

CARLA GRAZIELI AZEVEDO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE FASES ESTACIONÁRIAS C18 TERMICAMENTE IMOBILIZADAS SOBRE SÍLICA E SÍLICAS METALIZADAS E SUAS CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS, FÍSICAS E CROMATOGRÁFICAS UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E A CROMATOGRAFIA COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (CFS)

> CAMPINAS 2013

> > i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS INSTITUTO DE QUÍMICA

CARLA GRAZIELI AZEVEDO DA SILVA

DESENVOLVIMENTO DE FASES ESTACIONÁRIAS C18 TERMICAMENTE IMOBILIZADAS SOBRE SÍLICA E SÍLICAS METALIZADAS E SUAS CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS, FÍSICAS E CROMATOGRÁFICAS UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E A CROMATOGRAFIA COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (CFS)

ORIENTADORA: PROF. DRA. CAROL HOLLINGWORTH COLLINS

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM CIÊNCIAS.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA POR CARLA GRAZIELI AZEVEDO DA SILVA E ORIENTADA PELA PROF. DRA. CAROL HOLLINGWORTH COLLINS.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 - BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Si39d	Silva, Carla Grazieli Azevedo da (1978-). Desenvolvimento de fases estacionárias C18 termicamente imobilizadas sobre sílica e sílicas metalizadas e suas caracterizações químicas, físicas e cromatográficas utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia com fluido supercrítico (CFS) / Carla Grazieli Azevedo da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.
	Orientadora: Carol Hollingworth Collins.
	Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
	 Cromatografia líquida de alta eficiência. Cromatografia com fluído supercrítico. 3. Fases estacionárias reversas. 4. Poli (metiloctadecilsiloxano). Suportes de sílica metalizada. I. Collins, Carol Hollingworth. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Development of C18 stationary phases immobilized onto silica and metalized silicas and their chemical, physical and chromatographic characterizations using high performance liquid chromatography (HPLC) and supercritical fluid chromatography (SFC)

Palavras-chave em inglês:

High Performance Liquid Chromatography Supercritical Fluid Chromatography Stationary phases Poly (methyloctadecylsiloxane) Metalized silica supports

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Carol Hollingworth Collins [Orientadora] Martha Böhrer Adaime Anizio Márcio de Faria Isabel Cristina Sales Fontes Jardim Susanne Rath

Data de defesa: 26/02/2013

Programa de pós-graduação: Química

Aos meus pais, Maria Elaine e Carlos (in memorian), a minha avó D. Maria, por sempre acreditarem em mim e serem a base para que eu chegasse até aqui, a minha irmã Natacha, minha sobrinha Louise e a todos aqueles que sempre me incentivaram, em sinal de gratidão e amor, dedico esta tese.

"Above all, don't fear difficult moments. The best comes from them." (Rita Levi-Montalcini)

"Fais de ta vie un rêve, et d'un rêve, une réalité."

(Antoine de Saint-Exupéry)

AGRADECIMENTOS

À Professora Carol Hollingworth Collins, pela oportunidade e os ensinamentos, pelo exemplo de orientação e pela amizade, confiança e liberdade para conduzir meu projeto.

À Dra Caroline West e ao Dr. Eric Lesellier pelo aceite de orientação, vontade de ensinar e por todos os conhecimentos adquiridos durante a minha participação no Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) no Institut de Chimie Organique et Analytique da Université d'Orléans.

À Professora Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, pelos conhecimentos transmitidos, pela companhia agradável e exemplo profissional.

À Profa. Maria Izabel Maretti e a Dra Karen Goraieb pela disponibilidade e auxílio com as medidas de fluorescência de raios X.

Aos professores Fabio Augusto, Maria Izabel Maretti, Marco Aurélio Arruda Zezzi, Susanne Rath e Dosil Pereira de Jesus, pelos ensinamentos valiosos durante os semestres de estágio docente.

Aos amigos e colegas do LabCrom: Ana Paula Bodemeier, Cláudio Ferreira, Daniele Oshita, Elisa Moraes, Elias da Silva Júnior, Karen Goraieb, Fernanda Begnini, Lucília Melo, Luana Macedo, Renata Nome, Renata Magueta, Milena Segato, Liane Maldaner, Marcel Borges, Louise Magalhães, Paulo Rosa, Marcelo Delmonde, Hugo Richard, Mariana Sato, Marcelo André, Gizelle Bedendo e Rafael Marques pela companhia agradável e pelas discussões sobre nossos trabalhos.

Aos amigos do IQ-UNICAMP: Melina Mottin, Fernando Quites, Leonardo Barros, Danyele Xavier, Clarisse Ricci, Leandro Hantao, Bruna Toledo, Herbert Souza, Valeska Aguiar pelos bons momentos juntos.

À colega de Institut de Chimie Organique et Analytique Syame Khater por todo o apoio, atenção, discussões sobre nossos trabalhos em cromatografia com fluido supercrítico e pela amizade.

Aos colegas de Institut de Chimie Organique et Analytique Kinga Puzio, Aleksandra Krstulja, Aleksander Salwinski, Johanna Duval, Cecíle Garcia, Hala Nehmé, Ludivine Riffault, Daniela Barbu, Mathieu Beaumesnil, Laoges Thao, Hanane Belghit e Paola Oliveira que tornaram meus dias na França mais alegres e agradáveis.

À M.me Marie-Frédérique Pellerin pelo apoio e inserção na vida acadêmica e estudantil da Université D'Orléans.

À Cássia Chin, minha querida amiga, pela amizade incondicional, companherismo e seus conselhos sempre sensatos.

À minha família e meus amigos pelo carinho, torcida e incentivo a minha carreira.

Aos técnicos do IQ-UNICAMP: Mirian, Eraldo, Divino, José, Priscila, Anderson, Daniel, Cláudia, Márcia, Raquel, Fabiana e Daniel, que tiveram contribuições diretas para a conclusão deste trabalho e pela ótima convivência durante o período dos estágios docentes.

Ao técnico da mecânica fina Mário Toma por toda a atenção e empenho na confecção de adaptadores para o enchimento das colunas cromatográficas.

Aos demais professores, técnicos e funcionários do IQ-UNICAMP que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ӱ Ao CNPq pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

À CAPES pela bolsa concedida para realização do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

😃 À FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) pelo apoio financeiro.

Ao IQ-UNICAMP pelo apoio financeiro.

A todos os demais que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SÚMULA CURRICULAR FORMAÇÃO ACADÊMICA

MESTRADO EM QUÍMICA (QUÍMICA ANALÍTICA E AMBIENTAL) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Instituto de Química (IQ), Porto Alegre, RS, Brasil. Título: *Caracterização geoquímica orgânica das rochas geradoras de petróleo das formações Irati e Ponta Grossa da Bacia do Paraná*. Período: 12/2005 a 12/2007. Orientação: Prof. Dra. Maria do Carmo Ruaro Peralba. Co-Orientação: Prof. Dr. João Henrique Zimnoch dos Santos.

BACHARELADO EM QUÍMICA - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Instituto de Química (IQ), Porto Alegre, RS, Brasil. Período: 03/2000 a 12/2004.

LICENCIATURA EM QUÍMICA - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Instituto de Química (IQ), Porto Alegre, RS, Brasil. Período: 03/2005 a 12/2008.

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

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

- Estágio docente da Disciplina QA-582 - Química Analítica Instrumental I, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Período: 08/2010 a 12/2010. PED B.

- Estágio docente da Disciplina QA-682 - Química Analítica Instrumental II, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Período: 02/2011 a 07/2011. PED B.

- Estágio docente da Disciplina QA-416 - Química Analítica IV, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Período: 08/2011 a 12/2011. PED B.

- Estágio docente da Disciplina QA-582 - Química Analítica Instrumental I, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Período: 08/2012 a 12/2012. PED B.

INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS NACIONAIS: 7

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS INTERNACIONAIS: 10

ARTIGOS CIENTÍFICOS

S. Stefens, C. G. A. da Silva, J. G. Mendonça Filho, J. H. Z dos Santos, M.C.R. Peralba. Lipid biomarkers profile - presence of coprostanol: recent sediments from Rodrigo de Freitas Lagoon. Journal of Environmental Science and Health Part A - Environmental Science and Engineering

& Toxic and Hazardous Substance Control, 42 (2007) 1553-1560. Citações: Scopus: 3, ISI (*Web of Science*): 3, Google scholar: 2.

R. R. Dihl, C. G. A. da Silva, V. S. do Amaral, M. L. Reguly, H. H. R. de Andrade. Mutagenic and recombinagenic activity of airborne particulates, PM10 and TSP, organic extracts in the Drosophila wing-spot test. Environmental Pollution, 151 (2008) 47-52. Citações: Scopus: 8, ISI (*Web of Science*): 7, Google scholar: 12.

E.M. Borges, C.G.A Silva, C.H. Collins. Chromatographic evaluation of some stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica. Microchemical Journal, 96 (2010) 120-125. Citações: Scopus: 4. ISI (*Web of Science*): 6, Google scholar: 9.

C. G. A. da Silva, C. H. Collins. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. Química Nova, 34 (2011) 665-676. Scopus: 2. ISI (*Web of Science*): 1, Google scholar: 2.

C. G. A. da Silva, C. H. Collins. Preparation and characterization of a poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto zirconized silica stationary phase for high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1232 (2012) 248-256. Citações: Scopus: 1, ISI (Web of Science): 1.

C. G. A. da Silva, E. S. da Silva Júnior, C. H. Collins. Optimization of the thermal immobilization of poly(methyloctadecylsiloxane) and poly (dimethylsiloxane) onto silica stationary phases using central composite design and response surface methodologies, Brazilian Journal of Analytical Chemistry, 7 (2012), 304-308. Scopus: 0, ISI (*Web of Science*): 0.

C. G. A. da Silva, C. H. Collins. Improved chemical stabilities for end-capped high performance liquid chromatography stationary phases based on poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto metalized silicas. Journal of Chromatography A, 1260 (2012) 81-87. Citações: Scopus: 0, ISI (*Web of Science*): 0.

C. G. A. da Silva, C. H. Collins. Stationary phases based on poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto titanized silica for high-performance liquid chromatography. Microchemical Journal, *in press*. doi: 10.1016/j.microc.2012.03.009. Scopus: 0.

CITAÇÕES: ISI (Web of Science): 12, Google Scholar: 25

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE FASES ESTACIONÁRIAS C18 TERMICAMENTE IMOBILIZADAS SOBRE SÍLICAS E SÍLICAS METALIZADAS E SUAS CARACTERIZACÕES QUÍMICAS, FÍSICAS Е CROMATOGRÁFICAS UTILIZANDO A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) E A CROMATOGRAFIA COM FLUIDO SUPERCRÍTICO (CFS). Este trabalho apresenta o desenvolvimento de fases estacionárias (FE) para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e cromatografia com fluido supercrítico (CFS) а partir da imobilização térmica de poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) sobre suportes de sílicas metalizadas com zircônio e titânio. O processo de imobilização térmica do PMODS foi otimizado aplicando-se planejamento composto central. O polímero, os suportes e as fases estacionárias foram caracterizados por testes físicoquímicos e cromatográficos. As fases estacionárias Si(PMODS), Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) apresentaram os melhores resultados quando foi aplicada a temperatura de 120 °C por 16 horas. As melhores FE foram submetidas ao processo de capeamento. Estas FE mostraram eficiências entre 82.000 e 90.000 pratos m⁻¹ e boas separações com picos simétricos para compostos apolares e picos com simetria adequada, segundo parâmetros estabelecidos pela Farmacopéia Americana (United States Pharmacopeia), para compostos polares, avaliados pelos testes de Engelhardt, Tanaka, Neue, SRM 870 e pelo modelo dos parâmetros de solvatação utilizando CFS. A presença do óxido metálico no suporte resultou em FE com maior estabilidade química em condições drásticas de fase móvel (pH 1,7 e pH 10 a 50 °C), quando comparada com fases similares baseadas em sílica nua. A reação de capeamento melhorou a estabilidade química das FE e diminuiu o número de silanóis residuais. As FE Si-Zr(PMODS), Si-Ti(PMODS), Si-Zr(PMODS)ec e Si-Ti(PMODS)ec apresentam potencialidade na separação de fármacos psicoativos, filtros ultravioleta (UV), xantinas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), utilizando CLAE e CFS.

