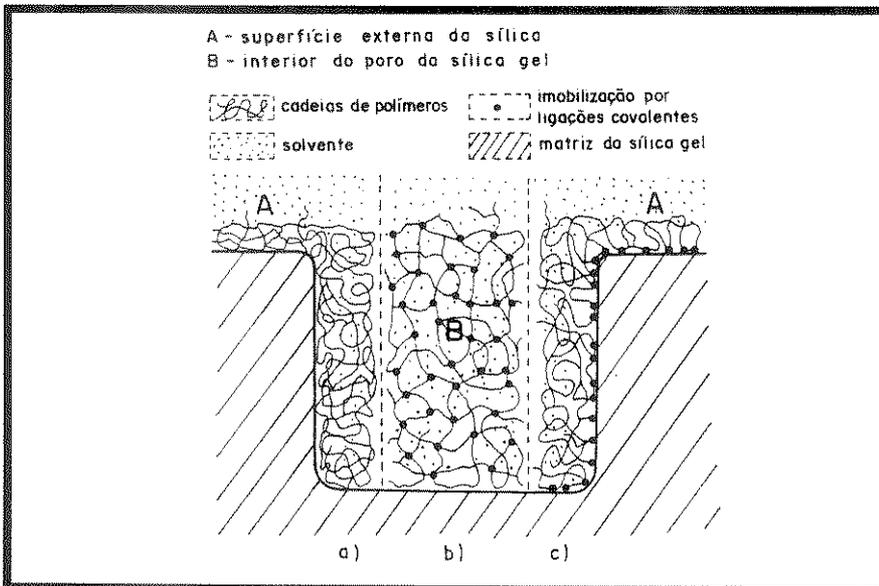


Figura 4 - Sílica gel com poros preenchidos com polímero:

- a) sem entrecruzamento e sem ligação à superfície da sílica - FE sorvida
- b) polímero entrecruzado homogeneamente - FE imobilizada
- c) ligado covalentemente à superfície da sílica - FE quimicamente ligada.

1) Sílica gel recoberta com camada de polímero

O objetivo mais frequente dos procedimentos de estabilização do polímero é o recobrimento da superfície da sílica com uma camada de polímero fina e homogênea. Isto pode ser conseguido por vários métodos, tais como, deposição de uma camada de polímero que pode ser sintetizada diretamente sobre a superfície da sílica por polimerização controlada de monômeros adequados (Figura 3a) ou entrecruzamento da cadeia de polímero (Figura 3b) ou ligação química à sílica (Figura 3c).

1.a - Camada de polímero sem entrecruzamento e sem ligação à superfície da sílica. O caminho mais simples de preparação de FE constituída de sílica-polímero é depositar uma camada de polímero sobre a superfície da sílica sem reação química entre as cadeias do polímero ou entre o polímero e a superfície da sílica^{49, 50, 74 - 76} (Figura 3a). A camada de polímero pode ser relativamente estável se o polímero for insolúvel ou não for arrastado pela FM. Polímeros que são insolúveis nos solventes cromatográficos usuais podem ser depositados sobre a sílica gel após a sua dissolução em um solvente adequado, gerando as FEs sorvidas.

1.b - Camada de polímero densamente entrecruzada. Na maioria dos casos, reações entre cadeias de polímero ou entre o polímero e a superfície da sílica são necessárias para estabilizar a camada de polímero. O mais popular é o entrecruzamento de camada de polímeros depositados^{38 - 41, 74, 77 - 83} (Figura 3b). As reações de entrecruzamento resultam em camadas estáveis que são insolúveis em fases móveis. A formação de ligações químicas com a superfície da sílica não é necessária, mas pode melhorar a estabilidade total da FE⁸⁰. O primeiro procedimento patenteado para preparar uma camada de polímero fina e altamente entrecruzada sobre sílica foi feito por Kirkland e Yates^{84,85}. Eles depositaram um polissiloxano pré-polimerizado sobre o suporte de sílica e depois entrecruzaram a camada de polímero por tratamento térmico. A seguir, Schomburg et al^{38 - 41} imobilizaram uma variedade de polímeros, tais como polissiloxanos, polibutadienos, etc., sobre suportes de sílica ou alumina, através de radiação gama, peróxidos, etc., e obtiveram bons resultados. Por exemplo, as FEs preparadas a base de alumina mostraram uma estabilidade adequada em pH 12. Estas são denominadas de FEs imobilizadas.

1.c - Camada de polímero ligada covalentemente à superfície da sílica. Camadas de polímero fina, homogênea e estável sobre a superfície da sílica podem

ser preparadas por ligação covalente à sílica^{82-83,86,87} do polímero, sintetizado previamente. Se o polímero não reage com os silanóis da sílica, grupos reativos apropriados podem ser introduzidos ou sobre a sílica^{86, 88 - 90} ou sobre as cadeias de polímero^{91 - 94}, resultando em ligações estáveis entre o polímero e a sílica. Por exemplo, Kurganov et al.^{91 - 94} recobriram a sílica com o polímero poliestirenovinilalcoxissilano, que foi quimicamente ligado à sílica através da reação de grupos alcoxissilano de um copolímero com os silanóis da sílica.

Uma camada de polímero quimicamente ligado à sílica também pode ser preparada por um processo que envolve a cobertura da superfície da sílica com um filme polimérico antes de ligar a fase estacionária líquida^{42,43,46,53,64}. Este procedimento é frequentemente designado como encapsulação de polímero na sílica. Os silanóis^{42,43,46} ou outros grupos introduzidos na sílica^{53,64} participam da polimerização e criam ligações estáveis entre o polímero e a superfície.

2) Sílica gel com poros preenchidos com polímero

Praticamente todos os procedimentos para preparação de FE a base de sílica-polímero mencionados na literatura incluem somente modificação da superfície da sílica. Um procedimento diferente é a preparação de sílica tendo os poros preenchidos com polímero.

Tais FEs podem ser preparadas por vários caminhos. Por exemplo, os poros da sílica gel podem ser preenchidos por múltiplas adsorção do polímero a partir de uma solução do polímero em um solvente volátil seguido de evaporação do solvente. Alternativamente, polímeros líquidos podem ser diretamente incorporados nos poros. Macromoléculas também podem ser diretamente formadas dentro dos poros por uma reação controlada como polimerização ou policondensação. Obviamente, o polímero incorporado deve ser insolúvel na FM. Detalhes de preparação e utilização de tais FEs para separações em cromatografia líquida não têm sido muito publicados.

1.9. Tendências atuais em utilização de colunas para CLAE

De acordo com a pesquisa realizada por Majors⁹⁵, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Reversa (CLAE-FR) é a modalidade mais popular de CLAE (Tabela 3) uma vez que ela pode ser usada nas separações de uma grande variedade de compostos orgânicos.

Tabela 3 - Modalidades diferentes de CLAE com suas respectivas porcentagens de uso em 1994 ⁹⁵.

Modalidade cromatográfica	% em 1994
Fase reversa (total)	50,9
Fase normal-ligada (tais como ciano, amino)	14,1
adsorção (liquido-sólido)	8,8
troca iônica (total)	12,1
cátion	6,2
ânion	5,9
exclusão por tamanho	8,5
quiral	3,6
interação hidrofóbica	1,5

A Tabela 4 mostra que as colunas C18 (octadecilsilano) lideram as fases reversas, mas houve um decréscimo do seu uso em relação à pesquisa de 1991 ⁹⁶ (25,5%), enquanto que as C8 aumentaram por causa da aplicação destas fases na separação de biomoléculas grandes (14,8%).

Tabela 4 - Fases estacionárias usadas em CLAE-FR ⁹⁵.

Fase Estacionária	% em 1994
C18	22,3
C8	16,2
C4	2,5
C1/C2	2,6
Fenil	7,3
Total	50,9

A Tabela 5 compara o uso de recheios de diferentes tamanhos de partículas de forma esférica com os de forma irregular. Os dados mostram as seguintes tendências: primeiro, os recheios esféricos são os preferidos devido às suas características, maior reprodutibilidade e resultam em colunas com eficiências mais

altas e em segundo lugar, o uso de partículas menores continua crescendo, sendo que a faixa de 4–5 μm é a mais empregada.

Tabela 5 - Porcentagem de pesquisadores entrevistados que utilizam recheio de forma esférica e irregular em CLAE analítica ⁹⁵.

Tipo de recheio	Pesquisadores Entrevistados (%)					
	Tamanho de partícula (μm)					
	1 – 3	4 – 5	6 – 10	11 – 20	21 – 30	>30
Esférico	24,6	71,3	26,3	2,3	1,2	1,2
Irregular	4,1	16,4	14,0	0,6	0	0

1.10. Colunas C8: todas são iguais?

A resposta para essa pergunta é não. As diferenças entre colunas C8 existem porque há muitas variáveis na preparação da FE. A Tabela 6 sumariza os parâmetros físicos, químicos e cromatográficos que podem contribuir para que colunas tenham comportamentos diferentes entre si ⁹⁷.

Os fabricantes usam tipos de sílica diferentes como suporte, que apresentam características físicas e químicas distintas (Tabela 6) e, deste modo, contribuem para produtos finais diferentes. Até quando o mesmo tipo de sílica inicial é usado por diferentes fabricantes, muitas manipulações químicas antes da ligação podem mudar suas propriedades físicas e químicas iniciais. Uma vez escolhido o tipo de sílica e o pré-tratamento, o método de ligação também influencia no produto final.

1.11. Radiação gama

A radiação gama é uma radiação eletromagnética de origem nuclear, de alta energia o que lhe confere um grande poder de penetração e uma alta capacidade de interagir com espécies atômicas ou moleculares ⁹⁸. É devido a estes fatores e também a ausência de produtos de decomposição do agente iniciador que a radiação gama tornou-se um catalisador excelente, em forma de energia, para iniciar um processo químico.

Tabela 6 - Variáveis que provocam possíveis diferenças em colunas com fase ligada ⁹⁷.

<p>1 - Física</p> <ul style="list-style-type: none"> área superficial volume dos poros diâmetro dos poros distribuição do tamanho dos poros 	<p>3 - Ligação Química</p> <ul style="list-style-type: none"> natureza do silano método de ligação concentração de grupos ligados na superfície
<p>2 - Química</p> <ul style="list-style-type: none"> propriedade da superfície número de grupos silanóis tipo de silanóis acidez da superfície 	<p>4 - Condições Cromatográficas</p> <ul style="list-style-type: none"> composição da fase orgânica pH modificador(es) sais

As fontes emissoras de radiação gama mais disponíveis são as que contêm os radionuclídeos cobalto-60 e césio-137. Apesar do tempo de meia-vida do césio-137 ser maior que o do cobalto-60, este último é preferido por liberar raios gama mais energéticos ⁹⁹.

Quando a radiação gama incide na matéria, ocorrem processos tais como excitação eletrônica e ionização. As moléculas excitadas ou ionizadas podem sofrer cisões ou reagirem com outras espécies, através de radicais livres ou íons, produzindo novas substâncias químicas. Assim, o efeito mais marcante da radiação gama em polímeros pode ser resumido na formação de produtos menores (degradação) ou maiores (entrecruzamento).

No entrecruzamento, as cadeias poliméricas são ligadas umas as outras resultando em estruturas ramificadas de massa molecular mais alta e tridimensionais, com propriedades físicas características.

Amostras de polidimetilsiloxanos quando submetidas a doses de radiação gama da ordem de 100 kGy sofrem um aumento de viscosidade ¹⁰⁰. Segundo Haken¹⁰¹, existe uma relação linear entre a viscosidade e a massa molecular dos

polialquilsiloxanos, desta forma, um aumento na viscosidade implica em um aumento da massa molecular das cadeias poliméricas.

O mecanismo de entrecruzamento não está devidamente estabelecido, sendo alvo de muitas controvérsias e, provavelmente, varia entre os diferentes tipos de polímeros. No entanto, três principais processos têm sido sugeridos ¹⁰²:

a) clivagem de uma ligação C–H em uma cadeia do polímero, seguida da abstração de um segundo átomo de hidrogênio da cadeia vizinha para produzir hidrogênio. Então, as duas cadeias radicalares combinam-se para formar a ligação entrecruzada, conforme está apresentada na Figura 5.

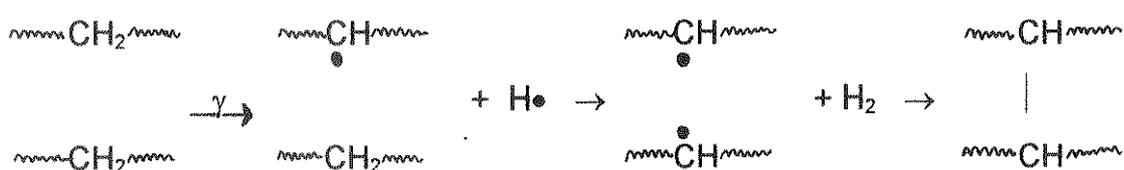


Figura 5 - Esquema representativo do entrecruzamento.

b) migração dos sítios de radicais, produzidos por clivagem da ligação C–H, ao longo das cadeias do polímero até os dois ficarem em posição adjacente para se combinarem e formarem a ligação entrecruzada.

c) reação de grupos insaturados com átomos de hidrogênio para originarem radicais poliméricos que podem combinar entre si para formarem a ligação entrecruzada.

A degradação de um polímero resulta em mudanças em suas propriedades físicas causadas por reações químicas que envolvem cisões na cadeia de polímeros. Estas reações químicas levam à redução na massa molecular, isto é, a diminuição do comprimento da cadeia ¹⁰³.

1.12. Enchimento de colunas cromatográficas

1.12.1. Fatores envolvidos no enchimento de colunas

O objetivo dos vários métodos de enchimento de colunas em CLAE é obter colunas estáveis, altamente eficientes e reprodutíveis. Porém, estes são requisitos difíceis de se conseguirem, pois na literatura são encontrados diversos métodos de

enchimento, daí a inexistência de um método amplo e universal capaz de produzir colunas sempre com o mesmo nível de qualidade. Além disso, a técnica de enchimento não só depende da metodologia empregada, como também do material de enchimento e da habilidade do usuário em encher colunas. Muitos pesquisadores concordam que o enchimento de colunas é muito mais arte que ciência.

Considerando o número de variáveis envolvidas no enchimento de colunas (Tabela 7) ¹⁰⁴, e o fato de que estas variáveis interagem entre si, é essencial otimizá-las tanto quanto possível, observando os demais parâmetros experimentais que poderão levar à obtenção de uma coluna com bom desempenho cromatográfico.

Além de todas estas variáveis, existem dois problemas que devem ser evitados durante o enchimento de colunas de diâmetro interno de 1–5 μm , com micropartículas¹⁰⁵:

1 - Sedimentação das partículas

Quando ocorre uma distribuição não homogênea do tamanho das partículas pode haver uma quantidade significativa de sedimentação durante o enchimento, resultando em um decréscimo na eficiência da coluna.

2 - Aglomeração das partículas

A medida que diminui o tamanho das partículas, a área superficial aumenta e isto leva a uma alta razão de energia de superfície/massa que origina as forças eletrostáticas na superfície, que podem, por sua vez, causar aglomeração e impedir que as partículas se sedimentem livremente no leito da coluna. Além disso, durante o enchimento feito a uma alta velocidade de impacto, cargas eletrostáticas podem ser geradas nas partículas à medida em que elas passam através de orifícios estreitos, formando aglomerados e influenciando negativamente na eficiência da coluna. A eficiência da coluna é determinada pelo tamanho dos vários aglomerados bem como pelo diâmetro das partículas mais finas. Recomenda-se não empregar misturas aquosas na preparação da suspensão, uma vez que estas podem provocar o desenvolvimento de cargas negativas na superfície da sílica, favorecendo a formação de aglomerados.

Tabela 7 - Variáveis que afetam o enchimento de colunas ¹⁰⁴.**1- Características das partículas de recheio****a) Qualidade do suporte**

- tamanho da partícula
- distribuição do tamanho da partícula
- tamanho do poro
- distribuição do tamanho do poro
- densidade da partícula
- forma da partícula (esférica ou irregular)

b) Preparação da fase estacionária

- reagentes de derivatização (mono-, di-, tricloro- ou etoxisilanos)
- reação de derivatização (monomérica ou polimérica)
- capeamento

2- Preparação da suspensão

- solvente
- qualidade do solvente
- concentração da suspensão
- temperatura da suspensão

3- Procedimento de enchimento

- pressão
- enchimento ascendente ou descendente
- geometria do reservatório de enchimento
- geometria da saída do reservatório de enchimento

4- Características da coluna

- diâmetro interno
- comprimento
- polimento das paredes do tubo
- porosidade e espessura do filtro

I.12.2. Métodos de enchimento

O enchimento de colunas para CLAE pode ser efetuado a seco ou usando uma suspensão da fase estacionária em um solvente adequado, sob alta pressão.

a) Enchimento a seco para sólidos rígidos

Este método é usado para recheiar colunas com partículas de diâmetro maior que 20 μm . Nesta técnica, a coluna é mantida em posição vertical e o material de enchimento é adicionado em pequenas porções, enquanto o tubo é vibrado manualmente ou através de um vibrador mecânico, para uma melhor compactação da fase estacionária ¹.

b) Enchimento por suspensão com alta pressão

O método de enchimento por suspensão com alta pressão é empregado para partículas de diâmetro menor que 20 μm , pois quanto maior a área superficial, maior será a probabilidade de formação de cargas eletrostáticas no enchimento a seco.

Neste método é preparada uma suspensão do material de enchimento em um líquido adequado (solvente de suspensão). A suspensão, colocada em um reservatório, é forçada a percorrer a coluna por ação de um solvente pressurizado, que se denomina solvente propulsor. Na extremidade oposta à coluna, o material de enchimento é retido por um filtro, acumulando-se até formar o leito da coluna. A pressurização do solvente é feita por uma bomba pneumática, movida a gás (N_2), que opera a pressão constante.

O solvente de suspensão possui duas funções: (a) impedir a aglomeração de partículas, mantendo-as dispersas através da redução da intensidade das forças eletrostáticas de interação e (b) impedir a sedimentação das partículas escolhendo-se um solvente ou uma mistura de solventes com densidade aproximadamente igual à das partículas.

Dependendo do tipo de solvente empregado na suspensão, as técnicas de enchimento podem ser classificadas em:

1- Densidade balanceada

Consiste no emprego de uma mistura de solventes cuja composição é ajustada para ter a mesma densidade das partículas utilizadas no enchimento, impedindo a sedimentação das mesmas ¹⁰⁶. Os solventes normalmente utilizados são hidrocarbonetos halogenados de alta densidade ^{107, 108}, altamente tóxicos e de custo elevado. Utilizando esta técnica de enchimento há a necessidade de remoção

de traços de solventes halogenados, pois os haloalcanos se decompõem facilmente, produzindo haletos, que são prejudiciais à coluna e a instrumentação. Com o passar dos anos, as experiências revelaram que esta técnica não produz bons resultados.

2- Alta viscosidade

Consiste no uso de solventes altamente viscosos, como glicol ou glicerina, que impedem a sedimentação das partículas, mas apresentam, por outro lado, uma alta resistência a vazão através da coluna, o que exige altas pressões e um tempo relativamente longo para o enchimento ¹⁰⁶.

3- Baixa viscosidade

A suspensão é feita com solventes de viscosidade baixa, como éter ou pentano. Nesta técnica, consegue-se uma velocidade de vazão alta, o que resulta em um tempo rápido de enchimento ¹⁰⁹.

4- Densidade não balanceada

Tetracloroeto de carbono, acetona, metanol e tetraidrofurano são alguns dos solventes usados nesta técnica. O procedimento de enchimento é conduzido rapidamente para evitar a sedimentação das partículas.

O que se observa é que existem controvérsias a respeito da utilização das técnicas descritas acima, o que leva o usuário a fazer a sua própria adaptação, dependendo do tipo de enchimento a ser realizado.

Inúmeras contradições são encontradas quanto a concentração da suspensão, sendo que alguns apontam o uso de altas concentrações como o mais indicado ¹⁰⁴ e outros consideram que altas concentrações devem ser evitadas ¹¹⁰. As concentrações variam numa faixa de 1–30% m/v.

I.13. Avaliação de colunas

Tanto em análises de rotina como em pesquisa, todas as colunas adquiridas prontas ou preparadas pelo usuário devem ser testadas antes de serem usadas.

A avaliação do desempenho da coluna é feita através da análise de parâmetros cromatográficos, que podem ser calculados a partir de valores extraídos do cromatograma obtido após a injeção de amostras conhecidas, como mostra a Figura 6.

O **tempo de retenção de um soluto**, t_R , é o tempo que o soluto gasta desde o momento da injeção até a saída do máximo do pico.

O tempo de retenção de um soluto, t_R , e o tempo de retenção de um soluto não retido (tempo de retenção da fase móvel), t_M , podem ser obtidos diretamente do cromatograma, se o sistema possui um integrador eletrônico, ou a partir da expressão (1), se o sistema utiliza um registrador potenciométrico:

$$t_R = d_R / f \quad \text{e} \quad t_M = d_M / f \quad (1)$$

onde: f = velocidade do papel do registrador

d_R = distância de retenção do soluto

d_M = distância de retenção de um soluto não retido ou da FM

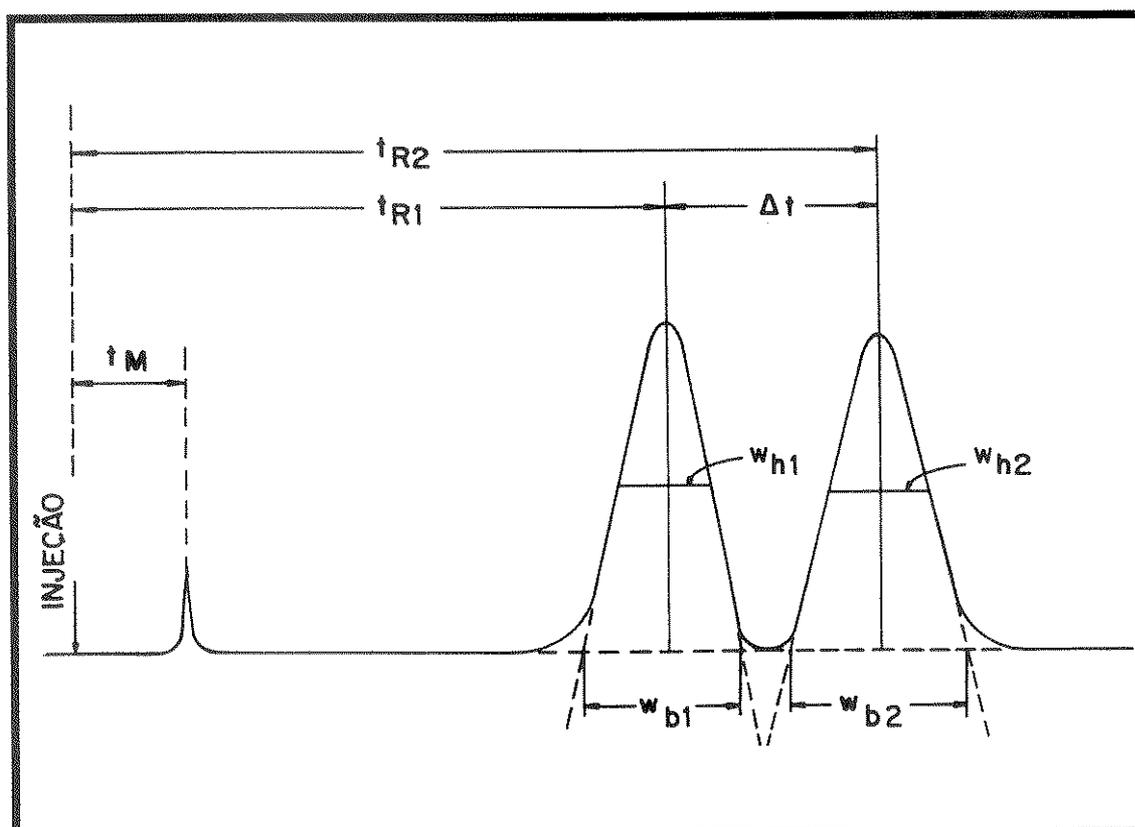


Figura 6 - Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.

Desse modo, pode-se calcular o **tempo de retenção ajustado** (tempo que o soluto fica retido na fase estacionária), t_R' , através da expressão (2):

$$t_R' = t_R - t_M \quad (2)$$

Outro parâmetro que também diz respeito à retenção de um soluto é o **fator de retenção, k**, que é determinado pela razão entre os tempos em que as

moléculas do soluto ficam retidas na FE e percorrendo a coluna na fase móvel, de acordo com a expressão (3):

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (3)$$

Os valores ideais de k devem variar entre 2 e 10. Valores maiores que 10 significam uma forte interação do soluto com a FE e, conseqüentemente, um longo tempo de análise. Por outro lado, valores de k menores que 2 implicam em pouca interação do soluto com a fase estacionária, o que pode ser prejudicial à análise ².

A **resolução**, R_S , refere-se à separação entre dois picos adjacentes e pode ser obtida pela expressão (4):

$$R_S = 2 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right) = 1,177 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right) \quad (4)$$

onde:

t_{R1} e t_{R2} = tempo de retenção de dois picos adjacentes envolvidos no cálculo

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

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

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

Um outro parâmetro cromatográfico 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, conforme a expressão (5):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (5)$$

O fator de separação é uma medida de seletividade de um sistema cromatográfico. Assim, quanto mais seletivamente a FE reter o segundo componente que está sendo analisado, maior será o fator de separação. Se $\alpha=1$, não existem diferenças termodinâmicas entre os dois componentes em um dado sistema e eles não podem ser separados. Entretanto, quando $\alpha > 1$ não significa que os picos estão totalmente separados, porque eles podem ser largos e estarem

parcialmente sobrepostos. Consequentemente, não somente com valores elevados de α se consegue separação, é necessário também que os picos sejam estreitos.

Um dos parâmetros utilizados para avaliar a eficiência de uma coluna é o **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 (6):

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (6)$$

No cromatograma, a eficiência é observada através do formato do pico. Quanto mais estreito for o pico cromatográfico, maior a eficiência da coluna na análise do soluto em estudo.

A expressão 6 só é válida para picos simétricos. Para bandas assimétricas aumentam-se os erros no cálculo de N e a eficiência não pode ser expressa por este valor. É necessário então, calcular o **fator de assimetria do pico, A_s** , a 10% da sua altura do pico, como mostra a Figura 7⁴. O valor de A_s deve ficar no intervalo de 0,9 a 1,2¹¹¹. Embora menos desejáveis, valores de 1,6 são admitidos⁴. Como uma regra geral, colunas com fator de assimetria acima de 1,6 devem ser descartadas^{2, 29}.

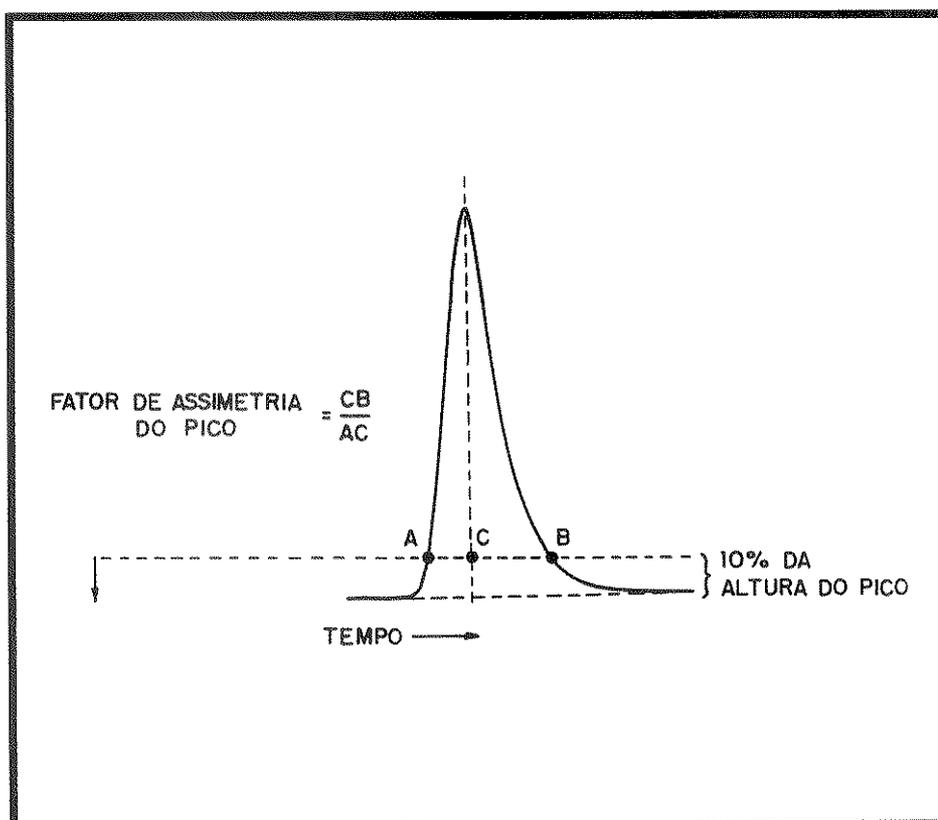


Figura 7 - Medida e cálculo do fator de assimetria do pico.

A Tabela 8 apresenta os valores limites de eficiência de colunas disponíveis comercialmente recheadas com fase reversa, de acordo com o tamanho das partículas da FE ²⁹. Abaixo deste limite, a coluna deve ser descartada ou recheada novamente, pois sua eficiência é inferior ao valor médio que se conseguiria obter com uma coluna similar.

Tabela 8 - Eficiência de colunas disponíveis comercialmente ²⁹, recheadas com fase reversa porosa.

Tamanho da partícula (μm)	Limite de eficiência (pratos/m)
10	12.000 – 20.000
5	35.000 – 45.000
3	80.000 – 100.000

Como o número de pratos, calculado para um determinado soluto, está relacionado com as dimensões da coluna sob avaliação, torna-se difícil usar este parâmetro para comparar colunas de comprimentos diferentes. Para isto emprega-se a **altura equivalente a um prato, H**, que é a razão entre o comprimento da coluna (L) e o número de pratos, conforme a expressão (7):

$$H = \frac{L}{N} \quad (7)$$

A eficiência de uma coluna, expressa pela altura equivalente a um prato, também pode ser determinada pela equação de van Deemter (8),

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C \cdot \mu \quad (8)$$

onde μ é a velocidade linear da fase móvel, obtida pela equação (9):

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad (9)$$

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-se 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 FM e pode ser minimizado empregando-se altas velocidades lineares da FM. Como o coeficiente de difusão em gases é bem maior que em líquidos, este termo é mais importante em CG do que em CLAE.

O termo C ($C_M + C_S$), transferência de massa, corresponde ao alargamento da banda devido à dificuldade de transferência de massa do soluto entre a FM e a FE. Um fator que minimiza o termo C é a espessura do filme líquido que recobre as partículas do suporte; quanto maior a espessura deste filme, maior será o termo C e menor será a eficiência da coluna. Em CLAE, como a FM participa do processo cromatográfico, o termo C se encontra subdividido em C_M e C_S , onde C_M é a transferência de massa na FM e C_S , a transferência de massa na FE.

A Figura 8 ilustra uma curva típica da equação de van Deemter, assim como a contribuição de todos os termos da equação ¹¹². Uma interpretação desta curva é que existe uma vazão (F) ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ($\mu_{\text{ótima}}$), na qual H terá um valor mínimo e, conseqüentemente, corresponde ao valor máximo de eficiência da coluna.

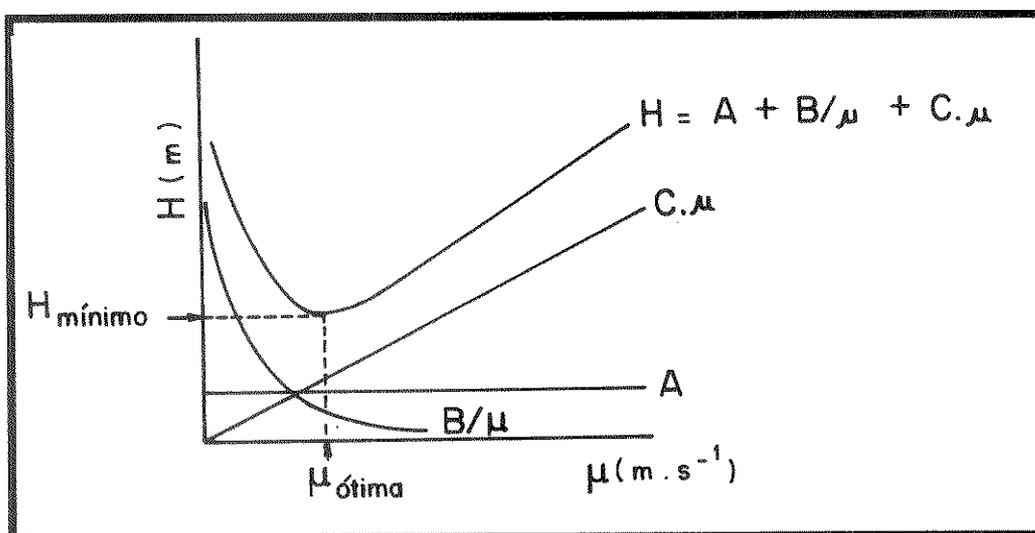


Figura 8 - Curva da equação de van Deemter mostrando a contribuição dos termos e a velocidade linear ótima ¹¹²

Portanto, na caracterização cromatográfica de uma coluna aconselha-se construir a curva de van Deemter para determinar a vazão que se deve trabalhar a fim de obter a eficiência máxima da coluna e recomenda-se que analise todos os parâmetros citados, especificando-se os compostos usados nos cálculos de tais parâmetros.

Capítulo II

OBJETIVOS E METODOLOGIA



II.1. Objetivos

Este trabalho dá continuidade ao projeto de desenvolvimento de novas FEs sorvidas (não-ligadas) e imobilizadas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) sendo que a origem das fases não-ligadas baseia-se em Cromatografia Líquido-Líquido (CLL). Nos trabalhos anteriores ^{49, 50, 113}, o polímero, poli(metiloctilsiloxano), encontrava-se sorvido nos poros da sílica e as colunas recheadas com este material apresentaram bom comportamento cromatográfico e boa estabilidade, sendo a eficiência similar às colunas recheadas com fases estacionárias quimicamente ligadas. Além da fase sorvida, foi preparada a imobilizada por meio de radiação gama, que também forneceu bons resultados.

No entanto, nestes trabalhos foram utilizados somente um tipo de sílica, não sendo possível obterem informações suficientes das influências de variáveis tais como a natureza das partículas porosas utilizadas como suporte, a quantidade de polímero depositada sobre sílicas com características diferentes, as condições físicas e químicas da superfície da sílica, o enchimento das colunas, etc.

Assim sendo, um dos objetivos deste trabalho foi pesquisar a influência das características do suporte de sílica, tais como tamanho e forma das partículas, volume e diâmetro dos poros e área superficial específica, na eficiência de colunas recheadas com dois tipos de FE: (a) sorvida e (b) imobilizada.

Um outro objetivo foi caracterizar, por meio de métodos químicos, físicos e cromatográficos a superfície da sílica modificada, antes e/ou depois da imobilização do líquido polimérico.

O objetivo principal foi desenvolver uma tecnologia de preparação de FEs que resultasse em colunas com eficiência e estabilidade semelhantes às das comerciais.

Cabe salientar que foi dada uma ênfase especial às FEs sorvidas, preparadas através da sorção de poli(metiloctilsiloxano) nos poros da sílica, devido ao seu grande potencial no campo da cromatografia líquida moderna.

II.2. Metodologia

Para alcançar os objetivos descritos no item anterior, o polímero poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) foi depositado sobre a superfície de sílica porosa, blindando alguns grupos silanóis de forma a desativá-los gerando as fases sorvidas

e posteriormente, foi imobilizado por meio de radiação gama. Foram preparadas várias fases estacionárias C8 a partir de sílicas com diferentes características.

O presente trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- 1- Preparação do corpo da coluna cromatográfica.
- 2- Preparação das FEs sorvidas, através do método de evaporação do solvente ¹¹⁴.
- 3- Preparação das FEs imobilizadas, através do método de evaporação do solvente seguido de imobilização por meio de radiação gama.
- 4- Enchimento das colunas com as FEs, utilizando-se para tal o método por suspensão com alta pressão.
- 5- Caracterização e avaliação das FEs através de testes químicos e físicos, tais como extração por solventes, análise elementar de carbono, titulação potenciométrica, espectroscopia no infravermelho, análise termogravimétrica, medidas de área superficial específica, medidas de volume específico dos poros, espectrometria de ressonância magnética nuclear, espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica, microscopia eletrônica de varredura.
- 6- Avaliação cromatográfica das colunas recheadas com as FEs, utilizando-se para isto misturas sintéticas.
- 7- Teste de estabilidade química das colunas cromatográficas através de lavagem com mistura de solventes.

Capítulo III

PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Materiais

III.1.1. Reagentes e solventes

- acetona p.a., Merck
- ácido clorídrico p.a., Cinética Química
- ácido fosfórico p.a., Merck
- água deionizada, sistema Milli-Q, Millipore
- anilina p.a., Merck
- acetilacetona, Carlo Erba
- benzeno p.a., Merck
- diclorometano p.a., Merck
- diclorometano para cromatografia, Lichrosolv, Merck
- fosfato de sódio dibásico
- hidróxido de sódio
- isopropanol p.a., Merck
- metanol p.a., Merck
- metanol para cromatografia, Lichrosolv e Omnisolv, Merck
- N,N-dimetilanilina
- N,N-dietilanilina
- naftaleno p.a., Carlo Erba
- 1-nitronaftaleno, Aldrich
- tetracloreto de carbono p.a., Merck
- tolueno p.a., Cinética Química
- tolueno, purificado na planta piloto do IQ/UNICAMP
- o-, m- e p-toluidina

III.1.2. Gás empregado

- nitrogênio, White Martins e Oxigênio do Brasil

III.1.3. Fase estacionária líquida

- poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), produto PS-140, da Hüls America (USA)

com as seguintes características ¹⁰⁰:

• viscosidade (em centistokes a 25°C)	600–1000
• massa molecular	6200
• gravidade específica (a 25°C)	0,91
• índice de refração (a 25°C)	1,445
• tensão superficial (dina/cm)	30,4

III.1.4. Suportes cromatográficos

Os suportes cromatográficos utilizados foram sílicas com diferentes características que estão apresentados na Tabela 9. As medidas de área superficial específica (S) e volume específico dos poros (V_p) foram feitas por nós, usando, respectivamente, o método de BET (Brunauer, Emmett e Teller) ^{32, 115} e de intrusão de mercúrio ³².

Tabela 9 - Caracterização das sílicas: fabricante ou fornecedor, forma da partícula (irregular ou esférica), tamanho médio das partículas (t_p), diâmetro médio dos poros (d_p), área superficial específica (S) e volume específico dos poros (V_p).

sílica	fabricante/fornecedor	forma da partícula	t _p (μm)	d _p (nm)	S (m ² g ⁻¹)	V _p (mL g ⁻¹)
Davisil	Alltech Associates	irregular	10	15	237	1,6
Sigma	Sigma	irregular	10	6	393	1,1
Lichrosorb Si-100	Merck	irregular	10	10	290	1,7
Lichrosorb Si-60	Merck	irregular	10	6	267	1,2
Lichrosorb Si-60	Merck	irregular	7	6	305	1,2
Lichrosorb Si-60	Merck	irregular	5	6	402	1,2
Spherisorb	Phase Separations	esférica	8	8	149	1,0
Spherisorb	Phase Separations	esférica	5	8	186	0,9

III.1.5. Coluna comercial

- Hypersil MOS (C8), com tamanho de partículas de 5 μm, comprimento de 100 mm e diâmetro interno de 4,6 mm, da Hewlett Packard.

III.1.6. Coluna empregada para CLAE

- comprimento de 125 mm e diâmetro interno de 3,4 mm, recheada com as fases estacionárias preparadas.

III.1.6.1. Confeção e polimento da superfície interna do corpo das colunas cromatográficas

O corpo das colunas cromatográficas foi confeccionado na oficina mecânica da UNICAMP, a partir de tubos de aço inoxidável 316L, sem costura, trafilado, com diâmetro externo de 9,5 mm e interno de 3,4 mm. A superfície interna do corpo da coluna foi polida usando uma técnica desenvolvida em nosso laboratório¹¹⁶.

III.2. Equipamentos

- a) cromatógrafo a líquido, marca Waters, constituído de:
 - bomba de alta pressão, recíproca do tipo pistão cabeça dupla, modelo 510
 - detector UV/Vis de comprimento de onda variável entre 190 a 700 nm, cela de 14 µL de volume, modelo 481
 - integrador, modelo 740
 - injetor pneumático SSI 3XL, com amostrador de 10 µL, modelo 02-0240
- b) cromatógrafo de permeação em gel, marca Waters, constituído de:
 - bomba de alta pressão, recíproca do tipo pistão cabeça dupla, modelo 510
 - detector de índice de refração, modelo 410
 - injetor U6K
 - forno para coluna
 - sistema de aquisição de dados utilizando software Millennium
- c) bomba de enchimento de colunas, marca Haskel, com faixa de pressão disponível entre 6,9 a 344,8 MPa, modelo 51769
- d) medidor de área superficial Micromeritics, Flow Sorb II, modelo 2300
- e) espectrofotômetro de infra-vermelho Perkin Elmer, modelo FT-IR 1600
- f) analisador elementar Perkin Elmer, modelo 2400
- g) analisador termogravimétrico Du Pont, modelo 9900, módulo 951
- h) espectrômetro de ressonância magnética nuclear de ²⁹Si e ¹³C, Bruker AC-300/P

- i) espectrômetro de ressonância paramagnética eletrônica Varian, Modelo E-12
- j) microscópio eletrônico de varredura JEOL JSMT-300
- k) fonte de cobalto-60 JS 6300, tipo industrial, fabricada pela AECL (Atomic Energy of Canada Limited), instalada na IBRAS-CBO - Indústria Cirúrgica e Ótica S.A. (Campinas - S.P.)
- l) ultra-som Sonifier B-12 e Thornton
- m) agitador "Roto-torque", Cole Parmer Instrument Company
- n) balança analítica, Fisher Scientific, modelo A-250
- o) pH-metro Micronal, modelo B 374

III.3. Preparação das fases estacionárias

A - FASES ESTACIONÁRIAS SORVIDAS

III.3.1. Recobrimento do suporte

As sílicas utilizadas na preparação das FEs foram ativadas através de aquecimento a 150°C por 24 horas. Este tratamento teve como finalidade deixar livre os grupos silanóis da superfície da sílica, através da remoção das moléculas de água fracamente adsorvidas.

O recobrimento do suporte pela fase líquida foi feito impregnando-se o suporte pelo método da evaporação ¹¹⁴, sendo utilizado a relação massa/massa.

Este método consistiu em dissolver uma quantidade determinada de PMOS em um volume conhecido de diclorometano. A sílica, também em quantidade determinada, foi adicionada à solução de PMOS. Esta adição foi feita lentamente, sob agitação, para permitir que todas as partículas da sílica ficassem em contato com o PMOS dissolvido no diclorometano. Esta mistura ficou sob agitação lenta por 3 horas e, depois, o solvente foi evaporado na capela.

III.3.2. Quantidade de PMOS sobre o suporte

Um dos fatores primordiais a ser determinado a priori, ao preparar-se uma FE, é a quantidade de PMOS que se deve colocar sobre o suporte ou seja, a porcentagem de carregamento (loading). Esta quantidade parece depender das

características do suporte. Para isso, foram preparadas FEs na faixa de 30–50% de PMOS em relação à quantidade de fase preparada, baseado no trabalho de Anazawa e Jardim ⁴⁹, onde foram obtidos os melhores resultados. No entanto, algumas fases foram preparadas com 40 e 50% devido a pouca quantidade de suporte disponível.

Na Tabela 10 estão apresentadas as FEs preparadas com as respectivas porcentagens de carregamento e as correspondentes massas de PMOS e sílicas utilizadas na preparação. Para 5 g de FE foram utilizados 60 mL de diclorometano. Para as sílicas com maior quantidade disponível, foi preparada uma maior quantidade de FE.

Tabela 10 - FEs preparadas para a escolha da quantidade ideal de PMOS sobre sílica.

sílica	t _p (μm)	% carregamento	massa utilizada (g)	
			PMOS	sílica
Davisil	10	30	2,4	5,6
		40	3,2	4,8
		50	4,0	4,0
Sigma	10	30	2,4	5,6
		40	3,2	4,8
		50	4,0	4,0
Lichrosorb Si-100	10	40	2,0	3,0
		50	2,5	2,5
Lichrosorb Si-60	10	40	1,6	2,4
		50	2,0	2,0
Lichrosorb Si-60	7	40	2,0	3,0
		50	2,5	2,5
Lichrosorb Si-60	5	40	2,4	3,6
		50	4,0	4,0
Spherisorb	8	30	1,5	3,5
		40	3,2	4,8
		50	2,0	2,0
Spherisorb	5	30	1,8	4,2
		40	3,2	4,8
		50	2,0	2,0

B - FASES ESTACIONÁRIAS IMOBILIZADAS

Quantidades determinadas de FE sorvida, preparada na porcentagem ideal de carregamento, foram colocadas em ampolas de vidro pyrex, as quais foram seladas em condição ambiente, utilizando-se um maçarico. As amostras seladas

foram irradiadas por uma fonte de cobalto-60, nas doses de 80 e 120 kGy, que foram as que forneceram melhores resultados no trabalho de Anazawa ¹¹³. As FEs preparadas a partir das sílicas Lichrosorb Si-100 e Si-60 (10 e 7 μm) foram irradiadas somente na dose de 120 kGy, devido a disponibilidade de sílica ser pequena.

III.4. Técnicas empregadas para avaliação das FEs

III.4.1. Testes químicos com as FEs

III.4.1.1. Extração por solventes

Com a finalidade de determinar a quantidade de PMOS que pode ser removida da FE, foram feitas extrações sucessivas com as FEs em refluxo com os solventes metanol, tolueno e diclorometano, por 6 horas com cada solvente, usando uma modificação do método de Sanchez et al. ¹¹⁷. O metanol foi usado porque ele é um solvente polar no qual o PMOS é levemente solúvel; o tolueno porque é um solvente apolar no qual o PMOS é moderadamente solúvel e o diclorometano por ser o solvente que solubiliza o PMOS.