XV

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF C18 STATIONARY PHASES IMMOBILIZED ONTO SILICA AND METALIZED SILICAS AND THEIR CHEMICAL, PHYSICAL AND CHROMATOGRAPHIC CHARACTERIZATIONS USING HIGH LIQUID PERFORMANCE CHROMATOGRAPHY (HPLC) AND SUPERCRITICAL FLUID CHROMATOGRAPHY (SFC). This work presents the development of stationary phases (SP) for high performance liquid chromatography in the reversed phase (RP-HPLC) and for supercritical fluid chromatography (SFC) prepared by the sorption and thermal immobilization of poly(methyloctadecylsiloxane) (PMODS) onto silica and metalized silica supports modified with zirconium and titanium. The immobilization process was optimized using central composite design for determination of the best conditions of time and temperature. The polymer, supports and stationary phases were characterized with physico-chemical and chromatographic tests. The stationary phases Si(PMODS), Si-Zr(PMODS) and Si-Ti(PMODS) presented the best results when a temperature of 120 °C for 16 hours was applied. The best SP were submitted to endcapping processes. These SP showed efficiencies between 82,000 and 90,000 plates m⁻¹ and good separations with symmetric peaks for apolar and polar compounds evaluated by the Engelhardt, Tanaka, Neue and SRM 870 tests and the solvation parameter model using supercritical fluid chromatography (SFC). The presence of metallic oxide on the supports resulted in stationary phases with better chemical stability under drastic conditions of mobile phase (pH 1.7 and pH 10 at 50 °C), when compared to similar stationary phases based on bare silica. The endcapping reaction improved the chemical stability. The SP Si-Zr(PMODS), Si-Ti(PMODS), Si-Zr(PMODS)ec e Si-Ti(PMODS)ec presented potentialities for the separation different pharmaceutical compounds used as psychotropic drugs, ultraviolet (UV) filters, xanthines, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), using separations in HPLC and SFC.

xvii

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	xxiii
Lista de Figuras	xxv
1. Introdução	1
1.1 Suportes cromatográficos	2
1.1.1 Sílica de alta pureza (tipo B)	3
1.1.2 Sílicas híbridas	3
1.1.3 Sílica superficialmente porosa	8
1.1.4 Sílica monolítica	9
1.1.5 Suportes de óxidos metálicos	11
1.1.6 Suportes de óxidos mistos	12
1.2 Fases estacionárias para CLAE-FR	13
1.2.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas	13
1.2.2 Estratégias de preparo de fases estacionárias	14
1.2.2.1 Reação de capeamento	15
1.2.2.2 Fases estacionárias com polimerização vertical	15
1.2.2.3 Fases estacionárias com polimerização horizontal	16
1.2.2.4 Fases estacionárias estericamente protegidas	16
1.2.2.5 Fases estacionárias com grupos polares embutidos	16
1.2.2.6 Fases estacionárias bidentadas	18
1.2.2.7 Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados	18
1.3 Avaliação das colunas cromatográficas	21
1.4 Cromatografia com fluido supercrítico	25
1.4.1 Fases móveis	27
1.4.2 Fases estacionárias	29
1.4.3 Instrumentação	29
1.4.3.1 Sistema de bombeamento e pressurização	29
1.4.3.2 Sistema de injeção	30
1.4.3.3 Sistema de aquecimento e controle de temperatura	30
1.4.3.4.Sistemas de detecção	31

3.9 Preparo da fase móvel	58
3.10 Condicionamento das colunas cromatográficas	58
3.11 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias	59
3.11.1 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias por CLAE-FR	59
3.11.2 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias por CFS	66
3.12 Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias	73
3.12.1 Estabilidade em meio alcalino	73
3.12.2 Estabilidade em meio ácido	74
3.13 Avaliação da aplicabilidade das FE otimizadas	74
3.13.1 Aplicabilidade em CLAE-FR	74
3.13.2 Aplicabilidade em CFS	78
4. Resultados e Discussão	83
4.1 Fluorescência de raios-X	83
4.2 Microscopia eletrônica de varredura	85
4.3 Planejamento experimental: avaliação da imobilização térmica do PMO	DS
sobre os suportes metalizados	86
4.4 Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros	92
4.5 Termogravimetria	93
4.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	96
4.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de sílicio (RMN 26	°Si)
	103
4.8. Caracterização cromatográfica das FE otimizadas por CLAE-FR 1	104
4.8.1 Escolha da vazão ótima 1	104
4.8.2 Separação das misturas teste 1 e 2 1	105
4.8.3 Mistura teste de Engelhardt 1	110
4.8.4 Mistura teste de Tanaka 1	112
4.8.5 Mistura teste de Neue 1	118
4.8.6 Mistura SRM 870 1	121
4.9 Caracterização cromatográfica das FE por CFS 1	122
4.9.1 Seleção dos grupos de solutos1	123
4.9.2 Avaliação estatística do modelo 1	126

4.9.3 Interpretação dos coeficientes	132
4.9.4 Interpretação gráfica dos dados	141
4.10 Avaliação da estabilidade química das FE	143
4.11 Avaliação da aplicabilidade das FE otimizadas	146
4.11.1 Aplicabilidade em CLAE-FR	146
4.11.2 Aplicabilidade em CFS	151
5. Conclusões	165
6. Referências Bibliográficas	167

Lista de Tabelas

Tabela supercrítico	1 .)	Propriedad	les	físicas	de	gás,	líquido	e	fluido 26
Tabela supercrítico	2 . DS	Parâmeti	ros	físico-qu	uímicos	de	algur	IS	fluidos 26
Tabela 3.tempo e terSi-Ti(PMOIobtida por rsãosãorespectivan	Matri mpera DS). A meio s mente	z do plane atura de im A conversão das equaçõ valores	ejamer iobiliza o dos čes: x ₁ reai	nto comp ação das valores re = (T – 1 s de	osto c fases e eais em 00)/20 te	entral p estaciona i valores e $x_2 = (t$ emperatu	ara as c árias Si-Z codificad – 12)/4, ura e	ondiçê Ir(PMC dos po na qua	bes de DDS) e de ser al T e t tempo, 50
Tabela 4. l parâmetros descritas na	Descr 3 de as res	rição das F solvatação spectivas re	E cara . As eferênc	acterizada condiçõe cias	as por s de p	CFS util preparo	lizando o de cada	mode fase	lo dos estão 68
Tabela 5. S solvatação.	Soluto	os utilizados	s na ca	aracteriza	ição pe	elo mode	elo dos pa	arâme	ros de 71
Tabela 6. tempo Zr(PMODS	Matri e)	z do plane temperatu	ejamer ıra	nto comp de	osto c imobiliz	entral p ação	ara as c da	ondiçô fase	ies de Si- 86
Tabela 7 . A coluna pa imobilizada	Anális ra o is terr	se da variâr composto nicamente.	ncia do o naft	o modelo aleno ol	quadrá btidas	tico ajus pelas	tado às e fases Si	eficiêno i-Zr(PN	cias de /IODS) 89
Tabela 8. tempo Ti(PMODS)	Matri e)	z do plane temperatu	ejamer ıra	nto comp de	osto c imobiliz	entral p ação	ara as c da	ondiçô fase	bes de Si- 90
Tabela 9 . Kromasil (otimizadas.	Área (sílica	superficial nua), su	espec uportes	cífica, vol s metaliz	lume e zados	diâmeti e das	ro de po fases e	ros da estacio	sílica nárias 93
Tabela 10, resolução Ti(PMODS) (ec)	. Valo (Rs))	ores de efi obtidos pa antes e	iciência ara as è a	a (N/m), s fases após a	assime estacic a re	etria (As onárias eação	s _{10 %}), re Si-Zr(PM de	tenção ODS) capea	(k) e e Si- imento 107

Tabela 14. Dados obtidos para a mistura teste de Neue antes e após (ec) areação de capeamento......120

Tabela 19. Fator de alargamento (TF) para os cinco benzodiazepínicos:oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila separadospor CFS153

Tabela 20. Fator de alargamento (TF) para os cinco benzodiazepínicos:oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila separadospor CFS.156

Lista de Figuras

Figura 7. Representação esquemática de uma partícula de sílica superficialmente porosa......9

Figura 14. Fórmula estrutural do poli(metiloctadecilsiloxano). A letra m representa o número de unidades do monômero.....20

Figura 17. Cálculo do fator de assimetria......25

Figura 18. Cálculo do fator de do fator de alargamento (TF)......25

Figura corpo fluxo	25 . da	Coluna colun	a croma a, (c)	tográfica manga	e sua com	s cone filtro	exões. (a) retentor	porcas e (d)	terminais redutor	, (b) de 47
Figura capean	nen	26. to	Sistem	a de	ref	luxo	para	а	reação	de 51
Figura colunas	S	27. F	Represe	ntação	do	sister	na de	ench	imento	das 57
Figura teste 1	28 e 2	. Estrut	uras qu	iímicas d	os cor	nposto	s que co	nstituer	n as mist	uras 60
Figura de Eng	29 . elha	Estrutu ardt	ıras quí	micas dos	s comp	oostos	que const	tituem a	a mistura t	este 61
Figura teste de	30 e Ta	. Estrut anaka	uras qu	iímicas d	os cor	nposto	s que co	nstituer	n as mist	uras 62
Figura de Neu	31. e	Estrutu	ıras quíi	micas dos	s comp	ostos	que consi	tituem a	a mistura t	este 64
Figura 870	32.	Estrutu	ıras quíi	micas dos	s comp	ostos	que const	tituem a	a mistura S	SRM 65
Figura utilizan	33 do a	. Estrut a FE Si-	turas qu Zr(PMO	uímicas d DS)	las me	etilxant	inas sepa	aradas	por CLAE	E-FR 75
Figura FR utilii	34 . zan	. Estruti do a FE	uras quí Si-Zr(P	micas do MODS)	s filtro	s UV d	químicos s	separad	los por CL	AE- 76
Figura FE Si-T	35. i(Pl	Estruti MODS)	uras quí	micas dos	s HPA	separa	ados por (CLAE-F	R utilizan	do a 77
Figura FR	36.	Estrutu	ıras quír	nicas dos	s fárma	icos ps	icoativos	separad	dos por CL	.AE- 78
Figura CFS	37	7. Estr	uturas	químicas	dos	benz	odiazepín	icos se	eparados	por 79
Figura	38.	Estrutu	ras quír	nicas dos	barbit	úricos	separados	s por Cl	=S	80
Figura por CF	39. S	Estrutu	iras quír	nicas dos	anti-ir	nflamat	órios não	esteroi	des separa	ados 80
Figura	40.	Estrutu	ras quír	nicas dos	filtros	UV se	parados p	or CFS		81
Figura titaniza	41 . da (Espect	tros de l	FRX dos	suport	es de	sílica zirco	onizada	(a) e de s	sílica 84

Figura 47. Superfície de resposta para a imobilização térmica do PMODS no suporte de sílica titanizada: (A) eficiência e (B) fator de assimetria......92

Figura 49. Curvas TG e DTG obtidas para o PMODS, sob atmosfera oxidante (O_2) (100 mL min⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 10 °C a 980 °C, utilizando-se aproximadamente 10 mg de amostra......95

Figura 50. Curvas TG e DTG obtidas para as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS), sob atmosfera oxidante (O₂) (100 mL min⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 10 °C a 980 °C, utilizando-se aproximadamente 10 mg de amostra. Em (a) FE Si-Zr(PMODS) e (b) Si-Ti(PMODS)......96 **Figura 51**. Curvas TG e DTG obtidas para as FE Si-Zr(PMODS)ec e Si-Ti(PMODS)ec, sob atmosfera oxidante (O_2) (100 mL min⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 10 °C a 980 °C, utilizando-se aproximadamente 10 mg de amostra. Em (a) FE Si-Zr(PMODS)ec e (b) Si-Ti(PMODS)ec......96

Figura 55. Espectros de absorção na região do infravermelho da FE Si-Zr(PMODS), utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m)......99

Figura 56. Espectros de absorção na região do infravermelho da FE Si-Ti(PMODS), utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m)......99

Figura 57. Espectros de absorção na região do infravermelho da FE Si-Zr(PMODS)ec, utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m)......100

Figura 58. Espectros de absorção na região do infravermelho da FE Si-Ti(PMODS)ec, utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m)......100

Figura 72. Cromatogramas obtidos na separação da mistura SRM 870, utilizando as FE Si-Zr(PMODS) (a) e Si-Ti(PMODS) (b). Condições de injeção: cromatográficas: volume 5 μL; fase móvel: metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹ 80:20 (v/v) pH 7,0; vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 23 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) etilbenzeno, (4) quinizarina (3) е (5) tolueno.