O método consistiu em pesar aproximadamente 0,3 g (com precisão de $\pm 0,1$ mg) de FE em um pesa-filtro de 30 mL, levar à estufa para secar até peso constante. Em seguida, o pesa-filtro contendo a amostra foi introduzido no interior de um extrator Soxhlet de 500 mL sobre um suporte de vidro (Figura 9). A fim de se direcionarem as gotas do solvente provenientes do condensador sobre a amostra, foi colocado um funil de vidro com abas que o sustentavam no pesa-filtro. Após o término de cada extração, o pesa-filtro foi removido do conjunto e mantido em capela para que o solvente evaporasse. Feito isto, o pesa-filtro com a FE foi levado à estufa, à 100°C, para secar. Depois de seca a fase, o pesa-filtro foi resfriado em dessecador e pesado. O processo foi repetido até massa constante.

III.4.1.2. Análise elementar

Amostras das FEs sorvida e imobilizada foram submetidas a análise elementar para determinar o teor total de carbono. O método empregado utiliza a

combustão para converter o carbono em CO_2 , que é então medido em função de sua condutividade térmica.

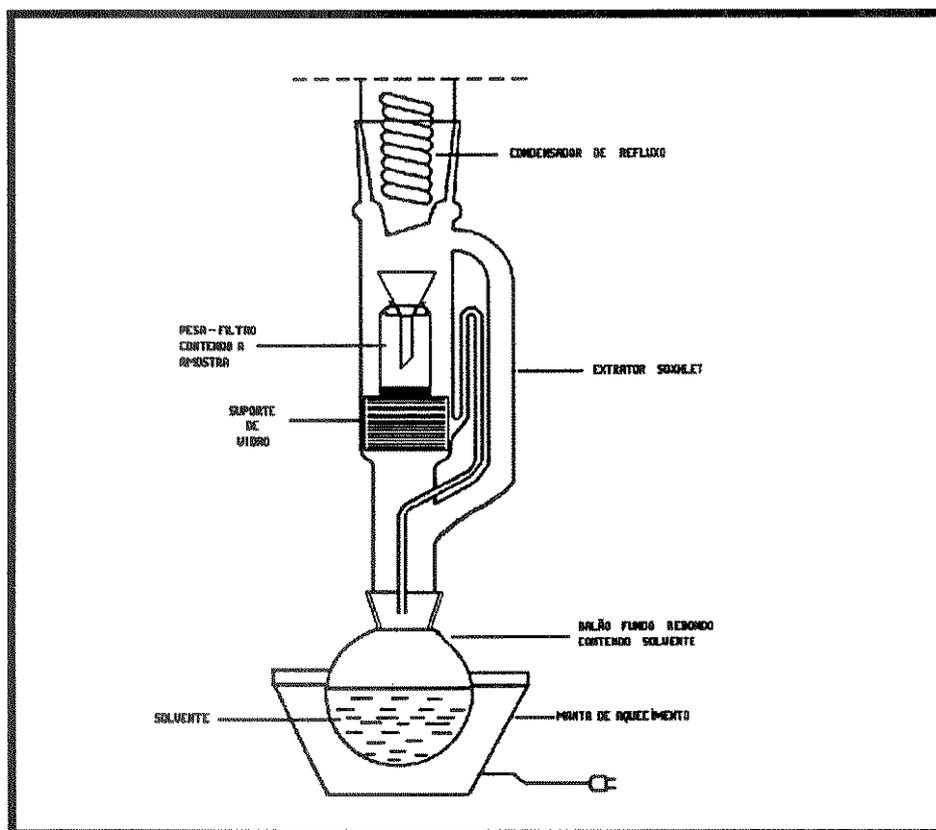


Figura 9 - Esquema da aparelhagem utilizada para a extração.

III.4.1.3. Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica foi feita para algumas sílicas e FEs, conforme a disponibilidade delas, com o objetivo de determinar a quantidade de grupos silanóis existente.

0,5 g de sílica suspensa em 10 mL de solução de NaCl 10% foram titulados com NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. No caso das FEs, a titulação foi realizada suspendendo-se 0,5 g de FE em 10 mL de solução de NaCl 10% contendo 3 mL de isopropanol. As titulações foram realizadas em pH 9, usando um eletrodo de vidro e um de calomelano como referência ^{118,119}.

III.4.2. Testes físicos com as FEs

III.4.2.1. Espectroscopia no infravermelho

O espectro de infravermelho do polímero foi obtido a partir de um filme da amostra em cela de cloreto de sódio. Para obtenção dos espectros das diversas FEs foram preparadas pastilhas de KBr, mantendo-se constante nos valores de 0,4 e 79,6 mg as massas de sílica, contidas nas FEs, e as de KBr, respectivamente, e variou-se a massa de PMOS segundo a sua porcentagem. Assim, para as fases com 30, 40 e 50% de PMOS utilizaram-se respectivamente 0,5714; 0,6666 e 0,8000 mg de FE.

Os espectros foram obtidos no intervalo de 4.000 a 500 cm^{-1} e analisados a fim de verificar o grau de recobrimento dos grupos silanóis da sílica e a existência ou não do PMOS, através da presença de determinados grupos funcionais que os caracterizam.

III.4.2.2. Medidas de área superficial específica (S)

A área superficial específica fornece a extensão da superfície do material analisado e é expresso em relação à sua massa ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$).

Para se obter a medida da área superficial específica das FEs sorvidas, imobilizadas e das sílicas foi utilizado o método de BET, que se baseia na determinação do volume de nitrogênio adsorvido a diversas pressões, na temperatura do nitrogênio líquido ^{32, 116}.

III.4.2.3. Medidas de volume específico dos poros (V_p)

O volume específico dos poros (V_p) é a quantidade de líquido adsorvido que preenche o volume total dos poros por grama de adsorvente e é usualmente expresso em mL g^{-1} . A determinação do mesmo foi feita pelo método da intrusão de mercúrio ³².

As medidas de volume específico dos poros foram feitas para todas as sílicas e algumas FEs sorvidas.

III.4.2.4. Análise termogravimétrica (ATG)

A análise termogravimétrica foi feita para as fases sorvidas e imobilizadas, para verificar as suas respectivas estabilidades térmicas. Para isso, utilizou-se um

analisador térmico onde, através de uma microbalança, se obteve a porcentagem de perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. Neste teste utilizaram-se aproximadamente 6 mg de FE e a análise foi realizada sob atmosfera de nitrogênio, com velocidade de aquecimento constante de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, desde a temperatura 100 até 900°C .

III.4.2.5. Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

A espectrometria de ressonância magnética nuclear foi utilizada a fim de averiguar como o PMOS se encontra disposto sobre a superfície da sílica, antes e após a irradiação.

Os espectros de ^{29}Si e ^{13}C CP-MAS-NMR (ressonância magnética nuclear com polarização cruzada segundo rotação em um ângulo mágico) no estado sólido de algumas sílicas e FEs foram obtidos em 59,62 e 75,46 MHz, respectivamente, usando um rotor de zircônio (7 mm d.i.) contendo aproximadamente 1 g de amostra. A rotação segundo um ângulo mágico foi realizada em uma velocidade de rotação de 4 kHz. O tempo de contato de polarização cruzada foi de 10 ms e o de relaxação de 5 s. Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e referenciados ao líquido tetrametilsilano.

Os espectros de ^{13}C do PMOS foram obtidos em solução de CCl_4 usando como referência externa D_2O , nas seguintes condições: frequência (SF): 75,46 MHz, largura espectral (SW): 181518,519 Hz, número de scans (NS): 1026, largura de pulso (PW): 3,5 μs , tempo de aquisição (AQ): 1,7 s e tempo de relaxação (RD): 1 s.

III.4.2.6. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Com o objetivo de verificar a presença ou não de radicais livres, foi obtido o espectro da FE com 40% de PMOS-Davisil, 80 kGy, em um espectrômetro operando em 9,4 GHz.

III.4.2.7. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Esta técnica foi utilizada com o intuito de verificar a forma das partículas do suporte, a sua distribuição de tamanho, a presença do polímero sobre a sílica e o aspecto da FE preparada.

A preparação das amostras para microscopia eletrônica de varredura consistiu em recobrir a amostra com uma fina camada de ouro, onde o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo. O tempo de metalização foi de 5 minutos.

III.4.3. Testes cromatográficos

III.4.3.1. Enchimento de colunas

III.4.3.1.1. Preparação da bomba de enchimento

As colunas foram recheadas usando-se o sistema mostrado na Figura 10, que consiste basicamente de duas partes:

A- coluna, reservatório de suspensão e reservatório de CCl_4

B- bomba de enchimento Haskel

Antes de iniciar o enchimento deve-se verificar se o sistema apresenta vazamentos ou bolhas de ar, pois isto pode resultar em colunas com baixas eficiências. Para isto, montou-se o reservatório de CCl_4 e o de suspensão acoplado à coluna com filtro, como mostrado na Figura 11. O reservatório de CCl_4 foi conectado à bomba. A seguir, colocou-se metanol filtrado no reservatório de solvente. Com a válvula de solvente fechada, acionou-se a válvula de controle de pressão do gás até o valor desejado para o enchimento. Feito isto, ligou-se a bomba mantendo a válvula do solvente e a válvula de controle de pressão do gás abertas para verificar a existência de vazamentos e eliminar as possíveis bolhas de ar presentes no sistema. Finalizada esta etapa, desligou-se a bomba, desconectou-se a coluna juntamente com o redutor e a conexão, e o reservatório de CCl_4 da bomba, retirou-se o metanol contido nos dois reservatórios e lavou-os com CCl_4 . Deixou-se o reservatório de CCl_4 cheio com este solvente e conectou-o a bomba de enchimento. Também ligou-se a coluna ao reservatório de suspensão, finalizando assim, a etapa de preparação do sistema de enchimento.

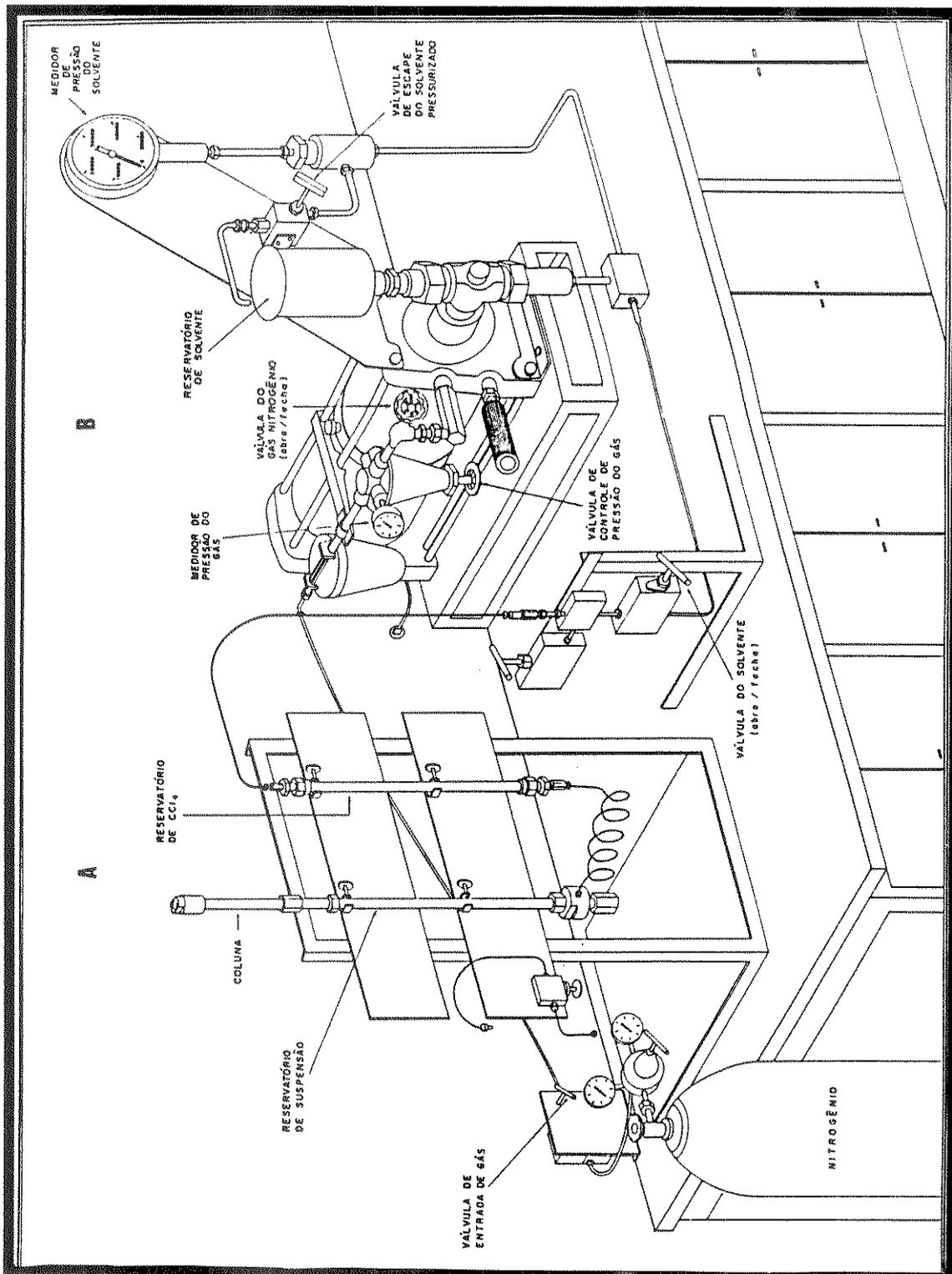


Figura 10 - Esquema completo do sistema de enchimento: (A) coluna, reservatório de suspensão e reservatório de CCl₄ e (B) bomba de enchimento, Haskel

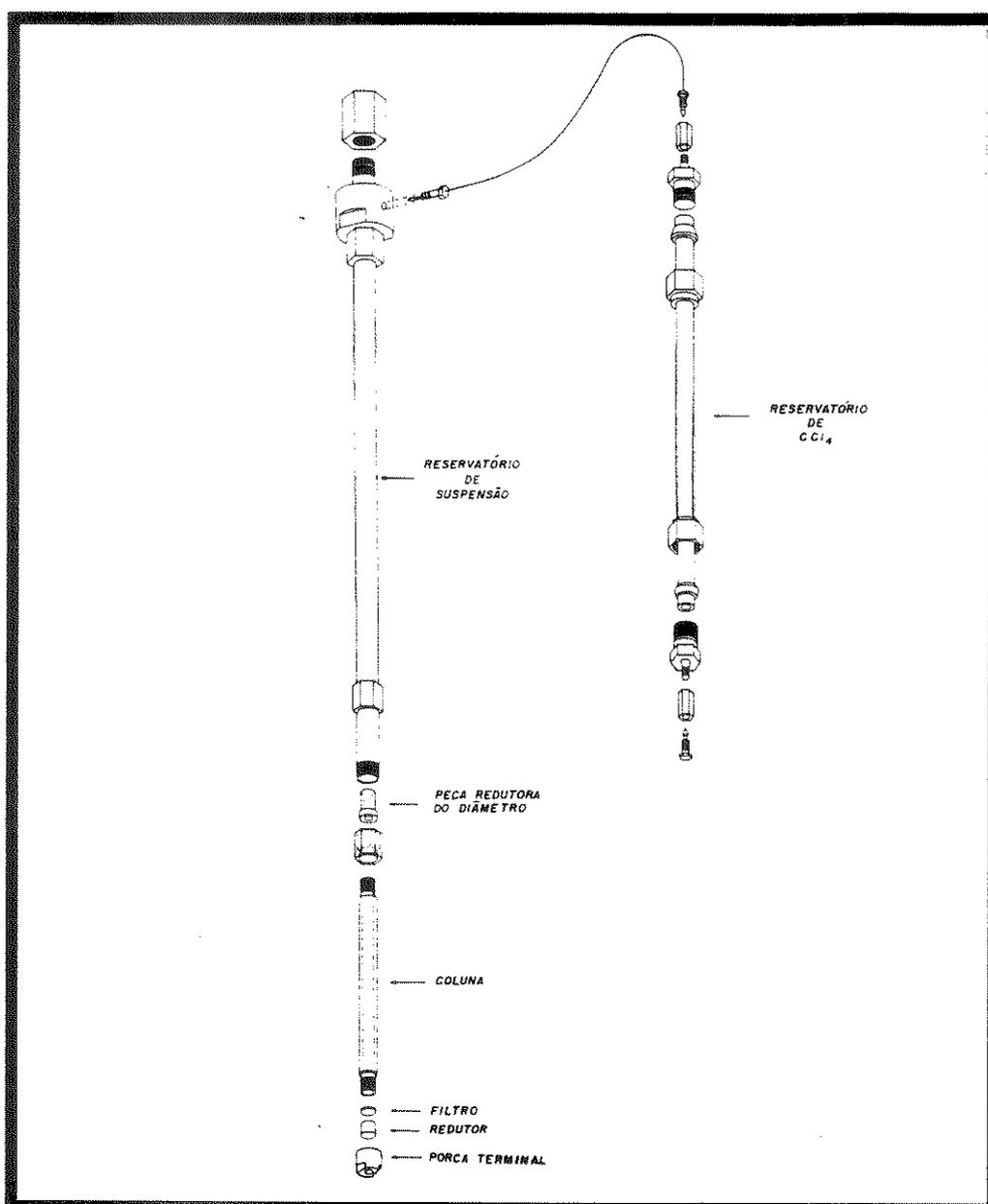


Figura 11- Esquema detalhado da coluna, do reservatório de suspensão e de CCl_4

III.4.3.1.2. Procedimento de enchimento

Antes de iniciar o enchimento, preparou-se uma suspensão contendo FE e CCl_4 , numa concentração de 10%, em um tubo de vidro pyrex com rosca e submeteu-o à agitação lenta por 14 horas, em um agitador "Roto-Torque".

O procedimento utilizado no enchimento de coluna foi:

- 1- Transferiu-se a suspensão para o seu reservatório e fechou-o em seguida.
- 2- Ligou-se a bomba de enchimento, abrindo-se a válvula de gás nitrogênio e a válvula de solvente e deixou-se passar 80 mL de metanol.
- 3- Fechou-se a válvula de solvente, esperou-se o metanol parar de gotejar da coluna e abriu-se novamente a válvula de solvente por 20 segundos. Esta etapa foi

repetida por mais duas vezes com a finalidade de obter um melhor assentamento da FE.

- 4- Deixou-se a coluna em repouso por 20 minutos, para despressurização do sistema.
- 5- Desconectou-se a coluna do reservatório. Na extremidade da coluna que estava ligada ao reservatório, adaptou-se um terminal com filtro e fecharam-se as duas extremidades.

A pressão de enchimento foi de 37,9 MPa (5.500 psi).

III.4.3.1.3. Escolha da concentração da suspensão

A concentração da suspensão para enchimento de colunas com FEs preparadas a partir de sílicas irregulares foi de 10% (m/v), determinada em trabalho anterior ¹¹³. Já para as sílicas esféricas foram realizados testes com concentração de suspensão de 10 e 20% (m/v). Como solvente de suspensão foi utilizado o tetracloreto de carbono (CCl₄) e MeOH como solvente propulsor.

III.4.3.2. Escolha dos componentes da fase móvel e da proporção destes na mistura

As fases móveis utilizadas em CLAE devem apresentar os seguintes requisitos: ser de alto grau de pureza, dissolver a amostra sem decompô-la, não dissolver ou decompor a FE, ter baixa viscosidade, ser compatível com o tipo de detector utilizado e ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Como requisitos secundários deve ser de baixa toxidez e ser disponível comercialmente a um preço acessível.

Como a FE preparada é apolar, selecionou-se uma FM mais polar. Os solventes disponíveis comercialmente e mais utilizados são: metanol, acetonitrila e tetraidrofurano. Como o metanol apresenta seletividade adequada, é menos tóxico e possui menor custo, ele foi o solvente orgânico escolhido.

A FM empregada neste trabalho foi uma mistura de metanol e água e a proporção foi determinada através da avaliação cromatográfica de algumas colunas. A proporção de FM variou de 70:30 a 50:50 (v/v).

O metanol utilizado foi de grau HPLC, Lichrosolv e mais tarde, Omnisolv, e a água foi obtida através do sistema Milli-Q, da Millipore.

A FM foi filtrada com filtro Millipore (GVWP 04700, 0,22 μ , 47 mm) e desgaseificada no ultra-som por aproximadamente 5 minutos.

A vazão da FM foi selecionada a partir de uma análise das curvas de van Deemter.

III.4.3.3. Condicionamento das colunas

Depois de recheada, é importante fazer o condicionamento da coluna para que ocorra um equilíbrio entre as fases móvel e estacionária. Caso não haja esse equilíbrio, nota-se uma flutuação na linha de base no sistema de registro ou variações nos tempos de retenção.

O tempo de condicionamento varia de coluna para coluna mas, de um modo geral, não se deve tentar abreviar o condicionamento empregando vazão de FM alta, em função do aumento da pressão, que além de desnecessário, poderia causar danos irreversíveis tanto à coluna quanto ao instrumento. O que se deve observar é o volume de FM empregado no condicionamento.

Assim, após o enchimento das colunas, estas foram condicionadas com a FM a ser utilizada na análise, a uma vazão de 0,1 mL min⁻¹, por pelo menos quatro horas. O condicionamento foi realizado sem acoplar a coluna ao sistema de detecção para evitar a possibilidade de partículas pequenas provocarem obstruções na tubulação de entrada ou saída do detector ou penetrarem na cela do detector, o que por sua vez ocasionaria um aumento de pressão ou até mesmo a ruptura das janelas da cela do detector.

Para as colunas utilizadas por vários dias consecutivos, cerca de 20 a 30 minutos de condicionamento, antes de iniciar as análises, foram suficientes.

III.4.3.4. Avaliação das colunas

III.4.3.4.1. Misturas testes utilizadas

As colunas foram avaliadas cromatograficamente utilizando as seguintes misturas orgânicas sintéticas:

- I: acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno
- II: acetilacetona, nitronaftaleno e naftaleno

- III: anilina, o-, m- e p- toluidina e N,N-dimetilanilina

- IV: anilina, N,N-dimetilanilina e N,N-dietilanilina

A escolha da mistura I foi baseada em trabalhos anteriores^{120, 121} e tem por objetivo avaliar as colunas quanto a sua performance frente a compostos polares e apolares.

A mistura II foi proposta por Verzele⁷¹ e Verzele e Dewaele⁷², e ela avalia as características hidrofóbicas da coluna através do pico do naftaleno, o grau de atividade ou desativação dos grupos silanóis residuais através da razão dos tempos de retenção do nitronaftaleno e naftaleno e a atividade de traços de metal através do formato e intensidade do pico da acetilacetona.

A função dos componentes da mistura III são: anilina (como base fraca), N,N-dimetilanilina (como base forte) e os isômeros orto, meta e para-toluidina como indicadores especiais das interações silanofílicas, uma vez que as propriedades hidrofóbicas destas três anilinas são idênticas, mas seus valores de pK_b são diferentes (entre 4,4 e 5,1) devido a hiperconjugação. Segundo Engelhardt e Jungheim¹²², as colunas podem ser consideradas boas se as três toluidinas isoméricas (orto, meta e para-toluidina) eluam juntas ou um pouco separadas ou se as razões desses $k(\alpha)$ for menor que 1,3.

A mistura IV também tem por finalidade avaliar as interações com compostos básicos, sendo a mais comumente encontrada em catálogo de coluna comercial¹²³.

As concentrações dos componentes na mistura teste variaram de coluna para coluna, pois não houve uma preocupação quantitativa e sim um interesse em obter altura de picos, de forma a ocupar 50% ou mais da escala total do papel do integrador. As misturas testes foram dissolvidas na própria fase móvel e quando não em uso, foram estocadas em frascos bem tampados e guardados em um refrigerador.

O volume de amostra injetado foi sempre de 10 μL e a detecção foi feita em 254 nm. Os cromatogramas foram obtidos a uma vazão de 0,2 mL min^{-1} para as misturas I, II e III e 0,5 mL min^{-1} para a mistura IV.

III.4.3.4.2. Cálculos dos parâmetros cromatográficos

Os cromatogramas foram obtidos em triplicata, utilizando uma velocidade de papel suficientemente rápida para que nenhuma das medidas da largura a meia altura (w_h), para o pico de interesse a ser usado nos cálculos, fosse inferior a 20

mm, com a finalidade de reduzir os erros relacionados às medidas feitas com a régua¹¹⁴. Além dos valores de w_h , foram retirados os valores de AC e CB (Figura 7), tempo de retenção (t_R) e tempo de retenção de um soluto não retido (t_M) a serem empregados nos cálculos de A_S , N , k e R_S , conforme as expressões apresentadas no item I.13.

Na mistura I, os cálculos de N , A_S e k foram feitos em relação ao naftaleno, que é um soluto com propriedades cromatográficas ideais para caracterizar a coluna. Já para o cálculo de R_S e α utilizou-se o par tolueno e naftaleno.

Para a mistura II, foi calculado A_S para o pico da acetilacetona e α em relação ao naftaleno e nitronaftaleno.

No caso da mistura III, foi calculado A_S para o pico da anilina e da N,N-dimetilanilina e α entre p- e m-toluidina e m- e o-toluidina.

Para a mistura IV, o cálculo de A_S foi realizado para todos os componentes.

Os cálculos destes parâmetros cromatográficos foram feitos por um microcomputador, utilizando-se uma planilha eletrônica, onde foram obtidos também as estimativas do desvio padrão absoluto. Os resultados apresentados já estão corrigidos de acordo com as estimativas de desvio padrão absoluto obtidas.

III.4.3.5. Estabilidade química das colunas recheadas com FEs sorvida e imobilizada

Com o objetivo de verificar a estabilidade da FE frente a FM, colunas recheadas com algumas FEs sorvida e imobilizada foram submetidas a este teste.

A estabilidade foi avaliada através dos parâmetros cromatográficos N , k e α obtidos ao injetar a mistura I. Esta mistura foi analisada após passagem de 500 vezes o volume da coluna até 5.000 vezes o volume da coluna (para colunas recheadas com 40% de PMOS-Davisil), à 2,0 mL min⁻¹, com FM MeOH/H₂O (70:30, v/v).

Para a coluna recheada com 50 % de PMOS-Sigma, as misturas I e básica (anilina e N,N-DMA) foram analisadas após passagem de 2.000 vezes o volume da coluna até 20.000 vezes o volume da coluna, com o intuito de realizar um teste mais drástico. Além da FM MeOH/H₂O (70:30, v/v), foram utilizadas: MeOH/H₂O (70:30, v/v), pH 2, ajustado com ácido fosfórico e MeOH/H₂O (70:30, v/v), pH 9, ajustado com tampão fosfato de sódio.

O volume da coluna pode ser calculado através da equação 10:

$$V_c = \pi \cdot r^2 \cdot L \quad (10)$$

onde: V_c = volume da coluna

$\pi = 3,14$

r = raio da coluna

L = comprimento da coluna

III.4.3.6. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Cromatografia de permeação em gel foi realizada nas amostras de PMOS e PMOS irradiado à 80 kGy para determinar a massa molecular e a polidispersividade.

As amostras foram dissolvidas em tolueno, numa concentração de 0,3%. As condições de análise utilizadas foram: fase móvel: tolueno (purificado na planta piloto da UNICAMP), vazão: 1,0 mL min⁻¹, temperatura interna do detector e das colunas: 40°C, volume injetado: 250 µL.

As colunas usadas foram Styragel HT 3, HT 4 e HT 5, da Waters. A faixa de permeação de cada coluna foram: HT 3 (500 – 30.000), HT 4 (5.000 – 600.000) e HT 5 (50.000 – 4 x 10⁶).

III.5. Aplicação das FEs preparadas

Com o objetivo de verificar a potencialidade de separação das colunas recheadas com as FEs preparadas, utilizaram-nas para analisar colesterol em amostras naturais de camarão 7 barbas e carne suína (pernil) e compararam os resultados com os obtidos com coluna comercial. As amostras foram provenientes do Laboratório de Análises de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos¹²⁴, onde as análises de colesterol foram realizadas utilizando o cromatógrafo constituído de bomba de alta pressão, recíproca do tipo pistão, com sistema ternário para solventes, marca Varian, modelo 9010; detector espectrofotométrico por conjunto de fotodiodos, marca Waters, modelo 994; integrador, marca Varian, modelo 4400 e injetor Rheodyne, com amostrador de 10 µL e coluna comercial Spherisorb ODS-2, 5 µm.

Capítulo IV

RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1. Escolha da concentração da suspensão de FE preparada a partir de sílicas esféricas

Os resultados obtidos com as colunas recheadas utilizando concentrações de suspensão de 10 e 20% estão na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros cromatográficos obtidos no estudo da influência da concentração de suspensão no enchimento de colunas com FE com 40% de PMOS-Spherisorb, de 8 e 5 μm .

FE	t_p (μm)	concentração da suspensão (% m/v)	Parâmetros cromatográficos*				
			N**	N/m ** (m^{-1})	A_s **	k**	R_s ***
40% PMOS-Spherisorb	8	10	7.400	59.200	0,8	3,9	3,4
		20	7.300	58.400	1,0	4,4	3,5
40% PMOS-Spherisorb	5	10	2.550	20.400	2,0	0,7	–
		20	9.300	74.400	1,3	2,1	3,3

* condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de injeção da mistura I: 10 μL e detecção: UV (254 nm)

** calculado para o naftaleno

*** calculado para o par tolueno-naftaleno

As colunas recheadas com 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm , com concentrações de suspensão de 10 e 20%, apresentaram parâmetros cromatográficos similares, com uma diferença no fator de assimetria, cujo pico do naftaleno é simétrico para a coluna recheada a partir de suspensão de 20%, enquanto que para a recheada a partir de 10% apresentou cauda frontal. A eficiência obtida em ambos os casos foi muito boa (\cong 60000 pratos por metro).

Com as colunas recheadas com 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , observa-se uma nítida diferença no número de pratos com a mudança da concentração de suspensão, sendo que a de 20% apresentou os melhores resultados e uma melhor separação dos componentes da mistura I, que pode ser visto na Figura 12. Não há uma explicação óbvia para este comportamento, pois existem muitas variáveis que influenciam no enchimento de colunas, como pode ser visto na Tabela 7, e é muito difícil explicar o que está afetando os resultados quando se usa partículas menores e regulares.

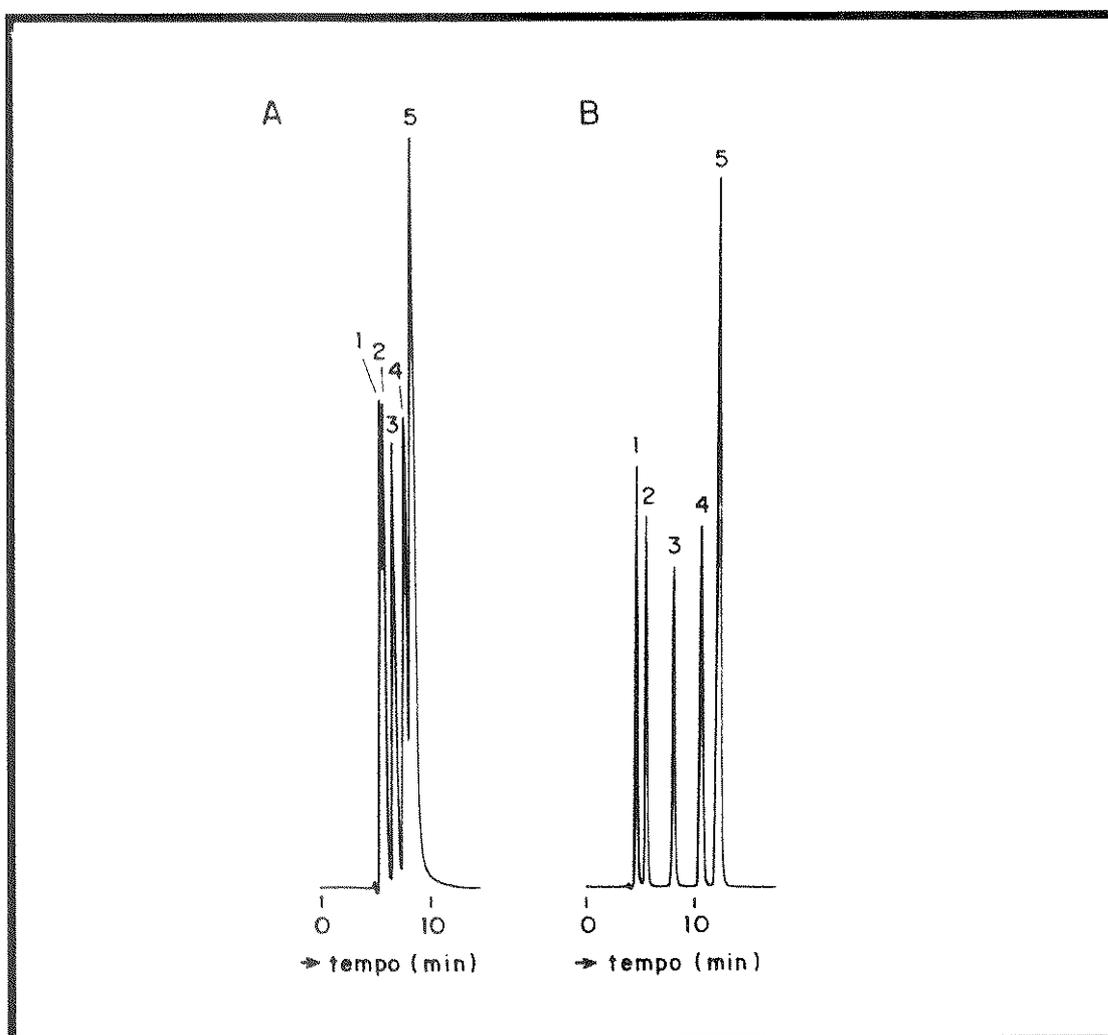


Figura 12- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , a partir de concentração de suspensão: (A) 10% e (B) 20%. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30 , v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹.

IV.2. Escolha da proporção dos solventes da fase móvel

Este teste foi realizado para as colunas recheadas com as FEs preparadas a partir de sílicas DAVISIL e SIGMA (com 30, 40 e 50% de carregamento) e LICHROSORB Si-100 e Si-60 (com 40 e 50% de carregamento), 10 μm . Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 12 e 13.

Analisando os dados das Tabelas 12 e 13, observa-se que variando a composição da FM, isto é, tornando-a mais polar, o tempo de análise aumentou

consideravelmente. Nas composições de FM 55:45 e 50:50 (v/v), o tempo de análise foi longo, o que não é muito desejável em CLAE. Logo, fase móvel menos polar elui a amostra mais rapidamente em cromatografia com fase reversa.

Tabela 12- Influência da composição da FM MeOH/H₂O nos parâmetros cromatográficos calculados para a mistura I, após injeção em colunas recheadas com fases preparadas a partir de sílicas DAVISIL e SIGMA.

sílica	carregamento (%)	composição da FM (v/v)	t _R * (min)	Parâmetros cromatográficos***					
				N*	N/m* (m ⁻¹)	A _s *	k*	R _s **	α**
DAVISIL	30	70:30	10,11	2.100	16.800	1,9	0,7	0,9	1,2
		60:40	14,66	2.100	16.800	1,7	1,4	2,0	1,4
		55:45	18,97	1.950	15.600	1,6	2,1	2,8	1,5
		50:50	26,85	1.800	14.400	1,6	3,5	3,8	1,7
	40	70:30	15,02	3.000	24.000	1,4	1,8	1,8	1,2
		60:40	27,35	3.100	24.800	1,3	4,2	3,6	1,4
		55:45	40,43	3.300	26.400	1,2	6,6	5,0	1,5
		50:50	61,21	3.250	26.000	1,2	10,4	6,4	1,7
	50	70:30	11,61	2.550	20.400	1,4	1,5	1,4	1,2
		60:40	20,59	2.650	21.200	1,3	3,4	3,0	1,4
		55:45	31,07	2.950	23.600	1,2	5,8	4,5	1,5
		50:50	45,40	2.700	21.600	1,2	8,6	5,5	1,7
SIGMA	30	70:30	10,51	2.600	20.800	1,7	1,3	1,4	1,2
		60:40	17,84	2.850	22.800	1,6	3,0	3,0	1,4
		55:45	37,81	2.600	20.800	1,5	7,2	5,3	1,7
		50:50	38,40	2.750	22.000	1,5	7,4	5,4	1,7
	40	70:30	16,13	3.450	27.600	1,4	2,3	2,1	1,2
		60:40	29,95	3.250	26.000	1,4	5,1	3,7	1,4
		55:45	69,98	3.200	25.600	1,3	12,4	6,4	1,7
		50:50	70,86	3.100	24.800	1,2	13,2	6,6	1,7
	50	70:30	20,62	4.300	34.400	1,1	3,6	2,7	1,2
		60:40	42,24	4.000	32.000	1,1	8,4	4,8	1,4
		55:45	107,7	4.000	32.000	1,1	21,6	7,9	1,7
		50:50	110,3	4.100	32.800	1,1	22,3	8,0	1,7

* calculado para o naftaleno

** calculado para o par tolueno-naftaleno

*** Condições cromatográficas: vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL, detecção: UV, 254 nm.

Tabela 13- Influência da composição da FM MeOH/H₂O nos parâmetros cromatográficos calculados para a mistura I, após injeção em colunas recheadas com fases preparadas a partir de sílicas Lichrosorb Si-100 e Si-60.

sílica	carrega- mento (%)	composição da FM (v/v)	t _R * (min)	Parâmetros cromatográficos***					
				N*	N/m* (m ⁻¹)	A _s *	k*	R _s **	α**
Si-100	40	70:30	14,11	3.950	31.600	1,4	2,2	2,2	1,2
		60:40	27,71	3.700	29.600	1,4	5,4	4,2	1,4
		55:45	40,57	3.600	28.800	1,4	8,1	5,3	1,5
		50:50	67,80	3.500	28.000	1,2	13,2	7,1	1,7
	50	70:30	17,10	4.200	33.600	1,0	3,2	2,4	1,2
		60:40	34,62	4.250	34.000	1,0	7,5	4,6	1,4
		55:45	49,17	3.750	30.000	1,0	10,8	5,4	1,5
		50:50	87,93	3.700	29.600	1,0	18,9	7,3	1,7
Si-60	40	70:30	11,51	3.500	28.000	1,5	1,3	1,6	1,2
		60:40	17,42	3.500	28.000	1,5	2,2	3,1	1,4
		55:45	24,67	3.500	28.000	1,5	3,6	4,4	1,5
		50:50	35,36	3.300	26.400	1,5	5,5	5,7	1,7
	50	70:30	11,29	4.400	35.200	1,2	1,5	2,0	1,2
		60:40	18,23	4.400	35.200	1,2	3,0	3,8	1,4
		55:45	26,19	4.400	35.200	1,1	4,8	5,3	1,5
		50:50	38,66	4.300	34.400	1,1	7,5	6,8	1,6

* calculado para o naftaleno

** calculado para o par tolueno-naftaleno

*** Condições cromatográficas: vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 µL, detecção: UV, 254 nm.

Quando houve uma variação de 10 partes de volume na FM, os valores de k sofreram um aumento de pelo menos o dobro. Portanto, o controle de k pode ser feito pela polaridade da FM, ou seja, através da força cromatográfica da FM.

Verifica-se que os picos passaram a ser melhores resolvidos quando se aumentou a quantidade de água na FM. Isto pode ser melhor visualizado na Figura 13.

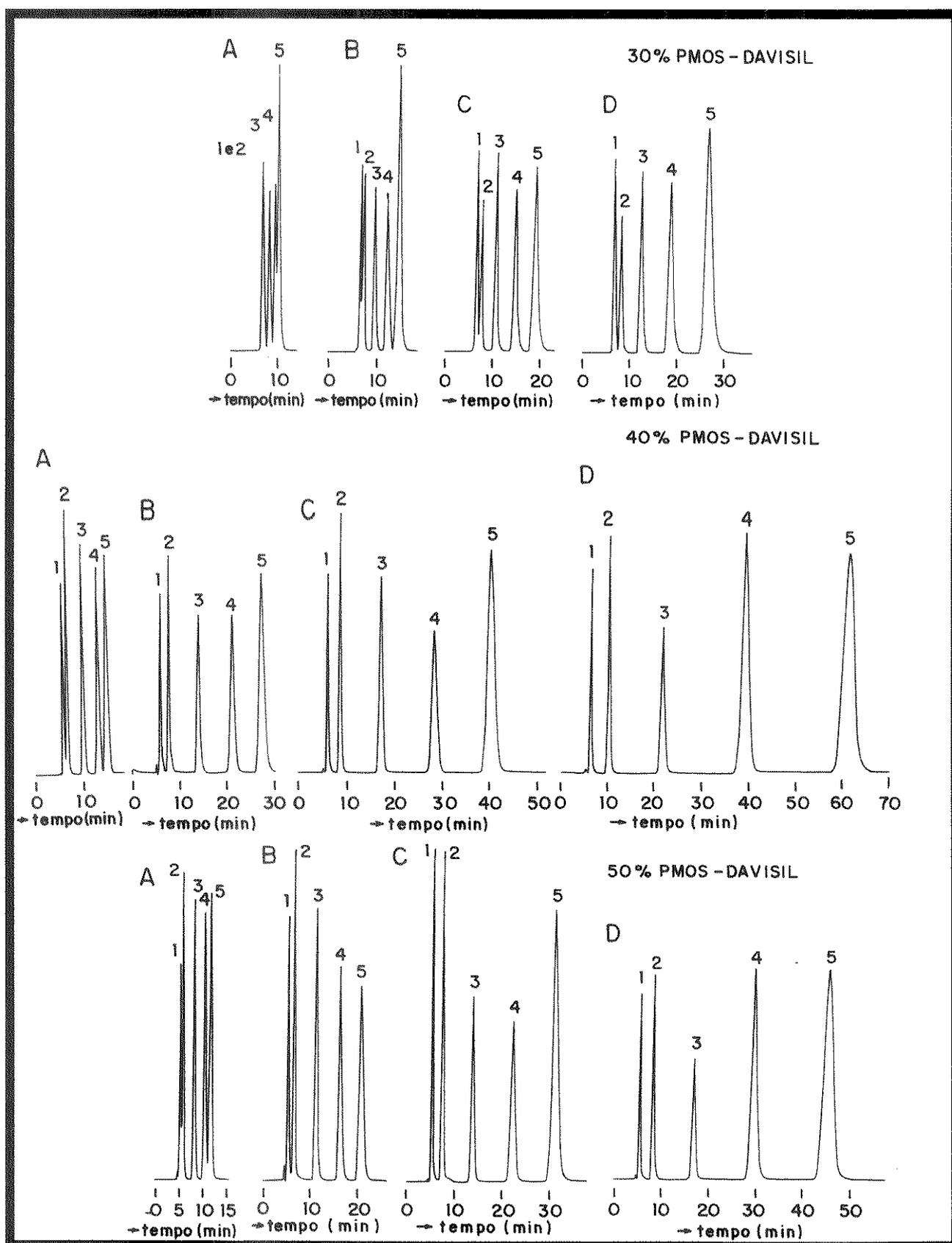


Figura 13- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com 30, 40 e 50% PMOS-Davisil, 10 μm , e FM MeOH/H₂O, A, B, C, D, respectivamente, nas proporções 70:30, 60:40, 55:45 e 50:50 (v/v). Condições cromatográficas: vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹.

Geralmente, quanto maior a quantidade de água na FM melhor o valor do fator de assimetria. Isto se deve ao fato que em altas concentrações de água, as cerdas da cadeia do grupo alquil colapsam como um filme, bloqueando e cobrindo os silanóis da superfície, o que está de acordo com a literatura ¹²².

Com exceção das colunas com FE com 30, 40 e 50% PMOS-Sigma e 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, avaliadas com FM nas proporções 55:45 e 50:50, observa-se que os valores de α encontrados são idênticos para as mesmas FM para todas as colunas com diferentes FEs. Isto pode ser atribuído ao uso de FE de características semelhantes (sílica mais PMOS) e sempre a mesma mistura e composição de FM.

Analisando-se os dados da Tabela 12, verifica-se que utilizando a sílica Davisil, com 40 e 50% de carregamento, a proporção de FM que resultou em um melhor número de pratos por metro e de assimetria foi a de 55:45. Entretanto, nota-se que o tempo de retenção do naftaleno, para esta proporção, praticamente triplicou em relação a 70:30. Portanto, o aumento do tempo de análise e de consumo de FM fazem com que a proporção 55:45 não justifique o aumento no número de pratos.

Tanto para as fases Sigma e Lichrosorb Si-100, ambas com 40 e 50% de carregamento, pode-se dizer que a melhor proporção foi de 70:30 (v/v). Já para a Lichrosorb Si-60 (40 e 50% de carregamento), nota-se que as eficiências obtidas, usando-se FM nas proporções 70:30, 60:40 e 55:45, foram iguais, mas o tempo de análise aumentou conforme a FM tornou-se mais polar.

Entretanto, como o nosso estudo é feito comparativamente e sendo que para três das quatro sílicas analisadas a melhor proporção, pelos motivos expostos acima, foi de 70:30 (v/v), resolveu-se adotá-la nos experimentos subsequentes.

Definida a melhor composição da FM construíram-se as curvas de van Deemter, que serão discutidas no item IV.3.5, para determinar a melhor vazão a ser utilizada nas avaliações das colunas. O valor adotado, ponderando-se a eficiência e o tempo de análise, foi de 0,2 mL min⁻¹.

IV.3. CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FEs SORVIDAS

IV.3.1. Escolha da quantidade ideal de PMOS sobre sílica

Na Tabela 14 estão apresentados os resultados dos testes físicos e químicos e na Tabela 15 dos testes cromatográficos realizados com as FEs sorvidas em suas diferentes porcentagens de carregamento.

Tabela 14 - Caracterização das sílicas: forma da partícula [irregular (I) ou esférica (E)], fabricante, valores de tamanho das partículas (t_p), diâmetro dos poros (d_p), área superficial específica (S) e volume específico dos poros (V_p), e resultados obtidos com as FEs sorvidas através de testes químicos e físicos.