Figura 73. Distribuição dos valores dos descritores em relação aos solutos descritos na Tabela 5......124

Figura 74. Correlação entre os descritores E e S para os solutos 1-85 (Tabela 3). Os solutos dentro do círculo compreendem os HPA......125

Figura 77. Distribuição dos valores do coeficiente *e* para as FE estudadas com as suas incertezas (nível de confiança de 95 %)......133

Figura 78. Distribuição dos valores dos coeficientes *e* e sua relação com o tamanho da cadeia alquila (C1 até C18) para as FE estudadas......133

Figura 79. Distribuição dos valores do coeficiente *s* para as FE estudadas com as suas incertezas (nível de confiança de 95 %)......134

Figura 83. Distribuição dos valores do coeficiente *v* para as FE estudadas com as suas incertezas (nível de confiança de 95 %)......137

Figura 84. Cromatogramas obtidos pela separação de uma mistura de alquilbenzenos (n-C₁₁ até n-C₁₅). FM: CO₂ com 10 % de MeOH; temperatura: 25 °C; pressão de saída: 150 bar; vazão: 3 mL/min e detecção: 210 nm. FE: Si(PDMPS); Si(PDMS); Si(PMOS); Si(PMTDS) e Si(PMODS)......138

Figura 93. Teste de estabilidade da FE Si-Zr(PMODS) (a) e Si-Ti(PMODS) (b) em termos do fator de retenção. Fase móvel: metanol: 0,2 % ácido trifluoroacético) (50:50, v/v) pH 1,7, vazão 0,5 mL/min; volume de injeção: 5 μ L; temperatura: 50 °C; detecção: 254 nm; soluto teste: amitriptilina......146

Figura 99. Cromatogramas obtidos na separação de cinco benzodiazepínicos: oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila, por CFS, utilizando as FE Si(PDMPS) (a) e Si-Zr(PDMPS) (b). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min .Volume de injeção: 20 µL; temperatura: °C: pressão 25 deteccão em 210 nm е de saída: 15 MPa......153

Figura 104. Cromatogramas obtidos na separação de seis anti-inflamatórios não esteroides: ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, suprofeno e indoprofeno, por CFS, utilizando as FE SiO₂ (a), KrC18ec (b), Si(PDMS) (c), Si(PMOS) (d), Si(PMTDS) (e) e Si(PMODS) (f). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min .Volume de injeção: 20 µL; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm е pressão de saída: 15 MPa......158

1. Introdução

As técnicas de separação exercem um papel importantíssimo na química analítica, sendo a cromatografia seu principal representante, devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas [1,2]. Nesse sentido, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um importante membro de toda a família, uma vez que consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares, independente da volatilidade e da estabilidade térmica, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e repetibilidade, sendo empregada em diversas áreas de pesquisa, científica ou aplicada, como medicina e farmácia; alimentos; química ambiental; polímeros e forense [1].

A CLAE é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Esse processo de separação normalmente utiliza colunas metálicas, de tamanho reduzido, preenchidas com material finamente pulverizado que oferece grande resistência ao fluxo da fase móvel (FM), chamado de fase estacionária (FE), exigindo o uso de bombas de alta pressão para forçar a passagem da FM através da coluna [2,3]. Desde 2004 [4], estima-se que mais de 85 % das aplicações da CLAE são realizadas em fase reversa (CLAE-FR), que consiste de uma modalidade da CLAE na qual a FE (fase estacionária) apresenta menor polaridade que a FM e atualmente acredita-se que esse percentual seja ainda maior.

A aplicabilidade da CLAE-FR deve-se às suas inúmeras vantagens, entre elas o uso de fases móveis mais simples e de menor custo, por ter água em sua composição; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da FM; boa repetibilidade dos tempos de retenção; possibilidade de eluição por gradiente, resultando em análises mais rápidas; grande variedade de FE disponíveis e vasta faixa de aplicação, devido à possibilidade de separação de compostos de diferentes polaridades, massas molares e grupos funcionais. As pesquisas que buscam o aprimoramento desta técnica referem-se principalmente ao desenvolvimento de novas FE [4,5].

As FE empregadas em CLAE-FR são formadas por uma camada orgânica, majoritariamente apolar, ligada a um suporte cromatográfico pelo
resultado de imobilização, sorção ou reação química. A forma mais usual de preparação é por meio de ligação covalente entre cadeias de carbono (por exemplo, C₈ ou C₁₈), provenientes de reagentes alquilsilanos, e a superfície do suporte cromatográfico. Essas FE são chamadas de fases quimicamente ligadas (FEQL). Outro procedimento de preparação alternativo utiliza a imobilização de polímeros orgânicos pré-sintetizados sobre partículas de sílica.

O aumento da estabilidade química, a redução da alta atividade de grupos polares residuais e a melhora na seletividade das FE têm sido, nas últimas quatro décadas, os principais focos de pesquisas na preparação de fases estacionárias para CLAE-FR. Novas e eficientes estratégias de modificação da superfície da sílica e a introdução de novos materiais como suportes cromatográficos têm minimizado algumas limitações da técnica e possibilitado uma crescente popularização da CLAE-FR e o desenvolvimento de FE que possuam características específicas para um composto ou para uma classe de compostos [6,7], de preferência com maior estabilidade térmica, que permita o seu uso em temperaturas mais elevadas (acima de 60 °C) sem que ocorra a dissolução do material [8,9]. Os parágrafos a seguir trazem uma breve revisão dos procedimentos de preparação de FE modernas, incluindo novos suportes e novos processos de síntese.

1.1 Suportes cromatográficos

Um suporte cromatográfico ideal é aquele que apresenta partículas com baixa distribuição de tamanho, área superficial alta, tamanho de poro adequado para possibilitar fácil transferência de massa, resistente a degradação frente a ataques químicos e estresse mecânico ou físico, além de superfície homogênea, quimicamente modificável [10].

O suporte mais utilizado nas preparações de FE para CLAE-FR é a sílica devido às características desse material como: estabilidade mecânica a altas pressões, facilidade de modificação química, estrutura e propriedades estabelecidas, variedade na forma e nos tamanhos de poro e de partícula e disponibilidade comercial. Porém, a desvantagem associada ao uso da sílica está relacionada à sua instabilidade em meios ácidos ou básicos (fora da faixa de pH entre 2 e 8). Em pH acima de 8 ocorre a dissolução da sílica e o colapso

da FE. Em pH menores que 2 ocorre a hidrólise da ligação siloxano (Si-O-Si-C), com a quebra da ligação entre a fase ligada e o suporte cromatográfico, resultando em uma perda contínua de fase, com subsequente perda de retenção do analito [11-13].

As limitações relacionadas à instabilidade química da sílica proporcionaram a busca por suportes cromatográficos mais estáveis obtidos por modificação da sílica ou o desenvolvimento de novos materiais ou ainda modificação na estrutura das FE, destacando-se as partículas de sílica de alta pureza, as sílicas híbridas, as sílicas monolíticas, sílicas superficialmente porosas, além de partículas de sílica metalizada (óxidos mistos). Óxidos metálicos, nos quais o silício da estrutura do suporte é substituído por outro elemento como zircônio, alumínio ou titânio, também são utilizados como suportes.

1.1.1 Sílicas de alta pureza (tipo B)

A presença de metais na superfície da sílica proporciona o aumento da acidez dos grupos silanóis (=Si-OH) e o alargamento dos picos cromatográficos de compostos básicos, podendo inclusive ocorrer retenção irreversível desses compostos, o que afeta negativamente o desempenho das FE.

A sílica de alta pureza ou tipo B apresenta baixo conteúdo de metais, especialmente Fe e Al (quantidades inferiores a 3 μ g/g) e quantidades de Ti, Zr e Zn não detectáveis por absorção atômica com atomização eletrotérmica por forno de grafite (< 3 μ g/g). O processo de produção baseia-se na obtenção das partículas pelo processo sol-gel a partir do tetraetoxissilano (TEOS) destilado. As partículas são desidratadas a alta temperatura e submetidas a sucessivas lavagens ácidas, seguidas de re-hidroxilação da superfície [6,14].

1.1.2 Sílicas híbridas

As partículas de sílica híbrida apresentam uma porção inorgânica, a sílica, e uma porção orgânica, um organossilano e são interessantes por reunir as características vantajosas dos dois materiais.

A síntese da sílica híbrida ocorre pelo processo sol-gel (PSG). O processo comercial patenteado em 2001 pela Waters Corporation emprega

uma mistura de 2:1 tetraetoxissilano (TEOS) e metiltrietoxissilano (MTEOS) para sintetizar partículas esféricas de sílica híbrida, com tamanho apropriado e porosidade controlada (Figura 1). Nessa reação, durante o PSG, os grupos etóxi dos organossilanos são hidrolisados na presença de um catalisador e, posteriormente, os grupos silanóis originados da hidrólise dos grupos etóxi, em condições adequadas, condensam-se para formar as partículas esféricas de tamanho apropriado e porosidade controlada [15].



Figura 1. Representação da síntese e da estrutura das partículas de sílica híbrida de acordo com processo sol-gel desenvolvido pela Waters Corporation [15].

Os suportes de sílica híbrida apresentam algumas vantagens em relação à sílica cromatográfica convencional por apresentar grupos metilas incorporado na matriz inorgânica, oriundos do reagente MTEOS (Figura 1). A presença dos grupos metila conferem maior hidrofobicidade ao material (um de cada três silanóis com um grupo metil durante a síntese), resultando em uma partícula orgânica-inorgânica híbrida sólida que pode ser utilizada com altas vazões de FM (elevada resistência mecânica), altas temperaturas e principalmente numa faixa mais ampla de pH (pH 1-12) [16]. Essas partículas foram denominadas de partículas híbridas de primeira geração e suas FE, obtidas pela organofuncionalização do suporte híbrido, são comercializadas com o nome de XTerra[®] pela Waters Corporation. Em 2003, foram introduzidas pela Waters Corporation as partículas de sílica híbrida com pontes de etano, denominadas de partículas de sílica híbrida de 2ª geração, que são empregadas nas colunas comercializadas como XBridge[™]. As colunas da XBridge[™] apresentam além das vantagens acima citadas, a maior resistência mecânica que permite a sua utilização em cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) [17]. A Figura 2 mostra as estruturas das partículas de sílica híbrida de 1ª geração e 2ª geração.

Ambos os suportes híbridos são comercializados funcionalizados com diversos grupos, especialmente os utilizados em FR.



(a)



Figura 2. Estruturas das partículas de sílica híbrida: (a) sílica híbrida 1^a geração e (b) sílica híbrida de 2^a geração, ambos com destaque para os grupos orgânicos: ligação silício metil (Si-CH₃) em (a) e a ligação com pontes de etano (Si-CH₂-CH₂-Si) em (b) [6].

Além da Waters Corporation, outras empresas, entre elas Akzo Nobel e Phenomenex, têm aplicado esforços no desenvolvimento de novas tecnologias para produção de sílica híbrida. A Akzo Nobel comercializa a coluna cromatográfica Eternity[™], na qual a estrutura da sílica é modificada com uma camada de organossilano e posteriormente funcionalizada (Figura 3) [18]. A Phenomenex [19], com a tecnologia TWIN[™] (*two in one*), utiliza uma camada de organossilano enxertada na superfície do núcleo de sílica porosa na forma de concha, produzindo as colunas comerciais Gemini[®] (Figura 4). Uma vez que a base de sílica interna permanece inalterada, a partícula mantém a sua resistência mecânica e rigidez, juntamente com excelente eficiência, enquanto que a estrutura na forma de concha protege a partícula de ataque químico, sendo resistentes a faixas de pH 1-12. Uma variação mais recente desse processo, chamada de TWIN-NX[™] produz suportes de 2ª geração com pontes de etano em ligações cruzadas (Figura 5), o que não só proporciona resistência ao ataque de pH elevado, mas também mantém a elevada eficiência e uma resistência mecânica de uma partícula de sílica não híbrida [19], sendo utilizadas em cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).



Figura 3. Representação simplificada da estrutura cromatográfica da coluna cromatográfica EternityTM da Akzo Nobel, onde R refere-se a um ligante tipo C18 ou fenil-hexil. [18].



Figura 4. Representação simplificada da estrutura cromatográfica da coluna cromatográfica Gemini[®] da Phenomenex, onde R refere-se à camada de organossilano [19].



Figura 5. Representação simplificada da estrutura do suporte cromatográfico da coluna cromatográfica Gemini-NX[®] da Phenomenex produzida pela tecnologia TWIN-NXTM [19].

Recentemente foram lançadas no mercado pela Waters Corporation as partículas de superfície híbrida carregada, pela tecnologia chamada CSH[™] *Technology* também chamadas de partículas híbridas de terceira geração, que podem ser empregadas em CLAE (partículas de 3,5 µm ou 5 µm) ou CLUE (partículas de 1,7 µm). Essas partículas são produzidas a partir de três etapas: produção da partícula híbrida de ponte etano "bruta", seguida pela etapa de adição de cargas de nível baixo e reprodutível à superfície da partícula e pela etapa de funcionalização da fase quimicamente ligada (C18, fenil hexil ou fluorfenil) e capeamento, que pode ser apropriada (Figura 6) que podem ser utilizadas com fases móveis entre 1 < pH < 11, com exceção das FE CSH fluoradas que apresentam estabilidade até pH 8 e são comercializadas com os nomes de Acquity UPLC[®] e XSelect[™] CSH. As vantagens oferecidas pelo fabricante para essas colunas cromatográficas incluem excelente formato de pico e elevada eficiência em fases móveis tamponadas e de força iônica baixa.



Figura 6. Representação simplificada das etapas envolvidas no processo de produção das partículas de superfície híbrida carregada, pela tecnologia chamada CSH™ *Technology da Waters Corporation*. [20].

1.1.3 Sílica superficialmente porosa

As partículas com núcleo fundido (do inglês, *Fused Core*) são formadas por sílica e produzidas em duas etapas. A primeira etapa consiste na sinterização da partícula de sílica porosa, em alta temperatura, produzindo um núcleo sólido. Na segunda etapa ocorre o revestimento do núcleo por uma camada de sílica porosa, sendo subsequentemente funcionalizada. A Figura 7 apresenta a representação esquemática de uma partícula de sílica superficialmente porosa [6].