Parâmetros marca , forma e fabricante da sílica	t_p (μm)	d_p (nm)	carregamento (%)		C (%)		% total extraída	S ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)			V_p (mL g^{-1})	
			inicial	após e.	inicial	após e		sílica	FE	inicial	após e.	sílica
Davisil, I (Alltech Associates)	10	15	30	–	16,1	–	14,0	237	87	–	–	–
			40	23	22,8	11,5	21,5	59	161	1,6	0,3	
			50	–	30,9	–	30,8	3	–	–	–	
Sigma, I (Sigma)	10	6	30	–	16,5	–	6,1	393	72	–	–	–
			40	–	24,2	–	10,5	5	–	–	–	
			50	29	30,2	17,7	25,6	1	87	1,1	0,2	
Lichrosorb Si-100, I (Merck)	10	10	40	–	23,4	–	16,5	290	55	–	–	–
			50	34	29,7	16,9	23,1	0,9	99	1,7	0,4	
Lichrosorb Si-60, I (Merck)	10	6	40	–	24,3	–	13,5	267	3	–	–	–
			50	30	30,4	8,5	30,1	0,3	183	1,2	0,3	
Lichrosorb Si-60, I (Merck)	7	6	40	–	24,5	–	16,0	305	4,3	–	–	–
			50	32	30,5	18,0	29,8	0,2	–	1,2	0,3	
Lichrosorb Si-60, I (Merck)	5	6	40	–	24,1	–	17,5	402	2,3	–	–	–
			50	31	30,0	18,8	26,6	0,6	62	1,2	–	
Spherisorb, E (Phase Separations)	8	8	30	–	18,8	–	10,5	149	0,8	–	–	–
			40	24	24,9	14,9	23,0	0	2	1,0	–	
Spherisorb, E (Phase Separations)	5	8	30	–	19,1	–	8,9	186	1,3	–	–	–
			40	14	23,8	13,5	22,1	0,5	99	1,0	–	

inicial = valores após a preparação da FE

após e. = após o enchimento da coluna

Observa-se que as sílicas apresentam diferentes áreas superficiais específicas (S), sendo que para as sílicas de mesmo fabricante e d_p , quanto menor o tamanho da partícula, maior a área superficial, tanto nas irregulares como nas esféricas. Os resultados obtidos na determinação de área superficial específica indicam que ocorreu uma diminuição na área conforme aumentou-se a quantidade de PMOS. Esta redução é explicada pelo recobrimento dos poros da sílica pelo

PMOS, impedindo, dessa forma, o acesso das moléculas de nitrogênio durante as medidas de área. De um modo geral, o que se observa entre as sílicas irregulares é que quanto menor o diâmetro dos poros, maior a área superficial e com o preenchimento dos poros com PMOS, a área superficial sofreu uma maior diminuição. Nota-se que após o enchimento, a área superficial aumentou em relação à da FE inicial devido a retirada de PMOS que não se encontrava fortemente aderido à sílica.

Quanto a % C, nota-se que conforme se colocou uma maior quantidade de PMOS, aumentou-se a % C. Comparando a % C inicial e após o enchimento, é comprovado que houve uma perda de PMOS durante o processo de recheio da coluna.

Devido a disponibilidade do suporte ser pequena, o V_p foi determinado somente para algumas FEs e, comparando com a sílica, nota-se que o V_p diminuiu devido, provavelmente, ao preenchimento dos poros da sílica com o PMOS, reduzindo então, a penetração do mercúrio.

Os valores obtidos nas extrações por solventes indicam que, conforme a quantidade de PMOS depositada sobre a sílica aumentou, a quantidade de PMOS extraída também aumentou. Entretanto esta quantidade é sempre menor que a colocada inicialmente, indicando que uma parte do PMOS encontra-se fortemente sorvido no suporte.

Analisando-se a Tabela 15, observa-se que a quantidade de PMOS sobre a sílica afetou todos os parâmetros cromatográficos, com exceção do fator de separação, o que era esperado, pois este parâmetro está relacionado com a seletividade da FE. Como esta permaneceu a mesma e sempre utilizou a mesma composição de FM o valor de α não se alterou, com a % de carregamento. Quanto maior a quantidade de PMOS, maior a eficiência da coluna, com exceção da Davisil.

Os melhores resultados cromatográficos foram obtidos com FEs com alto carregamento, ou seja, com 50% de PMOS inicial para as sílicas irregulares, com exceção da sílica Davisil, e 40% para as sílicas esféricas, sendo que nestas o carregamento de 50% resultou em uma FE com aspecto de uma goma, indicando excesso de PMOS. Esta diferença pode ser atribuída a forma da partícula, área superficial, volume específico e diâmetro médio dos poros. O que se observa também é que, após o enchimento, o carregamento diminuiu, pois o solvente, tetracloreto de carbono, utilizado na suspensão das FEs retira, durante o enchimento da coluna, uma certa quantidade de PMOS, deixando o PMOS que se

encontra fortemente sorvido à sílica. A porcentagem de carregamento após enchimento é obtida da seguinte maneira: 1) pesa-se um béquer vazio, 2) recolhe-se todo o solvente que passa pela coluna durante o enchimento, 3) evapora-se o solvente à temperatura ambiente, 4) pesa-se o béquer contendo o polímero retirado durante o enchimento, 5) calcula-se a % de carregamento a partir da diferença entre a massa inicial do polímero (m_p)_i e a perda (m_p)_p durante o enchimento (encontrada pelo procedimento descrito acima), ou seja: % carregamento_{final} = $(m_p)_i - (m_p)_p / [((m_p)_i - (m_p)_p) + m_{SiO_2}] \times 100$.

Tabela 15 - Caracterização das FEs sorvidas através dos testes cromatográficos realizados injetando-se a mistura I.

Parâmetros FE	t_p (μ m)	carrega- mento (%)	t_M^* (min)	t_R^{**} (min)	Parâmetros cromatográficos [#]					
					N ^{**}	N/m (m^{-1}) ^{**}	A _S ^{**}	k ^{**}	R _S ^{***}	α ^{***}
Davisil	10	30	5,88	10,11	2.100	16.800	1,9	0,7	0,9	1,2
		40	5,32	15,02	3.000	24.000	1,4	1,8	1,8	1,2
		50	4,73	11,61	2.550	20.400	1,4	1,5	1,4	1,2
Sigma	10	30	4,52	10,51	2.600	20.800	1,7	1,3	1,4	1,2
		40	4,89	16,13	3.450	27.600	1,4	2,3	2,1	1,2
		50	4,48	20,62	4.300	34.400	1,1	3,6	2,7	1,2
Lichrosorb Si-100	10	40	4,40	14,11	3.950	31.600	1,4	2,2	2,2	1,2
		50	4,08	17,10	4.200	33.600	1,0	3,2	2,4	1,2
Lichrosorb Si-60	10	40	5,08	11,51	3.500	28.000	1,5	1,3	1,6	1,2
		50	4,56	11,29	4.400	35.200	1,2	1,5	2,0	1,2
Lichrosorb Si-60	7	40	4,06	15,75	5.100	40.800	1,5	2,9	2,7	1,2
		50	3,83	15,83	5.150	41.200	1,3	3,1	2,7	1,2
Lichrosorb Si-60	5	40	3,53	17,47	5.600	44.800	2,5	3,2	2,9	1,2
		50	3,37	19,52	6.300	50.400	1,2	4,8	3,2	1,2
Spherisorb	8	30	3,92	19,38	6.400	51.200	1,2	3,9	3,3	1,2
		40	4,04	20,51	7.300	58.400	1,0	4,1	3,4	1,2
Spherisorb	5	30	4,74	11,21	5.100	40.800	1,9	1,4	2,0	1,2
		40	3,91	12,30	9.300	74.400	1,3	2,1	3,3	1,2

* para o metanol

** calculado para o naftaleno

*** calculado para o par tolueno-naftaleno

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μ L e detecção: UV, 254 nm.

Com carregamentos maiores, excluindo a FE 50% PMOS-Davisil, verifica-se que quase todos os picos passaram a ser mais resolvidos devido a uma melhor interação do soluto com a FE, que pode ser visto nas Figuras 14, 15, 16, 17 e 18. Nota-se também que o fator de assimetria (A_s) melhorou sensivelmente, ficando dentro do intervalo aceito na literatura ¹¹¹. Isto está de acordo com a literatura ¹²², onde a assimetria do pico está relacionada com o recobrimento da superfície da sílica, sendo que com o aumento do teor de carbono, os picos tornam-se mais simétricos, até atingirem um carregamento adequado.

Com exceção da sílica Davisil, as eficiências obtidas foram muito boas, chegando a surpreender visto que o PMOS se encontra somente sorvido sobre o suporte.

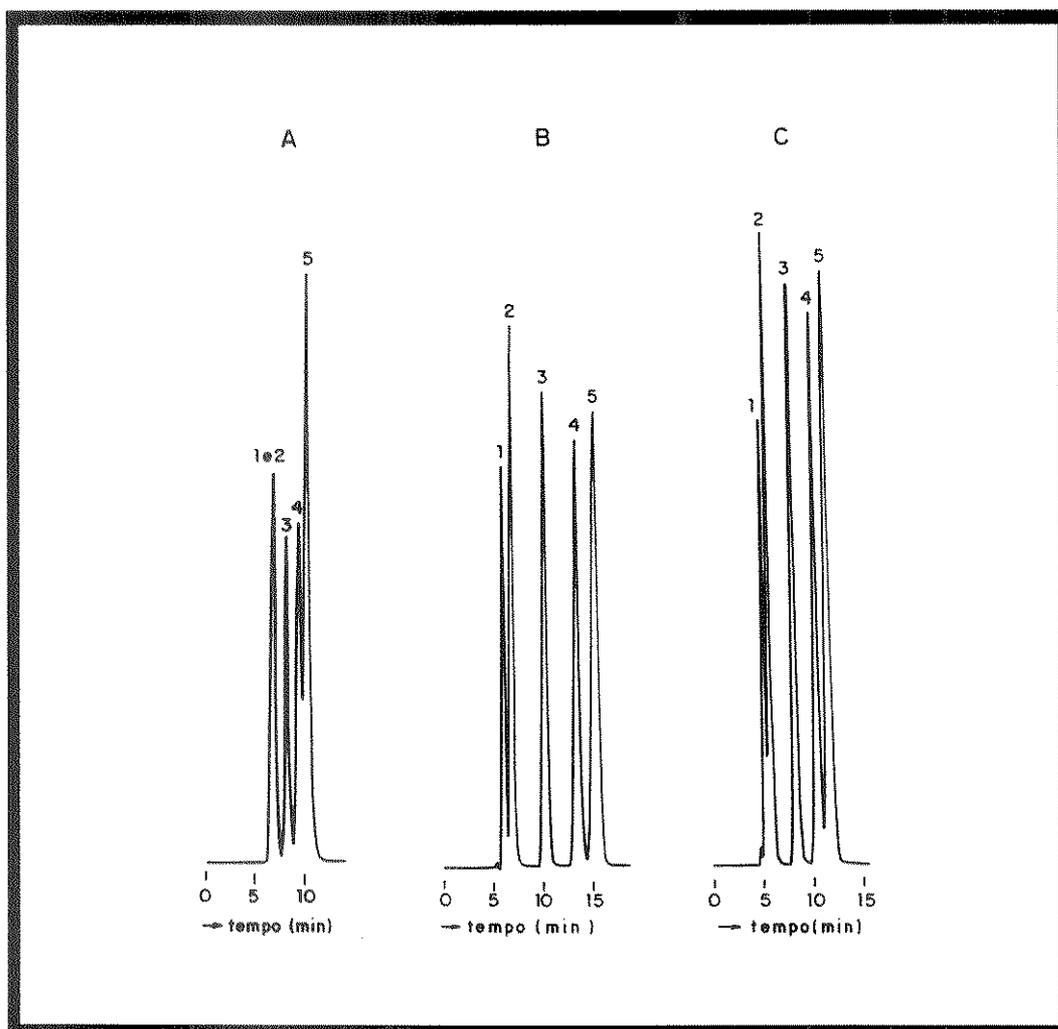


Figura 14- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com: (A) 30, (B) 40 e (C) 50% PMOS-Davisil. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30,v/v); vazão: 0,2 mL min⁻¹; volume de amostra injetado: 10 µL; detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹.

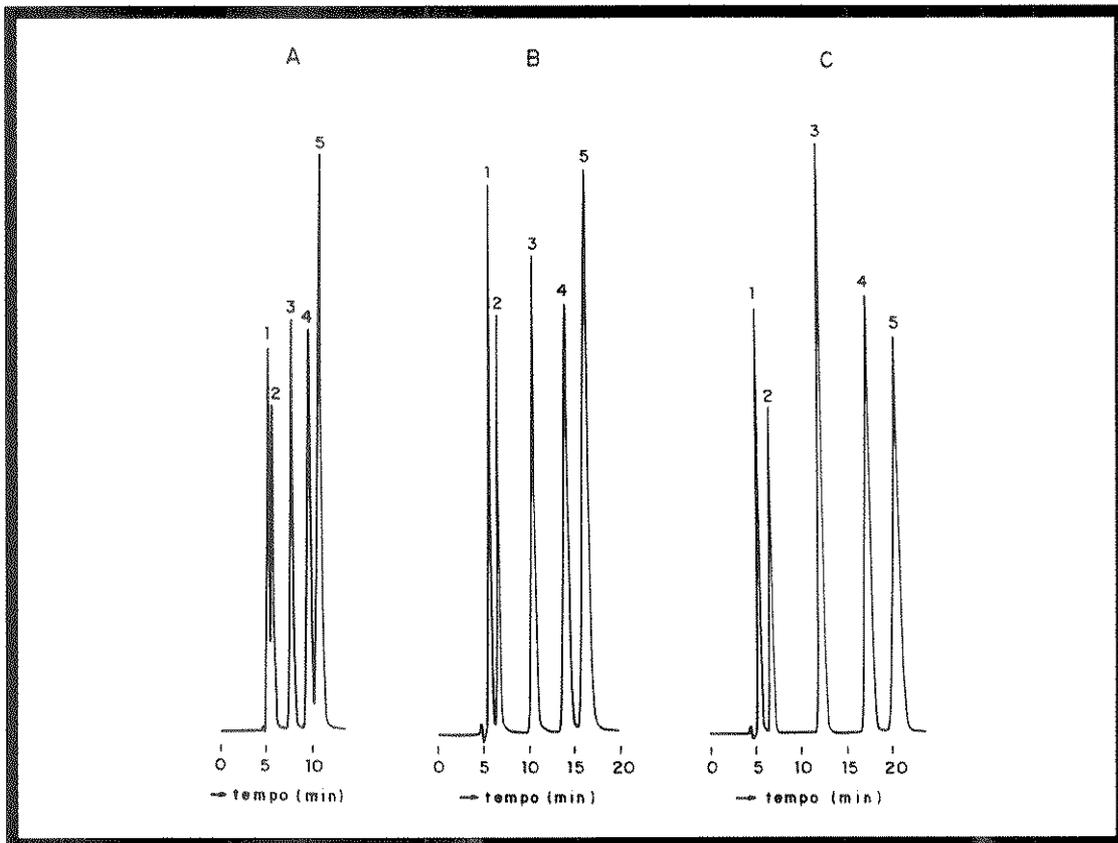


Figura 15 - Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com: (A) 30, (B) 40 e (C) 50% PMOS-Sigma. Condições idênticas às da Figura 14.

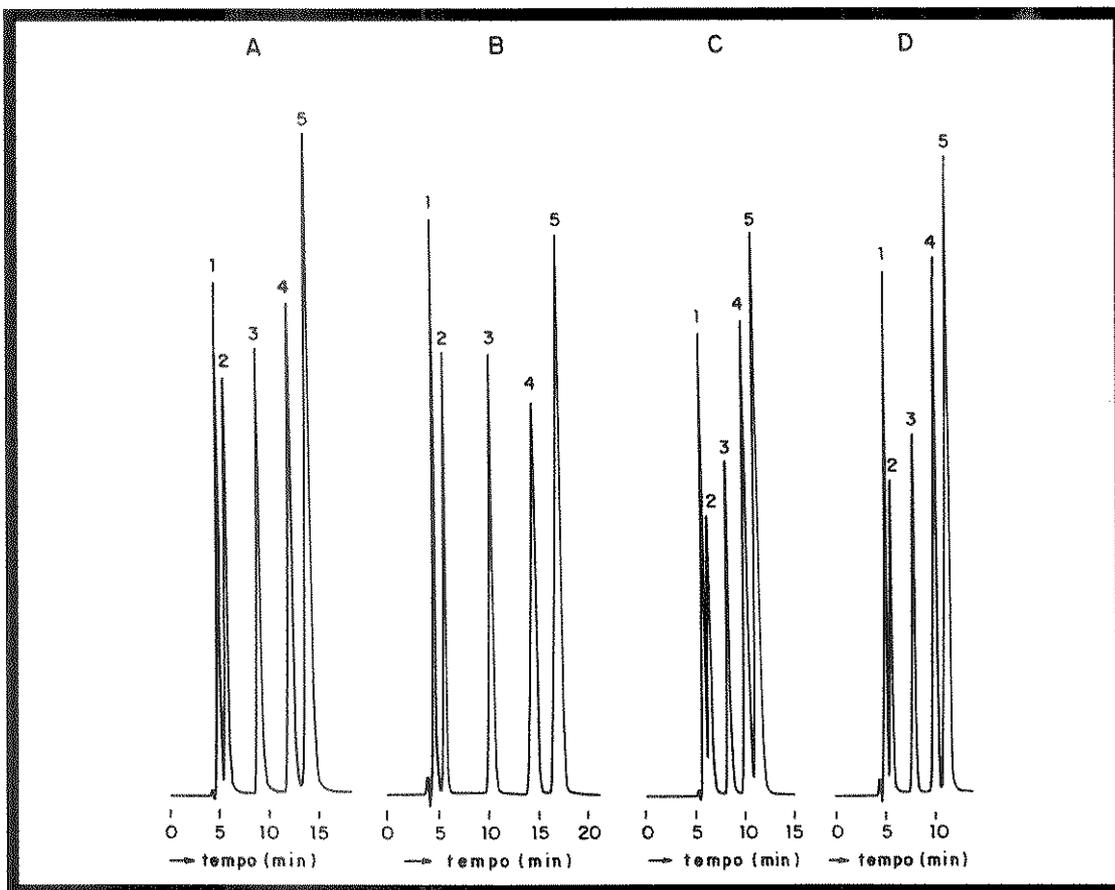


Figura 16 - Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com: (A) 40 e (B) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, 10 μ m, (C) 40 e (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μ m. Condições idênticas às da Figura 14.

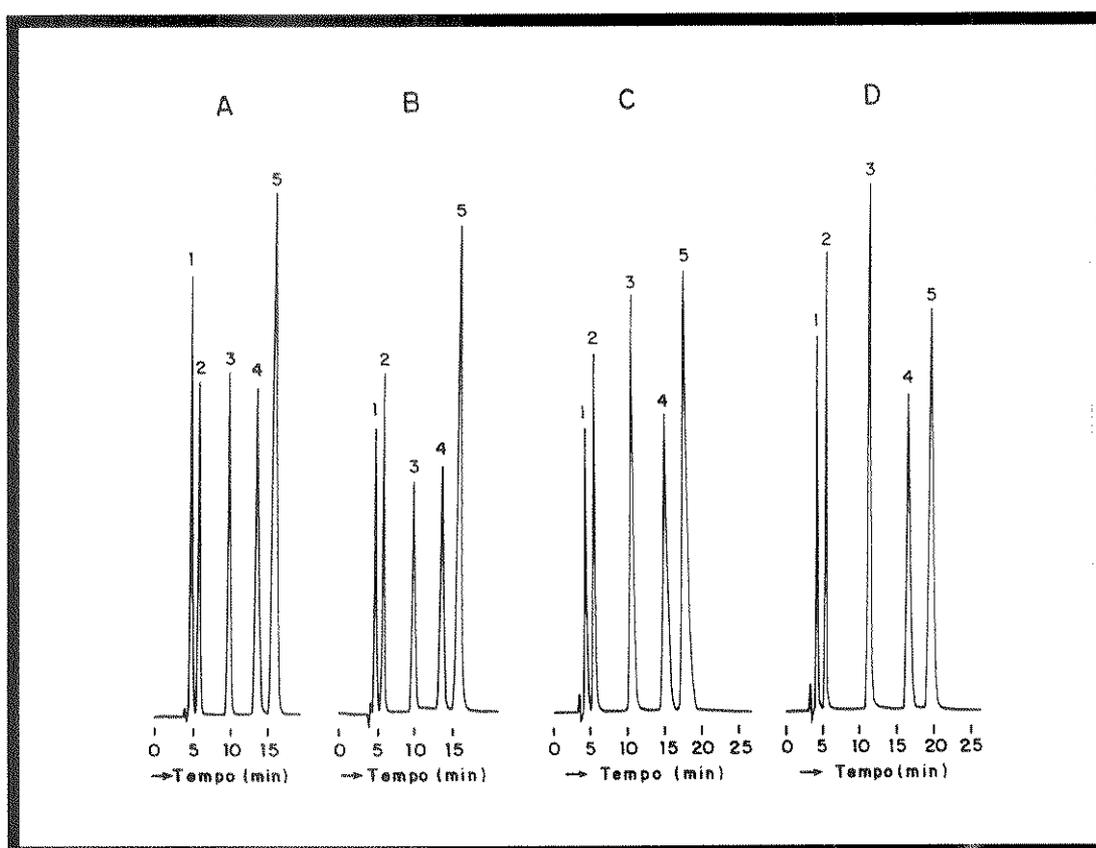


Figura 17 - Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com: (A) 40 e (B) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 μm , (C) 40 e (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm . Condições idênticas às da Figura 14.

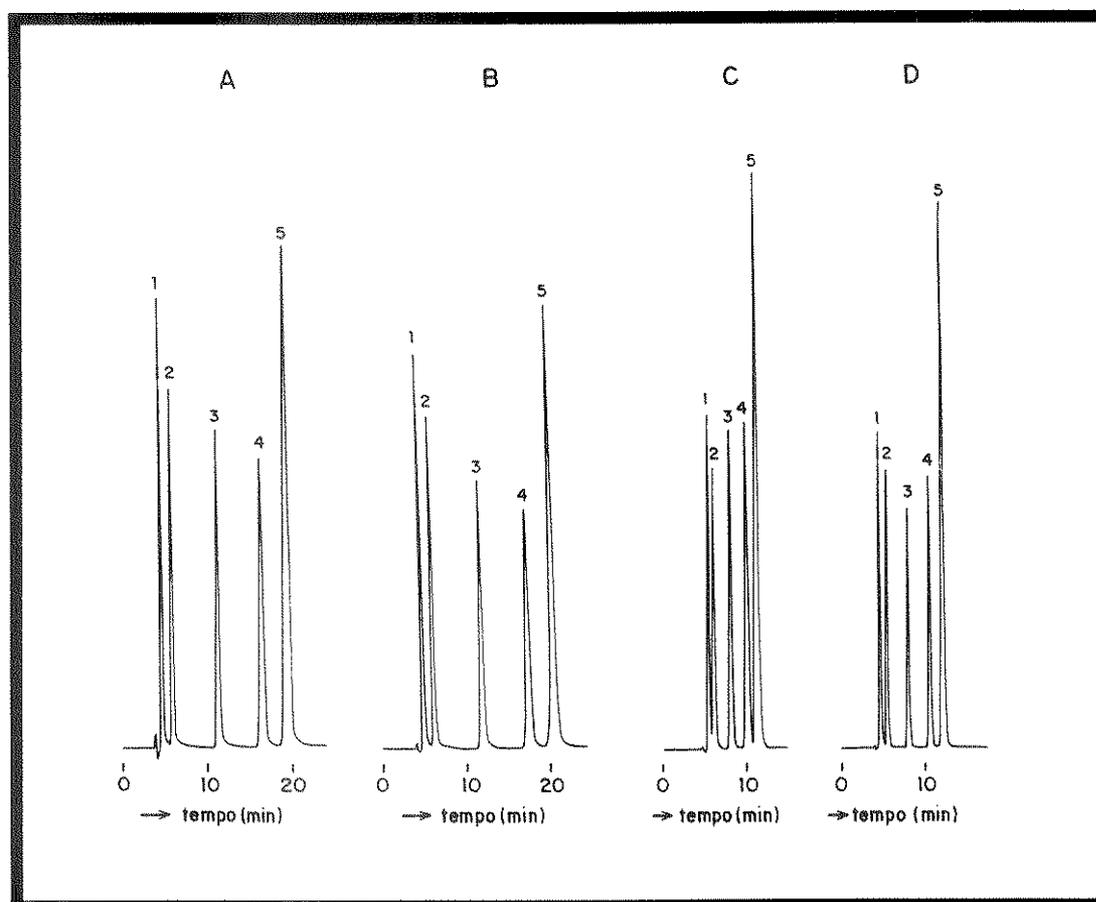


Figura 18 - Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com: (A) 30 e (B) 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm , (C) 30 e (D) 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm . Condições idênticas às da Figura 14.

IV.3.2. Teste físico: espectroscopia no infravermelho

Os espectros no infravermelho do PMOS, das sílicas e das FEs preparadas podem ser visualizados nas Figuras 19, 20 e 21.

Os espectros no infravermelho do PMOS, A, F, K e O, apresentaram como bandas principais um triplete em torno de 2900 cm^{-1} , característico dos grupos metilas, uma banda fraca em 1466 cm^{-1} da deformação de C-H, uma banda forte em 1258 cm^{-1} , característica do $\equiv\text{Si-O-}$ e um duplete forte em 1097 , 1021 cm^{-1} atribuído aos grupos siloxanos.

Os suportes de sílica, espectros B, G, L e P, apresentaram como bandas principais uma em torno de 3500 cm^{-1} , que pode ser proveniente tanto das vibrações de grupos hidroxilas ligados por pontes de hidrogênio à água fisicamente adsorvida como dos grupos hidroxilas geminais, uma banda forte em torno de 1100 cm^{-1} , proveniente dos grupos siloxanos e um ombro em torno de 970 a 980 cm^{-1} dos silanóis livres.

Basicamente, os espectros das FEs, C-E, H-J, M-N, Q-R, S-T, U-V, W-X e Y-Z, apresentaram uma banda na região de 3500 cm^{-1} , característica do suporte, que foi diminuindo à medida que a porcentagem de PMOS aumentou, quase desaparecendo para a maior porcentagem de carregamento; um triplete na região de 2900 cm^{-1} , característico dos grupos metilas do PMOS, cuja intensidade aumentou ligeiramente à medida que a porcentagem de carregamento aumentou; uma banda forte em 1100 cm^{-1} dos grupos siloxanos, constituinte de ambos, suporte e PMOS, entretanto ele deve ser mais devido ao suporte, pois essa geralmente diminuiu com o aumento do carregamento e um ombro, dependendo da porcentagem de carregamento, em torno de 970 cm^{-1} dos grupos silanóis livres do suporte.

Os espectros para as FEs foram obtidos mantendo-se a massa de sílica constante, para que se pudesse observar a variação da intensidade da banda na região de 970 cm^{-1} , que corresponde aos grupos silanóis livres. Observam-se nos espectros C, D e E, correspondentes a 30, 40 e 50% de PMOS sobre sílica Davisil, que a partir de 40% começou a ter um recobrimento da sílica, pois conforme aumentou-se a quantidade de PMOS houve uma diminuição na intensidade desta banda. Nota-se também que o ombro próximo a 1260 cm^{-1} , característico do PMOS, aumentou. Para as fases com 30, 40 e 50% de PMOS sobre sílica Sigma (espectros H, I e J), o recobrimento dos silanóis começou com 30%. Para os do Lichrosorb, tanto para Si-100 como para Si-60 ($10\text{ }\mu\text{m}$) e também Davisil e Sigma, nota-se a

ausência do ombro em 970 cm^{-1} , com 40% de carregamento. Para as Spherisorb, esta ausência é notada com 30%.

Logo, um alto carregamento provoca preenchimento dos poros do suporte e deposição sobre ele do PMOS, diminuindo assim a quantidade de grupos silanóis livres.

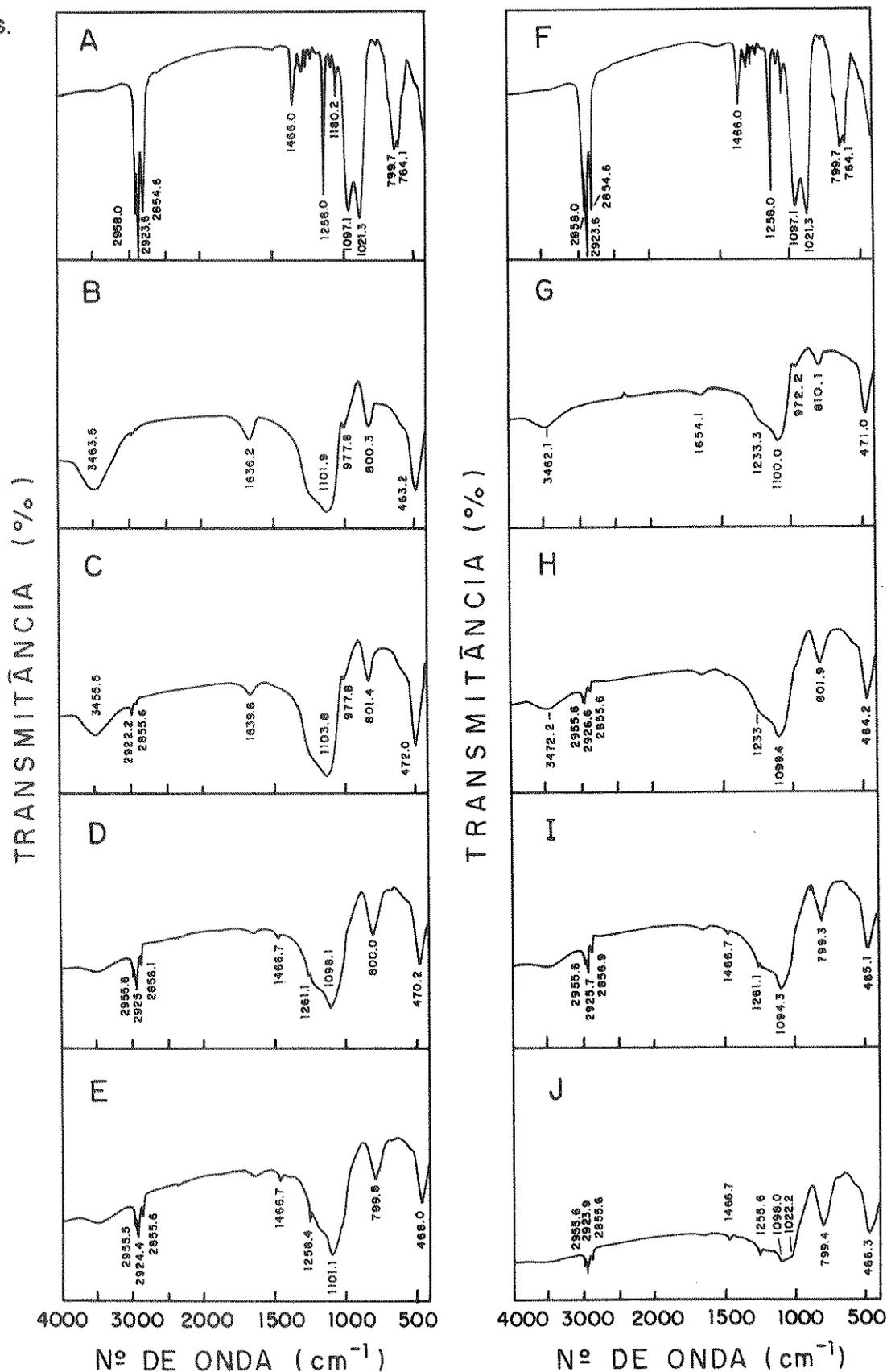


Figura 19- Espectros no infravermelho de: (A e F) PMOS, (B e G) sílica Davisil e Sigma, respectivamente, (C, D e E) 30, 40 e 50% PMOS-Davisil, (H, I e J) 30, 40 e 50% PMOS-Sigma.

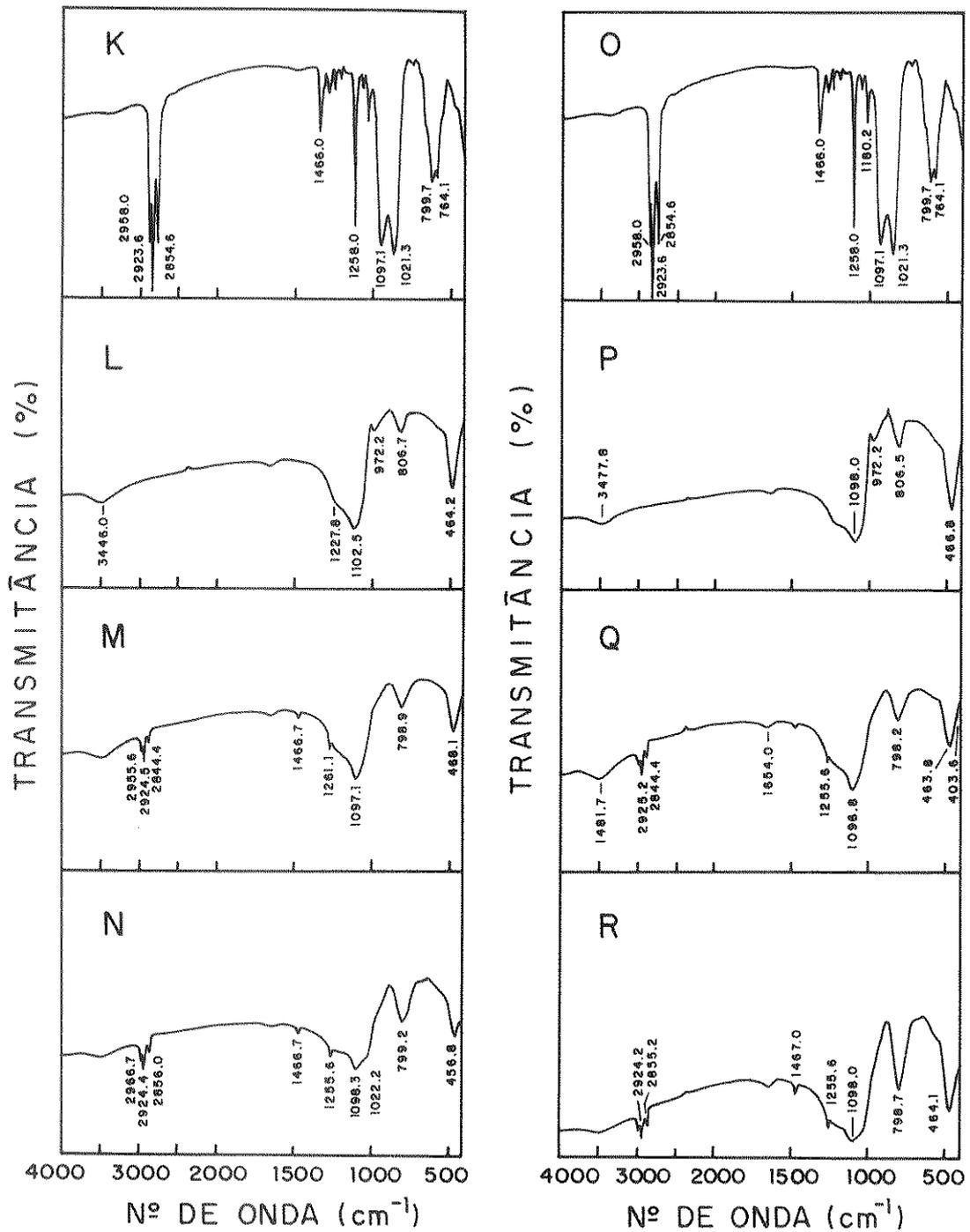


Figura 20 - Espectros no infravermelho de: (K e O) PMOS, (L e P) sílica Lichrosorb Si-100 e Si-60, respectivamente, (M e N) 40 e 50% PMOS-Lichrosorb Si-100 e (Q e R) 40 e 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 µm.

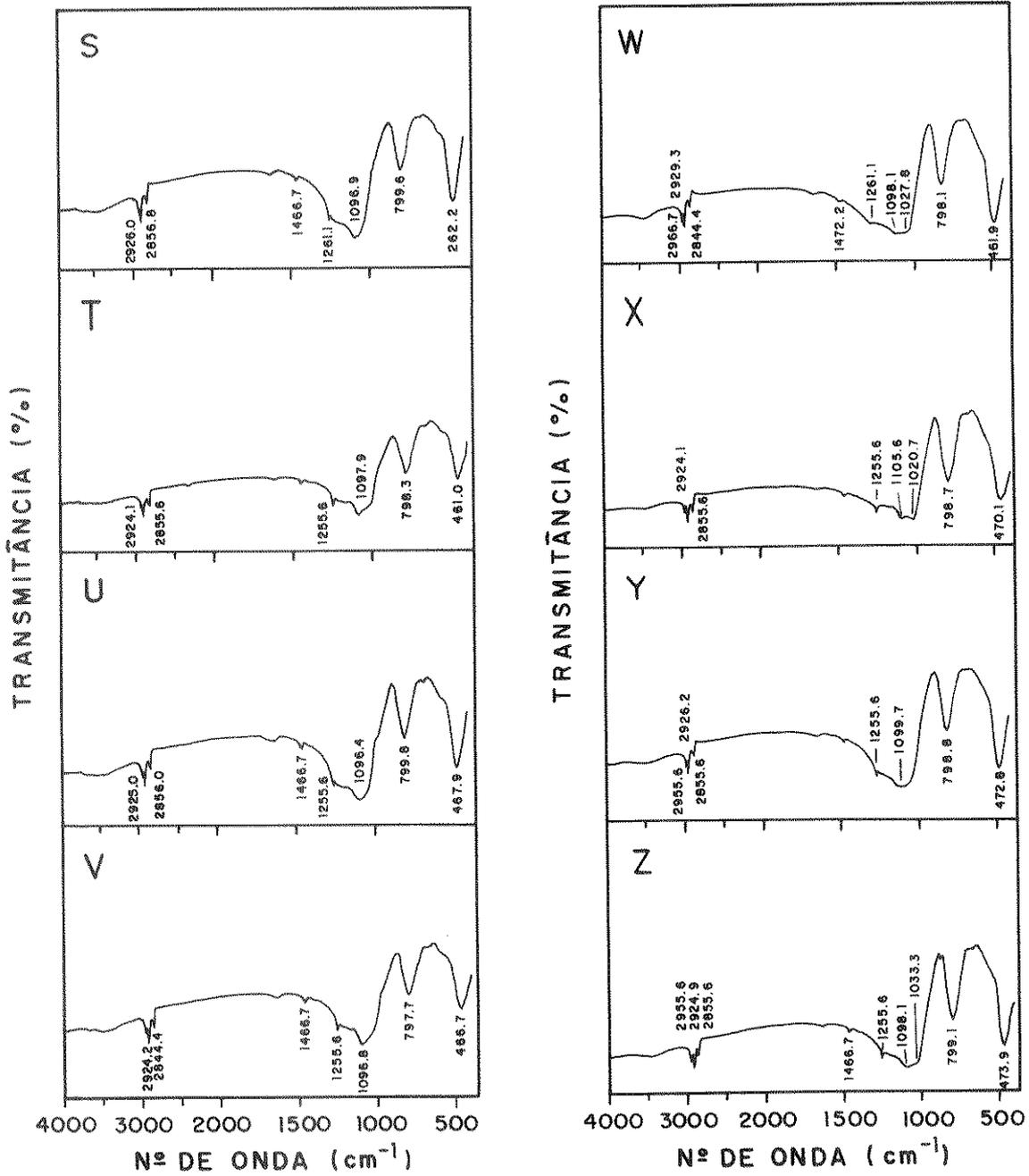


Figura 21- Espectros no infravermelho de: (S e T) 40 e 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 μm , (U e V) 40 e 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm , (W e X) 30 e 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm , (Y e Z) 30 e 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm .

IV.3.3. Teste químico: titulação potenciométrica

Na Tabela 16 estão apresentadas as quantidades, obtidas por titulação potenciométrica, de grupos silanóis livres presentes na sílica e os silanóis residuais encontrados nas FEs sorvidas. Os dados indicam que conforme se aumentou o carregamento, cerca de 96 - 99% dos silanóis da superfície da sílica inicial foram blindados pelo polímero. Nota-se também que a quantidade de silanóis na sílica Spherisorb, 8 μm , foi menor em relação as sílicas irregulares (Davisil e Sigma) devido a área superficial ser menor.

Tabela 16 - Quantidades de silanóis presentes nas sílicas e nas FEs sorvidas, determinadas por titulação potenciométrica.

Amostra	silanóis (mmol g ⁻¹)
sílica Davisil	0,322
30% PMOS-Davisil	0,118
40% PMOS-Davisil	0,094
50% PMOS-Davisil	0,012
sílica Sigma	0,402
30% PMOS-Sigma	0,116
40% PMOS-Sigma	0,062
50% PMOS-Sigma	0,004
sílica Spherisorb, 8 μm	0,164
30% PMOS-Spherisorb	0,016
40% PMOS-Spherisorb	0,002

Comparando-se a Tabela 16 com a 15 confirma-se que a presença de grupos silanóis residuais afeta o fator de assimetria, pois este valor diminuiu à medida que aumentou a porcentagem de PMOS, que resultou em uma menor quantidade de silanóis residuais.

Portanto, após uma análise dos resultados obtidos nos testes realizados, escolheram-se os carregamentos de 50% de PMOS sobre as sílicas Sigma, Lichrosorb Si-100, Lichrosorb Si-60, 10, 7 e 5 μm e 40% para Davisil e Spherisorb, 8 e 5 μm , pois estas quantidades foram suficientes para penetrar nos poros da sílica e fornecer maior blindagem dos grupos silanóis, resultando em fases cromatográficas que geraram colunas com eficiências muito boas, valor de fator de assimetria aceito na literatura e melhor resolução da mistura analisada.

IV.3.4. Comparação das diferentes FEs na sua melhor porcentagem de PMOS

Para facilitar uma comparação entre as diferentes FEs sorvidas preparadas na sua melhor porcentagem de carregamento, montou-se a Tabela 17, com os dados já apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Tabela 17 - Comparação das diferentes FEs preparadas na sua melhor % de PMOS.

Parâmetros FEs e forma	d_p^* (nm)	t_p^* (μm)	S^* ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	V_p^* (mL g^{-1})	C_{inicial} (%)	t_R^{**} (min)	parâmetros cromatográficos ^{##}					
							N^{**}	N/m^{**}	A_S^{**}	k^{**}	$R_S^{\#}$	$\alpha^{\#}$
40% PMOS-Davisil (I)	15	10	237	1,6	22,8	15,02	3000	24000	1,4	1,8	1,8	1,2
50% PMOS-Sigma (I)	6	10	393	1,1	30,2	20,62	4300	34400	1,1	3,6	2,7	1,2
50% PMOS-Si-100 (I)	10	10	290	1,7	29,7	17,10	4200	33600	1,0	3,2	2,4	1,2
50% PMOS-Si-60 (I)	6	10	267	1,2	30,4	11,29	4400	35200	1,2	1,5	2,0	1,2
50% PMOS-Si-60 (I)	6	7	305	1,2	30,5	15,83	5150	41200	1,3	3,1	2,7	1,2
50% PMOS-Si-60 (I)	6	5	402	1,2	30,0	19,52	6300	50400	1,2	4,8	3,2	1,2
40%PMOS-Spher. (E)	8	8	149	1,0	24,9	20,51	7300	58400	1,0	4,1	3,4	1,2
40%PMOS-Spher.(E)	8	5	186	1,0	23,8	12,30	9300	74400	1,3	2,1	3,3	1,2

I = irregular e E = esférica

* sílica pura

** calculado para o naftaleno

calculado para o par tolueno-naftaleno

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm.

Para as sílicas com forma de partículas irregulares, com exceção da Davisil, o teor de carbono (%) foi praticamente idêntico, mesmo tendo variações consideráveis na área superficial (S) e no volume específico (V_p) dos suportes.

Para partículas irregulares de mesmo tamanho, 10 μm , observa-se que o t_R e a retenção da amostra geralmente aumentaram com a S e a eficiência aumentou à medida que o volume dos poros diminuiu, o que deve contribuir para um aumento na velocidade de transferência de massa.

Excelentes fatores de assimetria (A_s) foram obtidos com a maioria das FEs. Em geral, altas eficiências foram obtidas com tamanho de partículas pequenas. As partículas esféricas, com S bem mais baixa, apresentaram % C menor, mas produziram colunas cromatográficas com eficiência significativamente mais alta que as partículas irregulares tendo tamanho de partículas similares; provavelmente as partículas regulares resultam em leitos mais homogêneos.

Nota-se também que entre os diferentes suportes irregulares de 10 μm , a sílica de marca Davisil apresentou os piores valores de parâmetros cromatográficos, mostrando que o tamanho dos poros influencia nos resultados, ou seja, o de 15 nm (Davisil) não mostrou ser um bom suporte cromatográfico. Os dois de 6 nm (Sigma e Si-60) apresentaram alguns resultados diferentes entre si, por serem de fabricantes diferentes, porém forneceram as melhores eficiências.

Comparando as três sílicas irregulares, 50% PMOS-Si-60, verifica-se que elas possuem mesmo d_p e V_p , porém diferentes t_p e conseqüentemente, diferentes S. Observa-se que a eficiência aumentou à medida que o t_p diminuiu. O mesmo pode-se afirmar para as duas sílicas regulares que possuem d_p e V_p iguais. Portanto, pode-se concluir que a característica do suporte que mais influencia na eficiência cromatográfica é o tamanho da partícula.

IV.3.5. Curvas de van Deemter das colunas recheadas com FE na sua melhor porcentagem de PMOS

Na Figura 22 têm-se as curvas de van Deemter das colunas recheadas com as FEs preparadas a partir de sílica com tamanho de partículas de 10 μm . Observa-se que as curvas obtidas com suportes cromatográficos de mesmo fabricante (Lichrosorb Si-100 e Si-60) apresentaram comportamentos similares. Variando o diâmetro dos poros, nota-se que nas FEs preparadas a partir de sílicas Davisil e Sigma, conforme aumentou-se a velocidade linear da fase móvel houve um aumento brusco na altura equivalente a um prato, ou seja, houve uma diminuição na eficiência da coluna. A vazão ótima destas colunas está em torno de 0,1 mL min^{-1} .

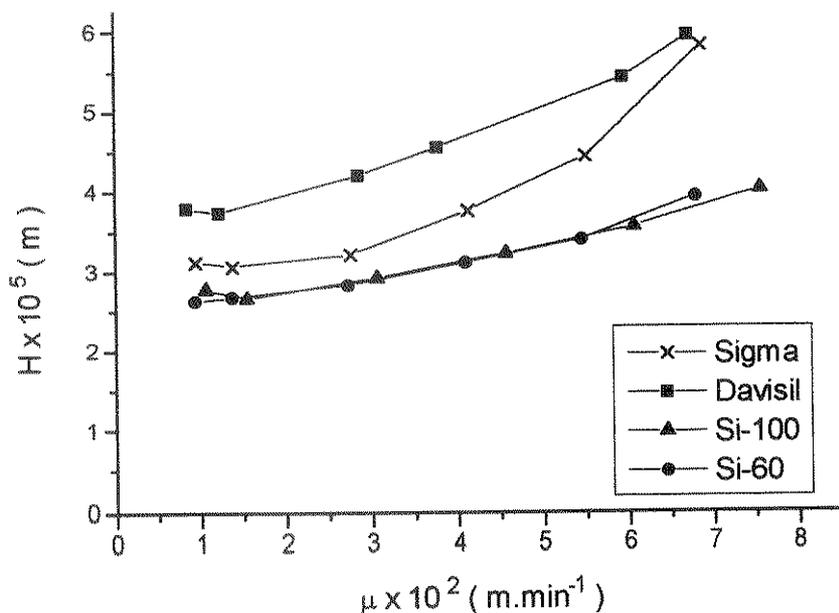


Figura 22 - Curvas de van Deemter das colunas recheadas com: 40% PMOS-Davisil, 50% PMOS-Sigma, 50% PMOS-Lichrosorb Si-100 e 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm .

As colunas recheadas com as FEs preparadas a partir de sílicas provenientes do mesmo fabricante e com o mesmo diâmetro dos poros, mas diferentes tamanhos da partícula (Lichrosorb Si-60, 10, 7 e 5 μm) (Figura 23), mostraram que quanto menor o tamanho da partícula menor é a altura equivalente a um prato e conseqüentemente, maior a eficiência cromatográfica. As colunas recheadas com partículas de 10 e 7 μm apresentaram vazão ótima de 0,1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e a de 5 μm de 0,2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, o que permite obter análises mais rápidas com altas eficiências.

As FEs sorvidas, preparadas a partir de sílicas esféricas, mostraram curvas de van Deemter (Figura 24) com a mesma tendência das FEs sorvidas preparadas com suportes irregulares. Novamente observa-se que as partículas menores, 5 μm , apresentaram menor altura equivalente a um prato e vazão ótima mais elevada (0,2 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

É interessante chamar atenção que as FEs preparadas com partículas de menor tamanho, tanto irregulares como esféricas, após a vazão ótima, apresentam uma curva quase paralela ao eixo x mostrando que a faixa de vazão ótima é mais ampla, o que permite que se use vazões maiores e que as análises sejam concluídas em menor tempo, sem praticamente perda da eficiência. Isto se deve ao fato que com partículas pequenas os poros não são tão profundos e a velocidade de

transferência de massa é rápida, o que possibilita o uso de vazões mais altas sem interferência no equilíbrio cromatográfico.

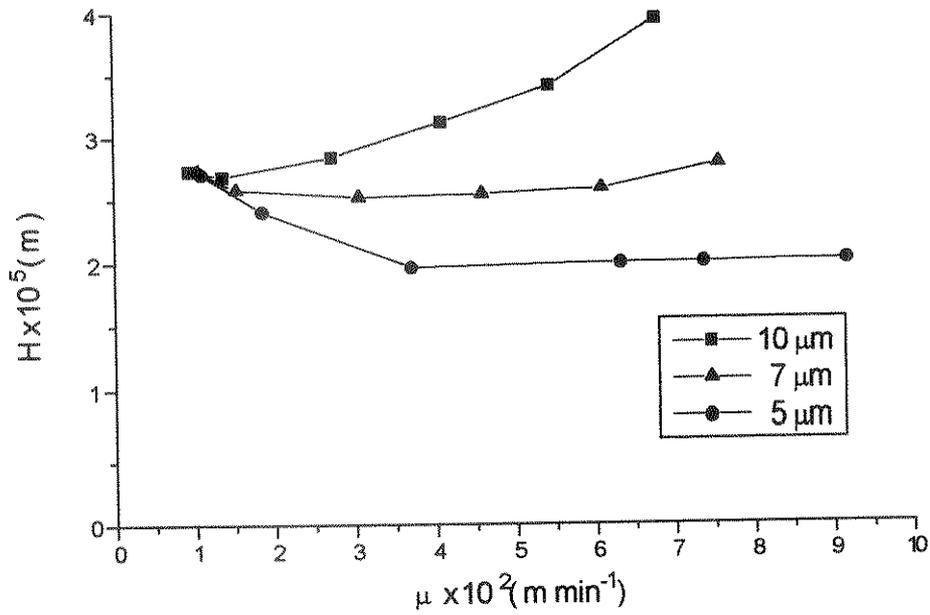


Figura 23 - Curvas de van Deemter das colunas recheadas com: 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10, 7 e 5 μm .

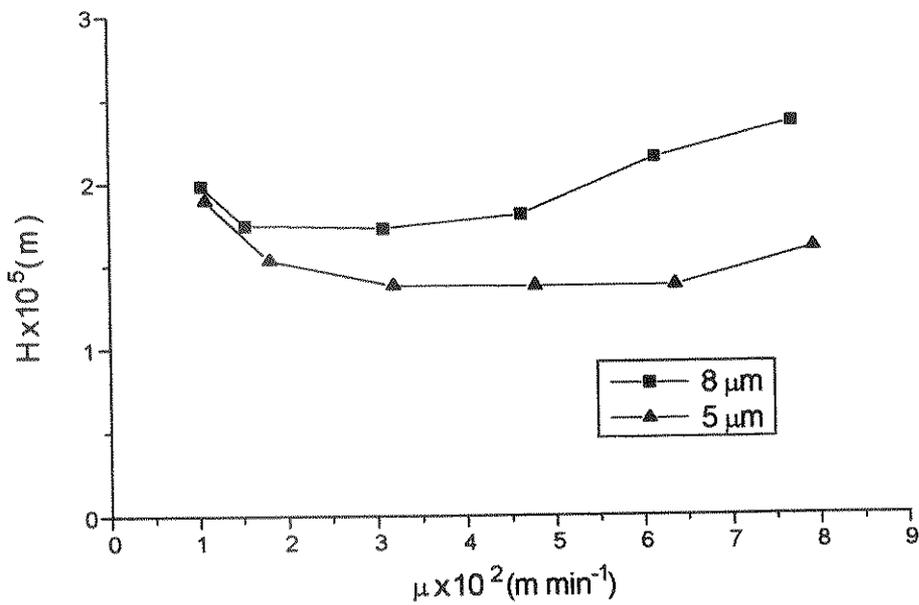


Figura 24 - Curvas de van Deemter das colunas recheadas com: 40% PMOS-Spherisorb, 8 e 5 μm .

IV.3.6. Testes cromatográficos com as misturas II, III e IV

Uma vez estabelecido qual o melhor carregamento para cada tipo de sílica, foram realizadas análises com as demais misturas orgânicas sintéticas, conforme descrito no item III.4.3.4.1.

Na tabela 18 estão apresentados os valores de A_s e α para as diferentes FEs quando se fez a injeção da **mistura II, acetilacetona, nitronaftaleno e naftaleno**. Observa-se, pelos valores de A_s , que todas as fases apresentaram caudas bem acentuadas para o pico da acetilacetona, que também podem ser visualizadas nas Figuras 25 e 26, indicando a presença de traços de alguns metais na superfície do suporte, provenientes do seu processo de fabricação. Isto pode acarretar em retenção de solutos e induzir o aumento da atividade dos grupos silanóis, prejudicando a análise.

Os valores do fator de separação, α , encontrados para o par nitronaftaleno-naftaleno estão acima de 1,2 e segundo Verzele e Dewaele⁷² estes valores caracterizam colunas com grupos silanóis mais desativados. Isto representa uma vantagem das fases sorvidas com alto carregamento de PMOS em relação as fases ligadas disponíveis comercialmente. Estas últimas precisam sofrer uma reação de capeamento para reduzir o efeito de grupos silanóis residuais, enquanto nos recheios preparados por nós, a maioria destes grupos são bloqueados sem nenhum tratamento, apenas pelo alto carregamento de polímero empregado.

Tabela 18 - Valores de A_s e α obtidos ao se injetar a mistura II em colunas recheadas com FEs sorvidas.

FEs	t_p (μ m)	parâmetros cromatográficos***	
		A_s^*	α^{**}
40% PMOS- Davisil	10	6,9	1,9
50% PMOS- Sigma	10	7,0	2,0
50% PMOS-Si-100	10	7,0	1,5
50% PMOS- Si-60	10	9,2	1,7
50% PMOS-Si-60	7	9,1	1,8
50% PMOS-Si-60	5	11,8	1,9
40% PMOS-Spherisorb	8	4,8	2,1
40% PMOS-Spherisorb	5	4,6	1,6

* calculado para a acetilacetona

** calculado para o par naftaleno/nitronaftaleno

*** Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μ L e detecção: UV, 254 nm

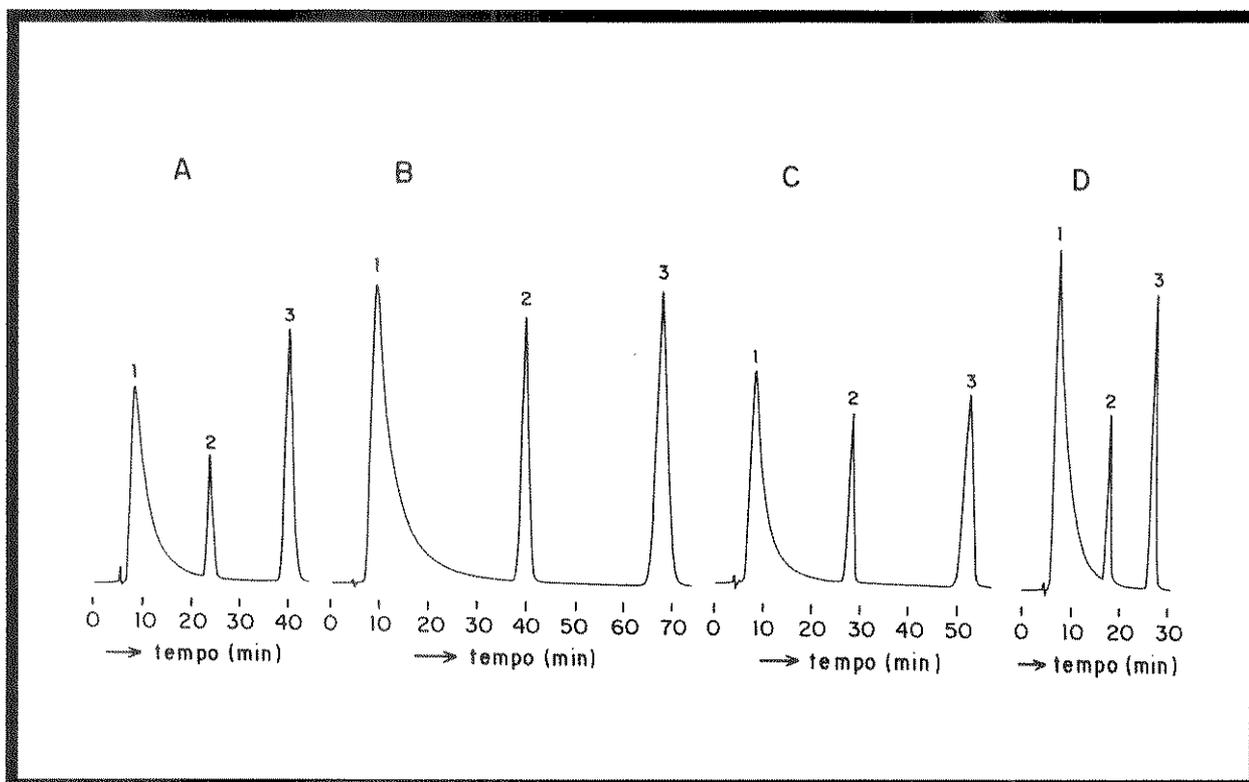


Figura 25 - Cromatogramas da mistura II: 1= acetilacetona, 2= nitronaftaleno e 3= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com: (A) 40% PMOS -Davisil, (B) 50% PMOS-Sigma, (C) 50% PMOS-Lichrosorb Si- 100 e (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL, detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹.

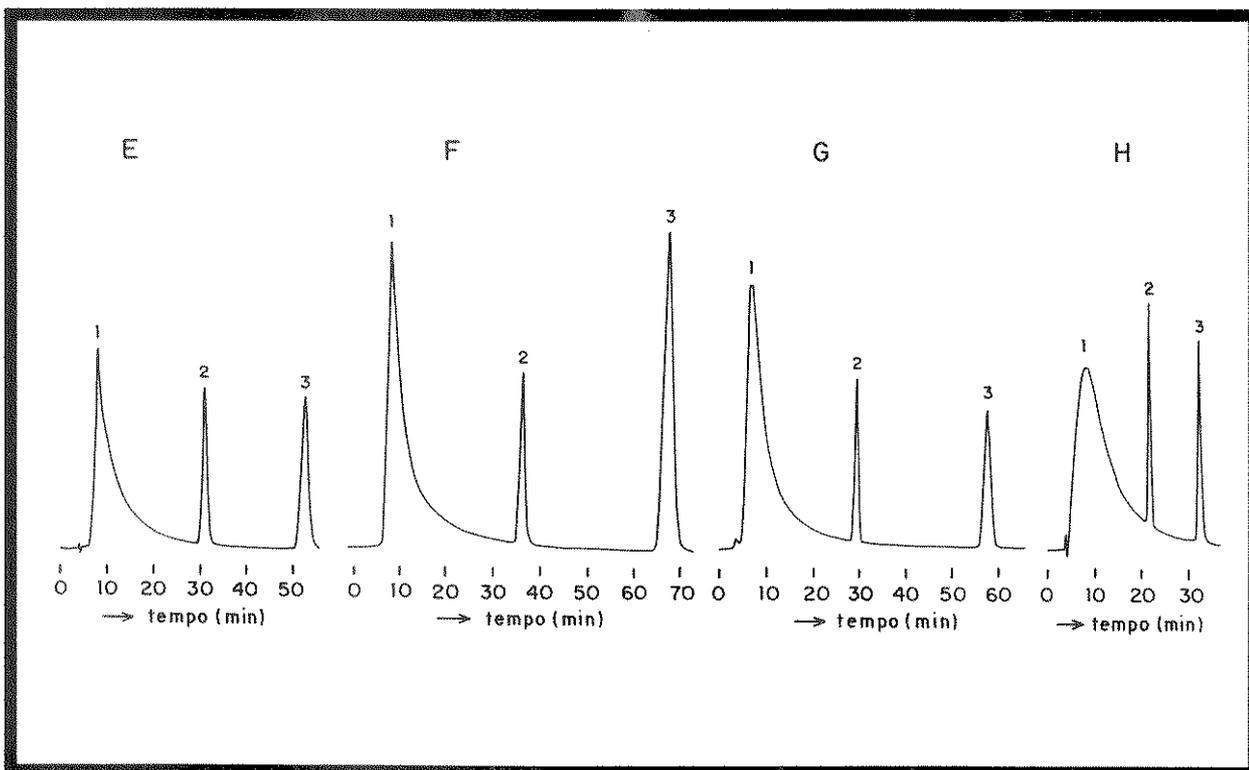


Figura 26 - Cromatogramas da mistura II obtidos com as colunas recheadas com: (E e F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 e 5 μm, respectivamente e (G e H) 40% PMOS-Spherisorb, 8 e 5 μm. Condições cromatográficas idem às da Figura 25.

Segundo Verzele⁷¹ e Verzele e Dewaele⁷², um meio que se tem mostrado eficiente para minimizar os problemas de picos largos e assimétricos para a acetilacetona é ferver a sílica gel, antes da preparação da FE, por 2 horas com HCl 2 mol L⁻¹, filtrar e lavar exaustivamente a sílica com H₂O deionizada. Repetir o procedimento por mais duas vezes. As sílicas Davisil e Sigma foram submetidas a este tratamento.

A Tabela 19 apresenta o teor de metais nessas sílicas antes e após o tratamento ácido, obtidos por absorção atômica. Observa-se que o conteúdo de metais na sílica foi reduzido bastante com o tratamento ácido, no entanto não foi eliminado completamente devido a oclusão, dentro da estrutura da sílica, de parte desses metais.

Tabela 19 - Teor de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) presentes nas sílicas Davisil e Sigma, tratadas ou não com HCl, obtidos por absorção atômica.

Metais	Teor de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sílicas tratadas ou não com HCl			
	DAVISIL		SIGMA	
	sem	com	sem	com
Alumínio (Al)	141	48	414	344
Ferro (Fe)	71	15	83	33
Titânio (Ti)	77	22	105	65
Cálcio (Ca)	1150	205	376	77
Magnésio (Mg)	239	64	91	62
Sódio (Na)	277	33	1070	88
Potássio (K)	37	8	7	7
Lítio (Li)	$\leq 0,1$	$\leq 0,2$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$
Crômio (Cr)	≤ 1	$\leq 0,3$	7	1,7
Cobalto (Co)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Níquel (Ni)	≤ 1	≤ 1	2	1,7
Chumbo (Pb)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Manganês (Mn)	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Cádmio (Cd)	≤ 1	$\leq 0,2$	$\leq 0,2$	≤ 5
Cobre (Cu)	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$	$\leq 0,5$	$\leq 0,2$
Zinco (Zn)	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 1,9$	$\leq 0,2$
Estanho (Sn)	≤ 5	≤ 5	≤ 10	$\leq 0,5$

Na Tabela 20 têm-se os valores de A_s da acetilacetona obtidos para as colunas recheadas com as FEs preparadas a partir das sílicas tratadas com ácido e para uma melhor comparação colocou também os valores obtidos para as que não foram submetidas ao tratamento ácido. Então, com a redução do teor de metais, a acetilacetona ficou menos tempo retida na coluna e com isto, a cauda do seu pico diminuiu. Logo, o tratamento ácido pode ajudar na separação da acetilacetona e de algumas classes de compostos.

Tabela 20 - Valores de A_s da acetilacetona para as FEs preparadas a partir de sílicas sem e com tratamento ácido.

FE	A_s	
	sem	com
40% PMOS-Davisil	6,9	3,5
50% PMOS-Sigma	7,0	4,8

A seguir, na Tabela 21, têm-se os resultados obtidos com a **mistura III**, **anilina**, **o-**, **m-** e **p-toluidina** e **N,N-DMA**. Praticamente, todas as colunas, com exceção da Spherisorb 5 μm cujos solutos foram sendo adsorvidos lentamente após cada injeção, o fator α , denominado na literatura ¹²² de razão dos k, foi menor que 1,3, o que é um bom indício da boa qualidade da coluna ¹²². Mas nota-se também que os valores de assimetria para as colunas com 40% PMOS-Davisil, 50% PMOS-Si-100, 50% PMOS-Si-60, 5 μm e 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm foram altos, enquanto que para as demais FEs pode-se dizer que são valores aceitos na literatura¹¹¹.

A pobre performance para compostos básicos da coluna recheada com 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , pode ser devido a presença de grupos silanóis fortemente ácidos que ocorrem na superfície da sílica e também a níveis significantes de impurezas de alguns metais, que poderiam aumentar a acidez dos grupos silanóis que estejam na vizinhança deles ³⁰. É interessante notar que estes problemas trazem comportamento indesejável, principalmente para partículas de 5 μm , tanto irregulares como regulares. Partículas menores podem resultar em maior concentração de grupos silanóis, entretanto nos suportes irregulares esta distribuição pode ser mais heterogênea de forma que alguns solutos básicos não interagem por problemas de impedimento estérico, enquanto nos suportes regulares a distribuição dos silanóis residuais deve ser mais homogênea e ter uma maior interação com os solutos básicos gerando adsorções irreversíveis.

Por absorção atômica, verificou-se que as sílicas regulares apresentaram teor de sódio e ferro mais elevado que as irregulares. Por exemplo, para a sílica Sigma o teor de sódio encontrado foi de 1070 $\mu\text{g g}^{-1}$ enquanto na Spherisorb de 8 e 5 μm , foi respectivamente de 4315 e 2070 $\mu\text{g g}^{-1}$ e de ferro foi de 83, 263 e 123 $\mu\text{g g}^{-1}$ para Sigma e Spherisorb de 8 e 5 μm , respectivamente. Como o teor desses metais nas

sílicas regulares é maior que nas irregulares, os compostos básicos ficam mais retidos, ocorrendo até adsorção deles, como é o caso da Spherisorb, 5 μm .

É importante salientar que valores excelentes foram obtidos com a Lichrosorb Si-60, 10 μm e que o tempo de análise foi bem menor que para as demais fases e além disso, as três toluidinas eluíram juntas (ver Figuras 27 e 28), que, segundo Engelhardt e Jungheim¹²² indica uma coluna de boa qualidade. Esta fase apresentou após o enchimento, um conteúdo baixo de C, 8,5%, resultando provavelmente em uma menor espessura da fase estacionária líquida, que justifica o menor tempo de análise e de fator de retenção (Tabela 14).

Tabela 21 - Parâmetros cromatográficos obtidos utilizando a mistura III e diferentes FEs sorvidas.

FEs	t_p (μm)	composto injetado	parâmetros cromatográficos	
			A_s	α
40% PMOS-Davisil	10	anilina	2,5	–
		N,N-DMA	3,3	–
		p-tol/m-tol	–	1,3
		m-tol/o-tol	–	1,0
50% PMOS-Sigma	10	anilina	1,3	–
		N,N-DMA	1,2	–
		p-tol/m-tol	–	1,2
		m-tol/o-tol	–	1,0
50% PMOS-Si-100	10	anilina	1,8	–
		N,N-DMA	1,9	–
		p-tol/m-tol	–	1,2
		m-tol/o-tol	–	1,0
50% PMOS-Si-60	10	anilina	1,5	–
		N,N-DMA	1,3	–
		p-tol/m-tol	–	1,0
		m-tol/o-tol	–	1,0
50% PMOS-Si-60	7	anilina	1,6	–
		N,N-DMA	1,4	–
		p-tol/m-tol	–	1,0
		m-tol/o-tol	–	1,5
50% PMOS-Si-60	5	anilina	2,2	–
		N,N-DMA	2,1	–
		p-tol/m-tol	–	1,0
		m-tol/o-tol	–	1,4
40% PMOS-Spherisorb	8	anilina	1,6	–
		N,N-DMA	1,8	–
		p-tol/m-tol	–	1,2
		m-tol/o-tol	–	1,2
40% PMOS-Spherisorb	5	anilina N,N-DMA p-tol/m-tol m-tol/o-tol	problemas de adsorção dos compostos	

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL e detecção: UV, 254 nm.

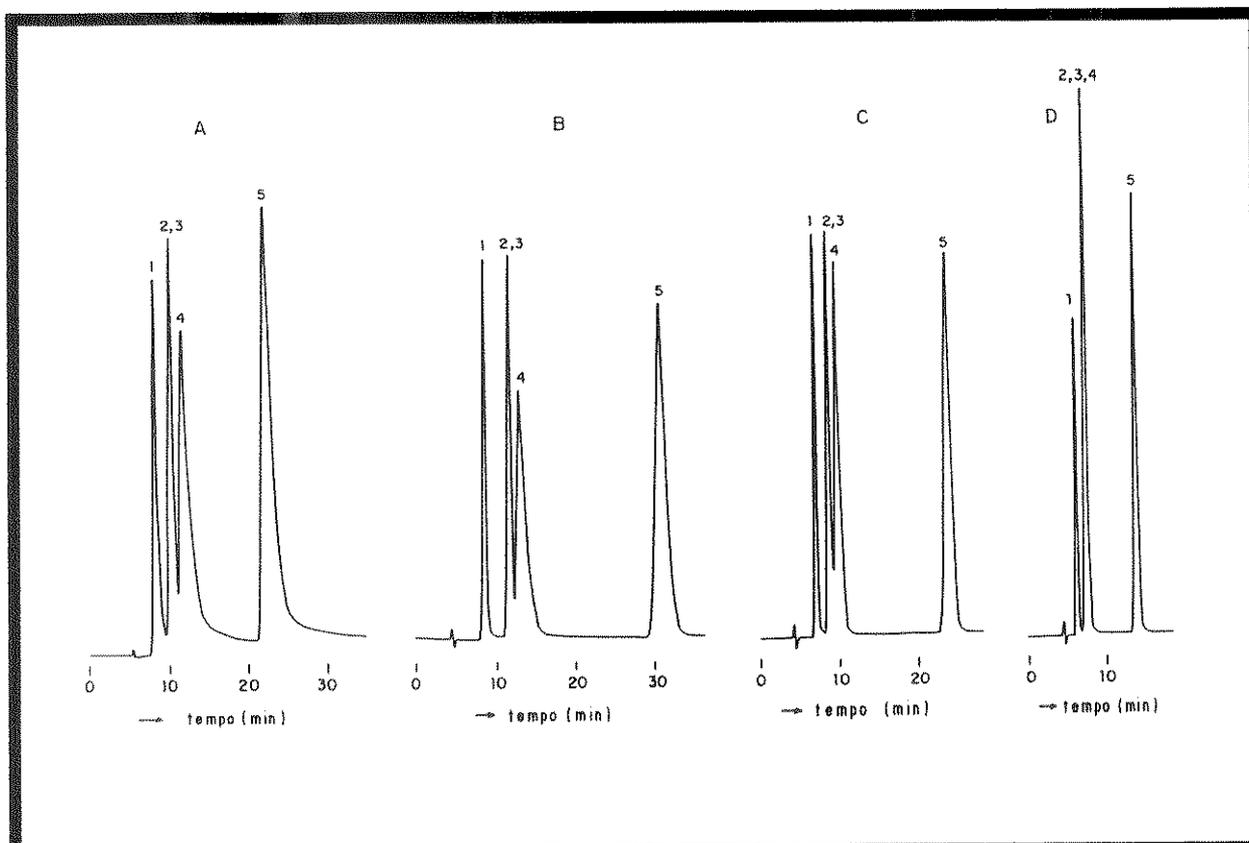


Figura 27 - Cromatogramas da mistura III: 1= anilina, 2, 3 e 4= o-,m- e p-toluidina, 5= N,N-DMA, obtidos com as colunas recheadas com: (A) 40% PMOS-Davisil, (B) 50% PMOS-Sigma, (C) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100 e (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm . Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹.

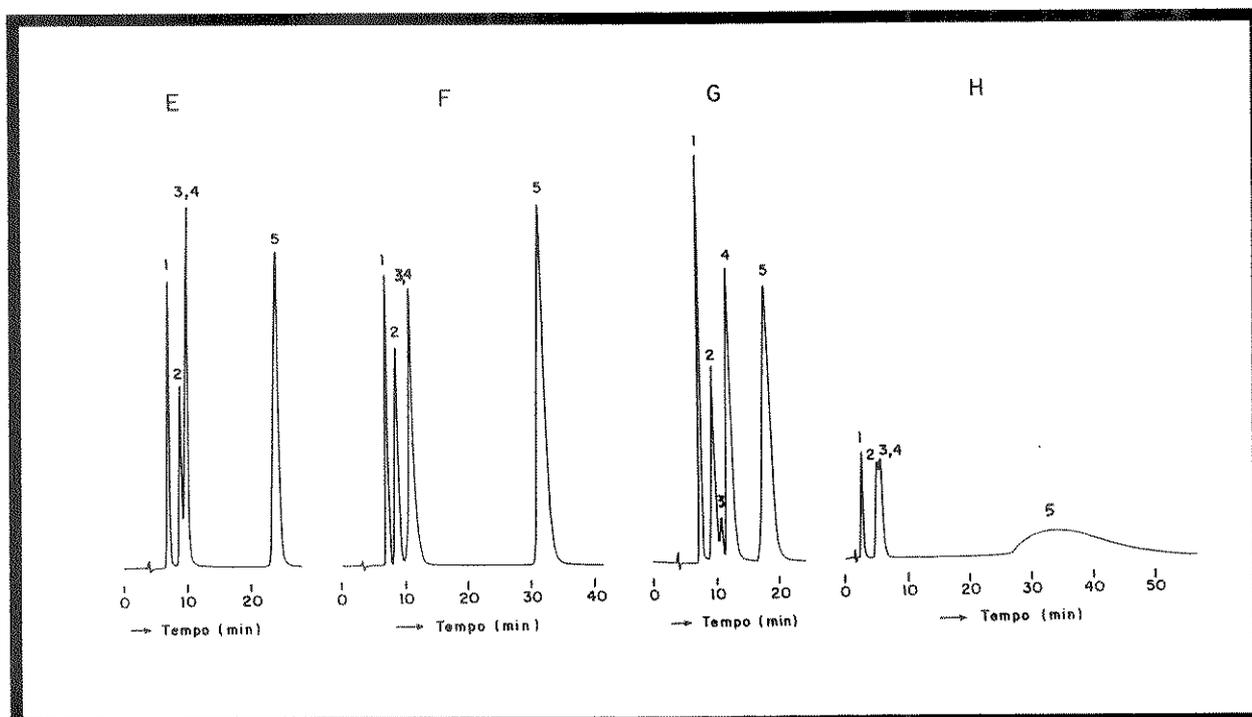


Figura 28 - Cromatogramas da mistura III obtidos com as colunas recheadas com: (E e F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 e 5 μm e (G e H) 40% PMOS-Spherisorb, 8 e 5 μm . Condições cromatográficas idem às da Figura 27.

A Tabela 22 apresenta os valores de A_s dos compostos da **mistura IV**, **anilina**, **N,N-DMA** e **N,N-DEA**. A coluna que apresentou melhor resultado foi a de 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, indicando que esta apresenta menos grupos silanóis expostos, o que é confirmado analisando a Tabela 17, onde se obteve um pico totalmente simétrico para o naftaleno ao injetar a mistura I, seguido da 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 μm . Novamente para a Lichrosorb Si-60, 5 μm , os valores de A_s foram os mais altos e para a Spherisorb, 5 μm , os picos dos compostos básicos foram sendo adsorvidos após cada injeção, o que reforça as explicações fornecidas para a mistura III.

Tabela 22 - Valores de A_s dos compostos da mistura IV em colunas recheadas com as FEs sorvidas.

FE	t_p (μm)	A_s		
		Anilina	N,N-DMA	N,N-DEA
40% PMOS-Davisil	10	1,9	1,7	3,3
50% PMOS-Sigma	10	1,3	1,2	2,6
50% PMOS-Lichrosorb Si-100	10	1,5	1,1	1,1
50% PMOS-Lichrosorb Si-60	10	1,8	1,8	5,8
50% PMOS-Lichrosorb Si-60	7	1,7	1,4	1,5
50% PMOS-Lichrosorb Si-60	5	2,2	2,3	4,1
40% PMOS-Spherisorb	8	1,7	1,2	–
40% PMOS-Spherisorb	5	problemas de adsorção dos compostos		

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,5 ml min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm.

IV.3.7. Estabilidade química das colunas cromatográficas recheadas com FEs sorvidas

Os resultados obtidos na lavagem com solvente em coluna recheada com 40% PMOS-Davisil indicam que não houveram mudanças apreciáveis nos valores de N, k e R_s (Figura 29). Logo, esta FE é estável frente a mistura de solventes MeOH/H₂O (70:30, v/v) mesmo após a passagem de 5000 vezes o volume da coluna.

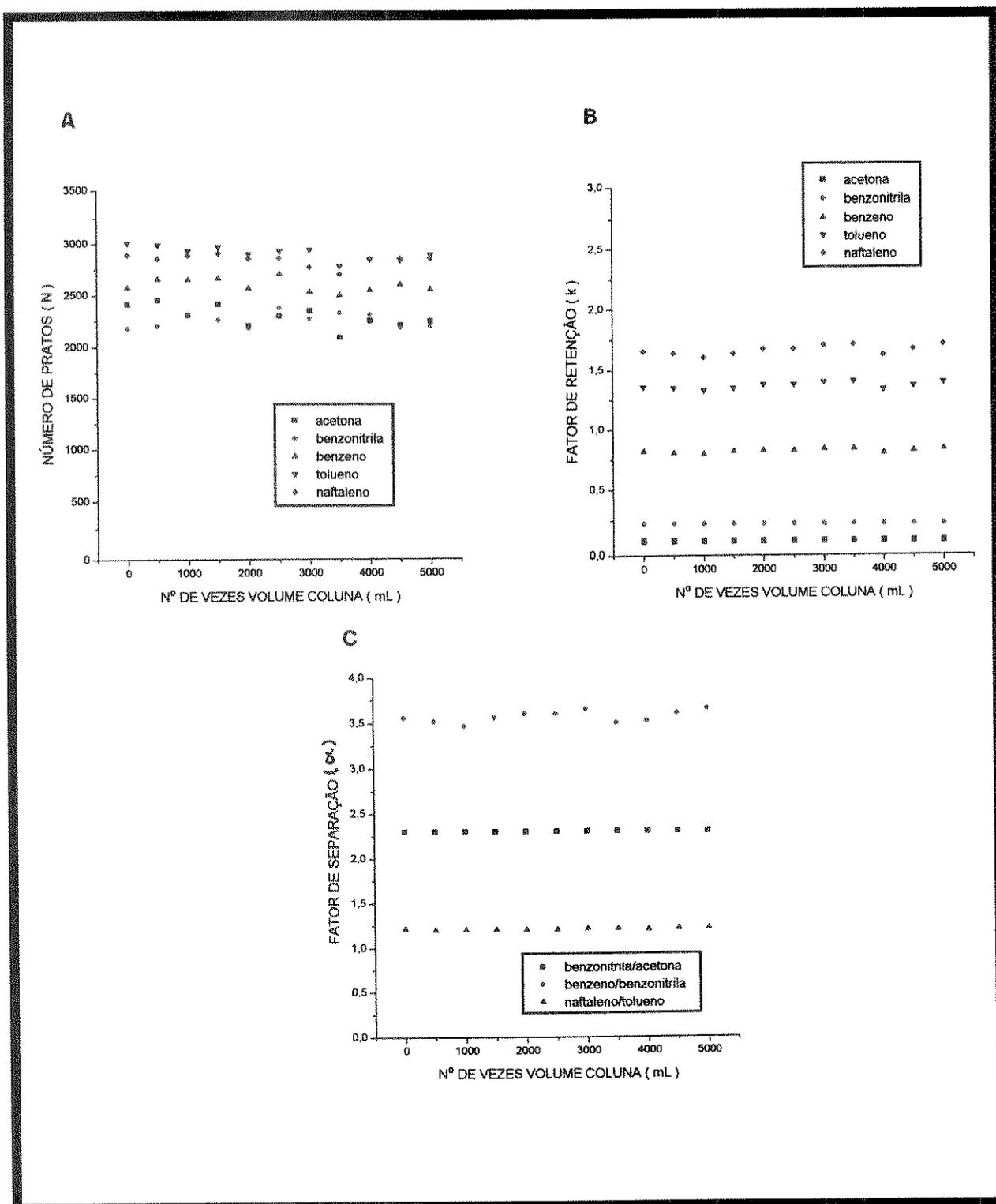


Figura 29 - (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 40% PMOS-Davisil, sorvida.

A Figura 30 apresenta os resultados obtidos para os parâmetros N, k e α , de todos os compostos da mistura I, após a lavagem com volumes de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) múltiplos do volume da coluna cromatográfica, contendo 50% PMOS-Sigma. Nota-se que usando esta FM não houveram mudanças relevantes. Os

valores de k e α não alteraram após a passagem de 20.000 x V_c , sugerindo que o uso desta FM não arrasta o PMOS e conseqüentemente, não ocorre solubilização da sílica.

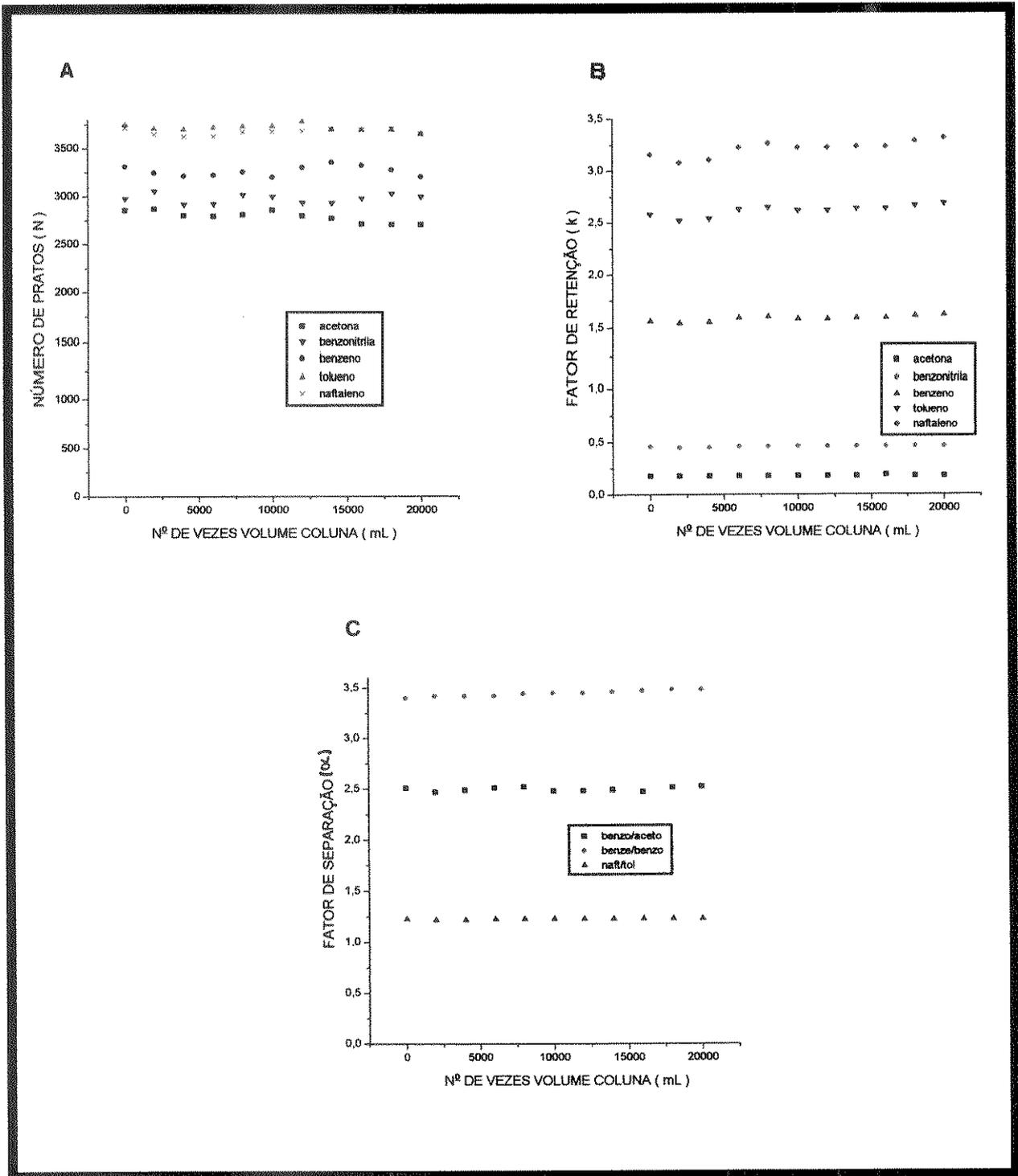


Figura 30 - (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α), como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida.

Com a FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 2, notam-se pequenas flutuações na eficiência da coluna (N). Observa-se também que para os compostos menos retidos, o k permaneceu constante, enquanto que para os compostos mais retidos houve uma pequena diminuição no seu valor. O oposto foi observado para o α (Figura 31C). Isto indica que ocorreu uma certa solubilização do PMOS de forma que a FE tornou menos apolar reduzindo, conseqüentemente, um pouco a permanência, na FE, dos compostos benzeno, tolueno e naftaleno. Os compostos acetona e benzonitrila, mais polares, interagem mais com a FM e não foram afetados pelas mudanças na FE.

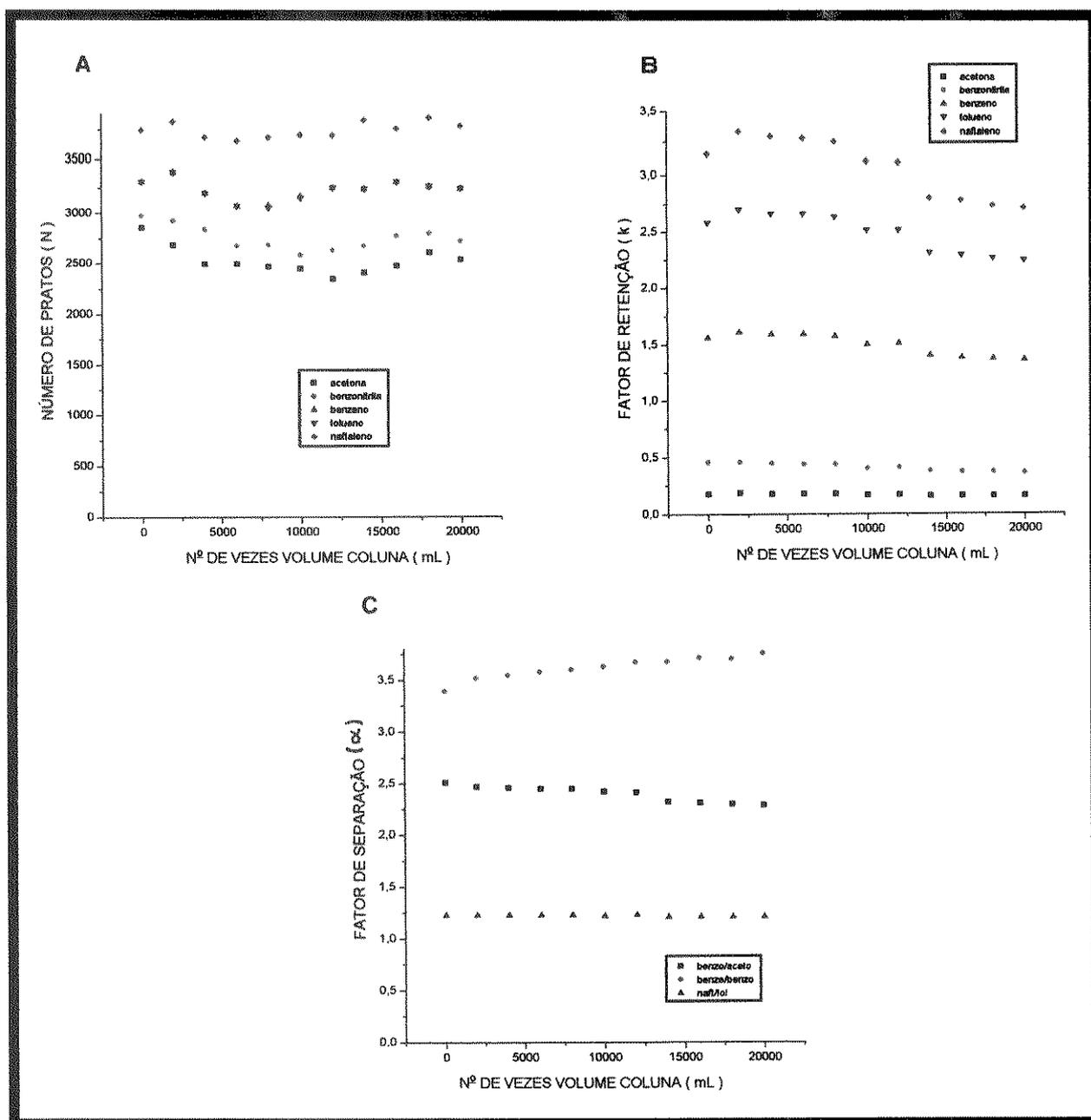


Figura 31 - (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 2 passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida.

Com a FM à pH 9, houve uma diminuição da eficiência da coluna até 4.000 x Vc e depois, ocorreram algumas flutuações. Quanto aos valores de k, os compostos mais retidos apresentaram uma leve alteração, indicando que uma pequena quantidade de PMOS foi arrastado. O α dos compostos de polaridade intermediária apresentaram um leve aumento (Figura 32C). Este comportamento foi semelhante ao da lavagem com a FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 2 da coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida.

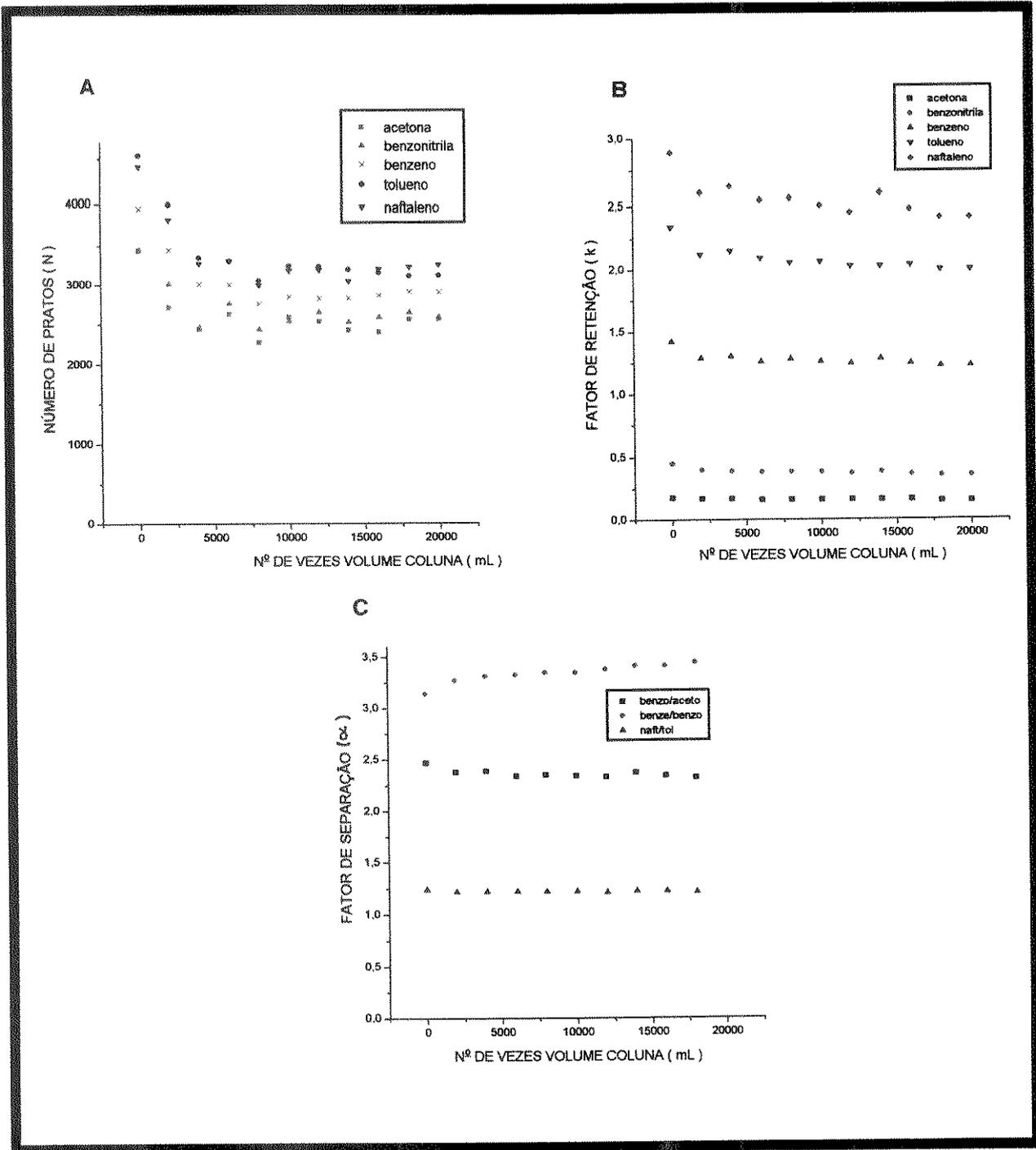


Figura 32 - (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 9 passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida.