A sílica superficialmente porosa apresenta algumas vantagens como: baixa resistência à transferência de massa, permitindo análises rápidas, sem gerar altas pressões; estabilidade mecânica; competitividade com partículas porosas menores que 2 µm de CLUE, sem a necessidade de utilização de equipamentos especiais, e eficiências superiores em relação as partículas porosas de mesmo tamanho [6].

Empresas como Agilent Technologies (Poroshell), Advanced Materials Technology (Halo[™]), Supelco (Ascentis[™] Express) e Phenomenex (Kinetex[™] Core-Shell) têm se dedicado ao desenvolvimento de novas tecnologias para produção de suportes de sílica superficialmente porosa com: dimensões de

núcleo entre 1,7 até 4,5 μ m; camada porosa entre 0,23 até 0,5 μ m e tamanho de partícula entre 1,7 e 2,7 μ m.



Figura 7. Representação esquemática de uma partícula de sílica superficialmente porosa [6].

1.1.4 Sílica monolítica

A sílica monolítica é um leito contínuo de separação constituído de sílica porosa [21] no formato de um bastão ou haste cilíndrica, que contém uma distribuição de tamanho de poro bimodal, composta por macro (~2 μm) e mesoporos (~13 nm) [6,22], como mostra a Figura 8.



Figura 8. Corte transversal do bastão cilíndrico de sílica monolítica e sua ampliação, mostrando a estrutura com mesoporos e macroporos [6].

As fases monolíticas podem ser descritas como um meio contínuo de separação, que possui uma estrutura sólida e altamente porosa, fornecendo alta permeabilidade e eficiência na sua aplicação [22]. A alta permeabilidade desses materiais permite o uso de vazões de FM elevadas (> 5 mL min⁻¹), sem perdas da eficiência de separação e sem aumento da pressão no sistema cromatográfico, resultando em separações rápidas, devido à alta taxa de transferência de massa. Porém, esta alta permeabilidade diminui a quantidade de amostra que pode ser injetada na coluna cromatográfica em análise. A eficiência das colunas monolíticas é comparável às colunas recheadas com partículas porosas de tamanho 3-5 µm.

A preparação de cilindros monolíticos poliméricos orgânicos é relativamente simples e realizada dentro da própria coluna cromatográfica, convencional ou capilar, através da polimerização *in situ* [10, 22-24]. O preparo de monolitos de sílica dá-se pela adição de tetraetoxissilano (TEOS) ou tetrametóxissilano (TMOS) a uma solução de agente porogênico (PEO) contendo catalisador ácido ou básico. Essa mistura é mantida a 0 °C, sob agitação, e depois transferida para um molde de policarbonato. As condições que possibilitam as reações de hidrólise e policondensação são ajustadas. Ocorre a formação do sol que sofre policondensação e converte-se em gel (Figura 9). O monolito obtido é envelhecido, lavado, seco e encapsulado [25].



Figura 9. Reações químicas que ocorrem durante o processo sol-gel [25].

Após a secagem, é realizado o revestimento do monolito pela transferência do mesmo para um tubo de PEEK (poli(éter-éter-cetona)), que se ajusta ao diâmetro do bastão obtido. A funcionalização do monolito pode ser realizada antes ou após o revestimento [6].

As colunas de sílica monolítica disponíveis no mercado são a Chromolith® fabricada pela Merck e a Onyx[™], fabricada pela Phenomenex. Ambas aplicam a tecnologia de produção obtida pela Merck. Essas colunas são funcionalizadas com grupos alquila octilsilano (C8) e octadecilsilano (C18), com diferentes dimensões.

1.1.5 Suportes de óxidos metálicos

Alguns óxidos metálicos podem ser utilizados como suporte para CLAE-FR. Dentre eles se destacam o uso de alumina, titânia e zircônia e, mais recentemente, os óxidos de cério e tório, devido à duas características: a estabilidade química e a excelente estabilidade térmica desses materiais [6, 26-29].

Devido à existência de sítios ácidos de Lewis na superfície dos óxidos metálicos, pode-se explorar o mecanismo de separação cromatográfica por troca iônica, além do mecanismo de fase reversa, o que propicia o mecanismo de retenção em modo misto, ampliando a faixa de seletividade dessas FE.

A alumina (Al₂O₃) foi primeiramente empregada em separações em FN e, posteriormente, como suporte cromatográfico, sendo modificada por recobrimento polimérico para ser utilizada em separações em FR. Apresenta elevada estabilidade química em uma extensa faixa de pH (1-12). Seu desempenho cromatográfico em fase reversa é inferior quando comparada com a sílica [30].

A titânia (TiO₂) apresenta propriedades e mecanismos de retenção similares à sílica, porém maior estabilidade química. Seu caráter anfótero poderia ser mais bem explorado, visto que a literatura apresenta poucas aplicações utilizando titânia como suporte [6,31]. A ZirChrom[®] comercializa uma coluna de titânia recoberta com polietileno (TiO₂-PE), denominada de Sachtopore[®]-RP. Em sua superfície existem os chamados grupos titanóis ácidos que, como a sílica, também adsorvem compostos básicos [5].

A zircônia (ZrO₂) é o óxido metálico mais estudado e utilizado devido sua elevada estabilidade química (pH 1-14) e térmica (estável até 200 °C), além de sua alta resistência mecânica. A coluna zirconizada mais popular disponível comercialmente é a ZirChrom[®]-PBD (zircônia recoberta com polibutadieno) da ZirChrom[®] [32-33]. Como o suporte de titânia, a zircônia também apresenta sítios ácidos de Lewis, os chamados zirconóis, que produzem picos cromatográficos com elevada assimetria para compostos básicos.

1.1.6 Suportes de óxidos mistos

A dificuldade de obtenção das partículas dos óxidos metálicos com as propriedades requeridas para um suporte cromatográfico, e a dificuldade de modificação química ou a organofuncionalização da sua superfície, devido à carência de grupos livres aptos a interagiram para a formação de ligações, levou ao desenvolvimento paralelo de óxidos mistos [26,27].

Os óxidos mistos são suportes cromatográficos mistos que apresentam na sua estrutura sílica e um óxido metálico e, desta forma, combinam as propriedades vantajosas desses dois materiais, como a alta área superficial, a boa estrutura de poros e a variedade de distribuição de tamanhos de partículas da sílica, com a elevada estabilidade química e térmica dos óxidos metálicos [34]. Assim, se pode obter materiais cromatográficos baseados em sílica com estabilidade química e térmica aumentada.

O LabCrom (Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida do Instituto do Química da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP) vem desenvolvendo diversos estudos nos quais foram preparadas FE baseadas em óxidos mistos, que apresentam maior estabilidade química e térmica, podendose destacar FE baseadas em óxidos mistos de sílica e zircônia e de sílica e titânia recobertas por diferentes polímeros orgânicos, como o polibutadieno (PBD), poli(dimetilsiloxano) (PDMS) e poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) [7]. Óxidos mistos de sílica com zircônia ou com titânia também foram organofuncionalizados quimicamente com C18 e com octadecil com um grupo ureia embutido [7,34-38]. Estas novas FE apresentaram excelente estabilidade química, superior a FE comerciais e bom desempenho cromatográfico para separação de fármacos básicos. Porém, nenhum estudo científico ainda foi descrito empregando suportes de óxidos mistos com recobrimento polimérico de poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS), utilizando o processo de imobilização térmica.

1.2 Fases estacionárias para CLAE-FR

As FE para utilização em CLAE-FR devem apresentar caráter apolar. Uma vez que os óxidos utilizados como suporte apresentam caráter polar, devem-se introduzir grupos orgânicos apolares nas suas superfícies. Existem várias formas de se obterem camadas orgânicas apolares sobre as superfícies dos diferentes óxidos. A mais utilizada comercialmente emprega a organofuncionalização dos suportes, dando origem as fases estacionárias quimicamente ligadas ou, alternativamente, através do processo de recobrimento polimérico com polissiloxanos pré-sintetizados e posterior imobilização, dando origem às fases estacionárias imobilizadas.

1.2.1 Fases estacionárias quimicamente ligadas

A modificação da superfície da sílica e dos óxidos metálicos com a introdução de uma camada quimicamente ligada ao suporte tem como objetivo principal unir, em um só material, as propriedades químicas dos grupos orgânicos com a rigidez e a estabilidade térmica e hidrolítica do óxido inorgânico [5]. Os procedimentos para a formação de uma camada quimicamente ligada sobre a superfície de óxidos utilizam reações de esterificação, cloração seguida por reação com reagente de Grignard ou ainda com compostos organo-lítio, e a organossilanização, que é a mais comum [39].

A organossilanização das fases ligadas ocorre pela reação dos grupos silanóis da sílica com reagentes organossilanos, dando origem a FE com ligações do tipo siloxano (≡Si-O-Si≡). As colunas recheadas com esse material apresentam eficiências altas devido aos rápidos mecanismos de transferência de massa [5].

A Figura 10 mostra os diferentes tipos de agentes silanos: monofuncional, bifuncional ou trifuncional que podem ser empregados no processo de organossilanização da FE. Diferenças estruturais do agente silano irão produzir FE com diferentes características físicas e cromatográficas, assim

como a ausência ou presença de água. Utilizando-se silanos mono, bi ou trifuncionais na ausência de água tem-se as fases monoméricas e silanos bi ou trifuncionais na presença de água geram reações cruzadas que levam à polimerização vertical do modificador e, consequentemente, as fases estacionárias poliméricas [5,39].



Silano monofuncionalSilano bifuncionalSilano trifuncionalFigura 10.Agentes silanos empregados na organossilanização de fases
estacionárias. R = normalmente CH_3 , R' = comumente C8 ou C18, X = grupos

estacionárias. R = normalmente CH₃, R' = comumente C8 ou C18, X = gru metóxi ou etóxi ou cloro [7].

O desempenho cromatográfico das colunas recheadas com fases monoméricas apresentam eficiências mais altas, devido à cinética favorável envolvendo a rápida difusão dentro e fora da camada fina da FE. No entanto, o principal inconveniente desse tipo de FE é a elevada quantidade de silanóis residuais (mais de 50 % dos grupos silanóis da sílica permanecem sem reagirem), o que pode ser explicado pelo impedimento estérico ocasionado pelos agentes silanos volumosos empregados na reação. Esses silanóis residuais não disponíveis para a reação com os agentes silanos acabam tornase suficientemente acessíveis para interagirem com os compostos durante a separação cromatográfica, resultando em aumento da retenção e do alargamento de pico de compostos básicos [40].

Estas reações de funcionalização podem ser realizadas empregando sílica nua ou óxidos mistos [7].

1.2.2 Estratégias de preparo de fases estacionárias

Na tentativa de contornar o problema dos silanóis residuais e também melhorar a estabilidade das FE à base de sílica frente a fases móveis agressivas, novas estratégias têm sido empregadas no preparo das FE modernas, com destaque para as reações de capeamento, as fases

estacionárias estericamente protegidas e as fases estacionárias bidentadas [6,41].

1.2.2.1 Reação de capeamento

Uma maneira interessante de aumentar a estabilidade química das FE em FM alcalinas e, consequentemente, melhorar a simetria do pico cromatográfico de compostos básicos, pela redução dos silanóis residuais ou outros hidróxidos é através da reação de capeamento. O capeamento consiste em uma reação de silanização com um ou mais reagentes organossilanos de tamanho reduzido, geralmente trimetilclorossilano (TMCS) e/ou hexametildissilazano (HMDS), que aumentam o recobrimento do suporte cromatográfico e a sua hidrofobicidade [42] (Figura 11), uma vez que estes grupos tendem a "ocupar os espaços" (grupos –OH) que não reagiram na organossilanização.



Figura 11. Reação de capeamento entre os grupos silanóis residuais e os reagentes trimetilclorossilano (TMCS) e/ou hexametildissilazano (HMDS).

1.2.2.2 Fases estacionárias com polimerização vertical

Estas FE (Figura 12b) são obtidas pela reação de agente silano bi ou trifuncional na presença de traços de água. Apesar da maior estabilidade hidrolítica desta fase, a dificuldade em controlar a reação de entrecruzamento e

a espessura da camada resultante torna o processo pouco reprodutível, sendo raramente formada uma camada uniforme [43-46].

1.2.2.3 Fases estacionárias com polimerização horizontal

O método de preparo deste tipo de FE utiliza monocamadas autoorganizadas de silanos trifuncionais de cadeias longas (C18) e curtas (C1) que são ligadas sobre as partículas de sílica, Figura 12c, melhorando a estabilidade hidrolítica das fases com substancial redução do acesso aos silanóis residuais. Além disso, o processo de obtenção destas fases é altamente reprodutível [47].

1.2.2.4 Fases estacionárias estericamente protegidas

As FE estericamente protegidas são obtidas pela reação de um reagente organossilano contendo o grupo principal (C8 ou C18) na cadeia lateral e dois grupos alquilas volumosos (isopropil ou terc-butil) que restringem o acesso de solutos básicos aos grupos silanóis residuais, também protegendo a ligação siloxano e evitando a quebra entre a fase ligada e o suporte quando são empregadas fases móveis ácidas, como pode ser visualizado na Figura 12d [48,49].