Na Figura 33 têm-se os resultados obtidos com a mistura constituída de anilina e N,N-dimetilanilina, sendo analisados os parâmetros k e A_s , utilizando a FM MeOH/H₂O (70:30, v/v). Não se observaram mudanças consideráveis nos valores de k e houve um decréscimo em A_s no início do teste e depois este permaneceu praticamente constante. À pH 9 (Figura 34) notaram-se pequenos decréscimos no k para a N,N-DMA e um A_s com leves flutuações, até 6000 x V_c , que pode ser devido a mudanças na superfície da sílica, talvez no arranjo de grupos silanóis, que influenciam na retenção de compostos básicos. Já com a FM à pH 2 não se conseguiu fazer o experimento, porque após passado 2.000 x V_c , a anilina e a N,N-DMA ficaram muito retidas e apresentaram picos com cauda, como pode ser visto na Figura 35, onde se tem uma comparação dos cromatogramas desta amostra com a FM 70:30 v/v, à 0 x V_c e a 20.000 x V_c , e à pH 2, à 2.000 x V_c . Isto pode ter sido devido a um aumento do caráter ácido dos grupos silanóis, após a passagem de FM à pH 2 o que provocou uma maior interação da amostra básica com estes grupos.

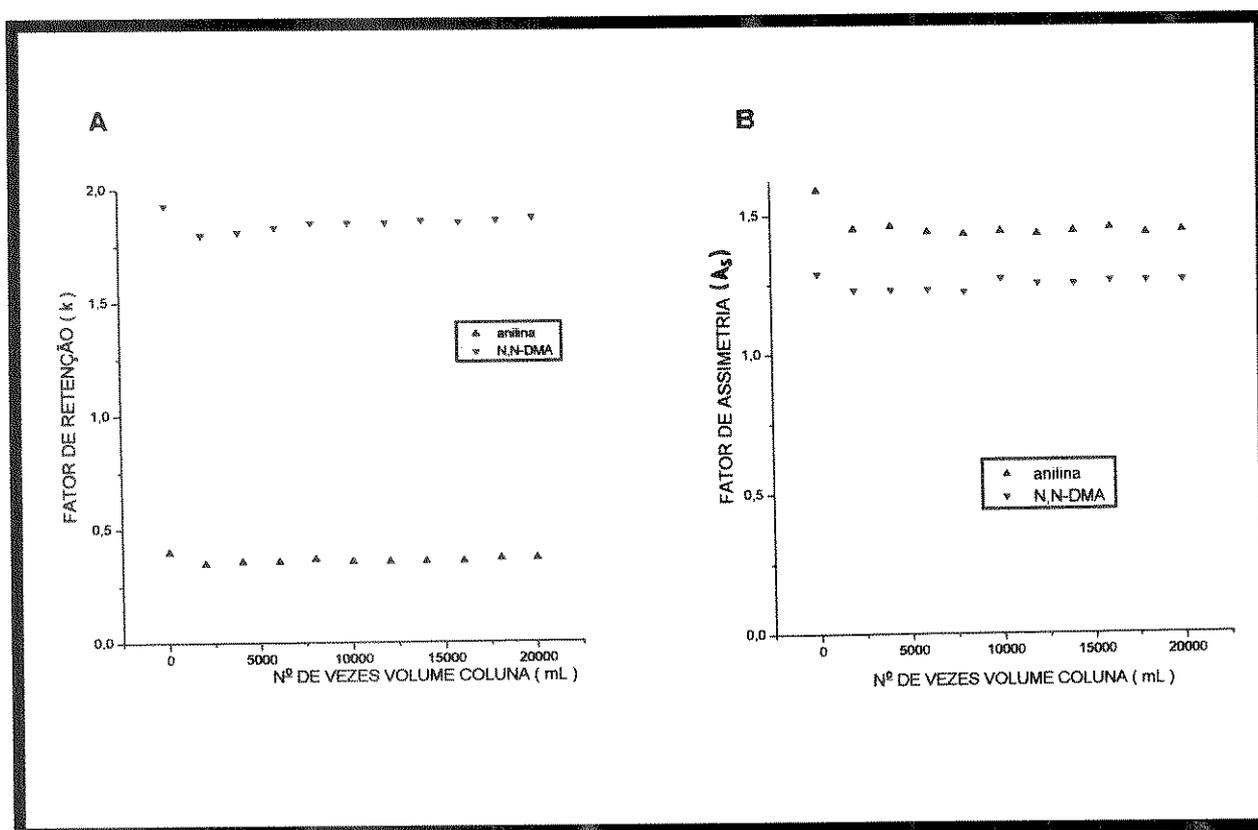


Figura 33 - (A) fator de retenção (k) e (B) fator de assimetria (A_s) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida.

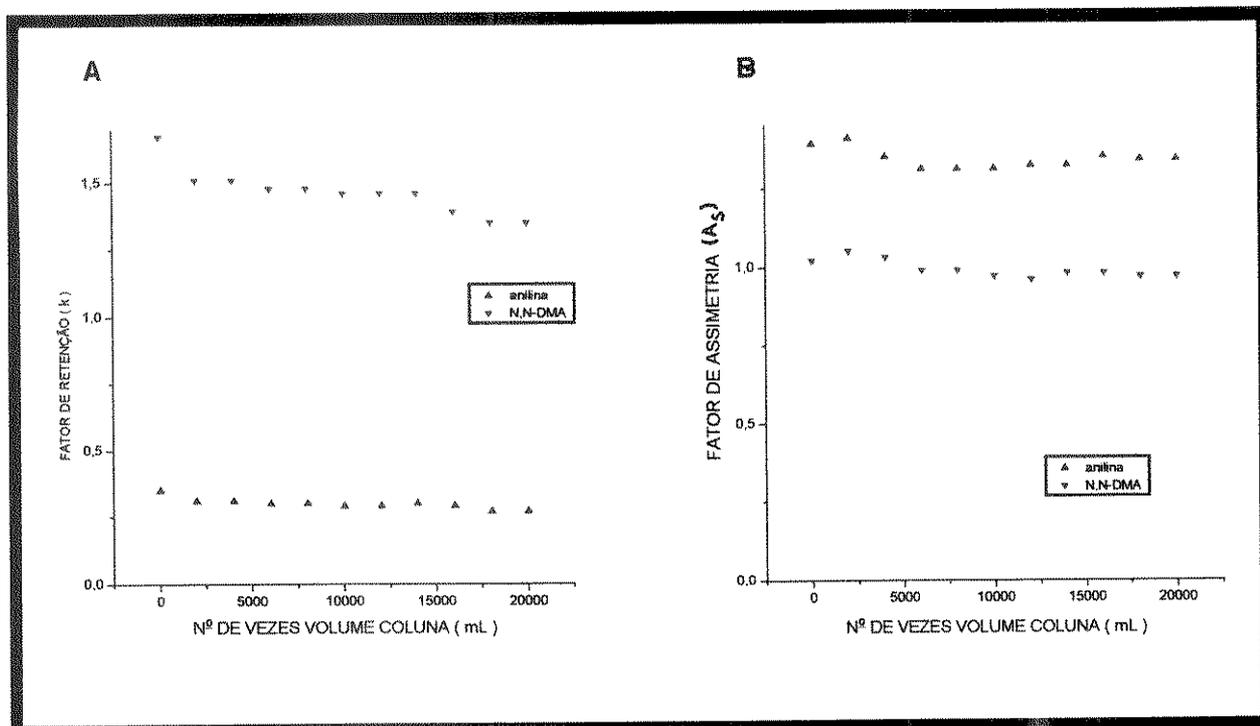


Figura 34 - (A) fator de retenção (k) e (B) fator de assimetria (A_s) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 9 passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida.

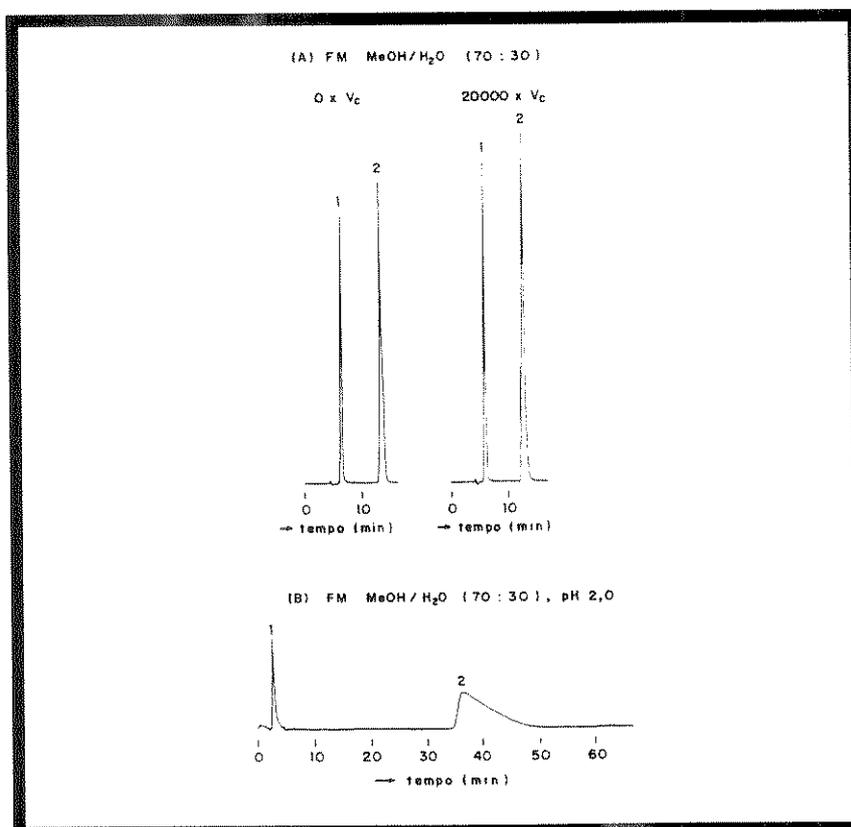


Figura 35 - Cromatogramas de compostos básicos: 1= anilina e 2= N,N-DMA, obtidos com a coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, sorvida, após passagem de volume de FM nas seguintes condições: (A) MeOH/H₂O (70:30, v/v) à 0 x V_c e à 20.000 x V_c e (B) MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 2 à 2.000 x V_c. Condições cromatográficas: vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 µL, detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹.

Apesar da fase estacionária líquida estar somente sorvida sobre a sílica, as colunas apresentaram uma boa estabilidade química. Utilizando-se a FM MeOH/H₂O (70:30, v/v), pode-se trabalhar arduamente com as colunas recheadas com as duas FEs usadas para este teste, sem perda de eficiência. Dessa forma pode-se dizer, analisando as Figuras 29, 30 e 33, que a FM 70:30 (v/v) pode ser usada tanto para a análise de compostos ácidos, neutros ou básicos, por longos períodos sem provocar deterioração da coluna. À pH 9, a coluna (no caso com 50% PMOS-Sigma) pode ser usada seguramente para o desenvolvimento de métodos, pois existem muitas análises que requerem o uso de FM com pH alto. Já com pH 2, ela fica restrita à análise de compostos neutros ou ácidos. Os resultados encontrados também indicam que a coluna recheada com este tipo de FE pode ser usada por mais de 235 dias à 8 h de trabalho/dia, à uma vazão de 0,2 mL min⁻¹, com FM MeOH/H₂O (70:30, v/v).

IV.4- CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DAS FEs IMOBILIZADAS POR RADIAÇÃO GAMA

IV.4.1 - Escolha da melhor dose de radiação gama

Nas Tabelas 23 e 24 encontram-se os resultados obtidos com as fases irradiadas em diferentes doses, sendo que as Lichrosorb Si-100 e Si-60 (10 e 7 µm) foram irradiadas somente na dose de 120 kGy devido a disponibilidade de sílica ser reduzida.

Tanto para as fases utilizando sílica Davisil e Sigma, os melhores resultados foram obtidos com a dose de 80 kGy. Para a Lichrosorb Si-60, 5 µm, foi com 120 kGy. De acordo com o trabalho anterior ¹¹³, a faixa de dose de radiação gama que forneceu colunas com as melhores eficiências foi de 80 a 120 kGy.

Para as sílicas esféricas (Spherisorb), as doses de 80 e 120 kGy forneceram colunas com fatores de assimetria fora do intervalo aceito na literatura ¹¹¹. Devido a isso mandaram-se irradiar estas FEs em doses mais baixa (20 kGy) o que resultou em uma melhora do fator de assimetria, mas para a Spherisorb 8 µm, o valor ainda não se encontra dentro do intervalo aceito. As doses de radiação 80 e 120 kGy devem promover uma maior imobilização do PMOS na sílica, o que prejudica o comportamento cromatográfico e o fato da sílica ser esférica, com características diferentes das irregulares, influencia nas diferenças que existem entre elas.

Observa-se, de um modo geral, uma variação muito pequena nos valores de k , R_s com a variação da dose de radiação e α permaneceu constante.

Tabela 23 - Influência da dose de radiação gama nas FEs.

FES	DAVISIL, 10 μm		SIGMA, 10 μm		LICH.Si-100,10 μm	LICH. Si-60,10 μm
carregamento (%)	40		50		50	50
dose(kGy)	80	120	80	120	120	120
Parâmetros [#]						
N^*	3300	2900	4550	4150	4550	5450
N/m (m^{-1})*	26400	23200	36400	33200	36400	43600
k^*	2,5	2,7	6,6	6,6	6,3	6,2
A_s^*	1,3	1,6	1,2	1,3	1,1	1,2
R_s^{**}	1,9	1,9	2,7	2,4	2,6	3,0
α^{**}	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
tempo anál.(min)*	17,28	17,66	26,05	25,18	27,14	22,85

* calculado para o naftaleno

** calculado para o par tolueno-naftaleno

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm.

Tabela 24 - Influência da dose de radiação gama nas FEs.

FES	LICH.SI-60,7 μm	LICH.SI-60,5 μm		SPHERISORB,8 μm			SPHERISORB,5 μm			
carregamento (%)	50	50		40			40			
dose(kGy)	120	80	120	20	80	120	20	80	120	
Parâmetros [#]										
N^*	4700	6900	8300	4950	5400	5000	8800	9450	8350	
N/m (m^{-1})*	37600	55200	66400	39600	43200	40000	70400	75600	66800	
k^*	6,4	6,4	6,4	6,5	6,9	6,4	4,7	6,7	6,5	
A_s^*	0,9	1,4	0,9	0,7	0,6	0,5	0,9	0,5	0,6	
R_s^{**}	2,7	3,4	3,6	3,0	2,9	2,7	4,0	4,3	3,8	
α^{**}	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	
tempo (min)*	21,59	24,65	20,99	20,44	19,47	22,53	18,33	21,88	20,58	

* calculado para o naftaleno

** calculado para o par tolueno-naftaleno

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL e detecção: UV, 254 nm.

IV.4.2. Testes físicos, químicos e cromatográficos

Na Tabela 25 encontram-se os resultados obtidos de testes físicos e químicos e na Tabela 26 de testes cromatográficos obtidos com as FEs imobilizadas na sua melhor dose de radiação e das FEs sorvidas, que foram colocados para facilitar uma comparação entre ambas.

As áreas superficiais das FEs iniciais com todos os tipos de suporte cromatográfico, com exceção da sílica Davisil, Sigma e Lichrosorb Si-100, permaneceram constantes. Após o enchimento, a área superficial das FEs sorvidas e imobilizadas aumentou devido a uma certa perda de PMOS durante o processo de recheio da coluna. Contudo, este valor foi menor nas FEs imobilizadas porque a radiação gama promoveu o entrecruzamento entre as cadeias poliméricas, dificultando o acesso das moléculas de nitrogênio durante as medidas de área.

O teor de carbono inicial para as FEs sorvidas e imobilizadas praticamente não alterou, indicando que a camada de hidrocarbonetos permaneceu constante. Quanto ao teor de carbono após o enchimento, verifica-se que houve uma retirada

Tabela 25 - Resultados obtidos por testes químicos e físicos com as FEs imobilizadas na sua melhor dose de radiação e com as FEs sorvidas.

Parâmetros FEs	t _p (μm)	tipo de FE	S (m ² g ⁻¹)		C (%)		% total extraída
			inicial	após ench.	inicial	após ench.	
Davisil	10	sorvida	59	161	22,8	11,5	21,5
		imobilizada (80 kGy)	56	120	22,8	16,3	14,9
Sigma	10	sorvida	1	87	30,2	17,7	25,6
		imobilizada (80 kGy)	0,2	18	30,2	21,7	20,8
Lichrosorb Si-100	10	sorvida	0,9	99	29,7	16,9	23,1
		imobilizada (120 kGy)	0,2	23	30,0	24,5	15,9
Lichrosorb Si-60	10	sorvida	0,3	183	30,4	8,5	30,1
		imobilizada (120 kGy)	0,2	42	30,5	22,0	21,5
Lichrosorb Si-60	7	sorvida	0,2	–	30,5	18,0	29,8
		imobilizada (120 kGy)	0,2	–	30,5	21,6	20,6
Lichrosorb Si-60	5	sorvida	0,6	62	30,0	18,8	26,6
		imobilizada (120 kGy)	0,6	21	30,0	20,4	23,1
Spherisorb	8	sorvida	0,0	2	24,9	14,9	23,0
		imobilizada (20 kGy)	0,2	0,9	24,8	15,1	22,0
Spherisorb	5	sorvida	0,5	99	23,8	13,5	22,1
		imobilizada (20 kGy)	0,5	52	23,8	13,1	21,2

de PMOS, tanto para as fases sorvidas como para as imobilizadas, sendo que nas imobilizadas o teor é superior, com exceção da Spherisorb, 5 μm , mostrando que provavelmente ocorreu imobilização do PMOS após a irradiação.

A % total extraída por solventes das FEs imobilizadas foi menor que das FEs sorvidas, confirmando que deve ter ocorrido imobilização do PMOS na sílica. Nota-se que para a sílica Spherisorb, tanto na de 8 e 5 μm , a diferença entre a % total extraída na FE sorvida e imobilizada foi menor que para as sílicas irregulares, devido a dose de radiação ter sido bem mais baixa. Os valores de % C após o enchimento reforçam os resultados obtidos com a % total extraída e mostram que a radiação gama promoveu o entrecruzamento da camada polimérica, de forma que houve um aumento no conteúdo de carbono, que refletiu em um maior valor tanto do fator de retenção como do tempo de retenção do naftaleno, um composto apolar.

Comparando os dados cromatográficos, Tabela 26, nota-se que após a irradiação, nas colunas enchidas com os materiais 40% PMOS-Davisil, 50% PMOS-Sigma, 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, 50% PMOS-Lichrosorb Si-60 (10 e 5 μm) ocorreu um aumento na eficiência da coluna, sendo mais pronunciado nas de 50% PMOS-Si-60 (10 e 5 μm), ou seja, a radiação gama deve ter gerado radicais livres que favoreceram o entrecruzamento e com isso, melhorou a qualidade destas FEs. Das sílicas irregulares, somente com a de 7 μm não se obteve uma eficiência superior que a da sorvida. Já para a sílica esférica de 8 μm , a radiação gama não foi benéfica, pois houve uma diminuição acentuada na eficiência da coluna e o fator de assimetria se encontra fora do intervalo aceito na literatura ¹¹¹. Este comportamento inverso ao das sílicas irregulares se deve as características das sílicas esféricas serem diferentes.

Observa-se que após a imobilização do PMOS sobre o suporte por radiação gama, os valores de tempo de análise, t_R , e fator de retenção, k , do naftaleno aumentaram, mostrando que a radiação gama deve ter promovido o entrecruzamento do polímero, que resultou em uma maior retenção do naftaleno na FE. Isto traz vantagem à análise de compostos de polaridade intermediária ao desta mistura, pois deixam de apresentar problemas de sobreposição de picos, como pode ser visto nas Figuras 36–39, onde existe um espaço maior entre os picos da benzonitrila e benzeno e benzeno e tolueno.

Tabela 26 - Caracterização através de testes cromatográficos realizados injetando-se a mistura I, nas colunas recheadas com FEs imobilizadas na sua melhor dose de radiação e comparação com as FEs sorvidas.

FES	Parâmetros t_p (μm)	tipo de FE	t_M^* (min)	t_R^{**} (min)	Parâmetros cromatográficos [#]					
					N^{**}	N/m^{**} (m^{-1})	A_S^{**}	k^{**}	R_s^{***}	α^{***}
Davisil	10	sorvida	5,32	15,02	3000	24000	1,4	1,8	1,8	1,2
		imobilizada (80 kGy)	4,98	17,28	3300	26400	1,3	2,5	1,9	1,2
Sigma	10	sorvida	4,48	20,62	4300	34400	1,1	3,6	2,7	1,2
		imobilizada (80 kGy)	3,42	26,05	4550	36400	1,2	6,6	2,7	1,2
Lichrosorb Si-100	10	sorvida	4,08	17,10	4200	33600	1,0	3,2	2,4	1,2
		imobilizada (120 kGy)	3,72	27,14	4550	36400	1,1	6,3	2,6	1,2
Lichrosorb Si-60	10	sorvida	4,56	11,29	4400	35200	1,2	1,5	2,0	1,2
		imobilizada (120 kGy)	3,16	22,85	5450	43600	1,2	6,2	3,0	1,2
Lichrosorb Si-60	7	sorvida	3,83	15,83	5150	41200	1,3	3,1	2,7	1,2
		imobilizada (120 kGy)	2,90	21,59	4700	37600	0,9	6,4	2,7	1,2
Lichrosorb Si-60	5	sorvida	3,37	19,52	6300	50400	1,2	4,8	3,2	1,2
		imobilizada (120 kGy)	2,82	20,99	8300	66400	0,9	6,4	3,6	1,2
Spherisorb	8	sorvida	4,04	20,51	7300	58400	1,0	4,1	3,4	1,2
		imobilizada (20 kGy)	2,73	20,44	4950	39600	0,7	6,5	3,0	1,2
Spherisorb	5	sorvida	3,91	12,30	9300	74400	1,3	2,1	3,3	1,2
		imobilizada (20 kGy)	3,23	18,33	8800	70400	0,9	4,7	4,0	1,2

* para o metanol

** calculado para o naftaleno

*** calculado para o par tolueno-naftaleno

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL e detecção: UV, 254 nm.

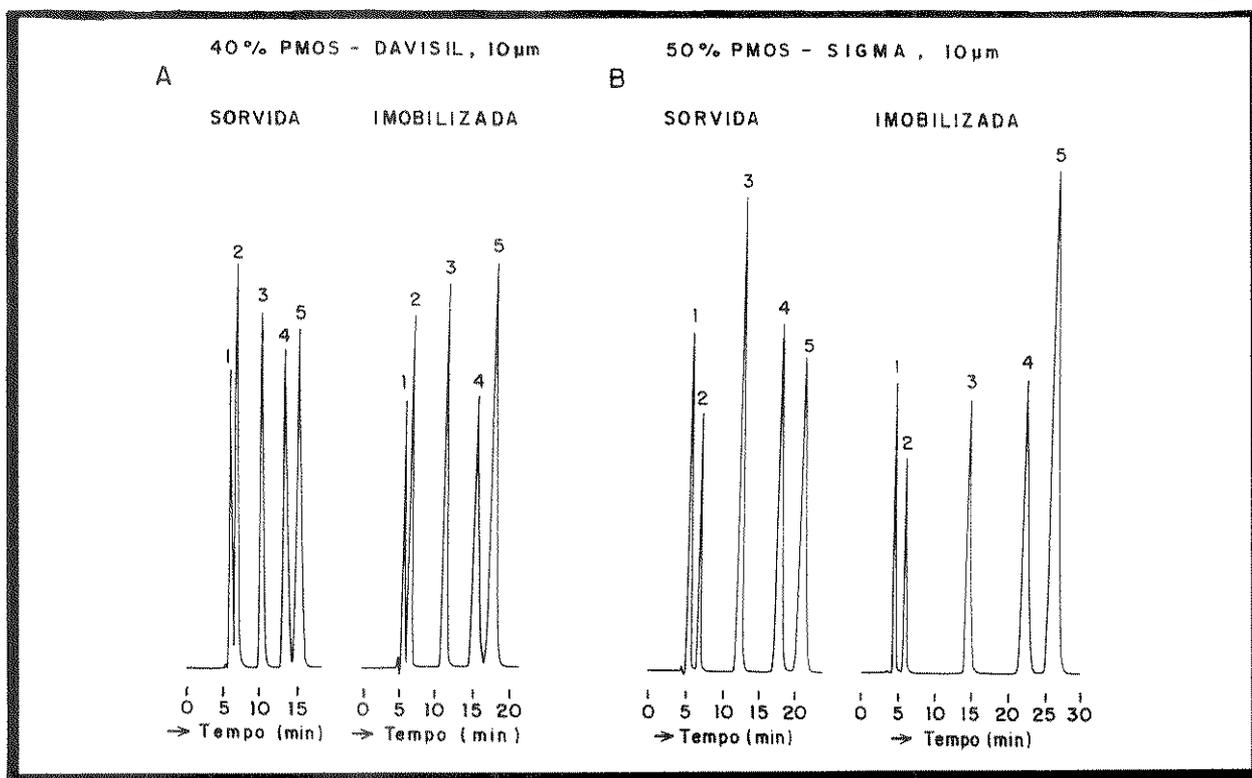


Figura 36 - Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno e 5= naftaleno, obtidos com as colunas recheadas com (A) 40% PMOS-Davisil, sorvida e imobilizada (80 kGy) e (B) 50% PMOS-Sigma, sorvida e imobilizada (80KGy). Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL, detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹.

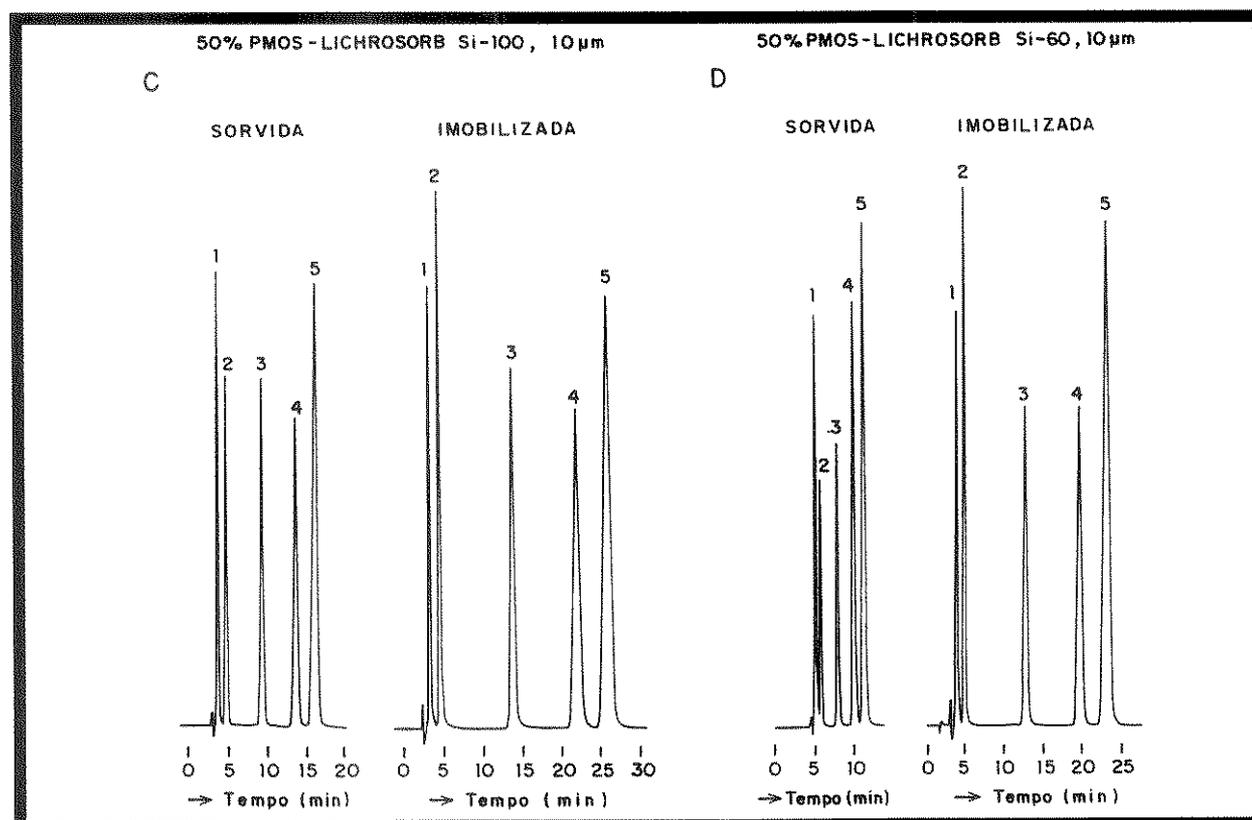


Figura 37 - Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com (C) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, sorvida e imobilizada (120 kGy) e (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm, sorvida e imobilizada (120 kGy). Condições cromatográficas idênticas às da Figura 36.

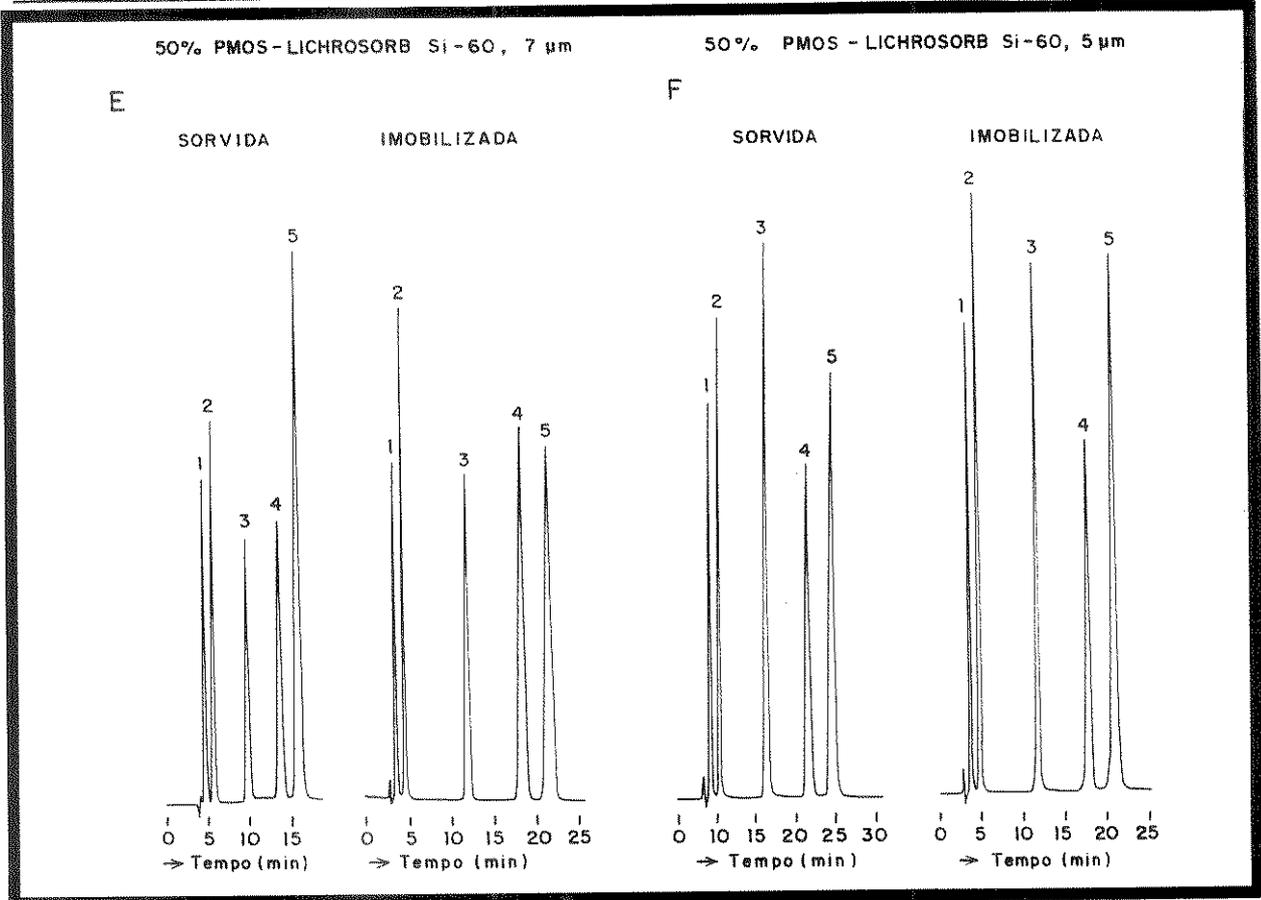


Figura 38 - Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com (E) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 µm, sorvida e imobilizada (120 kGy) e (F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 µm, sorvida e imobilizada (120 kGy). Condições cromatográficas idênticas às da Figura 36.

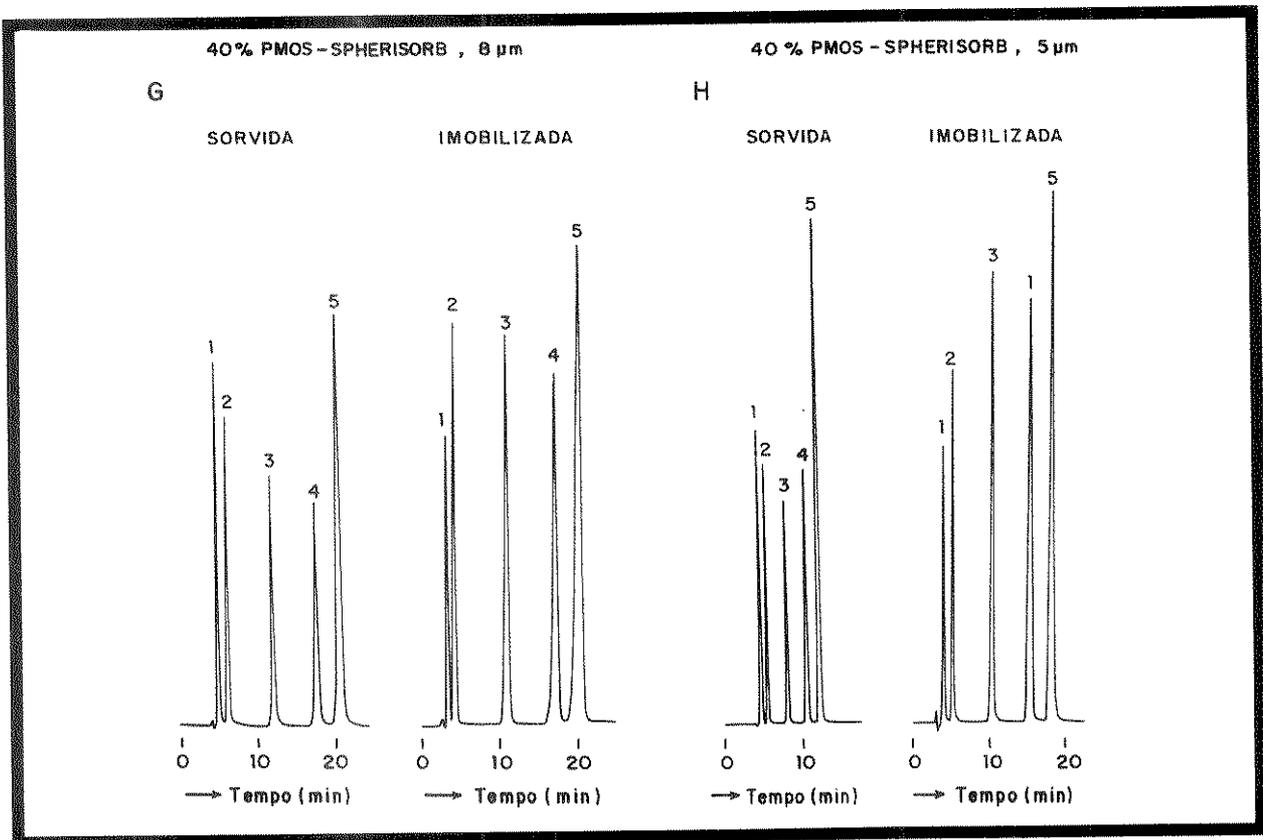


Figura 39 - Cromatogramas da mistura I obtidos com as colunas recheadas com (G) 40% PMOS-Spherisorb, 8 µm, sorvida e imobilizada (20 kGy) e (H) 40% PMOS-Spherisorb, 5 µm, sorvida e imobilizada (20 kGy). Condições cromatográficas idênticas às da Figura 36.

IV.4.3. Testes cromatográficos com as misturas II, III e IV

A seguir, na Tabela 27, têm-se os resultados obtidos ao se injetar a mistura constituída de **acetilacetona, nitronaftaleno e naftaleno, mistura II.**

Tabela 27 - Valores de tempo de retenção (t_R) fator de assimetria (A_s) e fator de separação (α) para as FEs sorvidas e imobilizadas, após injeção da mistura II.

FEs	t_p (μm)	tipo de FE	parâmetros cromatográficos [#]		
			t_R (min)*	A_s **	α ***
40% PMOS-Davisil	10	sorvida	39,36	6,9	1,9
		imobilizada (80 kGy)	50,39	7,0	2,2
50% PMOS-Sigma	10	sorvida	67,65	7,0	2,0
		imobilizada (80 kGy)	96,17	8,0	2,2
50% PMOS-Si-100	10	sorvida	51,37	7,0	1,5
		imobilizada (120 kGy)	90,11	9,5	2,4
50% PMOS-Si-60	10	sorvida	26,61	9,2	1,7
		imobilizada (120 kGy)	83,24	7,8	2,5
50% PMOS-Si-60	7	sorvida	51,77	9,1	1,8
		imobilizada (120 kGy)	84,97	5,5	2,3
50% PMOS-Si-60	5	sorvida	66,99	11,8	1,9
		imobilizada (120 kGy)	76,71	6,8	2,1
40% PMOS-Spherisorb	8	sorvida	57,85	4,8	2,1
		imobilizada (20 kGy)	75,49	8,5	2,6
40% PMOS-Spherisorb	5	sorvida	32,92	4,6	1,6
		imobilizada (20 kGy)	58,86	3,8	1,7

* naftaleno ** calculado para a acetilacetona *** calculado para o par naftaleno-nitronaftaleno

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL e detecção: UV, 254 nm.

Analisando-se a Tabela 27, verifica-se que o tempo de retenção do naftaleno foi bem maior nas FEs imobilizadas que nas sorvidas, comprovando que a radiação gama gerou o entrecruzamento da cadeia polimérica, que resultou em maior retenção do composto mais apolar da mistura, que possui maior afinidade pela FE. Os valores de fator de assimetria, calculado para a acetilacetona, em algumas FEs imobilizadas aumentaram e em outras diminuíram em relação aos das FEs sorvidas. Como o conteúdo de metais é o mesmo, tanto nas FEs sorvidas como nas imobilizadas, e o tempo de retenção da acetilacetona permaneceu praticamente

constante em ambas as fases, conclue-se que o entrecruzamento ocorreu aleatoriamente, provocando em algumas FEs maior bloqueio e em outras maior exposição dos metais ou dos grupos silanóis residuais presentes na sílica. Os valores de α aumentaram após a irradiação, portanto houve uma mudança na seletividade da FE que pode ser atribuída ao entrecruzamento do PMOS, que provocou uma retenção bem maior do soluto mais apolar. Exemplos de cromatogramas usando-se esta mistura estão apresentados nas Figuras 40 e 41.

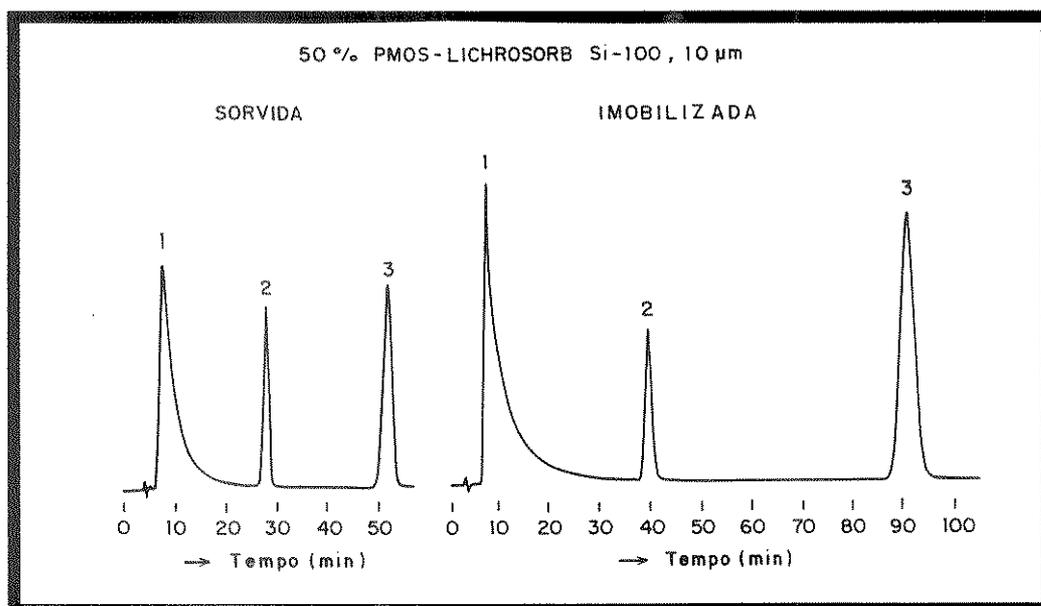


Figura 40 - Cromatogramas da mistura II: 1= acetilacetona, 2= nitronaftaleno e 3= naftaleno, obtidos com a coluna recheada com 50% PMOS-Lichrosorb Si-100. Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 µL, detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹.

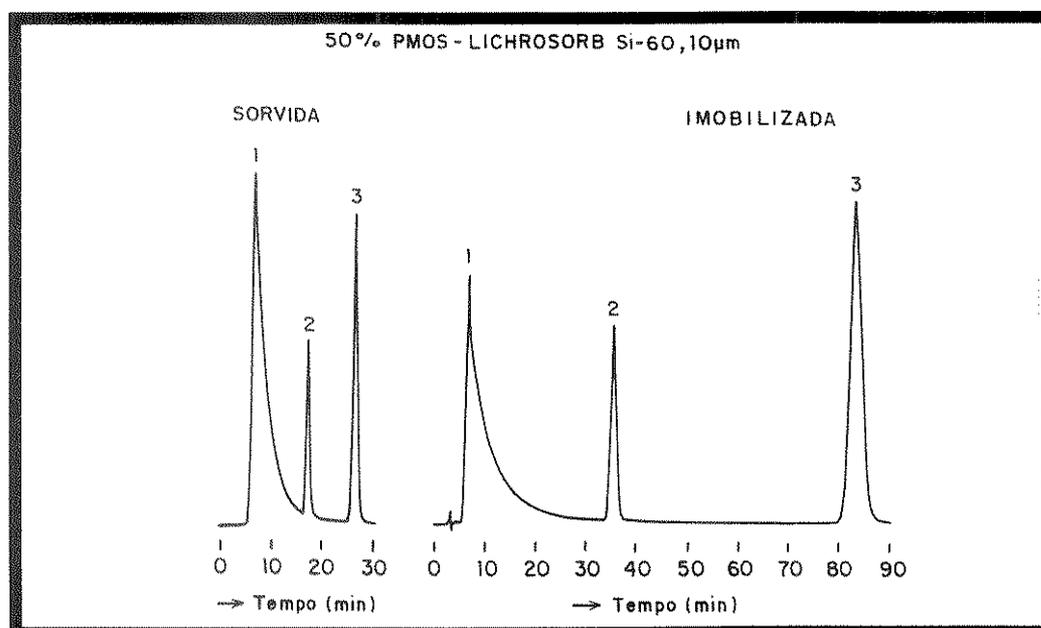


Figura 41 - Cromatogramas da mistura II obtidos com a coluna recheada com 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 µm. Condições cromatográficas idênticas às da Figura 40.

Na Tabela 28 estão apresentados os resultados obtidos ao se injetar a mistura constituída de **anilina, o-, m- e p-toluidina e N,N-dimetilanilina**. Com exceção das fases com 40% PMOS-Davisil, 80 kGy e 50% PMOS-Si-60, 5 μm , 120 kGy, a radiação gama não trouxe benefícios aos materiais irradiados na separação de compostos básicos. O entrecruzamento do PMOS pode ter formado regiões não homogêneas na sílica e ter dificultado a saída dos compostos básicos da FE.

Observa-se que na coluna recheada com 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , os compostos básicos ficaram adsorvidos irreversivelmente como ocorreu com as FEs sorvidas, confirmando, dessa forma as afirmações feitas no item IV.3.6.

Tabela 28 - Parâmetros cromatográficos obtidos ao se injetar a mistura III nas FEs.