1.2.2.5 Fases estacionárias com grupos polares embutidos

As FE com grupo polar embutido possuem um grupo polar inserido na cadeia alquila geralmente após o terceiro grupo metileno ligado ao átomo de silício do organossilano, Figura 12e [6]. Os grupos polares empregados nestas FE apresentam normalmente átomos de oxigênio e nitrogênio, capazes de estabelecer ligações de hidrogênio, como os grupos carbamato, amida, amina, uréia e éter, deixando estas FE com um caráter mais "básico".

As FE com grupo polar embutido apresentam algumas vantagens como boa repetibilidade e a estabilidade para análises com grande quantidade de água na FM. Contudo, a repetibilidade no parâmetro retenção é inferior para compostos ácidos, básicos e polares quando comparado às colunas convencionais de fase quimicamente ligada [50] (Figura 12e).

A Figura 12 mostra as estruturas esquemáticas das FE citadas anteriormente.



Figura 12. Estruturas esquemáticas de algumas FE: (a) monomérica, (b) polimérica vertical, (c) polimérica horizontal, (d) monomérica estericamente protegida, (e) grupo polar embutido (amida) e (f) bidentada. Todas as FE apresentam grupos C18, com exceção da fase bidentada. Adaptada da referência [41].

1.2.2.6 Fases estacionárias bidentadas

As FE bidentadas são preparadas a partir de silanos bifuncionais, formados por dois átomos de silício ligados entre si por um grupo etil ou propil, Figura 12f, que proporcionam maior restrição de acesso aos silanóis residuais e maior estabilidade química quando empregadas fases móveis com pH superior a 8 [51].

1.2.2.7 Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados

Uma das estratégias de preparo de FE que vem sendo empregada de forma interessante há mais de 20 anos é a que utiliza a imobilização de polímeros orgânicos pré-sintetizados sobre partículas de sílica e sílica metalizada (zirconizada e titanizada).

As FE obtidas a partir de polímeros sorvidos e imobilizados apresentam algumas vantagens quando comparadas com as FE quimicamente ligadas, como melhor proteção dos silanóis residuais (sílica) ou dos ácidos de Lewis (zircônia ou titânia), o que minimiza as interações por troca iônica, do suporte cromatográfico contra o ataque de FM alcalinas; fácil preparação e a possibilidade de maior seletividade da FE pela escolha do polímero apropriado [4,7,27].

O processo de recobrimento polimérico mais empregado consiste na adsorção física de um polímero pré-sintetizado, com composição química bem definida, sobre o suporte cromatográfico [27,52-54]. Outra possibilidade é a utilização de polimerização *in situ* de uma solução de monômeros ou oligômeros iniciada ou propagada na superfície do suporte [55,56], porém a adsorção física oferece maior reprodutibilidade no preparo das FE [49].

A superfície do suporte tem grande influência na sorção dos polímeros. Os grupos reativos superficiais agem como pontos de ancoramento, nos quais os polímeros podem se ligar por meio de ligações covalentes [57-59] ou interagirem mais fracamente [60-63].

A preparação das FE com polímeros imobilizados é uma etapa crítica e contempla a obtenção de materiais com as seguintes propriedades [7,64]:

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

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

O polímero sorvido (Figura 13) pode formar um filme fino na superfície da sílica (Figura 13a) ou preencher o volume do poro (Figura 13b) ou ainda é possível haver uma combinação destas duas possibilidades. Nos dois casos as cadeias poliméricas podem apenas recobrir (por mecanismo de sorção) as paredes dos poros sem entrecruzamento e sem ligar à superfície (representado no lado esquerdo da Figura 13a e 13b), ou pode formar uma camada densamente entrecruzada sem ligação química com a superfície dos poros (parte central) ou então pode se ligar quimicamente às paredes dos poros (representado no lado direito da Figura 13a e 13b) [7,64]. Porém, se a sorção do polímero ao suporte for governada por forças de interação fraca, ele poderá ser facilmente removido durante a passagem da FM. Faz-se necessário, portanto, uma etapa de imobilização posterior à sorção para melhor "ancoramento" do polímero ao suporte, dando uma maior estabilidade à FE [7,64].



Figura 13. Tipos de deposição polimérica nos poros do suporte cromatográfico, recobrimento das paredes dos poros (a) ou preenchimento do volume dos poros (b)[7].

O processo de imobilização do polímero na estrutura do suporte pode ser realizado de várias formas: auto-imobilização [65], tratamento térmico [61,65], radiação gama [66] e radiação micro-onda [60,67-69].

O presente trabalho estudará a utilização de três das alternativas descritas anteriormente para aumentar a estabilidade química das fases estacionárias e reduzir as interações indesejáveis entre alguns analitos e os sítios ativos da superfície da sílica:

- Modificação dos suportes de sílica comercial Kromasil (5 μm) com tetrabutóxido de zircônio (IV) ou tetrabutóxido de titânio (IV).
- Preparo de fases estacionárias a partir da sorção e imobilização por tratamento térmico de um polímero pré-sintetizado sobre as partículas dos suportes metalizados e de sílica nua comercial: poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS).
- ✓ Capeamento das FE após sorção e imobilização do polímero.

O polímero utilizado para produção das FE, poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS), é um polissiloxano de cadeia alquila. A estrutura molecular do PMODS está representada na Figura 14. Sua escolha está baseada na ampla aplicabilidade das FE tipo C18 quimicamente ligadas em CLAE-FR.



Figura 14. Fórmula estrutural do poli(metiloctadecilsiloxano). A letra m representa o número de unidades do monômero.

1.3 Avaliação das colunas cromatográficas

As colunas cromatográficas produzidas serão avaliadas através da análise de parâmetros cromatográficos obtidos a partir de informações extraídas dos cromatogramas obtidos por CLAE-FR e por cromatografia com fluido supercrítico (CFS).

A Figura 15 apresenta um cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes [2].



Figura 15. Cromatograma com as medidas empregadas na determinação dos parâmetros cromatográficos [2].

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

Tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária ou tempo de retardamento da fase móvel (t_M) é o tempo gasto por um composto não retido pela fase estacionária para percorrer o sistema cromatográfico desde a injeção até a chegada no detector.

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

$$t'_{R} = t_{R} - t_{M}$$

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

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

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

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

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

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

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

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

Valores de R_s iguais a 1,00 são suficientes para fins qualitativos, enquanto valores de R_s acima de 1,50 indicam separação dos compostos na linha de base.

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

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

Colunas cromatográficas com diferentes tamanhos podem ser comparadas quando se expressa a eficiência em pratos por metro (N/m).

$$N/m = \frac{N}{L}$$

onde: L = comprimento da coluna, em metros.

Altura de prato (H):

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

$$H = \frac{L}{N}$$

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

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

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

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

$$\mu = \frac{L}{t_M}$$

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

O termo B, da Equação de van Deemter, é a difusão longitudinal relacionado com a difusão molecular do soluto na FM. Pode ser minimizado empregando-se maiores velocidades lineares de fase móvel.

O termo C, da Equação de van Deemter, equivale à transferência de massa e corresponde ao alargamento da banda devido à dificuldade de transferência de massa do soluto entre a FM e a FE. O termo C está subdividido em C_M e C_S , sendo C_M a transferência de massa na FM e C_S , a

transferência de massa na FE. Para minimizar o termo C, o ideal é que a espessura da fase estacionária que recobre o suporte seja a menor possível.

A Figura 16 mostra o gráfico de H vs μ (formato de uma curva), que é conhecida como curva de van Deemter [2]. A curva de van Deemter mostra que existe uma vazão ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ($\mu_{\text{ótima}}$), na qual H terá um valor mínimo e corresponde ao valor máximo de eficiência da coluna. Na prática, esta é a maneira de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica.





A expressão para o cálculo de número de pratos, ou seja, a eficiência, é somente válida para picos simétricos. Para picos assimétricos, deve-se calcular o fator de assimetria (As) do pico a 10 % de sua altura (As₁₀) ou seu fator de alargamento (TF) a 5 % da sua altura.

Fator de assimetria do pico a 10 % da sua altura (As_{10}) e fator de alargamento a 5 % da sua altura (TF):

É uma medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico no sentido horizontal a 10 % da sua altura no caso do fator de assimetria e a 5% da sua altura no caso do fator de alargamento. A literatura indica que As₁₀ deve ter valores de 0,9 a 1,2 [2,3], sendo que valores entre 0,8 e 1,6 são admitidos, porém menos desejáveis. Para TF o valor o deve ser < 2 [70]. Os mesmos valores também se aplicam para TF. A Figura 17 apresenta a forma como é feito o cálculo do fator de assimetria do pico [2].



Figura 17. Cálculo do fator de assimetria.

A Figura 18 apresenta a forma como é feito o cálculo do fator de alargamento (TF):



Figura 18. Cálculo do fator de do fator de alargamento (TF).

1.4 Cromatografia com fluido supercrítico

A cromatografia com fluido supercrítico (CFS) é uma técnica de separação intermediária entre a cromatografia à gás (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) [71] e utiliza como fase móvel um fluido supercrítico.

Quando um composto é confinado em um espaço determinado, gás e líquido estão em equilíbrio entre si. Aquecendo-se o sistema, as propriedades intrínsecas de ambos convergem para um mesmo ponto até serem idênticas (por exemplo, densidade, viscosidade, índice de refração, condutividade térmica, etc.). Este ponto é denominado ponto crítico, e nele acaba-se a

interface gás/líquido, pois a partir deste ponto encontra-se uma única fase supercrítica. Fluido supercrítico é, portanto toda substância que se encontra em condições de pressão e temperatura superiores aos seus parâmetros críticos [72]. Essa região pode ser visualizada no diagrama de fases (Figura 19) [73].

Sob o ponto de vista cromatográfico, as propriedades físico-químicas de um fluido supercrítico são intermediárias àquelas dos gases ou dos líquidos e, muitas vezes, se aproximam às melhores características de cada fase como o alto poder de solvatação de um líquido e a baixa viscosidade de um gás. Além disso, a densidade de um fluido supercrítico é maior que a dos gases (100-1000 vezes) e muito próxima a dos líquidos [72] o que torna extremamente interessante para ser utilizado como FM (Tabela 1). A baixa viscosidade melhora os processos de transferência de massa e a alta difusibilidade e densidade permitem melhor interação molecular com os analitos [74], processo similar ao obtido com a cromatografia líquida com o uso de altas temperaturas [8], mas sem o risco de degradação térmica dos analitos quando se utiliza CO₂ como FM [75] (Tabela 2).

Propriedade Unidade Gás Líquido Fluido supercrítico $10^{-4}/10^{-3}$ Densidade (ρ) g/mL 1 0,2/0,9 $10^{-4}/10^{-3}$ $10^{-2}/l$ cm²/s < 10⁻⁵ Difusibilidade (D) 10⁻⁴ 10^{-2} $10^{-4}/10^{-3}$ Viscosidade (*n*) g/cm.s

 Tabela 1. Propriedades físicas de gás, líquido e fluido supercrítico [72].

 Tabela 2. Parâmetros físico-químicos de alguns fluidos supercriticos.

Fluido	Tc (°C)	Pc (atm)	ρc (g/mL)
Dióxido de carbono (CO ₂)	31,3	72,9	0,47
Óxido nitroso (N ₂ O)	36,5	71,7	0,45
<i>n</i> -Pentano (C ₅ H ₁₂)	196,6	33,3	0,23
Metanol (CH ₃ OH)	240,5	78,9	0,27
Isopropanol (C ₃ H ₇ OH)	235,3	47,0	0,27

Tc: Temperatura crítica; Pc: pressão crítica e pc: densidade crítica.



Figura 19. Diagrama pressão *versus* temperatura e os equilíbrios entre os estados sólido, líquido e gasoso. Definição de região supercrítica para o CO_2 ; Tc: temperatura crítica; Pc: pressão crítica. Pc = 73,8 bar. Temperatura crítica = 304 K (31 °C) e densidade crítica (dc = 0,467 g/mL) [73].

1.4.1 Fases móveis

O dióxido de carbono (CO₂) é a substância mais utilizada como FM, em CFS, uma vez que suas propriedades físico químicas de fluido supercrítico são brandas (Tc e Pc). Além disso, trata-se de um solvente não tóxico e de natureza química não agressiva [76], podendo ser utilizado em uma mistura com modificadores orgânicos como metanol, etanol, *n*-propanol, isopropanol, acetonitrila, tetraidrofurano e n-hexano [77,78], com ou sem o uso de outros de aditivos (ácidos ou bases orgânicos) [79,80], o que não restringe suas aplicações somente a separações em fase normal (FN). O CO₂ pode ser empregado com colunas cromatográficas contendo FE de polaridade variada. A característica não polar do CO₂ permite a solubilização de compostos com características mais hidrofóbicas e a utilização de colunas tipo alquila de fase ligada, as mesmas utilizadas em CLAE-FR. A separação de compostos mais polares, como, produtos farmacêuticos, utilizando FE de caráter mais polar, é uma alternativa à cromatografia líquida por interação hidrofílica (HILIC) [81], como demonstrado por Sandra e colaboradores [82] ao analisarem bases nitrogenadas utilizando FE a base de sílica.