FEs	t_b (μm)	compostos injetados	parâmetros cromatográficos [#]			
			A_s		α	
			sorvida	imobiliz.	sorvida	imobiliz.
40% PMOS-Davisil	10	anilina	2,5	2,2	–	–
		N,N-DMA	3,3	1,9	–	–
		p-tol/m-tol	–	–	1,3	1,4
		m-tol/o-tol	–	–	1,0	1,0
50% PMOS-Sigma	10	anilina	1,3	resultado	–	resultado
		N,N-DMA	1,2	não repro-	–	não repro-
		p-tol/m-tol	–	ductível	1,2	ductível
		m-tol/o-tol	–		1,0	
50% PMOS-Si-100	10	anilina	1,8	–	–	–
		N,N-DMA	1,9	1,1	–	–
		p-tol/m-tol	–	–	1,2	1,0
		m-tol/o-tol	–	–	1,0	2,1
50% PMOS-Si-60	10	anilina	1,5	adsor-	–	adsor-
		N,N-DMA	1,3	vidos	–	vidos
		p-tol/m-tol	–		1,0	
		m-tol/o-tol	–		1,0	
50% PMOS-Si-60	7	anilina	1,6	–	–	–
		N,N-DMA	1,4	3,6	–	–
		p-tol/m-tol	–	–	1,2	1,1
		m-tol/o-tol	–	–	1,5	1,4
50% PMOS-Si-60	5	anilina	2,2	2,3	–	–
		N,N-DMA	2,1	1,4	–	–
		p-tol/m-tol	–	–	1,0	1,0
		m-tol/o-tol	–	–	1,4	1,5
40% PMOS-Spherisorb	8	anilina	1,6	adsor-	–	adsor-
		N,N-DMA	1,8	vidos	–	vidos
		p-tol/m-tol	–		1,2	
		m-tol/o-tol	–		1,2	
40% PMOS-Spherisorb	5	anilina	adsor-	adsor-	adsor-	adsor-
		N,N-DMA	vidos	vidos	vidos	vidos
		p-tol/m-tol				
		m-tol/o-tol				

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL e detecção: UV, 254 nm.

Na Tabela 29 têm-se os valores de A_s dos compostos da **mistura IV, anilina, N,N-DMA e N,N-DEA**.

Tabela 29 - Valores de A_s dos compostos da mistura IV em colunas recheadas com as FEs imobilizadas.

FEs	dose (kGy)	t_p (μ m)	A_s		
			anilina	N,N-DMA	N,N-DEA
40% PMOS-Davisil	80	10	2,1	1,9	5,1
50% PMOS-Sigma	80	10	3,0	4,7	–
50% PMOS-Lichrosorb Si-100	120	10	1,5	1,1	1,1
50% PMOS-Lichrosorb Si-60	120	10	2,4	3,3	–
50% PMOS-Lichrosorb Si-60	120	7	4,5	6,1	–
50% PMOS-Lichrosorb Si-60	120	5	2,4	3,3	–
40% PMOS-Spherisorb	20	8	1,9	1,4	–
40% PMOS-Spherisorb	20	5	problemas de adsorção dos compostos		

Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,5 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μ L e detecção: UV, 254 nm.

Com exceção da coluna recheada com 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, cujos valores de A_s foram iguais aos da FE sorvida (ver Tabela 22), as demais colunas apresentaram A_s altos e, na maioria, a N,N-DEA foi ficando muito retida e apresentando cauda enorme. Através da extração por solventes e análise elementar, verifica-se que há uma maior quantidade de PMOS sobre o suporte após a irradiação. Desta forma, as FEs imobilizadas não apresentam maior quantidade de grupos silanóis expostos que as FEs sorvidas. Sabe-se que o A_s está mais relacionado aos grupos silanóis, no entanto, para estes casos, o aumento no A_s pode ser atribuído a uma maior retenção do composto na FE e com isso ocorre um processo mais lento no seu retorno, fazendo com que o pico se torne mais assimétrico.

IV.4.4 - Testes físicos

IV.4.4.1. Espectroscopia no infravermelho

Nas Figuras 42 e 43 encontram-se os espectros no infravermelho das FEs, sorvidas e imobilizadas. As bandas já foram atribuídas no item IV.3.2.

Analisando os espectros das FEs sorvidas e imobilizadas, observa-se que, com exceção da Davisil, as bandas atribuídas ao PMOS (2900, 1466 e 1258 cm^{-1}) apresentaram um leve aumento na intensidade nas FEs imobilizadas, devido a uma maior retenção de PMOS nas sílicas das FEs imobilizadas, provocada pelo entrecruzamento do PMOS, que também pode ser apoiado pela extração por solventes e teor de carbono.

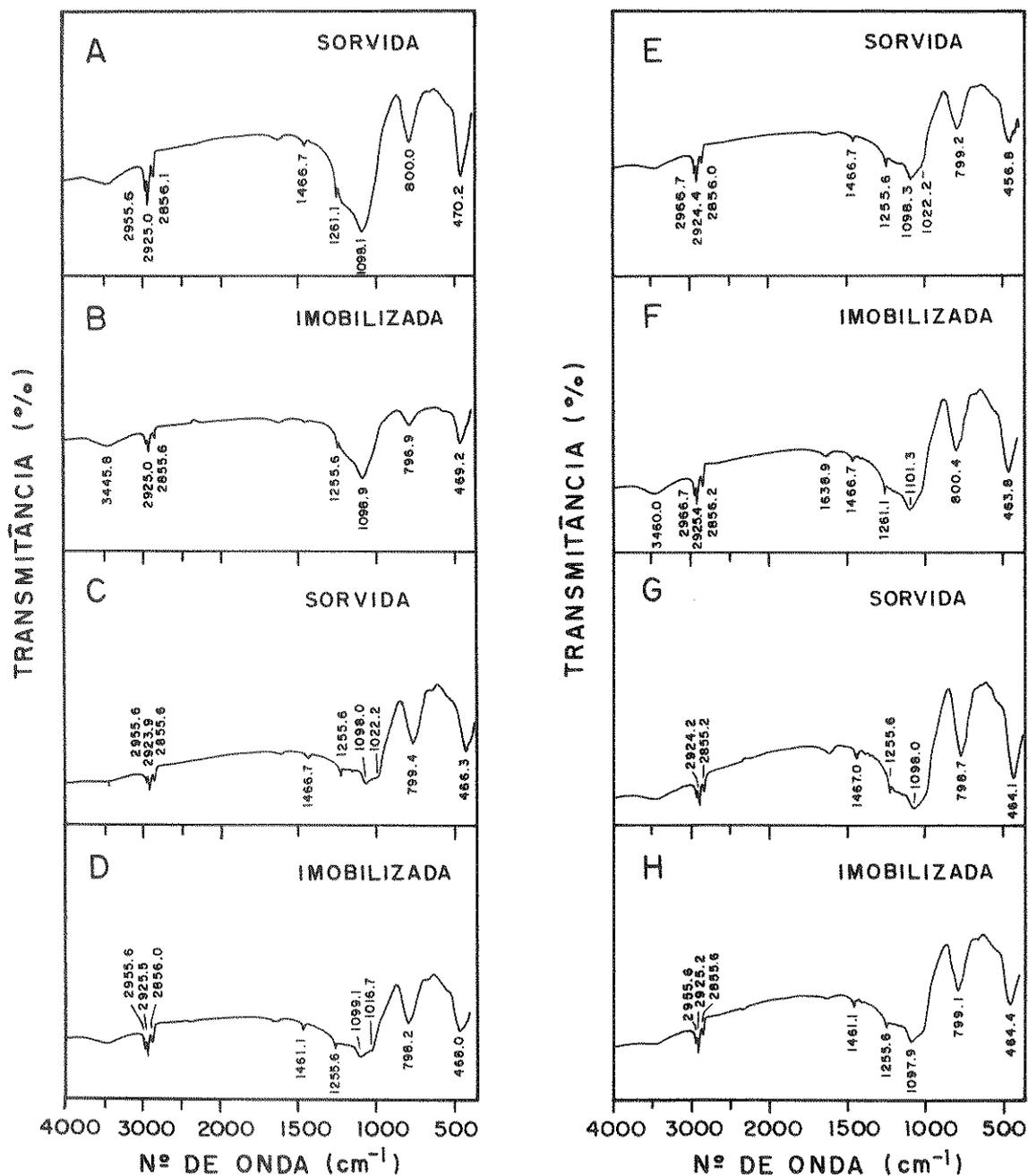


Figura 42 - Espectros no infravermelho de FEs sorvidas e imobilizadas, respectivamente, de: (A e B) 40% PMOS-Davisil, 10 μm , (C e D) 50% PMOS-Sigma, 10 μm , (E e F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, 10 μm e (G e H) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm .

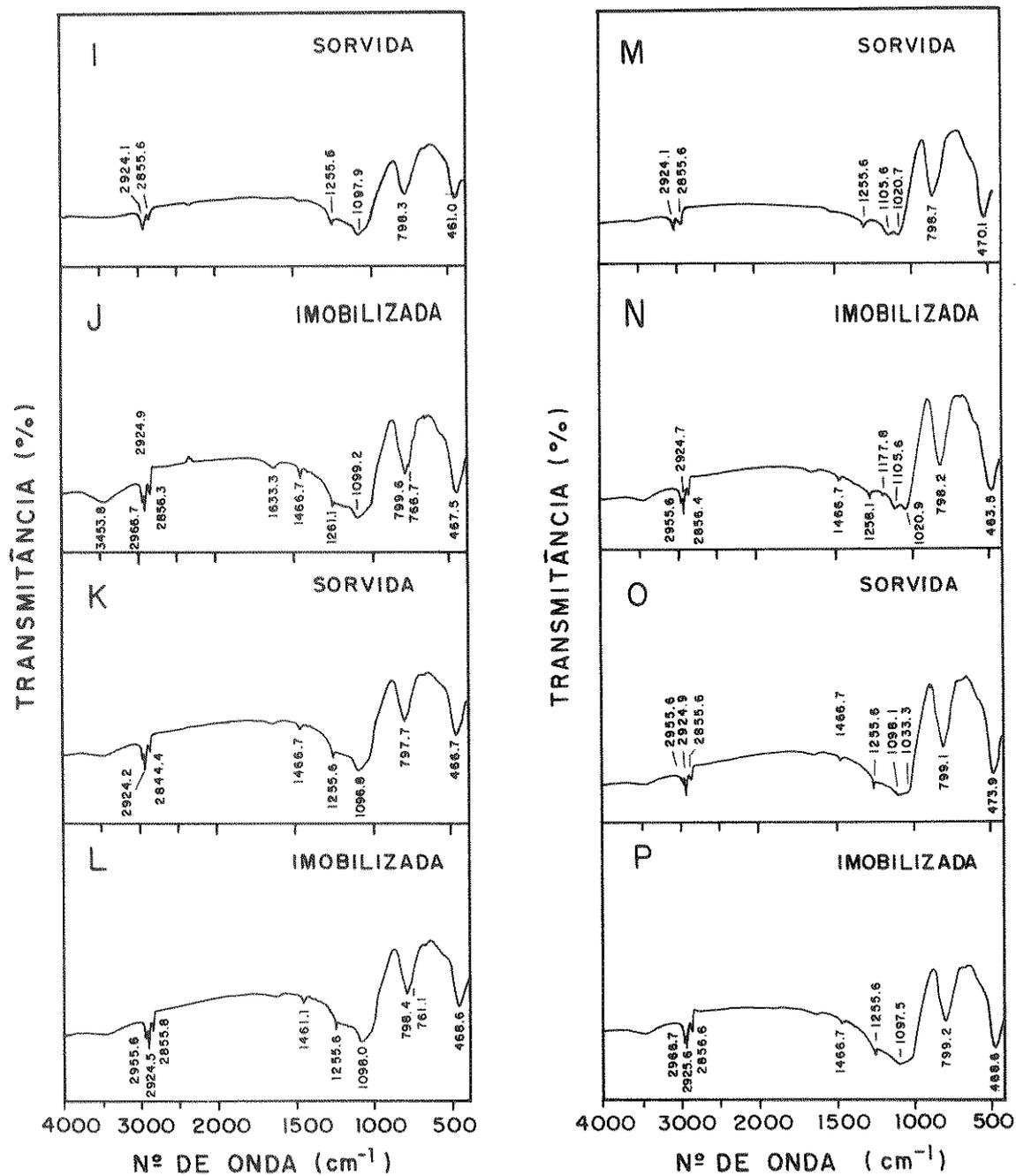


Figura 43 - Espectros no infravermelho de FEs sorvidas e immobilizadas, respectivamente, de: (I e J) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 μm, (K e L) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm, (M e N) 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm e (O e P) 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm.

IV.4.4.2. Análise termogravimétrica

Nas Figuras 44 e 45 estão respectivamente as curvas termogravimétricas das FEs sorvidas e imobilizadas, das quais foram retirados os valores de temperatura à 5% de perda de massa do polímero (T_d), que é o máximo de reorganização do polímero onde ocorre perdas de oligômeros, e da temperatura onde a velocidade de decomposição do polímero é máxima (T_m). Estes dados estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Análise termogravimétrica das FEs sorvidas e imobilizadas.

PMOS e FE	t_p (μm)	tipo de FE	T_d ($^{\circ}\text{C}$)	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
PMOS	–	–	409	489
40% PMOS-Davisil	10	sorvida	400	476
		imobilizada (80 kGy)	414	482
50% PMOS-Sigma	10	sorvida	373	473
		imobilizada (80 kGy)	310	437
50% PMOS-Si-100	10	sorvida	342	462
		imobilizada (120 kGy)	310	440
50% PMOS-Si-60	10	sorvida	362	475
		imobilizada (120 kGy)	307	418
50% PMOS-Si-60	7	sorvida	385	471
		imobilizada (120 kGy)	298	437
50% PMOS-Si-60	5	sorvida	375	463
		imobilizada (120 kGy)	388	489
40% PMOS-Spherisorb	8	sorvida	378	474
		imobilizada (20 kGy)	320	446
40% PMOS-Spherisorb	5	sorvida	370	456
		imobilizada (20 kGy)	403	482

Analisando-se os dados, observa-se que, de um modo geral, a T_d das FEs diminuiu em relação ao PMOS puro, logo quando ele está ou sorvido ou imobilizado, ele torna-se menos estável. Com exceção das FEs 40% PMOS-Davisil, 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm e 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , as FEs sorvidas apresentaram maior estabilidade que as imobilizadas. Quanto a T_m , as FEs sorvidas também foram mais estáveis que as imobilizadas, com exceção de 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm e 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm . Entretanto, considerando que em CLAE, normalmente as análises são feitas a temperatura ambiente ou no máximo a temperatura de 90 $^{\circ}\text{C}$ pode-se dizer que tanto as FEs sorvidas como as imobilizadas são estáveis.

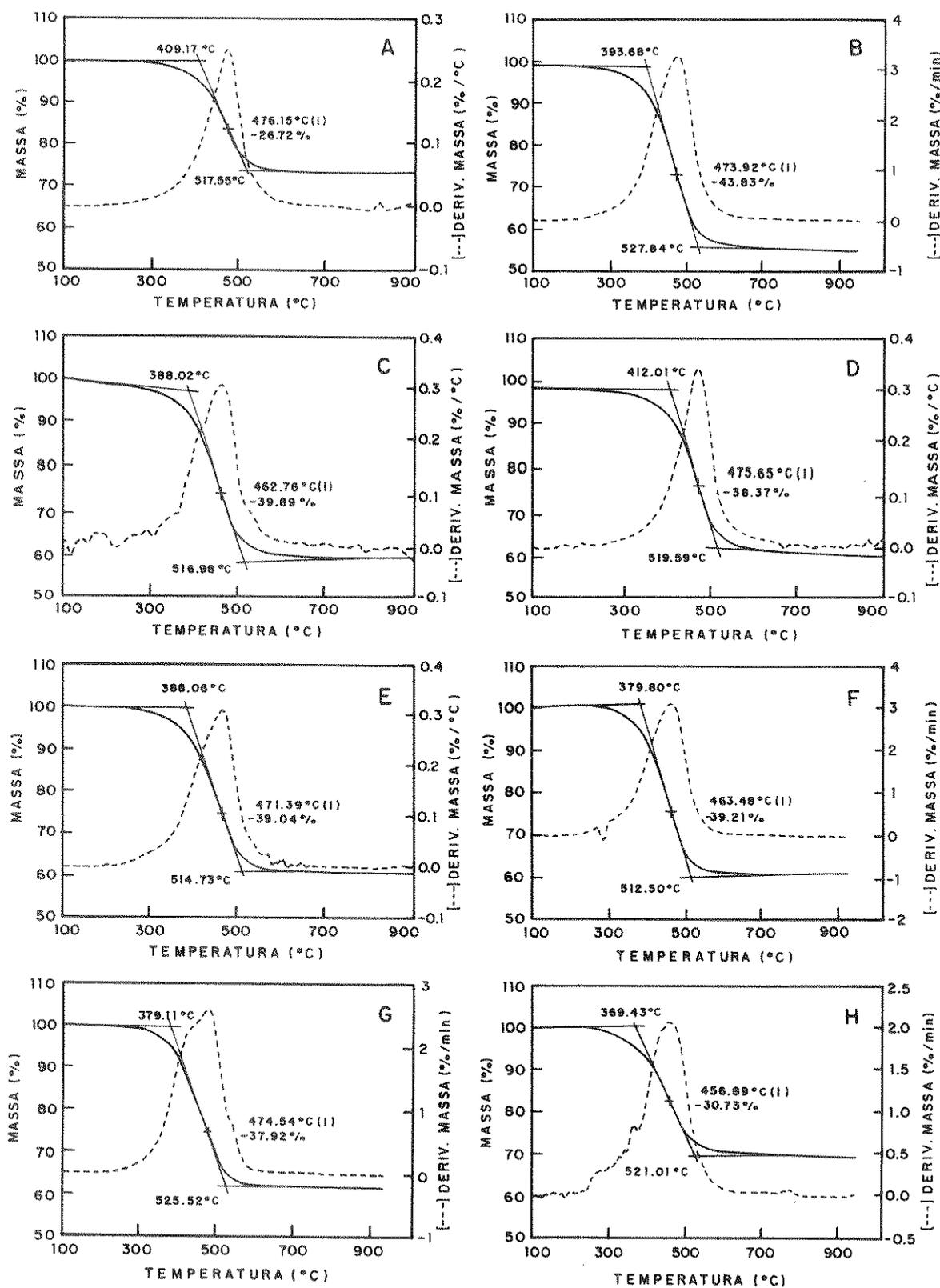


Figura 44 - Curvas termogravimétricas de FEs sorvidas: (A) 40% PMOS-Davisil, 10 μm , (B) 50% PMOS-Sigma, 10 μm , (C) 50% PMOS- Lichrosorb Si-100, 10 μm , (D) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 μm , (E) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 μm , (F) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm , (G) 40% PMOS-Spherisorb, 8 μm e (H) 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm .

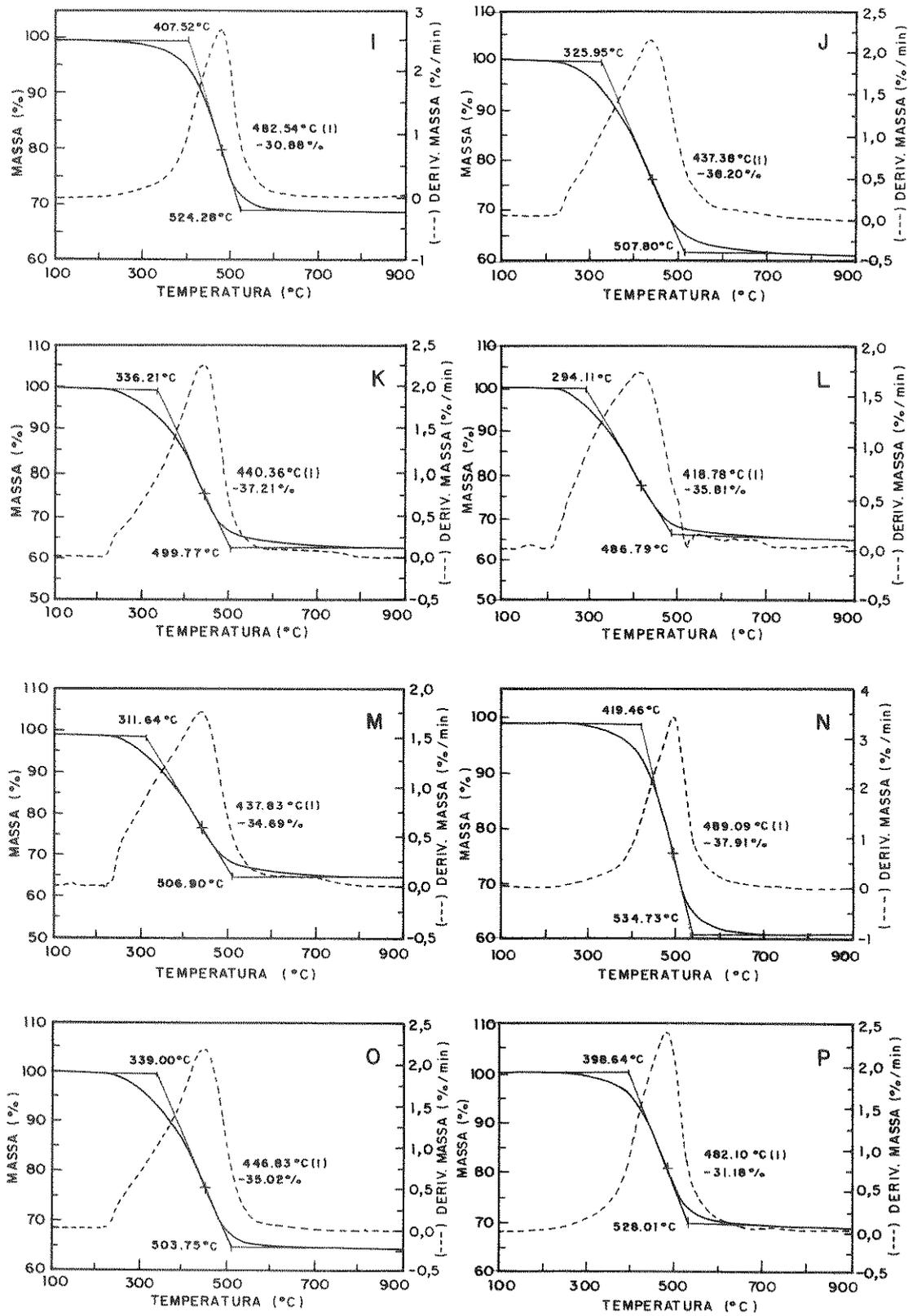


Figura 45 - Curvas termogravimétricas de FEs imobilizadas: (I) 40% PMOS-Davisil, 10 µm, 80 kGy, (J) 50% PMOS-Sigma, 10µm, 80 kGy, (K) 50% PMOS-Lichrosorb Si-100, 10 µm, 120 kGy, (L) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10µm, 120 kGy, (M) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 7 µm, 120 kGy, (N) 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 µm, 120 kGy, (O) 40% PMOS-Spherisorb, 8 µm, 20 kGy e (P) 40% PMOS-Spherisorb, 5µm, 20 kGy.

IV.4.4.3. Espectrometria de ressonância magnética nuclear

A Figura 46 mostra os espectros de ^{29}Si CP-MAS-NMR da sílica SIGMA e das fases preparadas a partir desta sílica. O espectro A, sílica, mostra as suas ressonâncias dominantes em -110 (pico a), -100 (pico b) e -90 (pico c) ppm e elas têm sido atribuído aos grupos siloxanos $(\equiv\text{SiO})_4\text{Si}$, silanóis livres $(\equiv\text{SiO})_3\text{Si}^*\text{OH}$ e silanóis geminais $(\equiv\text{SiO})_2\text{Si}^*(\text{OH})_2$, respectivamente^{125 - 130}. A fraca absorvância em -90 ppm indica que a sílica contém uma quantidade relativamente pequena de silanóis geminais em relação aos demais grupos presentes. Nos espectros das fases preparadas (B-E) têm-se, além das ressonâncias da sílica, uma proveniente do PMOS em -22 ppm (pico d). Fazendo uma comparação relativa entre os espectros das FEs sorvidas (B, C, e D), observa-se que conforme aumentou-se a % de carregamento, houve um aumento na intensidade do pico do PMOS (pico d) enquanto os picos b e c, atribuídos aos grupos silanóis, permaneceram praticamente inalterados, ou seja, eles não reagiram com o PMOS. Analisando-se as FEs com 50% de carregamento, sorvida e imobilizada, espectros D e E, respectivamente, verifica-se que ocorreu uma diminuição do pico dos siloxanos (pico a) na FE imobilizada, provavelmente devido a quebra das ligações siloxanos provocadas pela radiação gama.

Pode-se dizer também que estas fases preparadas são do tipo monomérica por não apresentar outros picos em -22 ppm^{127, 130}.

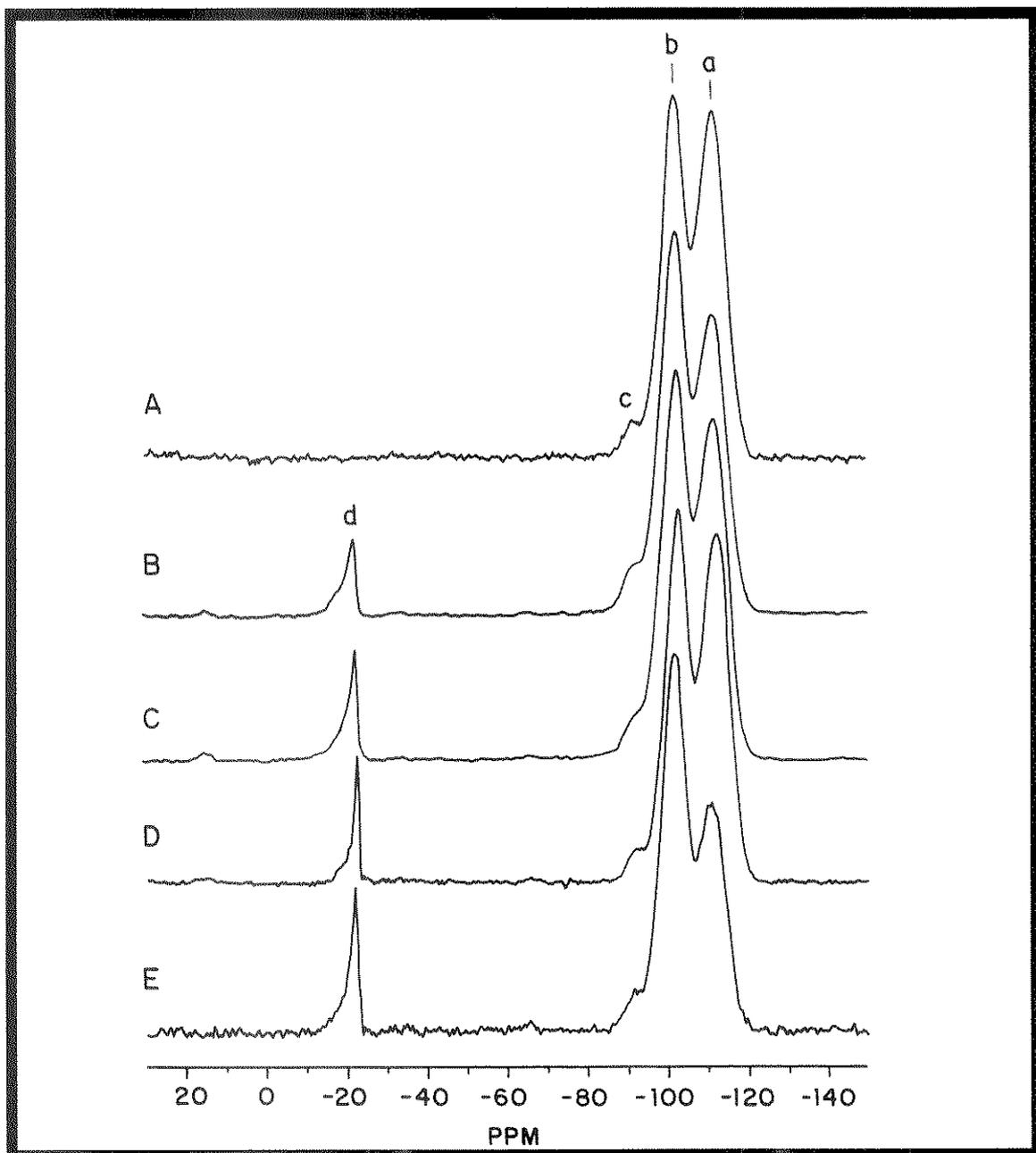


Figura 46 - Espectros de ^{29}Si CP-MAS-NMR de: (A) sílica Sigma, (B-D) 30, 40 e 50% PMOS-Sigma, sorvida e (E) 50% PMOS-Sigma, immobilizada (80 kGy).

A Figura 47 mostra os espectros de ^{13}C NMR do PMOS e de ^{13}C CP-MAS-NMR das FEs preparadas. Para avaliar os espectros numeraram-se os átomos de carbono do PMOS (Figura 48) cujas atribuições dos deslocamentos químicos encontram-se na Tabela 31.

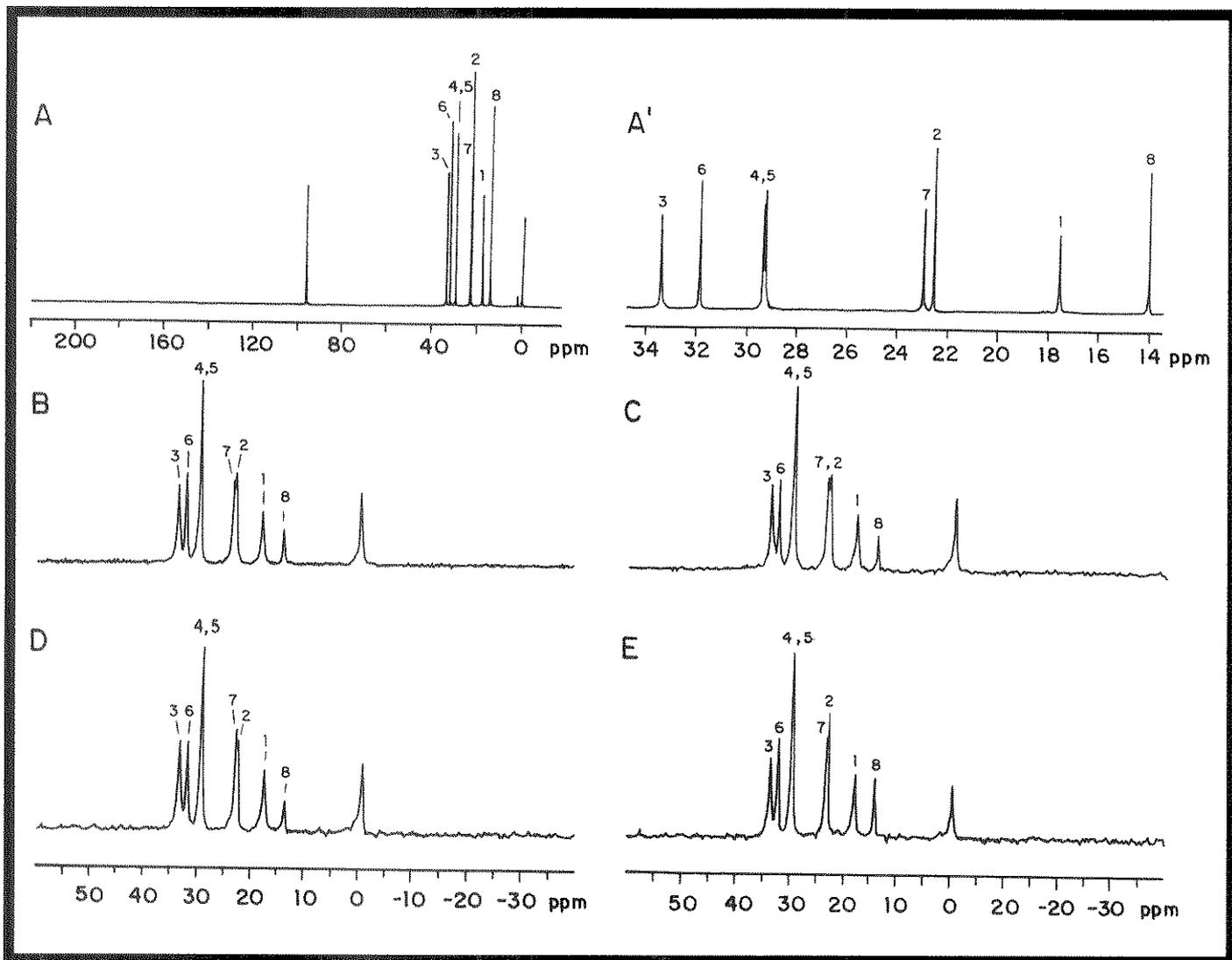


Figura 47 - Espectros de ^{13}C NMR de (A) PMOS e (A') espectro A expandido e de ^{13}C CP-MAS-NMR de (B-D) 30,40 e 50% PMOS-Sigma, sorvida e (E) 50% PMOS-Sigma, imobilizada (80 kGy).

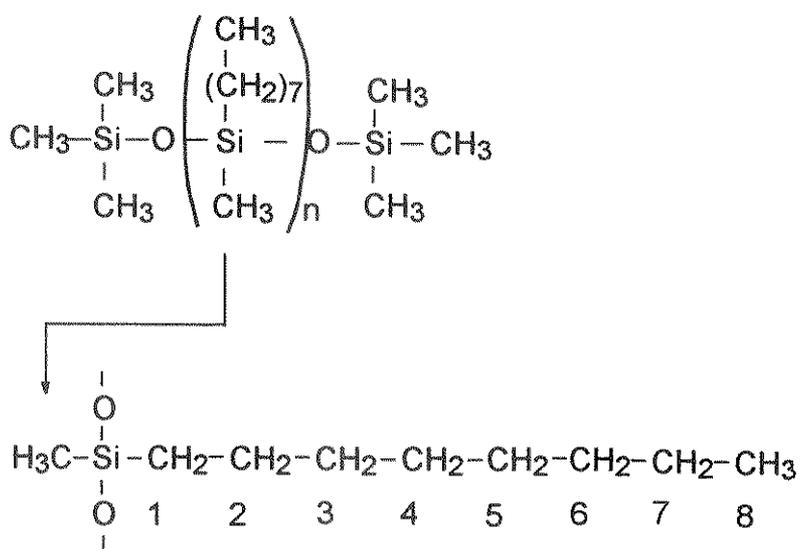


Figura 48 - Esquema da possível disposição do PMOS sobre o suporte de sílica.

Tabela 31- Atribuições dos deslocamentos químicos obtidos por ^{13}C CP-MAS-NMR.

Composto n ^o dos carbonos	literatura ¹³¹ para octano (ppm)	obtido para PMOS (ppm)	Fase Estacionária		
			ligada literatura ¹³⁰ (ppm)	sorvida obtido (ppm)	imobilizada obtido (ppm)
1	---	17,6	17	17,9	18,0
2	---	22,6 ^a	22	22,9	23,0
3	---	33,4 ^b	34	33,7	33,8
4	---	29,2 ^c	29	29,8	28,8
5	29,5	29,3 ^c	29	29,8	28,8
6	32,2	31,9 ^b	32	32,2	32,4
7	22,9	22,9 ^a	não atribuíram	23,3	23,4
8	13,9	14,0	12	14,1	14,2

a → são intercambiáveis entre si
c → são intercambiáveis entre si

b → são intercambiáveis entre si

Para distinguir os carbonos 1 e 8 das fases preparadas e do PMOS, tirou-se um espectro de PMOS usando a técnica DEPT 135°, que permite diferenciar CH₂ de CH₃ e dessa forma, comprovou-se que os deslocamentos químicos dos carbonos 1 e 8 correspondem aos apresentados na Tabela 31. Analisando-se esta Tabela, nota-se que entre a FE sorvida e a imobilizada não houveram alterações nos valores dos deslocamentos, logo não houve mudança perceptível na disposição do PMOS com a radiação gama. Comparando a FE ligada com as preparadas por nós, observa-se que ocorreu uma pequena mudança nos deslocamentos dos carbonos 1 e 8, implicando que em nossas fases não ocorreu ligação química entre o PMOS e a sílica.

IV.4.4.4. Microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 49 estão apresentadas as fotos de microscopia eletrônica de varredura: (A) das partículas da sílica Davisil, (B) da FE 40% PMOS-Davisil, sorvida e (C) da FE 40% PMOS-Davisil, sorvida, após enchimento.

Observando-se a Figura (A), nota-se que a sílica é de forma irregular e que sua distribuição de tamanho de partículas não é uniforme, apresentando um intervalo de vários tamanhos. Na Figura (B), nota-se a presença do PMOS sobre as partículas de sílica. Para a sílica Davisil pode-se visualizar que a quantidade de carregamento utilizada, 40%, foi suficiente para formar uma camada de polímero sobre toda a extensão do suporte cromatográfico. Após o enchimento, observa-se que houve uma perda de PMOS, com uma maior dispersão das partículas.

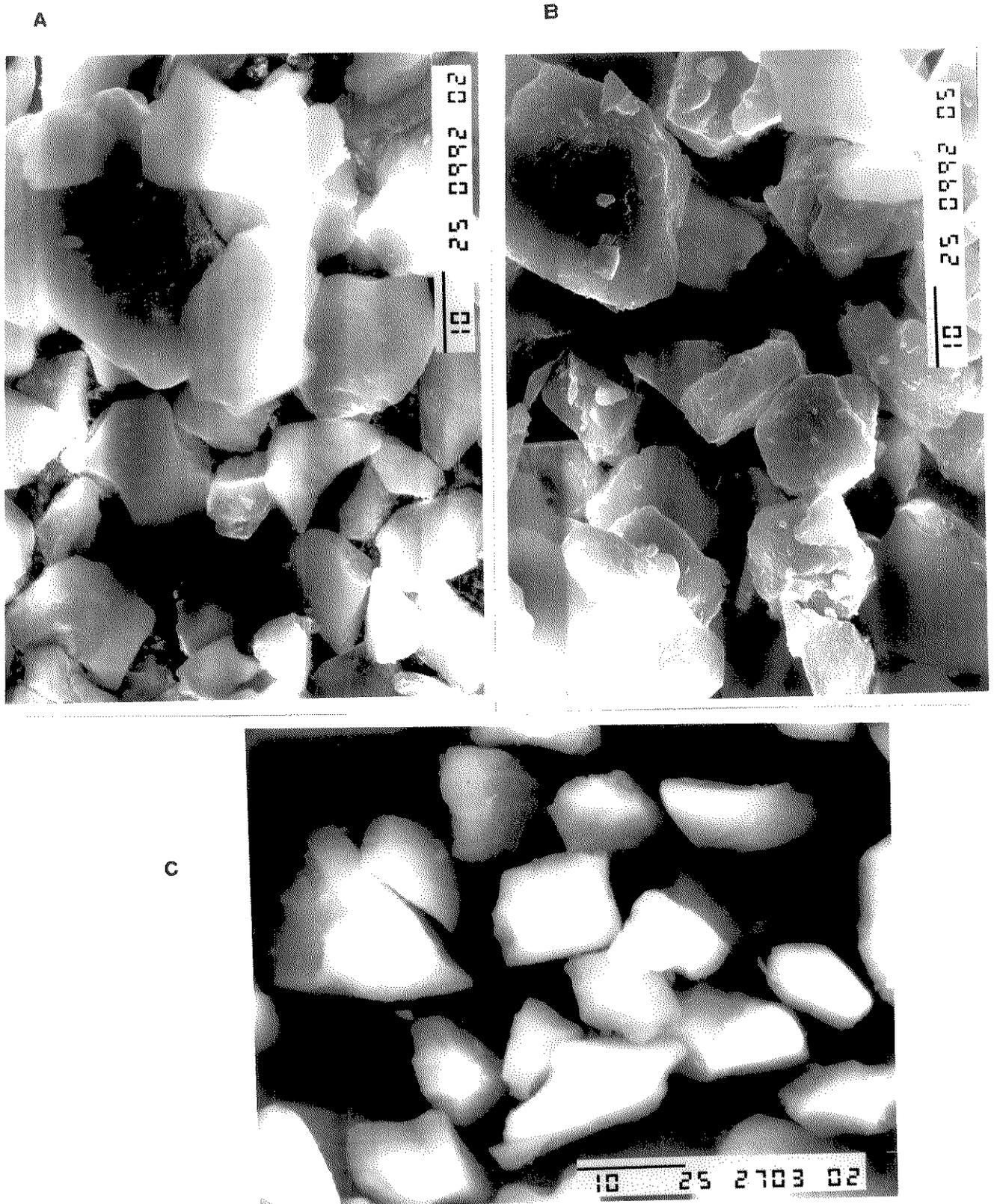


Figura 49 - Microscopia eletrônica de varredura: (A) sílica Davisil e 40% PMOS-Davisil sorvida, (B) antes do enchimento e (C) após enchimento.

A Figura 50 mostra as fotos com (D) 40% PMOS-Davisil, imobilizada, antes do enchimento e (E) após enchimento. Nota-se que após o enchimento, o PMOS ainda se encontra sobre as partículas de sílica, que se tornaram menos aglomeradas.

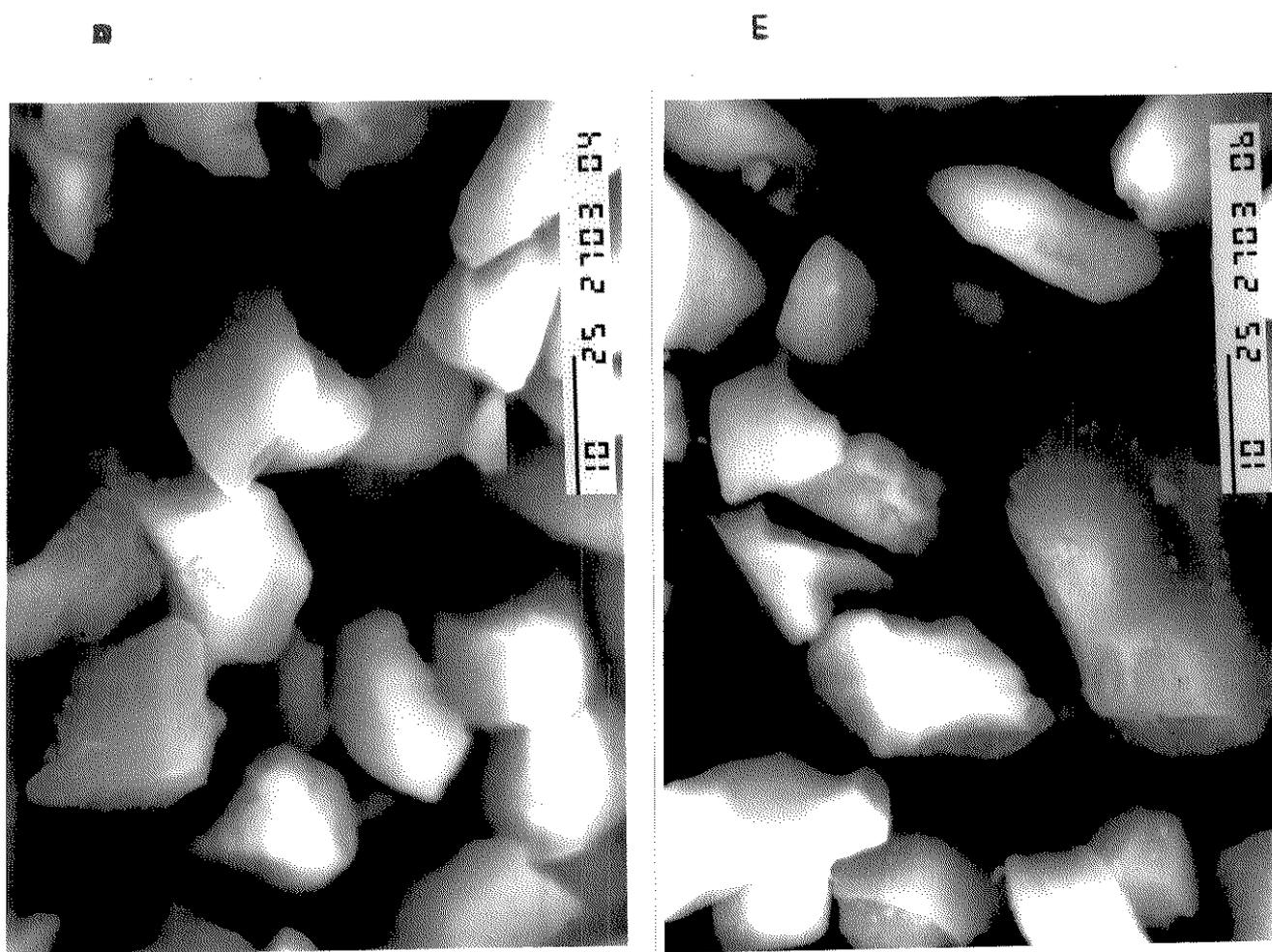
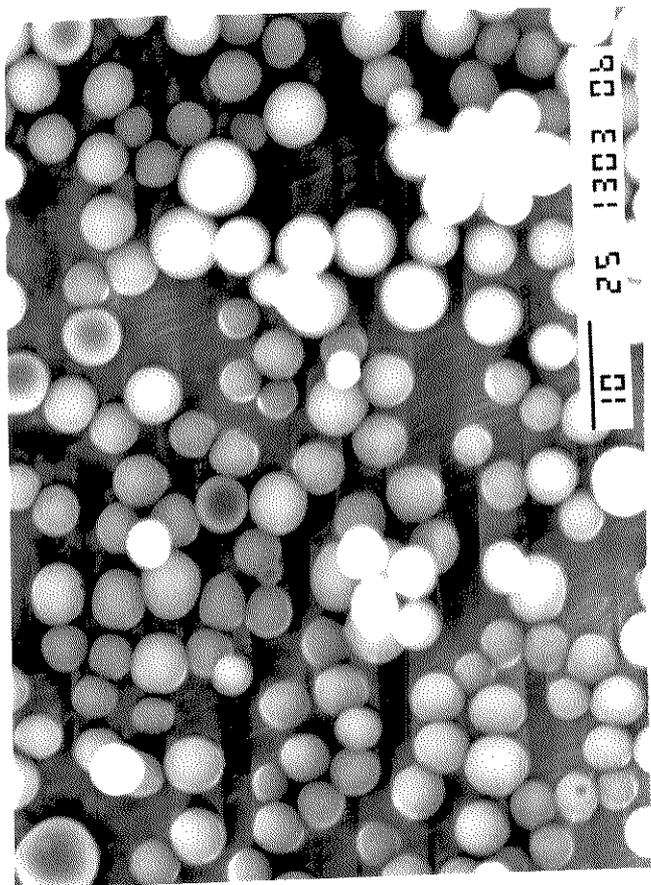


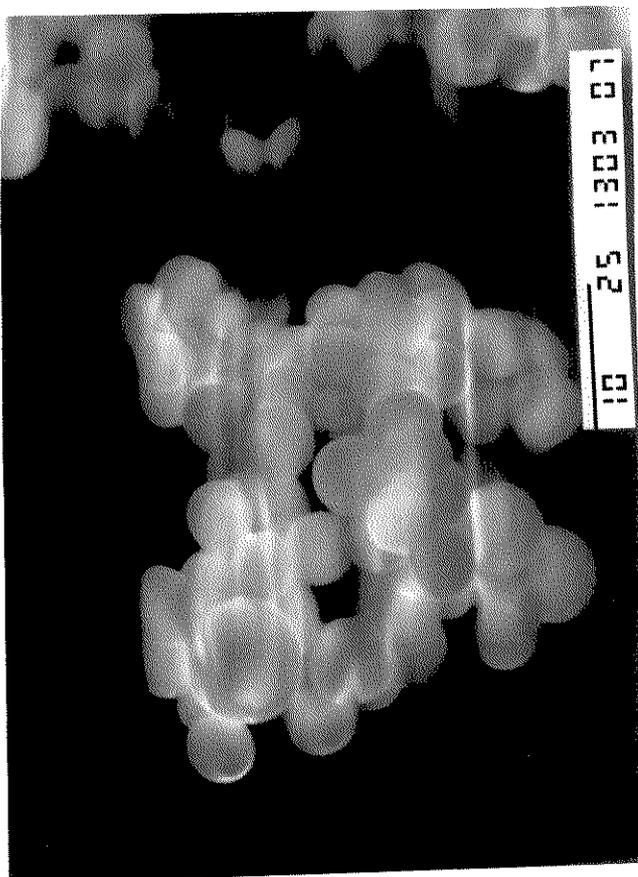
Figura 50 - Microscopia eletrônica de varredura de 40% PMOS-Davisil, imobilizada (80 kGy), (D) antes do enchimento e (E) após enchimento.