As condições críticas de análise dependem da composição da FM e da natureza do modificador orgânico utilizado. Esses valores normalmente são

aumentados e devem ser adaptados para manter a miscibilidade entre CO₂ e o modificador para evitar separação da FM em duas fases distintas, uma gasosa e a outra líquida [79,83]. Nesse caso, uma alternativa interessante é utilizar temperatura inferior à temperatura crítica, o que caracteriza a utilização de No estado subcrítico condições subcríticas. 0 fluído apresenta compressibilidade reduzida, o que limita a variação de sua densidade entre a entrada e a saída da coluna, devido à queda de pressão, o que determina menor variação de eficiência na coluna cromatográfica. Por outro lado, nenhuma separação de fases foi relatada em condições subcríticas em temperatura mais baixa que a crítica, qualquer que seja a percentagem de modificador utilizado [79].

Quando se trabalha com colunas recheadas em condições subcríticas, a volatilidade dos compostos a serem separados não tem influência na retenção e, como ocorre em CLAE, a retenção é influenciada pela porcentagem do modificador [71,84]. No entanto, é necessário manter a pressão de saída do sistema (*outlet pressure*) elevada e controlar a temperatura e a pressão já que estes parâmetros alteram a retenção cromatográfica.

Nesse contexto, a CFS apresenta comportamento de separação intermediário entre CG e CLAE, como se fosse uma ponte entre essas técnicas (Figura 20) [85].



Figura 20. Descrição esquemática dos três principais tipos de cromatografia: CG, CLAE e CFS e suas variações. Adaptada da referência 80.

1.4.2 Fases estacionárias

A CFS vem se beneficiando substancialmente de inovações na concepção de colunas para CLAE, mesmo que as condições de separação utilizadas sejam geralmente diferentes. A composição da fase móvel e a escolha adequada das FE desempenham papel fundamental na seletividade cromatográfica. Nesse sentido, a utilização crescente de colunas recheadas com FE desenvolvidas para CLAE vem resultando numa gama mais ampla e de intensidade variada de interações intermoleculares com os analitos [86].

Devido ao elevado poder de eluição das FM supercríticas baseadas em dióxido de carbono e modificadores, a vazão utilizada pode ser entre 3 a 5 mL/min e o alto coeficiente de difusão dos compostos nessa FM permite o uso de colunas cromatográficas recheadas mais longas (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 μ m. Por outro lado, colunas recheadas com partículas menores (2 – 3 μ m) ou com particulas superficialmente porosoas também podem ser utilizadas [87].

1.4.3 Instrumentação

1.4.3.1 Sistema de bombeamento e pressurização

Os cromatógrafos com fluido supercrítico (Figura 21) [88] operam em condições de pressão elevada e, por isso, existe a necessidade de um maior cuidado sobre o sistema de bombeamento e pressurização. O sistema ideal para CFS deve ser capaz de suportar altas pressões, apresentar rápida resposta aos comandos de alteração da pressão e manter-se a níveis constantes com baixas flutuações no bombeamento do eluente [89].

Os sistemas de bombeamento mais utilizados são do tipo pistão (recíproco) ou do tipo seringa. O sistema de bombeamento tipo pistão é uma bomba típica de CLAE que opera com dois pistões que comprimem o solvente utilizado como modificador. Se esse sistema for utilizado para bombear o gás é necessário refrigerar a bomba. O sistema de bombeamento por seringa funciona como um pistão único, com aproximadamente 20 mL e é mais indicada para o uso em CFS, pois apresenta vazão mais estável e rápida

resposta a programação e permite a utilização de gases como fluido supercrítico desde que mantidos sob-refrigeração [89].



Figura 21. Diagrama de um cromatógrafo com fluido supercrítico que utiliza colunas recheadas. Adaptada da referência 88.

1.4.3.2 Sistema de injeção

As válulas de amostragem utilizadas em CFS com colunas recheadas são as mesmas utilizadas em CLAE, sendo empregada a válvula de seis portas ou canais [2]. Este injetor apresenta alto desempenho em pressões elevadas e boa reprodutibilidade de amostragem. Para colunas recheadas de 250 x 4,6 mm, o volume de injeção pode ser em torno de 20 µL, dependendo da concentração empregada.

1.4.3.3 Sistema de aquecimento e controle de temperatura

O controle da temperatura em CFS é muito importante, pois a variação da temperatura acarreta variação da densidade do fluido e, consequentemente, influencia na partição, na volatilização dos analitos e na seletividade, especialmente na região próxima ao ponto crítico. Os fornos utilizados atingem temperaturas de até 300 °C e a seleção de temperatura depende do tipo de

fluido utilizado (Tabela 2). Na região próxima ao ponto crítico, o controle da temperatura deve ser o melhor possível para manter a densidade do fluido constante.

1.4.3.4 Sistemas de detecção

Ao contrário da CG, na qual o tipo de detector é dependente da FM utilizada, na CFS a FM, que apresenta um comportamento intermediário entre líquido e gás permite que os sistemas de detecção sejam mais versáteis e, e dessa forma, os detectores utilizados nesses dois modos de separação podem, a princípio, serem utilizados. Isto constitui em mais uma vantagem, ampliando a aplicabilidade da CFS para análise de compostos termicamente instáveis e/ou de elevada massa molar.

Detectores utilizados com FM gasosa como o detector de ionização em chama (DIC), foram inicialmente empregados aproveitando a instrumentação desenvolvida para CG [74], porém sua utilização caiu em desuso, uma vez que não podem ser usados quando são adicionados modificadores orgânicos ou aditivos à FM.

Os detectores de ultravioleta-visível de comprimento de onda variável (UV-Vis) ou por arranjo de diodos (DAD) utilizado em CLAE com FM líquida são os mais utilizados, porém seu uso requer o emprego de células de detecção resistentes à alta pressão nos quais a FM é mantida sob pressão, mas é refrigerada para se tornar um líquido antes da detecção [74,90].

Para a detecção de compostos com baixa absortividade na faixa do UV-Vis, uma alternativa bastante interessante é a utilização dos detectores de espalhamento de luz [91-93] e de índice de refração [94].

Mais recentemente, o detector por espectrometria de massas (EM) vem sendo acoplado aos cromatógrafos com fluido supercrítico, como descritos em várias publicações [80], dentre as quais se destacam as aplicações para caracterização de fármacos, principalmente devido à possibilidade de identificação e confirmação estrutural dos compostos separados [95]. Os sistemas de ionização inicialmente utilizados foram análogos a CG, impacto de elétrons ou ionização química, sendo posteriormente adaptados para utilização dos sistemas de ionização empregados em CLAE, ionização por eletrospray ou

ionização química à pressão atmosférica (do inglês, *atmospheric pressure chemical ionization*, APCI).

1.4.4 Aplicações em CFS

Atualmente, a CFS pode ser considerada como uma poderosa ferramenta de separação de analitos incluindo compostos apolares, polares e ionizáveis [96]. A possibilidade de utilização de colunas recheadas de CLAE permite a separação de compostos quirais por CFS, sendo que a maioria é aplicada à separação de fármacos [97].

A crescente aplicação da CFS na separação de fármacos básicos (pKa entre 7-10) deve-se ao fato de que alguns problemas relativos ao aparecimento de picos assimétricos e desempenho e separação cromatográfica não satisfatória (picos com cauda frontal, divididos e com ombro), além de retenção elevada em fases estacionárias mais polares devido a ocorrência de interações iônicas entre silanóis residuais foram resolvidos com o procedimento de capeamento das FE [96].

Por outro lado, a elevada assimetria de compostos básicos pode ser explicada devido à reatividade do CO₂, uma vez que reage com grupos aminos frequentemente encontrados em fármacos, principalmente fármacos com grupos aminas primárias, ocorrendo à formação de ácido carbâmico. Esse problema foi superado com a utilização de metanol como modificador orgânico, uma vez que a adição desse modificador leva a formação de ácido metilcarbônico [98,99] que atua como "protetor" dos grupos amino dos fármacos básicos [96].

A separação de compostos polares pode ser utilizada quando se aplica o modo gradiente com aumento do modificador polar entre 5 até 50 % em mistura com CO₂. Podem ser separados aminoácidos, sacarídeos, xantinas, triglicerídeos, vitaminas hidrofóbicas e purinas [87] e o uso de outros aditivos adicionados ao modificador (água, acetato de amônio, isopropilamina, ácido acético ou ácido trifluoroacético) permite a separação de proteínas e peptídeos [87].

Para a separação de compostos básicos, a adição de aditivos como ácido trifluoroacético, ácido fórmico ou isopropilamina, geralmente melhora a

simetria de pico [87, 98, 99]. Estes aditivos também podem ser utilizados na separação de compostos quirais, enquanto ácido etanolsulfônico pode ser empregado na separação de compostos ácidos [87].

O uso de fases estacionárias tipo alquila, principalmente ODS (octadecil), quimicamente ligada, permite a separação de compostos que diferem pela presença de grupos metil e metileno, possibilitando a separação de gliceróis, esqualano, ceramidas, clorofilas, carotenóides e esteróides de cadeias carbônicas de séries homólogas [87].

1.4.5 Caracterização de FE utilizando CFS

1.4.5.1 Teste dos Carotenóides

O uso da CFS para caracterização de FE e classificação de colunas cromatográficas é uma ferramenta muito interessante e pode ser aplicada para FE de diferentes polaridades.

Em 1993, Lesellier *et al.* [100] desenvolveram um teste baseado na retenção de carotenóides, utilizando FM supercrítica não aquosa. A utilização de FM sem a adição de água produz separações com alta eficiência. As principais vantagens desse experimento são [41]:

 (i) Melhor caracterização da seletividade estérica, baseada na separacão de isômeros conformacionais (cis e trans-carotenos);

(ii) Interações silanofílicas mais intensas (devido à ausência de água na FM);

(iii) Rápido estabelecimento do equilíbrio entre FM e FE, resultando em análises cromatográficas mais rápidas.

Além das vantagens listadas acima, a utilização do teste de carotenóides permite classificar FE que apresentam leve diferença entre os parâmetros cromatográficos analisados, sem perder a propriedade de diferenciar FE mesmo quando há um grande número de colunas sendo caracterizadas. Essa propriedade é particularmente interessante quando análises quimiométricas exploratórias de dados como Análise de Agrupamentos (*hierarchical cluster*)

analysis) e Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*) são utilizadas [41].

O Teste de Carotenóides, desenvolvido por Lesellier *et al.* [100], utiliza como solutos os carotenóides: 13-cis-β-caroteno, trans-β-caroteno e zeaxantina (Figura 22), a separação cromatográfica com fluído supercrítico, CO₂: metanol, 85:15 (v/v), a 3 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C, detecção a 440 nm e pressão de 15 MPa. As propriedades cromatográficas obtidas são [101,102]:

- <u>Atividade silanofílica (α_{β-trans/zea})</u>: a presença de dois grupos hidroxilas na molécula da zeaxantina nas extremidades cíclicas da molécula permite que sua retenção seja utilizada como um parâmetro para avaliar a atividade silanofílica, uma vez que a presença de silanóis residuais influencia a retenção desse soluto em comparação a retenção do composto trans-β-caroteno.
- <u>Fator de separação estérica (α_{cis/trans})</u>: As diferentes conformações dos carotenos cis e trans são utilizadas para determinar o fator de separação estérica das FE, uma vez que esses compostos têm hidrofobicidade semelhante, porém, os carotenos em conformação cis têm conformação angular e os isômeros trans apresentam conformação linear.
- <u>Hidrofobicidade (k_{β-caroteno})</u>: a hidrofobicidade das FE pode ser determinada pelo fator de retenção do soluto trans-β-caroteno, que apresenta conformação linear e várias duplas ligações conjugadas, o que reflete a densidade da cobertura polimérica das FE.

A Figura 23 mostra um exemplo de cromatograma do teste de carotenóides obtido para uma FE tipo octadecil com fator de separação estérica ($\alpha_{cis/trans}$) de 1,05 e atividade silanofílica ($\alpha_{\beta-trans/zea}$) de 4,9. Esses valores são característicos para FE do tipo monoméricas, nas quais a zeaxantina elui antes do *trans*- β -caroteno e apresenta baixo fator de seletividade estérica.



Figura 22. Estruturas dos solutos utilizados no Teste de Carotenóides: (a) 13cis-β-caroteno, (b) *trans*-β-caroteno; (c) zeaxantina. Adaptada da referência 101.



Figura 23. Cromatograma do teste de carotenóides obtido para uma FE ODS com fator de separação estérica ($\alpha_{cis/trans}$) de 1,05 e atividade silanofílica (α_{β} -trans/zea) de 4,9. Adaptada da referência 102.

1.4.5.2 Modelo dos Parâmetros de Solvatação

O método da relação quantitativa entre estrutura e retenção (do inglês, *quantitative structure-retention relationship*, QSRR) é o mais utilizado para caracterização de FE por CFS. Para obter informações de caracterização a partir desse método é necessário um conjunto suficientemente grande de solutos e com propriedades físico-químicas adequadas que descrevam as propriedades a serem investigadas.

Dentre os QSRR que utilizam os descritores de Abraham *et al.* [103], o modelo dos parâmetros de solvatação é o que merece maior destaque [104,105]. Nesse modelo, a retenção de um grupo específico de solutos pode ser descrita pela equação:

 $\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV$

Nessa equação, as letras maiúsculas representam os descritores dos solutos, relacionados às propriedades de interação específicas, enguanto as letras minúsculas representam as constantes do sistema cromatográfico, relacionadas aos efeitos complementares entre as fases, nas quais ocorrem essa interação. O termo c é o intercepto do modelo, o qual descreve a razão entre os volumes de fase (FM e FE). Segundo a equação do modelo, E é o excesso de refração molar (calculado pelo índice refrativo da molécula) e relacionado às contribuições dos modelos de polarizabilidade de elétrons n e π , S é a polarizabilidade/dipolarizabilidade, A e B são a acidez ou basicidade, respectivamente, relacionadas à capacidade de realizar ligações de hidrogênio, V é o volume característico de McGowan em cm³ mol⁻¹/100 (Figura 24a). As constantes do sistema (e, s, a, b e v), obtidas através da aplicação de uma regressão multilinear dos fatores de retenção dos solutos para os quais os descritores são conhecidos, refletem a magnitude da diferença dessa propriedade estudada entre fase estacionária e fase móvel. A interpretação do sinal agregado aos coeficientes permite inferir se essa interação é mais intensa com a FM, se esse coeficiente for negativo, ou mais intensa com a FE, se esse coeficiente for positivo. Quanto maior seu valor, mais forte é a interação e, consequentemente, reflete a seletividade relativa do sistema para a referida interação molecular estudada [106,107]. Dessa forma, pode-se derivar a equação que descreve o modelo dos parâmetros de solvatação, em termos do fator de separação, sendo a equação descrita por:

$$\log \alpha = e\Delta E + s\Delta S + a\Delta A + b\Delta B + v\Delta V$$

Nessa equação, α é o fator de separação entre dois solutos e ΔX , onde X se refere a E, S, A, B e V e representa a diferença em relação ao descritor X entre os solutos. Consequentemente, os coeficientes *e*, *s*, *a*, *b* e *v* refletem não somente as propriedades de retenção do sistema cromatográfico, mas também a seletividade frente a uma interação molecular específica.



Figura 24. (a) Modelo dos parâmetros de solvatação: interações relacionadas a cada descritor (entre FE e soluto). Adaptada da referência 106; (b) diagrama do "tipo aranha" para o espaço de cinco dimensões representando os coeficientes *e*, *s*, *a*, *b* e *v* para FE utilizadas em CLAE do tipo alquila, fenil (RPH), fluorada (FD) e com grupo polar (PE). Adaptada da referência 108.
A possibilidade do uso do modelo dos parâmetros de solvatação depende da disponibilidade na literatura científica dos valores dos descritores de Abraham. Atualmente os descritores de Abraham podem ser encontrados para cerca de 4.000 compostos e esse número pode ser aumentado através de determinação experimental utilizando dados de retenção de CG e/ou CLAE ou das constantes de equilíbrio solvente-solvente ou cálculos teóricos (para os descritores E e V) ou ainda utilizando algoritmos de programas específicos como o Absolv desenvolvido pela Pharma Algorithms [103,107].

Uma das vantagens de utilização do modelo dos parâmetros de solvatação está relacionada à possibilidade de seu emprego para estudo de sistemas com FE de diferentes polaridades, desde sílica pura ou nua até fases do tipo octadecil (ODS). O modelo já foi utilizado para caracterizar diversos grupos de FE: do tipo ODS, de fase ligada tipo cianopropil sílica, divinilbenzeno-ODS, polidimetilsiloxano e de carbono grafitizado e poroso [107]. No entanto, os trabalhos de West e Lesellier [107-110] recebem maior destaque por caracterizarem uma grande quantidade de FE, com diferentes características, tipo alquila, aromáticas e polares, empregando as mesmas condições cromatográficas, o que permitiu comparar as propriedades das FE e caracterizá-las de forma eficiente, além de estabelecerem novas e interessantes ferramentas de investigação numéricas e gráficas para melhor comparação das FE caracterizadas, na qual se destaca o diagrama do "tipo estrela" ou do "tipo aranha" (do inglês *spider diagram*) (Figura 24b)[108].

Para interpretar e comparar os coeficientes obtidos pelo modelo dos parâmetros de solvatação é interessante utilizar o gráfico tipo aranha. Num gráfico tipo aranha, cada FE é representada por um ponto em forma de bolha e cada bolha é plotada na figura de acordo com os valores normalizados de suas cinco constantes, representando seus cinco coeficientes (e, s, a, b e v). O valor normalizado é obtido dividindo-se o respectivo coeficiente pelo vetor comprimento, ou vetor u [108], definido por:

$$u_i = \sqrt{e_i^2 + s_i^2 + a_i^2 + b_i^2 + v_i^2}$$

A CFS será utilizada para caracterizar as FE obtidas nesse trabalho, bem como algumas das principais FE obtidas em mais de 20 anos de pesquisas no LabCrom, a partir do modelo dos parâmetros de solvatação, a fim de estudar a aplicabilidade do modelo para caracterização de FE obtidas pelo processo de imobilização térmica de polissiloxanos sobre suportes de sílica e sílica metalizada. O modelo dos parâmetros de solvatação avaliará as interações das FE relacionadas com as propriedades das FE, a saber:

- A tendência das FE de interagir com solutos que apresentam pares de elétrons π e n.
- ✓ A tendência das FE de interagir com solutos dipolares e/ou polarizáveis.
- A capacidade da FE interagirem com compostos que apresentam caráter ácido.
- ✓ A capacidade da FE de interagir com solutos básicos por meio de ligações de hidrogênio.
- ✓ A capacidade das FE de interagir com solutos por forças dispersivas.

A aplicabilidade das FE utilizando a CFS será realizada a partir da separação de produtos de interesse da indústria farmacêutica: benzodiazepínicos, barbitúricos, anti-inflamatórios não esteróides e da indústria de cosméticos: filtros ultravioleta (UV).

39

2. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é de preparar novas fases estacionárias (FE) a partir do poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) sorvido e imobilizado termicamente sobre sílica e sílica modificada com zircônio e titânio com eficiência, simetria adequada para separação de compostos básicos e alta estabilidade, principalmente em meio alcalino. Essas características serão investigadas através da realização de testes físicos, químicos e cromatográficos, e avaliação da sua estabilidade química em condições drásticas de fase móvel, bem como através da separação de diferentes misturas de compostos.

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

- Obtenção da sílica zirconizada a partir da reação da sílica nua (Kromasil, 5 μm) com tetrabutóxido de zircônio (IV).
- Caracterização das partículas de sílica modificada com zircônio, empregando métodos físicos e químicos.
- Obtenção da sílica titanizada a partir da reação da sílica nua (Kromasil, 5 μm) com tetrabutóxido de titânio (IV).
- Caracterização das partículas de sílica modificada com titânio, empregando métodos físicos e químicos.
- 5) Preparo das FE empregando o método de evaporação estática do solvente e imobilização por tratamento térmico em estufa do PMODS sobre as partículas de sílica, sílica zirconizada e sílica titanizada.
- 6) Otimização das condições de imobilização das FE através da realização de planejamento composto central do tipo estrela com triplicata do ponto central para as variáveis tempo e temperatura.
- Caracterização físico-química e cromatográfica (utilizando CLAE e CFS) das FE otimizadas anteriormente.
- Avaliação da estabilidade química das FE empregando condições drásticas de fase móvel (pH 1,7 e pH 10 e temperatura de 50 °C).
- Avaliação da aplicabilidade das FE na separação de diferentes classes de compostos utilizando as modalidades de separação por CLAE e CFS.
- 10) Capeamento das FE otimizadas através da reação com a mistura dos reagentes trimetilclorossilano (TMCS) e hexametildissilazano (HMDS).

- 11) Caracterização físico-química e cromatográfica (utilizando CLAE e CFS) das FE capeadas.
- 12) Avaliação da estabilidade química das FE capeadas empregando condições drásticas de fase móvel (pH 1,7 e pH 10 e temperatura de 50 °C).
- Avaliação da aplicabilidade das FE capeadas na separação de diferentes classes de compostos utilizando as modalidades de separação por CLAE e CFS.

3. Parte Experimental

3.1 Reagentes e colunas

- 1,1,1,3,3,3-Hexametildissilazano (HMDS), 97 %, Aldrich
- 4-Metilbenzilideno cânfora, AccuStandard
- Acenafteno, 99 %, Aldrich
- Acetofenona, 99 %, Aldrich
- Antraceno, 96 %, Aldrich
- Ácido 2-fenilbenzimidazol-5sulfônico, 96 %, Aldrich
- Ácido fosfórico, 85 %, Nuclear
- Ácido nitrico, p.a., Synth
- Água deionizada, Milli-Q, Millipore
- Amitriptilina, 99 %, Aldrich
- Benzeno, 99 %, Synth
- Benzilamina, 99 %, Merck
- Benzofenona-3, 98 %, Aldrich
- Benzonitrila, Riedel-de Häen
- Bicarbonato de potássio, 99,7 %, Synth
- Butilbenzeno, 99 %, Aldrich
- Carbonato de potássio, 99 %, Synth
- Cafeína, 98,5 %, Acros Organics
- Clorofórmio, grau HPLC, Tedia
- Coluna C18 Nova-Pak®, Waters, 4 μm, 150 mm x 3,9 mm d.i.
- Diazepam, Medley
- Dióxido de carbono, 99,99%, l'Air Liquide
- Etilbenzeno, 99 %, Aldrich
- Propilbenzeno, 98 %, Aldrich

- Fase estacionária C18 Kromasil®, Akzo Nobel, 5 μm.
- Fenol, 99,5 %, Fluka
- Fluoranteno, 99 %, Aldrich
- Fluoxetina, Medley
- Fosfato de dipotássio dibásico 99
 %, Synth
- Fostato de potássio monobásico anidro, 99 %, Synth
- Hidróxido de sódio, 97 %, Ecibra
- Hidróxido de potássio, 85 %, Merck
- Isopropanol, p.a., Tedia
- Metanol, grau HPLC, Tedia
- N,N-Dimetilanilina, 98 %, Fluka
- n-Hexano, grau HPLC, Tedia
- Naftaleno, 98,5 %, Vetec
- Nortriptilina, 98 %, Aldrich
- Octilmetoxicinamato, AccuStandard
- Octocrileno, 97 %, Aldrich
- o-Terfenila, 99 %, Merck
- Óxido de Titânio, 99,9 %, Aldrich
- Óxido de Zircônio, 99,9 %, Aldrich
- Peneira molecular de 3 Å, Alfa Inorganics Ventron
- Pentilbenzeno, 98 %, Merck
- Tetraidrofurano, grau HPLC, Tedia
- Tolueno p.a., Merck
- Trifenileno, 98 %, Fluka

- Pireno, 98 %, Aldrich
- Quinizarina, 96 %, Aldrich
- Teobromina, 99%, da Acros Organics
- Teofilina, 99 % da Acros Organics
- Tetrabutóxido de titânio, 97 %, Aldrich
- Tetrabutóxido de zircônio, 80 %, Aldrich

3.2 Equipamentos

- Agitador do tipo vórtex, Phoenix, modelo AP56.
- Agitador magnético, Corning GlassWorks, modelo PC-351.
- Agitador rototorque, Cole Parmer, modelo 7637-01.
- Analisador elementar (CHN), Perkin Elmer, modelo 2400.
- Analisador termogravimétrico, TA Instruments, modelo TGA-Hi-Res 2950.
- Balança analítica com precisão de ± 0,0001 g, Fisher Scientific, modelo A-250.
- Banho de ultrassom, Thornton, modelo T14.
- Banho ultratermostatizado, Marconi, MA-184.
- Centrífuga Fisher Scientific, modelo 225.
- Cromatógrafo a fluido supercrítico, sistema modular composto por uma bomba para CO₂ PU-2080 e uma bomba para modificador orgânico PU-2080 Plus HPLC, ambas da Jasco, misturador de FM modelo 811 da Gilson, redutor de pulsação da Sedere, válvula de injeção Rheodyne 7725 com alça de amostragem de 20 µL, forno modelo Jetstream 2 da Hewlett-Packard Plus, detector espectrofotométrico UV/Vis, modelo 151 da Gilson equipado com célula resistente a altas pressões, controlador de pressão de saída modelo BP-2080 da Jasco e programa computacional de aquisição e tratamento de dados Azur, versão 4.6 da Datalys (França).
- Cromatógrafo a líquido Shimadzu, constituído de bomba de alta pressão modelo LC-10AD; detector UV-Vis modelo SPD-10AV; forno de coluna CTO-10AS e injetor Rheodyne, modelo 8125, com alça de amostragem de 5 µL; programa computacional de aquisição e tratamento de dados ChromPerfect

- Trimetilclorossilano (TMCS), 97 %, Aldrich
- Uracila, 98 %, Sigma-Aldrich

Spirit versão 5.5.6, da Justice Laboratory (sistema utilizado em todas as análises cromatográficas por CLAE, exceto nos estudos de estabilidade).