Na Figura 51 estão as fotos de (F) sílica Spherisorb, 5 μm , (G) 40% PMOS-Spherisorb, sorvida antes do enchimento e (H) 40% PMOS-Spherisorb, sorvida, após enchimento. Observando-se a Figura (F), verifica-se que a sílica Spherisorb possui formato de partículas esféricas e uma distribuição não uniforme de tamanho de partícula, entretanto este intervalo de distribuição parece ser mais restrito que o suporte irregular de sílica Davisil. Nota-se que após a preparação da FE com 40% de carregamento, houve agregação de partículas, indicando que esta porcentagem deve ser a máxima que se pode colocar sobre a sílica. Após o enchimento, verifica-se que houve perda de PMOS e as partículas ficaram mais dispersas.

F



G



H

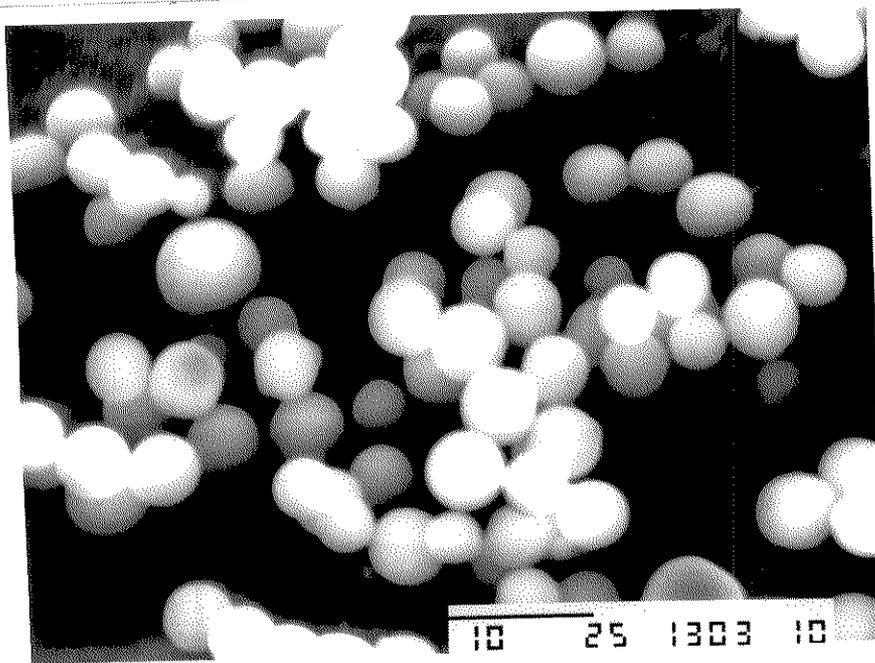


Figura 51- Microscopia eletrônica de varredura de (F) sílica Spherisorb, 5 μm e 40% PMOS-Spherisorb, sorvida (G) antes do enchimento e (H) após enchimento.

IV.4.4.5. Espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (EPR)

Na Figura 52 tem-se o espectro de EPR da FE 40% PMOS-Davisil, irradiada à 80 kGy. A partir dele obtiveram-se valores de campo magnético e frequência de microonda, que foram utilizados na equação:

$$g = \frac{h \cdot \nu}{\beta \cdot H}$$

onde: g = fator g para um elétron livre

h = constante de Planck ($6,62559 \times 10^{-27}$ erg s)

ν = frequência (9,3999 GHz)

β = magneton de Bohr ($9,2732 \times 10^{-21}$ erg G⁻¹)

H = campo magnético (3320 G)

Se o valor de g obtido for 2,023, isto indica a presença de radicais livres ¹³².

O valor encontrado de g para a FE 40% PMOS-Davisil foi de 2,023, indicando, portanto, a presença de radicais livres, que promove o entrecruzamento do PMOS.

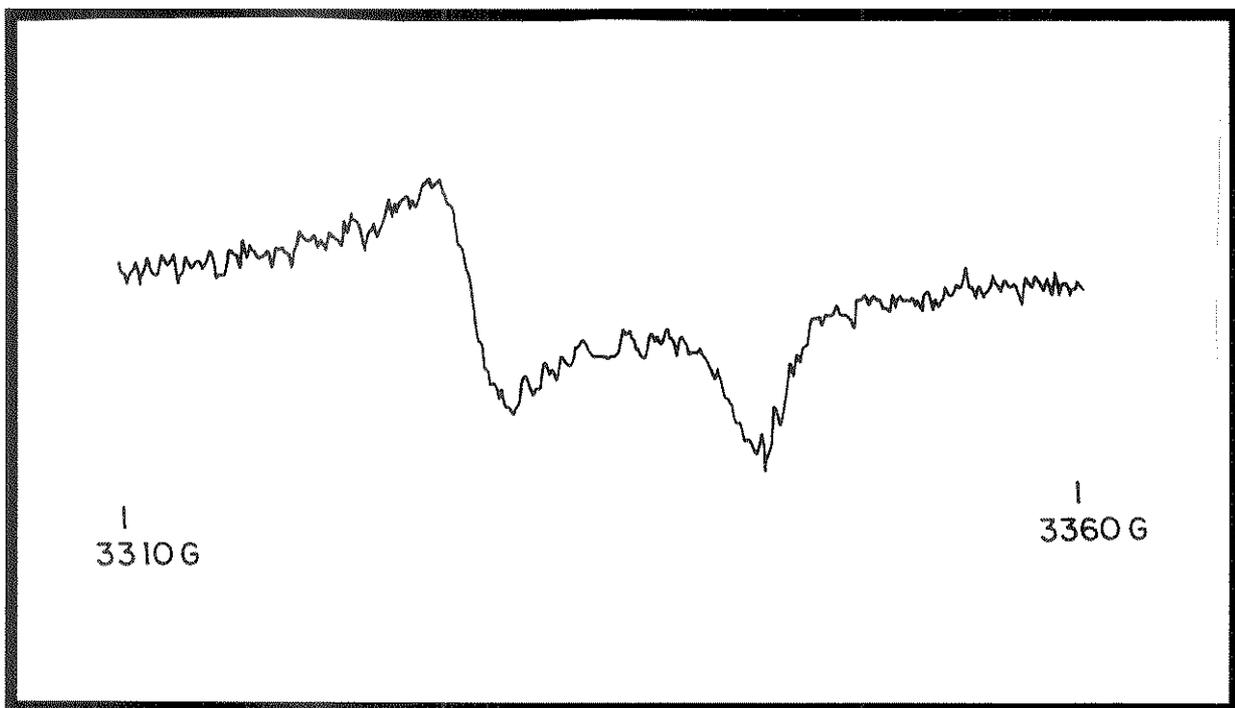


Figura 52 - Espectro de EPR da FE 40% PMOS-Davisil, irradiada à 80 kGy.

IV.4.5. Teste químico: titulação potenciométrica

Os resultados obtidos na determinação de silanóis residuais, por titulação potenciométrica, das FEs imobilizadas indicam que o entrecruzamento do polímero favoreceu uma blindagem maior dos silanóis que nas FEs sorvidas (Tabela 32).

Tabela 32 - Quantidade de silanóis residuais nas FEs imobilizadas e sorvidas, determinadas por titulação potenciométrica.

Amostra	Tipo de FE	silanóis (mmol g ⁻¹)
40% PMOS-Davisil	sorvida	0,094
40% PMOS-Davisil	imobilizada (80 kGy)	0,058
50% PMOS-Sigma	sorvida	0,004
50% PMOS-Sigma	imobilizada (80 kGy)	0,002
40% PMOS-Spherisorb	sorvida	0,002
40% PMOS-Spherisorb	imobilizada (20 kGy)	0,001

IV.4.6. Teste cromatográfico: cromatografia de permeação em gel (GPC)

A Figura 53 mostra os cromatogramas de GPC do PMOS não irradiado e irradiado à 80 kGy, e a expansão do pico de massa molecular alta, que corresponde ao pico mais largo, no qual são calculados os valores de massas moleculares médias.

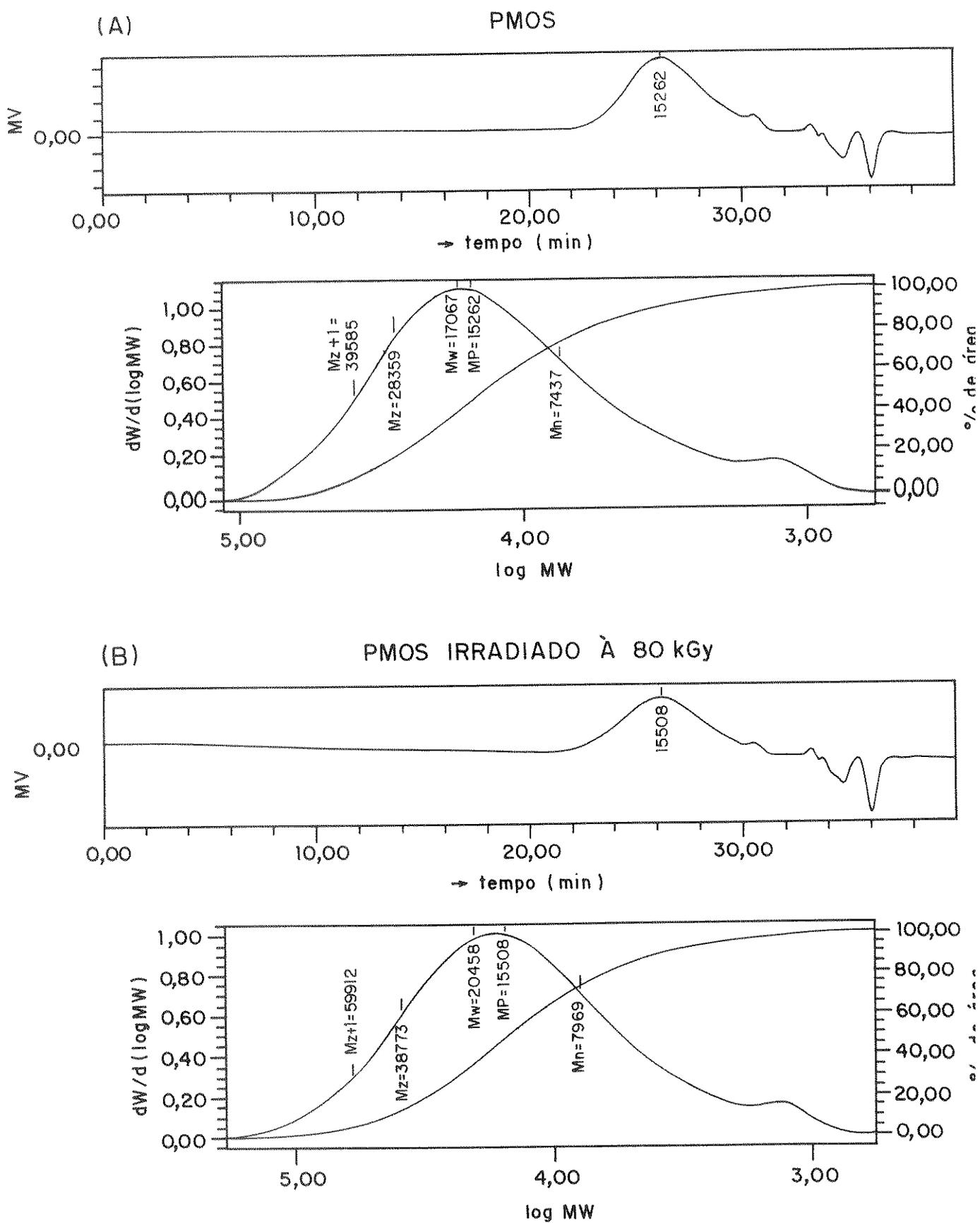


Figura 53 - Cromatogramas de PMOS: (A) não irradiado e (B) irradiado à 80 kGy. Colunas: 3 x Ultrastyrigel linear, 7,8 x 300 mm. Condições cromatográficas: FM: tolueno, vazão: 1,0 mL min⁻¹, temperatura da coluna: 40°C e temperatura do detector de índice de refração.: 40°C.

Na tabela 33 estão apresentados os valores de massa molecular numérica média (M_n) e a polidispersividade. Observa-se que a massa molecular obtida é diferente à do catálogo, que é de 6.200, provavelmente devido as condições de análise serem diferentes. Contudo, nota-se que a massa molecular do PMOS irradiado aumentou, indicando que a radiação gama promoveu o entrecruzamento do polímero, ou seja, as cadeias poliméricas são ligadas umas as outras resultando em estruturas ramificadas de massa molecular mais alta. Isto também pode ser apoiado pelo valor ligeiramente mais elevado para a polidispersividade do PMOS irradiado, que indica que a faixa de distribuição da massa molecular deste se tornou mais larga.

Tabela 33 - Resultados de massa molecular numérica média (M_n) e polidispersividade obtidos por GPC.

PMOS	M_n	polidispersividade
não irradiado	7.437	2,29
irradiado à 80 kGy	7.969	2,56

utilizou-se uma curva de calibração com poliestirenos

IV.4.7- Estabilidade de colunas recheadas com FEs imobilizada

Na Figura 54 estão apresentados os resultados obtidos no teste de estabilidade com a coluna recheada com 40% PMOS-Davisil, imobilizada. Nota-se que não ocorrem alterações significantes durante o teste. Logo, este tipo de FE apresenta uma boa estabilidade frente a solventes.

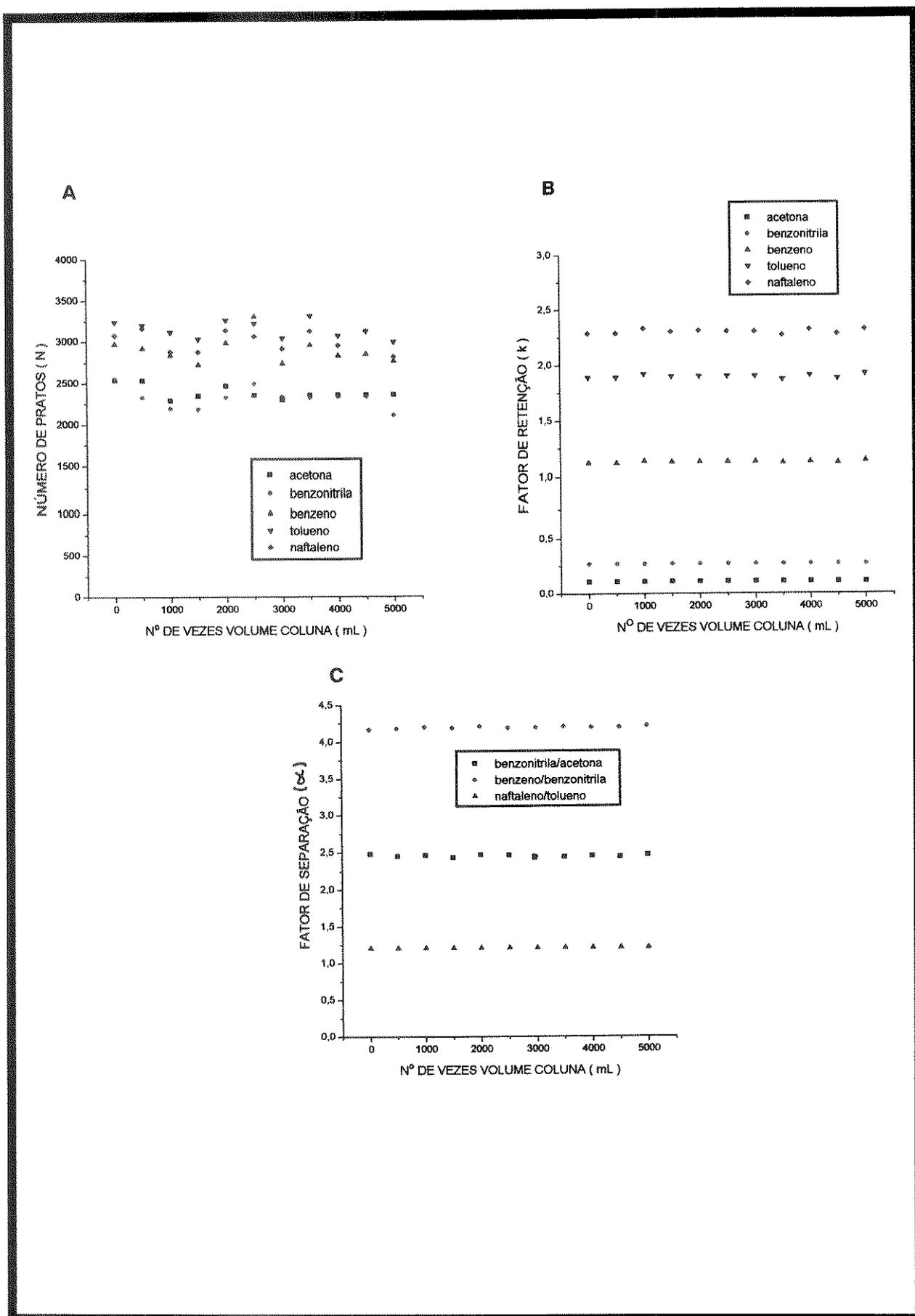


Figura 54 - (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 40% PMOS-Davisil, imobilizada com 80 kGy.

Para a coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, com FM MeOH/H₂O (70:30, v/v), notou-se um pequeno aumento na eficiência (Figura 55A) no início do teste, depois uma estabilização e no final, novamente um aumento. Quanto ao k e α não se observaram mudanças apreciáveis. Portanto, esta FE também é estável a este tipo de FM.

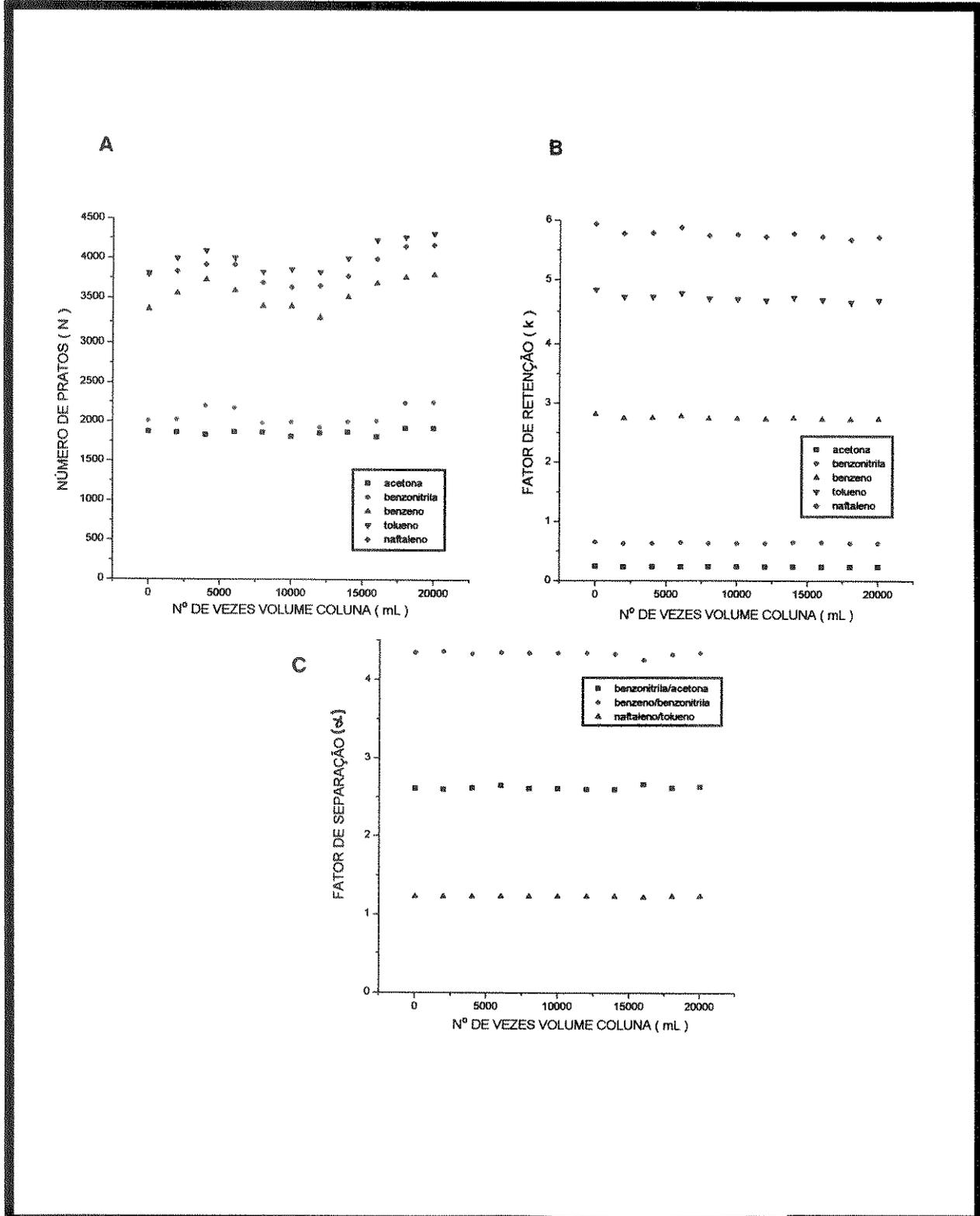


Figura 55 - (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, imobilizada com 80 kGy.

Com a FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 2, nota-se levíssimas alterações nos valores de N, k e α (Figura 56), indicando que a análise de compostos com características similares ao da mistura I podem ser realizadas sem problemas, após muito tempo de uso da coluna.

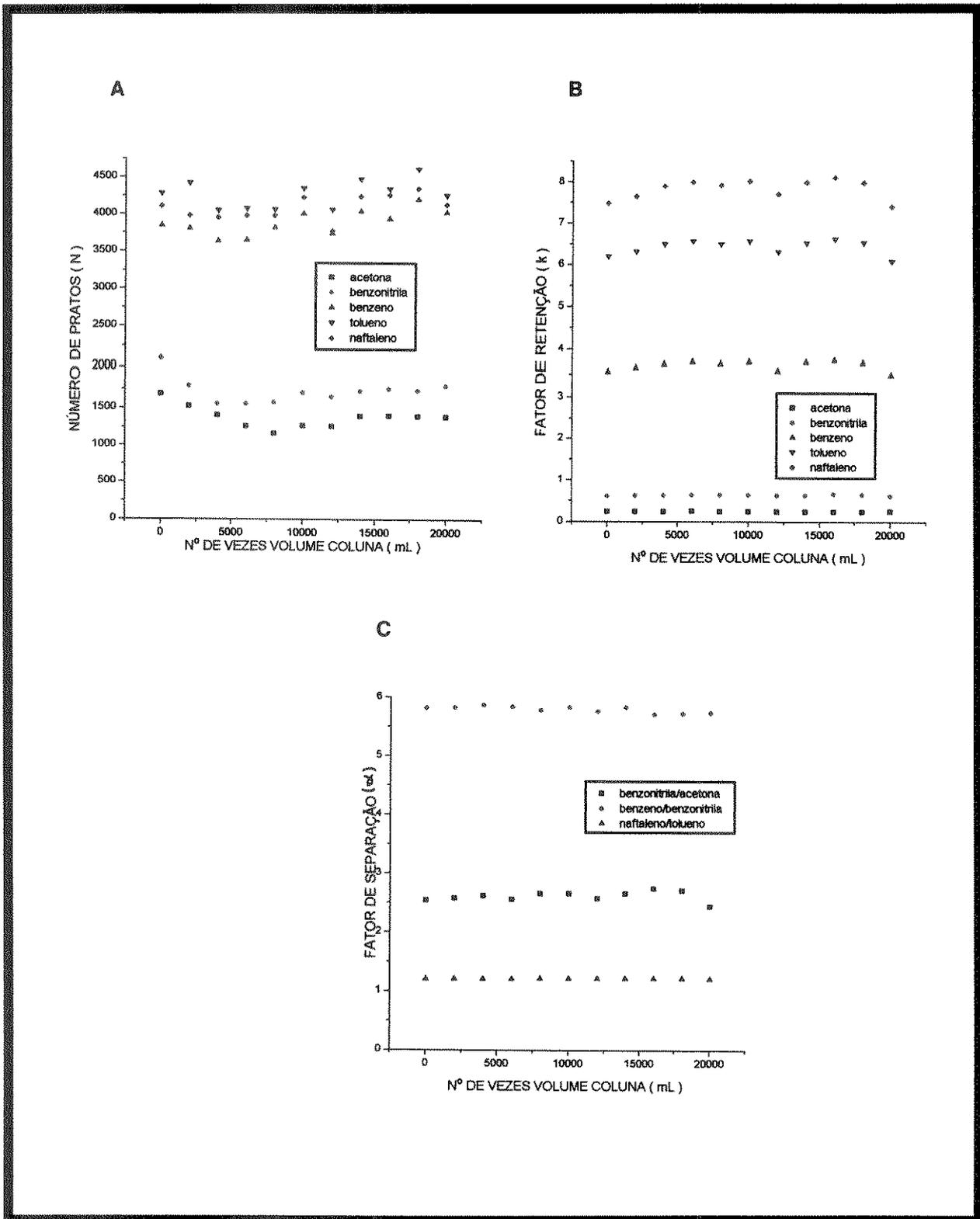


Figura 56 - (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 2, passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, imobilizada com 80 kGy.

O uso da coluna após passagem de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 9 indica que a eficiência da coluna diminuiu logo no início do teste e depois ocorreram algumas flutuações. Os parâmetros cromatográficos k e α não apresentaram mudanças relevantes (Figura 57). Apesar da eficiência da coluna ter diminuído, pode-se dizer que esta FE é estável na análise de compostos da mistura I.

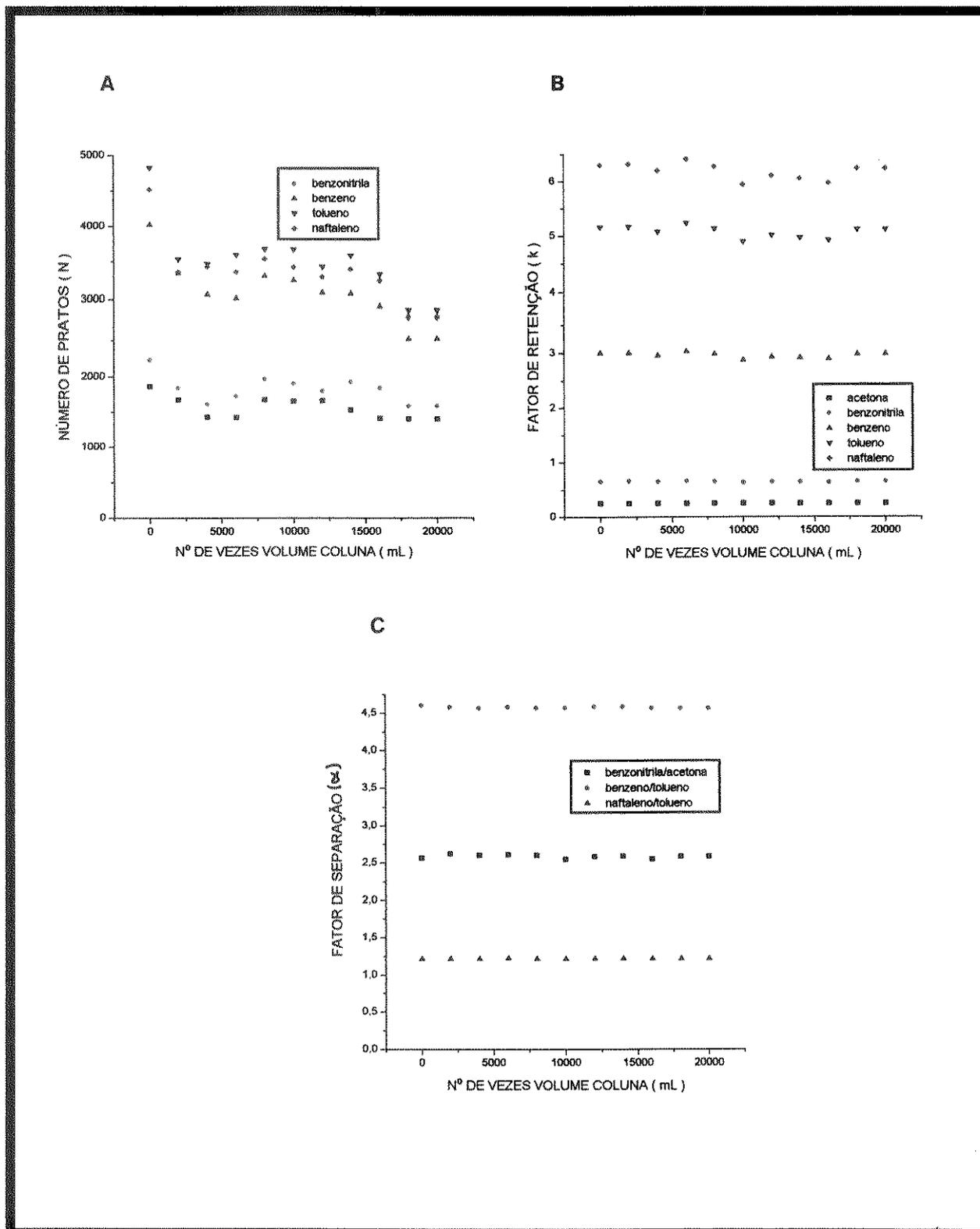


Figura 57 - (A) eficiência da coluna (N), (B) fator de retenção (k) e (C) fator de separação (α) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH 9, passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, imobilizada com 80 kGy.

Na Figura 58 têm-se os resultados obtidos com a mistura constituída de anilina e N,N-DMA, utilizando a FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) (Figura 58A e B) e à pH 9 (Figura 58C e B). Para a lavagem usando FM MeOH/H₂O (70:30, v/v), observa-se que no início do teste houveram alterações tanto no k como no A_s e depois as mudanças não foram tão significativas. À pH 9, os valores de k obtidos para a N,N-DMA, que é uma base mais forte que a anilina, sofreram uma pequena redução e o A_s de ambas as aminas variaram bastante. Esta variação em A_s foi bem mais acentuada que a ocorrida com a FE sorvida (Figura 34B) e pode ser atribuída ao entrecruzamento. Já com a FM à pH 2 ocorreu adsorções dos compostos básicos, semelhantes aos resultados obtidos com a FE sorvida.

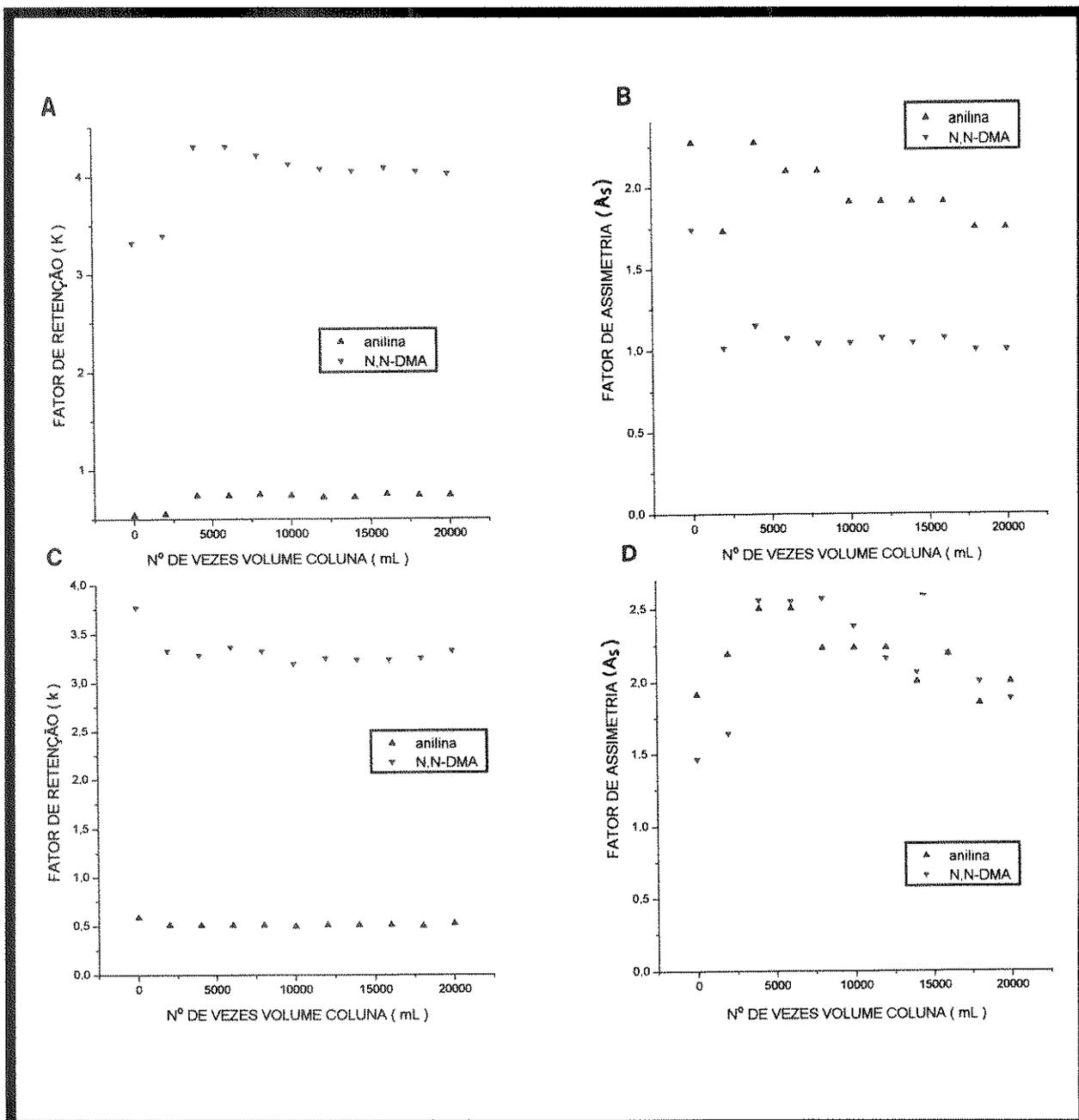


Figura 58 - (A e C) fator de retenção (k) e (B e D) fator de assimetria (A_s) como função de volume de FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) e à pH 9, respectivamente, passando pela coluna recheada com 50% PMOS-Sigma, imobilizada com 80 kGy.

IV.5. Comparação entre coluna recheada com FE preparada e coluna comercial

A Figura 59 e Tabela 34 apresentam respectivamente os cromatogramas e os resultados obtidos com as colunas recheadas com 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , sorvida e imobilizada, e com a coluna comercial Hypersil MOS, 5 μm , quimicamente ligada, nas mesmas condições experimentais, para facilitar a comparação entre elas, ao injetar a mistura teste I.

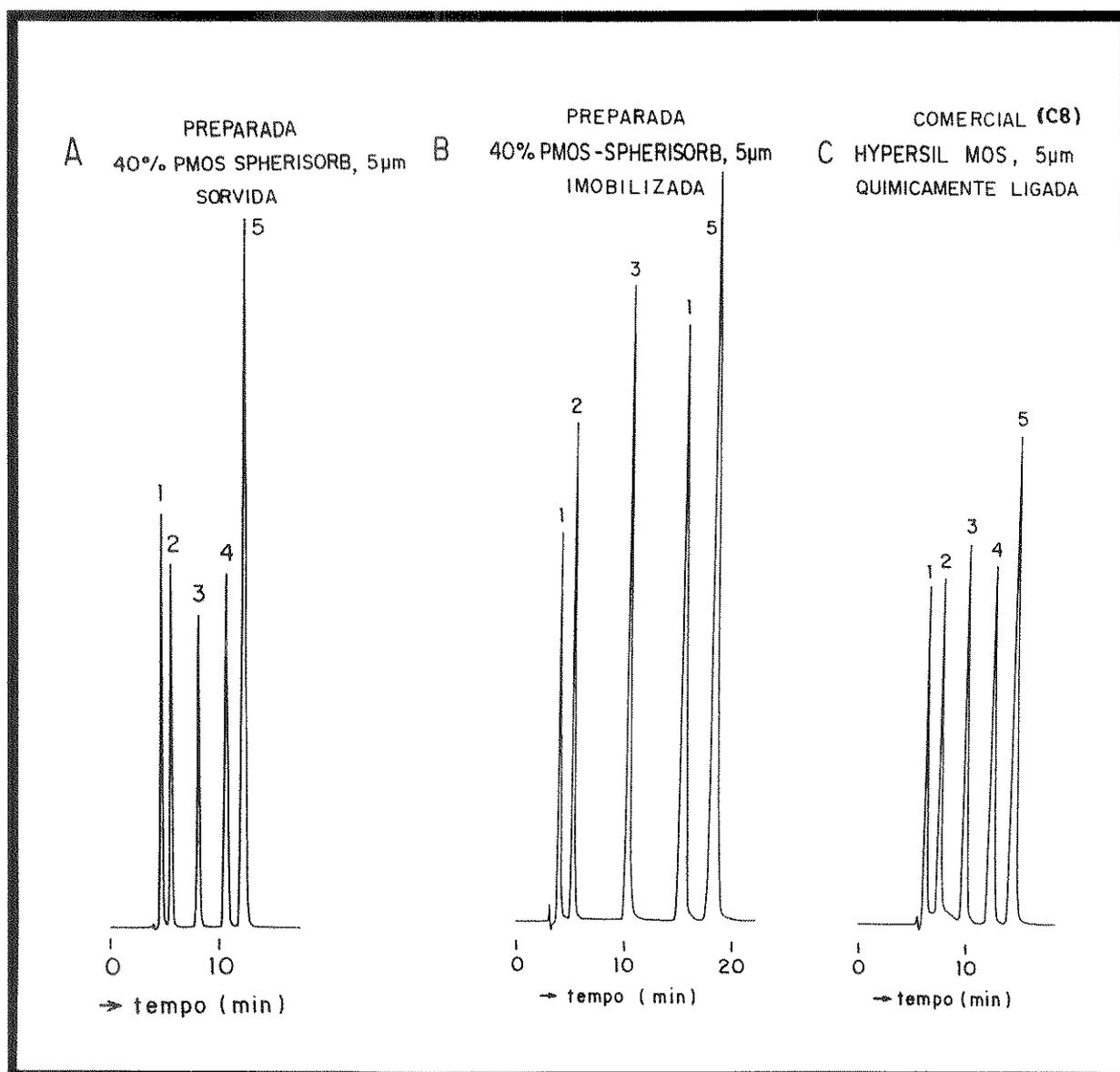


Figura 59- Cromatogramas da mistura I: 1= acetona, 2= benzonitrila, 3= benzeno, 4= tolueno, 5= naftaleno, obtidos com: (A e B) colunas (125 x 3,4 mm d.i.) recheadas com a FE 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , sorvida e imobilizada (20 kGy), respectivamente, e (C) coluna comercial Hypersil MOS (C8), 5 μm , quimicamente ligada (100 x 4,6 mm d.i.), Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL , detecção: UV, 254 nm e velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹.

Tabela 34 - Parâmetros cromatográficos obtidos com as colunas recheadas com 40% PMOS-Spherisorb, 5 μm , sorvida e imobilizada (20 kGy), e com a coluna comercial Hypersil MOS (C8), 5 μm , após a injeção da mistura I.

Tipo de coluna	Tipo de FE	dimensões da coluna (mm)	Parâmetros cromatográficos [#]								
			t_M^* (min)	t_R^{**} (min)	N^{**}	N/m^{**} (m^{-1})	A_s^{**}	k^{**}	R_s^{***}	α^{***}	
preparada	sorvida	125 x 3,4	3,91	12,30	9.300	74.400	1,3	2,1	3,3	1,2	
	imobilizada	125 x 3,4	3,23	18,33	8.800	70.400	0,9	4,7	4,0	1,2	
comercial	ligada	100 x 4,6	5,58	14,17	6.628	66.280	1,1	1,5	2,9	1,3	

* para o metanol

** calculado para o naftaleno

*** calculado para o par tolueno e naftaleno

[#] Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (70:30, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL e detecção: UV, 254 nm.

Observa-se que o tempo de análise da coluna imobilizada foi maior que da coluna comercial, entretanto na sorvida foi um pouco menor. Ambas (imobilizada e quimicamente ligada) mostraram uma forma perfeita dos picos, sendo que na preparada por nós, as resoluções entre picos adjacentes foram um pouco melhores, os solutos interagiram mais com a FE e a eficiência foi superior. Estes resultados comprovam que se conseguiu desenvolver uma tecnologia muito eficaz de preparação de FEs para CLAE.

Na Tabela 35 estão apresentados os valores de A_s e α para as colunas, obtidos após a injeção da mistura II, **acetilacetona, nitronaftaleno e naftaleno**. Observa-se, pelos valores de A_s encontrados para a acetilacetona, que a FE comercial apresenta teor de metais menor, indicando que o fabricante trabalhou com uma sílica mais pura que a utilizada na preparação de fases sorvidas e imobilizadas. Todas apresentaram valores de α acima de 1,2, caracterizando colunas com grupos silanóis desativados. Cabe salientar que nas FEs sorvidas, preparadas por nós, não foi realizada nenhuma reação de capeamento, enquanto que na comercial foi realizada esta reação exaustivamente. Isto é mais um ponto favorável à tecnologia de preparação de fases desenvolvida por nós, onde em uma única etapa, através da sorção de uma quantidade considerável de fase estacionária líquida, consegue-se a blindagem dos grupos silanóis residuais, enquanto que nas fases comerciais, para

se obter resultados semelhantes são necessários duas etapas e o uso de reagentes diferentes dos empregados no processo de preparação.

Tabela 35 - Valores de A_s e α obtidos após injeção da mistura II, nas colunas recheadas com 40% PMOS-Spherisorb, sorvida e imobilizada, 5 μm , e com Hypersil MOS (C8), 5 μm (comercial).

tipo de coluna	tipo de FE	Parâmetros cromatográficos [#]	
		A_s	α
preparada	sorvida	4,6	1,6
	imobilizada	3,8	1,7
comercial	ligada	2,2	1,3

[#] Condições cromatográficas: FM: MeOH/H₂O (55:45, v/v), vazão: 0,2 mL min⁻¹, volume de amostra injetado: 10 μL e detecção: UV, 254 nm.

* calculado para a acetilacetona

** calculado para o par naftaleno-nitronaftaleno

Injetando-se as misturas básicas III e IV, ocorreu adsorção irreversível em todas as colunas.

Diante destes resultados , conclue-se que a FE sorvida é de grande potencial cromatográfico.

IV.6. Aplicação das FEs preparadas

As Figuras 60 e 61 mostram os cromatogramas de padrão de colesterol e de amostras de colesterol extraídas de camarão 7 Barbas e carne suína (pernil)¹²⁴. O tempo de análise obtido com a coluna recheada com fase sorvida foi maior por ter utilizado uma vazão menor, entretanto, pelo cromatograma obtido, verifica-se que a coluna pode ser usada na análise de amostras do tipo citado. Possivelmente, estas diferenças ocorreram porque o comprimento da cadeia da fase estacionária líquida é menor que o da coluna comercial. É importante salientar que na análise de colesterol em carne suína a coluna preparada encontrava-se recheada com FE imobilizada com tamanho de partícula de 10 μm e forneceu resultados semelhantes à coluna comercial, recheada com partículas de 5 μm .

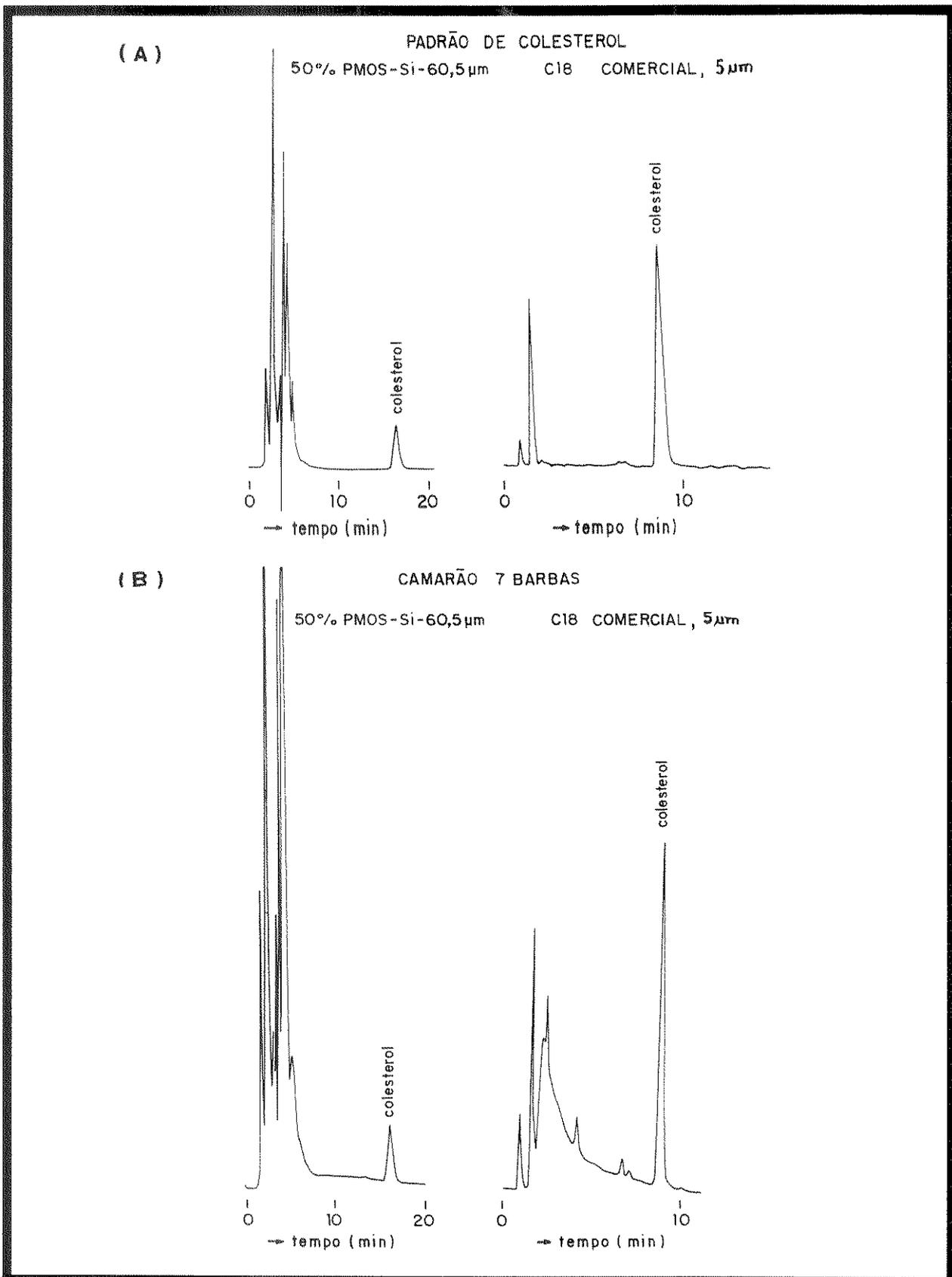


Figura 60 - Cromatogramas de: (A) padrão de colesterol e (B) em amostra de camarão 7 barbadas obtidos com a coluna recheada com 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 5 μm, sorvida (125 x 3,4 mm d.i.), e com a coluna comercial C18, 5 μm (150 x 4,6 mm d.i.). Condições cromatográficas: FM: acetonitrila/isopropanol (70:30, v/v), vazão: 0,5 mL min⁻¹ (sorvida) e 1,0 mL min⁻¹ (comercial), volume de amostra injetado: 10 μL, velocidade do papel: (A) 0,2 cm min⁻¹ e (B) 0,5 cm min⁻¹ e detecção: UV, 210 nm.

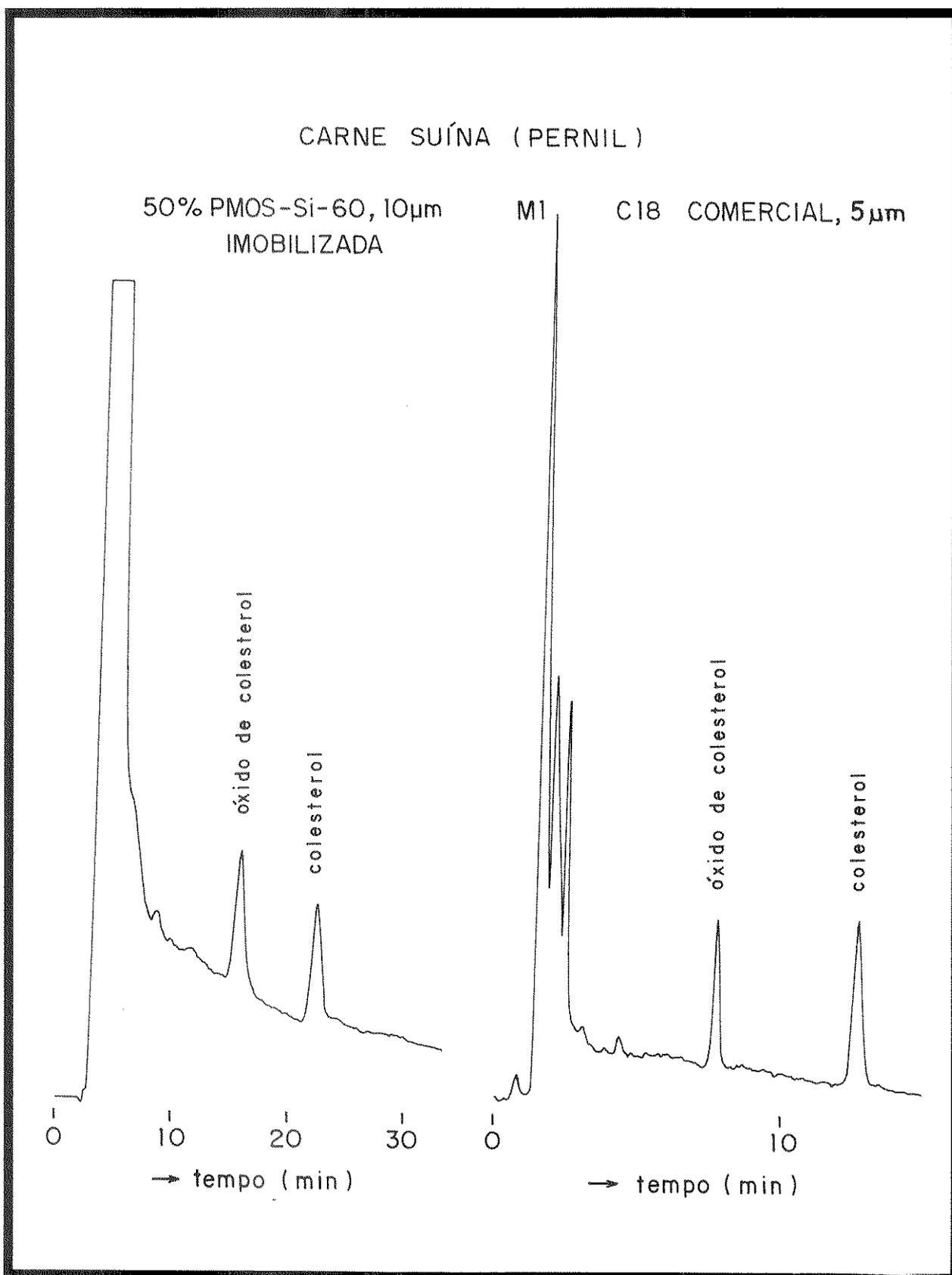


Figura 61- Cromatogramas de colesterol em amostra de carne suína (pernil) obtidos com coluna recheada com 50% PMOS-Lichrosorb Si-60, 10 µm, imobilizada (125 x 3,4 mm d.i.) e com a coluna comercial C18, 5 µm (150 x 4,6 mm d.i.). Condições cromatográficas: FM: acetonitrila/isopropanol (70:30, v/v), vazão: 0,5 mL min⁻¹ (imobilizada) e 1,0 mL min⁻¹ (comercial), volume de amostra injetado: 10 µL, velocidade do papel: 0,2 cm min⁻¹ (imobilizada) e 0,5 cm min⁻¹ (comercial) e detecção: UV, 210 nm.

Capítulo V

COMENTÁRIOS FINAIS

A concentração da suspensão de enchimento é um dos fatores que influencia na obtenção de colunas eficientes. Baseado no trabalho anterior ¹¹³, a concentração da suspensão utilizada para as FEs preparadas a partir de sílicas irregulares foi de 10% (m/v) fornecendo colunas com eficiências muito boas. Uma suspensão mais diluída deve aumentar a distância interpartículas e portanto, minimizar os efeitos de aglomeração, gerando colunas mais eficientes. Contudo, para as sílicas esféricas com t_p de 5 μm , o contrário foi observado. A melhor eficiência foi obtida com suspensão concentrada (20%, m/v). Como existem muitas variáveis que influenciam no enchimento de colunas, não encontrou uma explicação óbvia para este comportamento.

Um dos fatores primordiais na obtenção de colunas eficientes é a porcentagem de carregamento, ou seja, a quantidade de fase estacionária líquida que se deve colocar sobre o suporte. Esta quantidade depende das características do suporte. Os testes físicos, químicos e cromatográficos auxiliaram na escolha da quantidade ideal de PMOS sobre sílica. Os melhores resultados cromatográficos foram obtidos com FE com alto carregamento, ou seja, com 50 % de PMOS inicial para as sílicas irregulares, com exceção da sílica Davisil, e 40% para as sílicas esféricas. Esta diferença pode ser atribuída a forma da partícula, área superficial, volume específico e diâmetro médio dos poros. Entre as irregulares, nota-se que até para as sílicas com diâmetro de poros iguais houveram alguns resultados diferentes entre si, por serem de fabricantes diferentes, tendo sido, provavelmente, submetidas a processos de síntese distintos. O diâmetro dos poros influencia nos resultados, pois o de maior diâmetro (15 nm) não apresentou valores de parâmetros cromatográficos bons. Já com as sílicas de mesmo diâmetro de poros, mas diferentes tamanho de partículas (Lichrosorb Si-60), observa-se que conforme diminuiu o tamanho da partícula, aumentou a eficiência da coluna. Para partículas irregulares de mesmo tamanho, 10 μm , o tempo de análise e o fator de retenção geralmente aumentaram com a área superficial e a eficiência aumentou à medida que o volume específico dos poros diminuiu. Para as duas sílicas regulares que possuem diâmetro de poros iguais também verificou que a eficiência aumentou à medida que o tamanho da partícula diminuiu. Logo, pode-se concluir que a característica que mais influencia na eficiência cromatográfica é o tamanho das partículas.

A espectroscopia no infravermelho mostrou que os sinais característicos dos grupos silanóis diminuíram com o aumento do teor do polímero sobre o suporte

cromatográfico, indicando dessa forma, o preenchimento dos poros da sílica e a diminuição de grupos silanóis expostos. Isto também pode ser apoiado pelas medidas de área superficial, onde ocorreu uma diminuição na área conforme aumentou-se a quantidade de PMOS, e pela titulação potenciométrica, que mostrou que a maioria dos grupos silanóis da superfície da sílica foram blindados pelo polímero conforme o carregamento de PMOS sobre a sílica aumentou. Estes resultados estão em concordância com a literatura, onde Nawrocki⁶⁹ também verificou que o alto grau de recobrimento da sílica com a fase estacionária líquida acarreta na supressão quase total das interações com os grupos silanóis. Nas fases preparadas por nós, provavelmente se tenha comprovado este efeito de blindagem, segundo Sander e Wise⁷³, por tratarem de fases monoméricas e por se ter utilizado um polímero de cadeia curta.

Os dois tipos de FEs preparadas, sorvida e imobilizada, apresentaram comportamentos diferentes. As colunas recheadas com FE imobilizada mostraram melhoras na eficiência para as fases preparadas a partir de sílicas irregulares, com exceção da Lichrosorb Si-60, de 7 μm , ou seja, o aumento na % C provocada pela radiação gama trouxe benefícios à fase. Com o aumento na % C, houve um aumento no tempo de análise e conseqüentemente, nos parâmetros cromatográficos resolução (R_s) e fator de retenção (k). Já para as esféricas, principalmente para a Spherisorb de 8 μm , o entrecruzamento do PMOS sobre a sílica foi prejudicial às análises cromatográficas. Isto pode ser devido a área superficial e o volume específico dos poros serem menores que as das sílicas irregulares. No entanto, as FEs sorvidas forneceram colunas com resultados muito bons, chegando a surpreender visto que o PMOS se encontra sorvido sobre o suporte. Por isso, fases estacionárias líquidas do tipo polissiloxanos são adequadas para serem usadas como FE para CLAE de fase reversa, sorvida.

As colunas avaliadas através da injeção da mistura III, acetilacetona, nitronaftaleno e naftaleno, indicaram a presença de metais na superfície do suporte, proveniente do seu processo de fabricação, que pode acarretar em retenção de certos solutos e induzir o aumento da atividade dos grupos silanóis, prejudicando a análise. O tratamento da sílica com ácido eliminou parte de traços de metais, que refletiu em uma melhora na separação da acetilacetona. Os valores obtidos para o fator de separação do par nitronaftaleno-naftaleno⁷² mostraram que as FEs estão com seus grupos silanóis desativados, o que é uma vantagem das FEs sorvidas em relação as fases ligadas disponíveis comercialmente, pois estas precisam sofrer uma

reação de capeamento para reduzir o efeito de grupos silanóis residuais, enquanto que nas fases preparadas por nós, estes grupos são blindados apenas pelo alto carregamento do PMOS.

Os testes cromatográficos com amostras básicas mostraram que as colunas recheadas com as FEs preparadas a partir de sílica com t_p de 5 μm , principalmente as esféricas, apresentaram uma pobre performance cromatográfica, que pode ser devido ao tamanho reduzido da partícula, que propicia que tanto os grupos silanóis, presentes na superfície da sílica, como as impurezas de metais acentuem as características ácidas da sílica intensificando adsorção de compostos básicos. As demais colunas, com exceção da sílica Davisil, apresentaram valores de A_s aceitáveis na literatura. É interessante observar que a coluna comercial recheada com partículas de 5 μm , mostrou adsorção irreversível de compostos alcalinos semelhante às FEs preparadas por nós.

O teste de termogravimetria mostrou que os dois tipos de FEs desenvolvidos são termicamente estáveis.

A espectrometria de ressonância magnética nuclear indicou que os grupos silanóis não reagiram com o polímero.

De um modo geral, tanto as colunas recheadas com FEs sorvida e imobilizada foram resistentes à lavagem com solventes, indicando que elas apresentam uma boa estabilidade química. As colunas recheadas com estes tipos de FEs podem ser usadas intensamente com FM MeOH/H₂O (70:30, v/v), sem perda de eficiência. Segundo Hetem et al ¹³³, à pH=2 e à pH=9 ocorrem solubilização da sílica devido a hidrólise e dissolução, respectivamente. Entretanto, nos testes de estabilidade química das FEs 50% PMOS-Sigma verificou-se que quando se utilizou para as lavagens FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) tanto em pH=2 como pH=9, a variação nos valores de N, k e α , usando a mistura I, foi muito pequena, indicando que apenas uma parte do PMOS foi arrastada e que não deve ter ocorrido solubilização da sílica. Portanto, nas FEs sorvidas, o alto carregamento protege o suporte de sílica, aumentando o tempo de vida da coluna cromatográfica. Ao se fazer a lavagem da coluna com FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) à pH=2, após a análise da mistura básica com a FM MeOH/H₂O (70:30, v/v) verificou adsorção dos compostos básicos, uma vez que estes apresentaram maior afinidade pela FE que, após a lavagem, tornou-se mais ácida.

A inspeção microscópica mostrou a presença de PMOS sobre as partículas de sílica quando se utilizou teor de carbono alto, que induziu agregação das partículas,

principalmente na sílica esférica. Após o enchimento, estas partículas tornaram mais dispersas devido a perda do polímero

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se dizer que antes do enchimento das colunas, o polímero preenche completamente os poros e forma uma camada sobre a superfície da sílica, o que pode ser apoiado pelas medidas de área superficial, volume específico dos poros e pelo teor de carbono. Após o enchimento das colunas, o PMOS que não se encontra fortemente aderido a superfície da sílica é arrastado, ficando os poros semi-preenchidos e formando um filme fino sobre a superfície da sílica. Esta hipótese é apoiada pela redução do teor de carbono e pelo aumento da área superficial obtidas após o enchimento. Este modelo é atribuído às FEs sorvidas e para uma melhor ilustração, pode ser visto na Figura 62a. Para as FEs imobilizadas ocorre uma maior retenção do PMOS devido ao entrecruzamento provocado pela radiação gama (Figura 62b). O entrecruzamento pode ser verificado por GPC através do aumento da massa molecular do polímero e pela presença de radicais livres medidos pela técnica de espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica. O aumento na retenção do PMOS, após irradiação, pode ser comprovado pelo teor de carbono, extração por solventes, medidas de área superficial e testes cromatográficos.

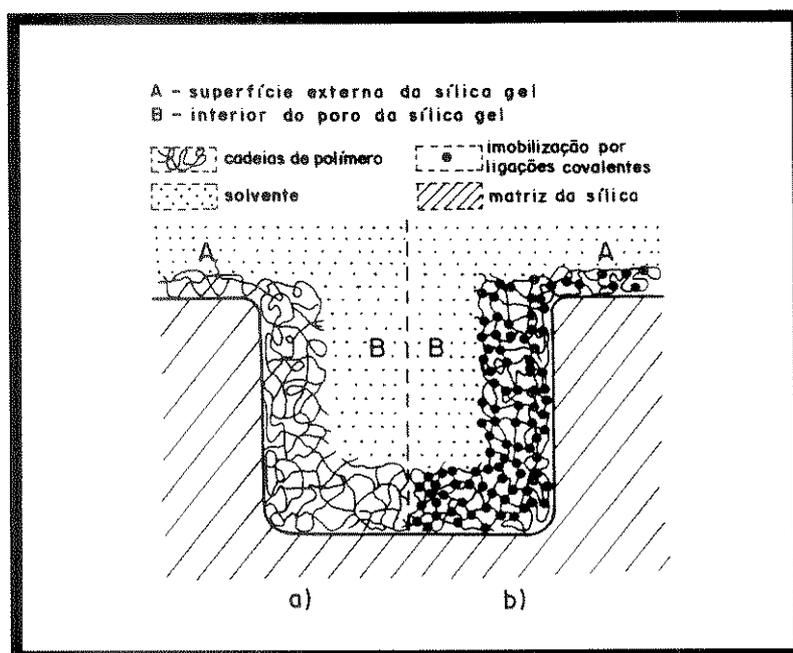


Figura 62 - Sílica gel com poros semi-preenchidos com polímero e superfície recoberta com filme fino de PMOS.

- a) sem entrecruzamento e sem ligação à superfície da sílica- FE sorvida
b) polímero entrecruzado - FE imobilizada.

O método de preparação de FEs foi reprodutível, como pode ser observado pelos dados obtidos da análise de carbono nas diferentes FEs sorvidas e imobilizadas, preparadas a partir do mesmo lote de sílica com a mesma quantidade de PMOS.

Cabe salientar que as FEs sorvidas, denominadas de não-ligadas, desenvolvidas neste trabalho têm grande potencial cromatográfico e são consideradas revolucionárias no campo da cromatografia moderna, pois possuem as vantagens das fases quimicamente ligadas e não apresentam as desvantagens e limitações de ambas. Ao contrário do que se tem na literatura, elas têm uma estabilidade excelente desde que se use uma fase estacionária líquida, de alta massa molecular, como é o caso dos polissiloxanos.

Finalmente, para a obtenção de colunas eficientes é necessário usar na preparação de FEs uma fase estacionária líquida apropriada e sílicas com características adequadas, ou seja, de menores tamanhos de partículas e de preferência de forma regular, o que confirma as tendências atuais da CLAE⁹⁵ como mostrado na Tabela 5. Entretanto, ao se trabalhar com sílicas irregulares com t_p de 10 μm deve optar por sílicas com d_p : 6 a 10 nm, S : ~300 a 400 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ e V_p : 0,9 a 1,7 mL g^{-1}), que também podem resultar em colunas com excelentes performances cromatográficas. Ambas as FEs desenvolvidas, sorvida e imobilizada, competem em qualidade e estabilidade com as comerciais, com a vantagem da nossa preparação ser mais simples e de menor custo.

Capítulo VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S., coordenadores, "Introdução a Métodos Cromatográficos", 4ª edição, Editora da UNICAMP, Campinas, 1990.
- 2- Poole, C.F.; Poole, S.K., "Chromatography Today", Elsevier Science Publishers, B.V., Amsterdam, 1991.
- 3- Martin, A.J.P.; Synge, R.L.M., "A New Form of Chromatogram Employing Two Liquid Phases. 1- A Theory of Chromatography. 2- Application to the Micro-Determination of the Higher Monoamino-Acids in Proteins", *Biochem. J.*, **35** (1941) 1358.
- 4- Snyder, I.R.; Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2ª edição, John Wiley and Sons, New York, 1979.
- 5- Majors, R.E., "Twenty-Five Years of HPLC Column Development - A Commercial Perspective", *LC-GC*, **12** (1994) 508.
- 6- Engelhardt, H.; Ahr, G., "Properties of Chemically Bonded Phases", *Chromatographia*, **14** (1981) 227.
- 7- Colin, H.; Guiochon, G.; "Introduction to Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **141** (1977) 289.
- 8- 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.
- 9- Melander, W.; Stoveken, J.; Horváth, C., "Stationary Phase Effects in Reversed-Phase Chromatography. I- Comparison of Energetics of Retention on Alkyl-Silica Bonded Phases", *J. Chromatogr.*, **199** (1980) 35.
- 10- Nagae, N.; Ishii, D., "Stability and Separation Characteristics of Alkyl-Bonded Silica Gels for Reversed-Phase Liquid Chromatography under Acidic and Basic pH Conditions", *American Laboratory*, **27** (5) (1995) 20.
- 11- Steffek, R.J.; Woo, S.L.; Weigand, R.J.; Anderson, J.M., "A Comparison of Silica-Based C18 and C8 HPLC Columns to Aid Column Selection", *LC-GC*, **13** (1995) 720.
- 12- Henry, M.P., "Design Requirements of Silica-Based Matrices for Biopolymer Chromatography", *J. Chromatogr.*, **544** (1991) 413.
- 13- Hanai, T.; Ohhira, M.; Tamura, T.; "Stability of Alkyl-Bonded Silica Gels" *LC-GC*, **6** (1988) 922.
- 14- Köhler, J.; Chase, D.B.; Farlee, R.D.; Vega, A.J.; Kirkland, J.J., "Comprehensive Characterization of Some Silica-Based Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, **352** (1986) 275.

- 15- Kirkland, J.J.; Henderson, J.W., "Reversed-Phase HPLC Selectivity and Retention Characteristics of Conformationally Different Bonded Alkyl Stationary Phases", *J. Chromatogr. Sci.*, 32 (1994) 473.
- 16- Hanson, M.; Unger, K.K.; Schomburg, G., "Non-Porous Polybutadiene-Coated Silicas as Stationary Phases in Reversed-Chromatography", *J. Chromatogr.*, 517 (1990) 269.
- 17- Hanson, M.; Unger, K.K.; Mant, C.T.; Hodges, R.S., "Polymer-Coated Reversed-Phase Packings with Controlled Hydrophobic Properties. I- Effect on the Selectivity of Protein Separations", *J. Chromatogr.*, 559 (1992) 65.
- 18- Hanson, M.; Unger, K.K.; Mant, C.T.; Hodges, R.S., "Polymer-Coated Reversed-Phase Packings with Controlled Hydrophobic Properties. II- Effect on the Selectivity of Peptide Separations", *J. Chromatogr.*, 599 (1992) 77.
- 19- Mizutani, T., "Use of Silicone-Coated Porous Glass for Exclusion Chromatography in an Aqueous Medium", *J. Chromatogr.*, 196 (1980) 485.
- 20- Mizutani, T., "Separation of Proteins on Silicone-Coated Porous Glass", *J. Chromatogr.*, 207 (1981) 276.
- 21- Haky, J.E.; Vemulapalli, S.; Wieserman, L.F., "Comparison of Octadecyl-Bonded Alumina and Silica for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 505 (1990) 307.
- 22- Heinemann, G.; Köhler, J.; Schomburg, G., "New Polymer Coated Anion-Exchange HPLC-Phases: Immobilization of Poly(2-Hydroxy, 3-N-Ethylenediamino)Butadiene on Silica and Alumina", *Chromatographia*, 23 (1987) 435.
- 23- Kaliszan, R.; Osmialowski, K., "Correlation between Chemical Structure of Non-Congeneric Solutes and Their Retention on Polybutadiene-Coated Alumina", *J. Chromatogr.*, 506 (1990) 3.
- 24- Hjertén, S.; Zelikman, I.; Lindberg, J.; Lederer, M.; "High-Performance Adsorption Chromatography of Proteins on Deformed Non-Porous Agarose Beads Coated with Insoluble Metal Compounds. II- Coating: Aluminum and Zirconium (Hydr)Oxide with Stoichiometrically Bound Phosphate", *J. Chromatogr.*, 481 (1989) 187.
- 25- Kaliszan, R.; Blain, R.W.; Hartwick, R.A., "A New HPLC Method of Hydrophobicity Evaluation Employing Poly(Butadiene)-Coated Alumina Columns", *Chromatographia*, 25 (1989) 5.
- 26- Chicz, R.M.; Shi, Z.; Regnier, F.E., "Preparation and Evaluation of Inorganic

- Anion-Exchange Sorbents not Based on Silica", *J. Chromatogr.*, 359 (1986) 121.
- 27- Ge, H.; Wallace, G.G., "Electrosynthesis of Chromatographic Stationary Phases", *Anal. Chem.*, 61 (1989) 198.
- 28- Berthod, A., "Silica: Backbone Material of Liquid Chromatographic Column Packings", *J. Chromatogr.*, 549 (1991) 1.
- 29- Poole, C.F.; Schuette, S.A., "Contemporary Practice of Chromatography", Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, 1979.
- 30- Cox, G.B., "The Influence of Silica Structure on Reversed-Phase Retention", *J. Chromatogr. A*, 656 (1993) 353.
- 31- Pfannkoch, E.A.; Switzer, B.S.; Kopaciewicz, W., "Aluminum Ion Mediated Stabilization of Silica-Based Anion-Exchange Packings to Caustic Regenerants", *J. Chromatogr.*, 503 (1990) 385.
- 32- Unger, K.K., "Porous Silica, Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography", 3ª edição, Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, 1986.
- 33- Petro, M.; Berek, D., "Polymers Immobilized on Silica Gels as Stationary Phases for Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 37 (1993) 549.
- 34- Hanson, M.; Unger, K.K., "Polymer Coatings as Stationary Phases in High-Performance Liquid Chromatography", *Trends Anal. Chem.*, 11 (1992) 368.
- 35- Schomburg, G., "Stationary Phases in High Performance Liquid Chromatography", *LC-GC*, 6 (1988) 36.
- 36- Wise, S.A.; Sander, L.C.; Chang, H.C.H.; Markides, K.E.; Lee, M.L., "Shape Selectivity in Liquid and Gas Chromatography: Polymeric Octadecylsilane (C₁₈) and Liquid Crystalline Stationary Phases", *Chromatographia*, 25 (1988) 473.
- 37- Hetem, M.J.J.; de Haan, J.W.; Claessens, H.A.; Cramers, C.A.; Deege, A.; Schomburg, G., "Characterization and Stability of Silanized and Polymer-Coated Octadecyl Reversed Phases", *J. Chromatogr.*, 540 (1991) 53.
- 38- Schomburg, G.; Köhler, J.; Figge, H.; Deege, A.; Bien-Vogelsang, U., "Immobilization of Stationary Liquids on Silica Particles by γ -Radiation", *Chromatographia*, 18 (1984) 265.
- 39- Figge, H.; Deege, A.; Köhler, J.; Schomburg, G., "Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography. Coating of Silica by Polymers of Various Polarities", *J. Chromatogr.*, 351 (1986) 393.

- 40- Bien-Vogelsang, U.; Deege, A.; Figge, H.; Köhler, J.; Schomburg, G., "Syntheses of Stationary Phases for Reversed-Phase LC Using Silanization and Polymer Coating", *Chromatographia*, 19 (1984) 170.
- 41- Schomburg, G.; Deege, A.; Köhler, J.; Bien-Vogelsang, U., "Immobilization of Stationary Liquids in Reversed and Normal-Phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 282 (1983) 27.
- 42- Shirota, O.; Ohtsu, Y.; Nakata, O., "Characterization of Polymer-Coated C₁₈ Packing Materials for Reversed-Phase Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. Sci.*, 28 (1990) 553.
- 43- Ohtsu, Y.; Shirota, O.; Ogawa, T.; Tanaka, I.; Ohta, T.; Nakata, O.; Fujiyama, Y., "Application of a New Capsule-Type Silica Gel Coated with Hydrophobic Polymer to Preparative Liquid Chromatography on an Industrial Scale", *Chromatographia*, 24 (1987) 351.
- 44- Ohmacht, R.; Kele, M.; Matus, Z., "Polymer Coated Stationary Phases for Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 28 (1989) 19.
- 45- Ohtsu, Y.; Shiojima, Y.; Okumura, T.; Koyama, J.; Nakamura, K.; Nakata, O., "Performance of Polymer-Coated Silica C₁₈ Packing Materials Prepared from High-Purity Silica Gel. The Suppression of Undesirable Secondary Retention Processes", *J. Chromatogr.*, 481 (1989) 147.
- 46- Ohtsu, Y.; Fukui, H.; Kanda, T.; Nakamura, K.; Nakano, M.; Nakata, O.; Fujiyama, Y., "Structures and Chromatographic Characteristics of Capsule-Type Silica Gels Coated with Hydrophobic Polymers in Reversed-Phase Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 24 (1987) 380.
- 47- Kutsuna, H.; Ohtsu, Y.; Yamaguchi, M., "Synthesis and Characterization of Highly Stable Polymer-Coated Aminosilica Packing Material for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 635 (1993) 187.
- 48- Hetem, M.J.J.; De Haan, J.W.; Claessens, H.A.; Cramers, C.A.; Deege, A.; Schomburg, G., "Characterization and Stability of Silanized and Polymer-Coated Octadecyl Reversed Phases", *J. Chromatogr.*, 540 (1991) 53.
- 49- 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.
- 50- Anazawa, T.A.; Carraro, F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F., "Stability of High-Performance Liquid Chromatography Columns Packed with C₁ and C₈ Polysiloxanes Sorbed into Porous Silica Particles", *J. Chromatogr. A*, 697

- (1995) 159.
- 51- Hanson, M.; Eray, B.; Unger, K.; Neimark, A.V.; Schmid, J.; Albert, K.; Bayer, E., "A Model for Polybutadiene Coatings on Porous Silica", *Chromatographia*, 35 (1993) 403.
- 52- Kaliszán, R.; Petruszewicz, J.; Blain, R.W.; Hartwick, R.A., "Determination of Hydrophobicity Parameters on Polybutadiene-Coated Alumina and Their Application in Quantitative Structure-Activity Relationships Analysis", *J. Chromatogr.*, 458 (1988) 395.
- 53- Engelhardt, H.; Löw, H.; Eberhardt, W.; Mauß, M., "Polymer Encapsulated Stationary Phases: Advantages, Properties and Selectivities", *Chromatographia*, 27 (1989) 535.
- 54- Engelhardt, H.; Cuñat-Walter, M.A., "Polymer Encapsulated Stationary Phases with Improved Efficiency", *Chromatographia*, 40 (1995) 657.
- 55- Davankov, V.A.; Kurganov, A.A.; Unger, K.K., "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Polypeptides on Polystyrene-Coated Silica Supports, *J. Chromatogr.*, 500 (1990) 519.
- 56- Kurganov, A.; Davankov, V.; Isajeva, T.; Unger, K.; Eisenbeiss, F., "Characterization of Covalently Bonded and Adsorbed Polymer Coatings on Silica, Alumina and Zirconia by Means of Physico-Chemical and Chromatographic Methods", *J. Chromatogr. A*, 660 (1994) 97.
- 57- Nasuto, R.; Kwietniewski, L., "Toluene Polymer as a New Stationary Phase in Reversed-Phase Column Liquid Chromatography", *Chromatographia*, 29 (1990) 597.
- 58- Bentrop, D.; Kohr, J.; Engelhardt, H., "Poly(methylglutamate)-Coated Surfaces in HPLC and CE", *Chromatographia*, 32 (1991) 171.
- 59- Messina, A.; Nicoletti, I.; Quaglia-Strano, M.G.; Sinibaldi, M., "High-Performance Liquid Chromatographic Resolution of Enantiomers on Chiral Epoxy Polymer-Coated Silica Gel", *Chromatographia*, 28 (1989) 477.
- 60- Olsson, L.; Samuelson, O., "Chromatography of Aromatic Acids, Aldehydes and Phenols on Pellicular Polyamide in Aqueous Solution", *J. Chromatogr.*, 106 (1975) 139.
- 61- Rokushika, S.; Huang, D.Y.; Qiu, Z.Y.; Hatano, H., "Polyallylamine-Coated Silica Gel Microbore Column for Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 332 (1985) 15.
- 62- Kennedy, L.A.; Kopaciewicz, W.; Regnier, F.E., "Multimodal Liquid

- Chromatography Columns for the Separation of Proteins in Either the Anion-Exchange or Hydrophobic-Interaction Mode", *J. Chromatogr.*, 359 (1986) 73.
- 63- Kimura, K.; Harino, H.; Nakajima, M.; Shono, T., "Drastic Effect of Crown-Complexing Cations in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using Poly(Crown Ether)-Immobilized Silica", *Chem. Lett.*, 6 (1985) 747.
- 64- Harino, H.; Kimura, K.; Tanaka, M.; Shono, T., "Reversed-Phase Liquid Chromatography of Polar Benzene Derivatives on Poly(Vinylbenzo-18-Crown-6)-Immobilized Silica as a Stationary Phase", *J. Chromatogr.*, 522 (1990) 107.
- 65- Roth, M.; Novák, J.; David, P; Novotny, M., "Thermodynamic Studies into a Sorption Mechanism within the Cross-Linked Polysiloxane Stationary Phases", *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1490.
- 66- Klaas, E.B.; Horváth, C.; Melander, W. R.; Nahum, A., "Surface Silanols in Silica-Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases. II- Irregular Retention Behavior and Effect of Silanol Masking", *J. Chromatogr.*, 203 (1981) 65.
- 67- Melander, W.; Stoveken, J.; Horváth, C., "Stationary Phase Effects in Reversed-Phase Chromatography. I- Comparison of Energetics of Retention and Alkyl-Silica Bonded Phases", *J. Chromatogr.*, 199 (1980) 35.
- 68- Bij, K.E.; Horváth, C.; Melander, W.R.; Nahum, A.; "Surface Silanols in Silica-Bonded Hydrocarbonaceous Stationary Phases. II- Irregular Retention Behavior and Effect of Silanol Masking", *J. Chromatogr.*, 203 (1981) 65.
- 69- Nawrocki, J., "Silica Surface Controversies, Strong Adsorption Sites, Their Blockage and Removal. Part I and Part II", *Chromatographia*, 31 (1991) 177.
- 70- Ascah, T.L.; Feibush, B., "Novel, Highly Deactivated Reversed-Phase for Basic Compounds", *J. Chromatogr.*, 506 (1990) 357.
- 71- Verzele, M., "Trace Metals in Silica Gel Based HPLC Packing Materials, LC, 1 (1981) 217.
- 72- Verzele, M.; Dewaele, C., "The Evaluation of Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography Packing Materials", *Chromatographia*, 18 (1984) 84.
- 73- Sander, L.C.; Wise, S.A., "Recent Advances in Bonded Phases for Liquid Chromatography", *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 18 (1987) 299.
- 74- Alpert, A.J.; Regnier, F.E., "Preparation of a Porous Microparticulate Anion-Exchange Chromatography Support for Proteins", *J. Chromatogr.*, 185 (1979) 375.

- 75- Rokushika, S.; Huang, D.H.; Qiu, Z.Y.; Hatano, H., "Polyallylamine-Coated Silica Gel Microbore Column for Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 332 (1985) 15.
- 76- Erlandsson, P.; Hansson, L.; Isaksson, R., "Direct Analytical and Preparative Resolution of Enantiomers Using Albumin Adsorbed to Silica as a Stationary Phase", *J. Chromatogr.*, 370 (1986) 475.
- 77- Stuurman, H.W.; Köhler, J.; Schomburg, G., "HPLC-Separation of Enantiomers Using Quinine, Covalently Bonded to Silica as Stationary Phase", *Chromatographia*, 25 (1988) 265.
- 78- Ruffing, F.J.; Lux, J.A.; Roeder, W.; Schomburg, G., "Chiral Stationary Phases for LC and SFC Obtained by "Polymer Coating"", *Chromatographia*, 26 (1988) 19.
- 79- Köhler, J., "Poly(vinylpyrrolidone)-Coated Silica: A Versatile, Polar Stationary Phase for HPLC", *Chromatographia*, 21 (1986) 573.
- 80- Erler, U.; Heublein, G., "Synthesis and Characterization of Stationary Phases on the Basis of Silicas Modified with Epoxidized Polybutadienes. IV- Chromatographic Experiments on a New Amino-Functionalized Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr.*, 588 (1991) 340.
- 81- Alpert, A.J., "Cation-Exchange High-Performance Liquid Chromatography of Proteins on Poly(Aspartic Acid)-Silica", *J. Chromatogr.*, 266 (1983) 23.
- 82- Alpert, A.J., "High-Performance Hydrophobic-Interaction Chromatography of Proteins on a Series of Poly(Alkyl Aspart-Amide)-Silicas", *J. Chromatogr.*, 359 (1986) 85.
- 83- Alpert, A.J., "Cation-Exchange Chromatography of Peptides on Poly(2-Sulfoethyl Aspartamide)-Silica", *J. Chromatogr.*, 443 (1988) 85.
- 84- Kirkland, J.J.; Yates, P.C., US Patent. 3 795 313 (1974).
- 85- Kirkland, J.J.; Yates, P.C., US Patent. 3 722 181 (1973).
- 86- Jarrett, H.W., "Development of N-Hydroxysuccinimide Ester Silica, a Novel Support for High-Performance Affinity Chromatography", *J. Chromatogr.*, 405 (1987) 179.
- 87- Lecourtier, J.; Audebert, R.; Quivoron, C., "Theoretical and Experimental Aspects of Fractionation Mechanisms in Liquid Chromatography on Macromolecular Stationary Phases (Gel or Bonded Chains)", *Pure Appl. Chem.*, 51 (1979) 1483.

- 88- Kalbé, J.; Höcker, H.; Berndt, H., "Design of Enzyme Reactors as Chromatographic Columns for Racemic Resolution of Amino Acid Esters", *Chromatographia*, **28** (1989) 193.
- 89- Erlandsson, P.; Marle, I.; Hansson, L.; Isaksson, R.; Petersson, C.; Petersson, G., "Immobilized Cellulase (CBH I) as a Chiral Stationary Phase for Direct Resolution of Enantiomers", *J. Am. Chem. Soc.*, **112** (1990) 4573.
- 90- Domenici, E.; Bertucci, C.; Salvadori, P.; Félix, G.; Cahagne, I.; Motellier, S.; Wainer, I.W., "Synthesis and Chromatographic Properties of an HPLC Chiral Stationary Phase Based Upon Human Serum Albumin", *Chromatographia*, **29** (1990) 170.
- 91- Kurganov, A.A.; Tevlin, A.B.; Davankov, V.A., "High-Performance Ligand-Exchange Chromatography of Enantiomers. Studies on Polystyrene-Type Chiral Phases Bonded to Microparticulate Silicas", *J. Chromatogr.*, **261** (1983) 223.
- 92- Davankov, V.A.; Kurganov, A.A.; Unger, K.K., "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Proteins and Polypeptides on Polystyrene-Coated Silica Supports", *J. Chromatogr.*, **500** (1990) 519.
- 93- Kurganov, A.A.; Kuzmenko, O.; Davankov, V.A.; Eray, B.; Unger, K.K.; Trüding, U., "Effect of Polystyrene Coating on Pore, Structural and Chromatographic Properties of Silica Packings", *J. Chromatogr.*, **506** (1990) 391.
- 94- Kurganov, A.A.; Davankov, V.A.; Unger, K.K., "Ion-Exchange High-Performance Liquid Chromatography of Nucleotides and Polypeptides on New Types of Ion-Exchange Sorbents, Based on Polystyrene-Coated Silicas", *J. Chromatogr.*, **548** (1991) 207.
- 95- Majors, R.E., "Current Trends in HPLC Column Usage", *LC-GC*, **12** (1994) 890.
- 96- Majors, R.E., "Trends in HPLC Column Usage", *LC-GC*, **9** (1991) 686.
- 97- Bidlingmeyer, B.A., "Practical HPLC Methodology and Applications", John Wiley & Sons, New York, NY, 1993.
- 98- Swallow, A.J., "Radiation Chemistry - An Introduction", Longman, London, 1973.
- 99- Spinks, J.W.T.; Woods, R.J., "An Introduction to Radiation Chemistry", 2ª edição, John Wiley & Sons, New York, 1976.
- 100- Petrarch Systems Silanes & Silicones, catálogo, 1989

- 101- Haken, J.K., "Polysiloxane Stationary Phases", *J. Chromatogr.*, 73 (1972), 419.
- 102- Denaro, A.R.; Jayson, G.G., "Fundamentals of Radiation Chemistry", Ann Arbor Science Publishers Inc., London, 1972.
- 103- Schnabel, W., "Polymer Degradation, Principles and Practical Applications", Hanser International, Wien, 1981.
- 104- Verzele, M.; Dewaele, C., "Low-Viscosity Solvent Packing of HPLC Columns Using the "Up-Tube" Packing Procedure", *LC-GC*, 4 (1986) 614.
- 105- Majors, R.E., "Slurry Packing Microparticulate Columns", *LC*, 2 (1984) 502.
- 106- Scott, R.P.W., "Silica Gel and Bonded Phases. Their Production, Properties and Use in LC", John Wiley & Sons Ltd, Chichester, England, 1993.
- 107- Majors, R.E., "High-Performance Liquid Chromatography on Small Particle Silica Gel", *Anal. Chem.*, 44(1972) 1722.
- 108- Asshauer, J.; Halász, I., "Reproducibility and Efficiency of Columns Packed With 10 μm Silica in Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. Sci.*, 12 (1974) 139.
- 109- Menet, H.; Gareel, P.; Caude, M.; Rosset, R., "Packing and Performance of Microbore Columns for Adsorption and Partition Chromatography", *Chromatographia*, 18 (1984) 73.
- 110- Bristow, P.A.; Brittain, P.N.; Riley, C.M.; Williamson, B.F., "Upward Slurry Packing of Liquid Chromatography Columns", *J. Chromatogr.*, 131 (1977) 57.
- 111- Dolan, J.W.; Snyder, L.R., "Troubleshooting LC Systems". The Humana Press Inc., Clifton, New Jersey, 1989.
- 112- Braithwaite, A.; Smith, F.J., "Chromatographic Methods", 4^a edição, Chapman and Hall, London, 1985.
- 113- Anazawa, T.A., "Imobilização por Radiação Gama de Fase Estacionária Líquida sobre Suporte de Sílica para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)", Tese de Mestrado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P., 1992.
- 114- Basso, M.A., "Avaliação da Radiação Gama como Agente de Imobilização de algumas Fases Estacionárias sobre Suportes para Uso em Cromatografia Gasosa", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P., 1989.
- 115- Iler, R.K., "The Chemistry of Silica", John Wiley & Sons, New York, 1979.
- 116- Anazawa, T.A.; Carraro, F.; Souza, J.B.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F.,

- "Polimento da Parede Interna de Aço Inoxidável para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", 14^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Caxambu, MG, 1991, QA-010.
- 117- Sanchez, E.F.; Dominguez, J.A.; Muñoz, J.G.; Molera, M.J., "Determination of the Liquid Loading in Gas Chromatography Packings by an Extraction Method", *J. Chromatogr.*, **299** (1984) 151.
- 118- Khurana, A.L.; Ho, C.T., "Determination of Surface Silanols of Silica Gels and HPLC Bonded Phases", *J. Liq. Chromatogr.*, **11** (1988) 3205.
- 119- Zuo, Y.M.; Zhu, B.R.; Liao, Y.; Gui, M.D.; Pang, Z.L.; Qi, J.X., "Polymer Encapsulated Packing Material for Reversed Phase Liquid Chromatography", *Chromatographia*, **38** (1994) 756.
- 120- Lima, M.A.F., "Desenvolvimento de Colunas para HPLC e Micro HPLC", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P., 1988.
- 121- Trindade, M.F.S., "Estudo da Influência da Radiação Gama sobre Fases Comerciais Utilizadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Instituto de Química da UNICAMP, Campinas, S.P., 1992.
- 122- Engelhardt, H.; Jungheim, M., "Comparison and Characterization of Reversed Phases", *Chromatographia*, **29** (1990) 59.
- 123- Alltech Chromatography, Buyers's Guide, Bulletin nº 240.
- 124- Bragagnolo, N.; Rodriguez-Amaya, D.B., "Teores de Colesterol em Carne de Frango", *Rev. Farm. Bioquím.*, **28** (2) (1992) 122.
- 125- Buszewski, B.; Kulpa, M., "Influence of Coverage Density of Chemically Bonded C₁₈ Phases on the Retention Data of Substances Eluted in Dead Volume During RP HPLC Analysis", *J. Liq. Chromatogr.*, **16** (1994) 75.
- 126- Albert, K.; Brindle, R.; Schmid, J.; Buszewski, B.; Bayer, E., "CP/MAS NMR Investigations of Silica Gel Surfaces Modified with Aminopropylsilane", *Chromatographia*, **38** (1994) 283.
- 127- Albert, K.; Bayer, E., "Characterization of Bonded Phases by Solid-State NMR Spectroscopy", *J. Chromatogr.*, **544** (1991) 345.
- 128- Albert, K.; Brindle, R.; Martin, P.; Wilson, I.D., "Characterisation of C₁₈-Bonded Silicas for Solid-Phase Extraction by Solid-State NMR Spectroscopy", *J. Chromatogr. A*, **665** (1994) 253.
- 129- Verhulst, H.A.M.; van de Ven, L.J.M.; de Haan, J.W.; Claessens, H.A.; Eisenbeiss, F.; Cramers, C.A., "Patching in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Materials Studied by Solid-State NMR

- Spectrometry", J. Chromatogr. A, 687 (1994) 213.
- 130- Akapo, S.O.; Simpson, C.F., "Structural Investigation of Oligomeric n-Octylsilyl Reversed Phases", J. Chromatogr., 557 (1991) 515.
- 131- Breitmaier, E.; Voelter, W., "Carbon-13 NMR Spectroscopy", 3^a edição, VCH, New York, 1987.
- 132- Chang, R., "Basic Principles of Spectroscopy", McGraw-Hill, Inc., New York, 1971.
- 133- Hetem, M.; van de Ven, L.; de Haan, J.; Cramers, C.; Albert, K.; Bayer, E., "Study of the Changes in Mono-, Di- and Trifunctional Octadecyl-Modified Packings for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Different Eluent Compositions", J. Chromatogr., 479 (1989) 269.