- Cromatógrafo a líquido Shimadzu, constituído de bomba de alta pressão modelo LC-10AD; detector UV-Vis modelo SPD-10A; forno de coluna CTO-10AS; injetor automático Shimadzu, SIL-10AD e um sistema controlador SCL-10A; programa computacional de aquisição e tratamento de dados CLASS-VP, da Shimadzu (sistema cromatográfico utilizado para avaliação da estabilidade das colunas).
- Espectrômetro de absorção na região do infravermelho FT-IR, Bomem MB Series, modelo 3102, utilizado para a análise das amostras em pastilha de KBr.
- Espectrômetro de fluorescência de raios-X de energia dispersiva, Shimadzu, modelo EDX-720, com tubo de Rh e um detector semicondutor de Si(Li).
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear, Bruker ASX 300 Avancell.
- Estufa a vácuo, Yamato, modelo ADP-21.
- Forno de micro-ondas, Milestone, modelo START E.
- Forno tubular, EDG, modelo 10P-S.
- Mandril, Shulz, modelo FSB, para polimento das colunas.
- Microscópio eletrônico de varredura, Jeol JMS 6360-Lv.
- pHmetro, Digimed modelo DM 21.
- pHmetro, Metrohm modelo 827 US.
- Porosímetro, Micrometrics, modelo ASAP 2010.
- Sistema de deionização de água, Milli-Q-Plus, Millipore.
- Sistema de enchimento de colunas composto por uma bomba de alta pressão, pneumática, pressurizada com nitrogênio, para enchimento de colunas, com faixa de pressão de 1000 a 15000 psi, Haskel, modelo 51769.
- Sistema de extração em fluxo contínuo, constituído de bomba de alta pressão, Waters, modelo 510, para extração do excesso de polímero.

3.3 Suportes cromatográficos

Sílica porosa Kromasil[®], da Akzo Nobel, tipo B, forma esférica, tamanho de partícula de 5 μ m, com área superficial específica de 310 m²/g, diâmetro de poro de 11,1 nm e volume de poro de 0,86 mL/g, lote 1959, foi utilizada como

material de partida para as reações de metalização, cujo processo está descrito a seguir.

3.3.1 Preparo dos suportes de sílica zirconizada e titanizada

A síntese dos suportes cromatográficos foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Faria et al. [111,112]. O procedimento baseia-se na reação de alcóxidos metálicos com as partículas de sílica Kromasil de 5 µm. Em tubos de reação foram pesados 2,5 g de sílica, 7,1 g de tetrabutóxido de zircônio ou 5,0 g de tetrabutóxido de titânio. Em seguida, foram adicionados em 20 mL de tolueno anidro (previamente seco com peneira molecular) e os tubos agitados em vórtex por dois minutos. Após, o tubo com a mistura foi deixado por 5 horas e 30 minutos a 40 °C em banho termostático no caso da reação de zirconização e por 4 horas e 30 minutos para a reação de titanização, sendo agitada em vórtex a cada 30 minutos por um minuto. Após o período de reação, a mistura foi centrifugada por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o sólido lavado com cinco porções sucessivas de tolueno anidro para remoção dos resíduos orgânicos. Ao final dessa etapa, o sólido foi seco com nitrogênio gasoso (N_2) por no mínimo 8 horas. Após a secagem, foi realizada a etapa de hidrólise dos grupos alcóxicos residuais com 15 mL de HNO₃ 10⁻³ mol/L. A mistura foi agitada em vórtex por um minuto e centrifugada por 15 minutos. Após, a fase aquosa foi descartada e o sólido lavado com quatro porções de água deionizada e seco em estufa a 120 °C por 12 horas. Para incorporação de uma dupla camada na superfície da sílica, no dia seguinte todo o procedimento de metalização foi repetido.

3.4 Fase estacionária

A fase estacionária empregada foi o polissiloxano poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS), da United Chemical Technologies, CAS [068440-90-4], lote 145-04, viscosidade 600-1000 cSt (25 °C), densidade 0,89 g/mL (25 °C) e massa molar média (Mw) de 28.000. Diferente dos demais polímeros estudados no LabCrom o PMODS encontra-se no estado sólido à temperatura ambiente (25 °C).

46

3.5 Colunas cromatográficas

As colunas utilizadas nesse trabalho foram confeccionadas na oficina mecânica do IQ-UNICAMP, obtidas a partir de tubos de aço inoxidável 316 sem costura, com 3,9 mm de diâmetro interno que foram reduzidos para 60 mm de comprimento. Essas colunas utilizam como acessórios: 2 mangas com filtros retentores, 2 redutores de volume e 2 porcas terminais, que são conectados em cada uma das suas extremidades, de acordo com a Figura 25 [113]. Além destes acessórios, são usados parafusos de vedação, para armazenar a coluna quando esta não está sendo utilizada em análises, evitando-se o ressecamento do leito cromatográfico.



Figura 25. Coluna cromatográfica e suas conexões. (a) porcas terminais, (b) corpo da coluna, (c) manga com filtro retentor e (d) redutor de fluxo [113].

Antes de serem utilizadas, as paredes internas das colunas foram polidas usando pasta de polimento (Carborundum 360F) através da técnica desenvolvida no LabCrom por Collins *et al.* [114]. Esse processo é necessário para garantir que a superfície interna esteja polida, o que possibilita melhor fluidez da FM durante o enchimento das colunas, bem como durante as análises, assegurando uma boa eficiência cromatográfica. A técnica emprega uma haste metálica, de diâmetro menor que o tubo da coluna, recoberta com lã de aço e pasta de polimento contendo partículas abrasivas. A haste é presa a um mandril, e, por ela, o tubo da coluna é passado inúmeras vezes, em movimento de sobe e desce. O processo de polimento foi aplicado até a obtenção de uma superfície interna livre de imperfeições e aparência espelhada. Após o polimento, os tubos foram lavados com detergente e água

para remoção do excesso de pasta de polimento, deixadas em ácido nítrico 50 % (v/v) por 24 horas e lavadas com água e etanol.

3.6 Preparo das fases estacionárias

3.6.1 Identificação das fases estacionárias

Para facilitar a identificação das FE preparadas neste trabalho, abaixo encontra-se a listagem das FE e suas respectivas siglas:

- ✓ Suporte sílica zirconizada e PMODS: Si-Zr(PMODS)
- ✓ Suporte sílica titanizada e PMODS: Si-Ti(PMODS)
- ✓ Suporte sílica zirconizada e PMODS, capeada: Si-Zr(PMODS)ec
- ✓ Suporte sílica titanizada e PMODS, capeada: Si-Ti(PMODS)ec
- ✓ Suporte sílica não modificada (nua) e PMODS: Si(PMODS)
- ✓ Suporte sílica não modificada (nua) e PMODS, capeada:
 Si(PMODS)ec

3.6.2 Sorção do polímero sobre os suportes

A sorção do polímero PMODS à superfície e aos poros dos suportes de sílica nua, zirconizada e titanizada foi realizada utilizando-se o método de evaporação estática do solvente [7]. Para isso, preparou-se, separadamente, uma suspensão de suporte, previamente ativado em estufa a 150 °C por 16 horas, e uma solução do polímero, ambas em *n*-hexano, na proporção de 10 mL de solvente para cada grama de material. A solubilização do polímero foi realizada em banho de ultrassom durante 10 minutos, enquanto a suspensão de sílica foi sonicada pelo mesmo intervalo de tempo. Em seguida, a solução polimérica foi adicionada lentamente à suspensão de sílica, agitada durante 3 horas utilizando agitador magnético e deixada em repouso na capela por 6 dias, para que o solvente evaporasse lentamente e possibilitasse assim a sorção e distribuição do polímero nos suportes. Um excesso de PMODS foi utilizado, uma vez que a carga de polímero, calculada pelo produto de densidade do PMODS (ρ = 0,89 g/mL) e do volume total de poros do suporte (sílica não modificada Vp = 0,86 mL/g, sílica zirconizada Vp = 0,72 mL/g e sílica

titanizada Vp = 0,80 mL/g), X = ρ PMODS x Vp, em que X representa a quantidade mínima de PMODS necessária para preencher todos os poros da sílica. Fazendo-se os cálculos, os valores obtidos foram 44 % (m/m) de PMODS para a sílica não-modificada (nua), 39 % (m/m) para a sílica zirconizada e 42 % (m/m) para sílica titanizada. No entanto foi utilizada a proporção de 1,25 g PMODS/g suporte, o que representa um excesso de polímero du 125 %, evitando, desta forma, problemas futuros devido a perdas do polímero durante o preparo, principalmente durante a etapa de enchimento, visto que pode ocorrer "extração" ou "lixiviação" de grande parte do polímero durante essa etapa, o que prejudica a avaliação por planejamento experimental.

Após a etapa de sorção do PMODS aos suportes, os materiais foram submetidos ao procedimento de imobilização por tratamento térmico utilizando estufa. Esta etapa é utilizada para aumentar a intensidade da interação do polímero com o suporte, reduzindo a sua lixiviação com a passagem contínua de fase móvel sobre o leito cromatográfico.

3.6.3 Imobilização térmica

A otimização do processo de imobilização térmica do PMODS sobre os suportes metalizados foi realizada através da aplicação de planejamento do tipo composto central para as variáveis tempo e temperatura com determinação da superfície de resposta para eficiência de separação (N) e assimetria (As). Porções de 2,5 g da fase sorvida foram colocadas em um béquer de 50 mL e tratadas em estufa de acordo com as diversas condições descritas na Tabela 3. As imobilizações foram realizadas em ar atmosférico em duplicata. Os intervalos de tempo e temperatura foram selecionados a partir da realização de testes univariados e na estabilidade térmica do PMODS até a temperatura de 175 °C, determinada por termogravimetria.

Para realizar a comparação, o mesmo procedimento foi realizado, substituindo o suporte metalizado por sílica nua na temperatura de 120 ° C por 16 horas, dando origem a FE Si(PMODS).

49

Tabela 3. Matriz do planejamento composto central para as condições de tempo e temperatura de imobilização das fases estacionárias Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS). A conversão dos valores reais em valores codificados pode ser obtida por meio das equações: $x_1 = (T - 100)/20 e x_2 = (t - 12)/4$, na qual T e t são os valores reais de temperatura e tempo, respectivamente.

Experimento	Valores reais		Valores codificados		
Experimente	Temperatura (°C)	Tempo (h)	X 1	X ₂	
1	80	8	-1	-1	
2	120	8	+1	-1	
3	80	16	-1	+1	
4	120	16	+1	+1	
5	100	12	0	0	
6	100	12	0	0	
7	100	12	0	0	
8	72	12	-1,4	0	
9	128	12	+1,4	0	
10	100	6,4	0	-1,4	
11	100	17,6	0	+1,4	

3.6.4 Extração do excesso de polímero

Após a etapa de imobilização, nem todo o PMODS adicionado inicialmente foi imobilizado na superfície dos poros da sílica metalizada já que um excesso de polímero foi adicionado. Essa quantidade não imobilizada deve ser removida antes do enchimento da coluna cromatográfica com o intuito de otimizar o procedimento de condicionamento da coluna cromatográfica antes do seu uso, bem como melhorar o seu desempenho através da obtenção de uma camada polimérica mais fina, permitindo maior rapidez na velocidade de transferência de massa do soluto entre a FE e a FM [113]. Para isto, um tubo de aço inox (150 × 10 mm d.i.) contendo o material imobilizado foi colocado dentro de um forno e conectado a uma bomba recíproca de alta pressão de pistão duplo. O solvente *n*-hexano foi escolhido como solvente de extração por solubilizar completamente o PMODS, permitindo assim uma completa remoção do polímero não imobilizado no suporte. Dessa forma, o solvente extrator, *n*-hexano foi bombeado para dentro do tubo a uma vazão de 0,5 mL/min por 4 h, mantendo a temperatura do tubo a 50 °C. Após a extração, a fase foi

transferida do tubo para um béquer e deixada sob um fluxo brando de N₂ até a completa evaporação do solvente. A otimização do procedimento de extração foi realizada medindo-se a massa de polímero presente no eluente de saída do tubo extrator.

3.6.5 Capeamento

A reação de capeamento das FE foi realizada com o intuito de reduzir a quantidade de silanóis residuais e melhor proteger os grupos -OH dos suportes de sílica, sílica zirconizada e sílica titanizada. Em um balão tritubulado de 250 mL foram adicionados 5,0 g de FE previamente seca em estufa a 110 °C, durante 12 h e 100 mL de tolueno anidro (seco com peneira molecular). A este balão foi conectado um condensador de bolas para refluxo do solvente em atmosfera inerte (gás N₂) (Figura 26). Ao balão contendo a solução de FE em tolueno foram adicionados 15 mL de trimetilclorossilano (TMCS) e 35 mL de hexametildissilazano (HMDS). Esta mistura foi mantida sob agitação branda em temperatura de refluxo do tolueno (~ 110 °C) por 48 h. Após este período, a solução foi transferida para um funil de placa porosa nº. 4 para filtração, sob vácuo, do material sólido. Após a eliminação do tolueno, o material foi lavado sequencialmente com 25 mL de tolueno, 25 mL de isopropanol, 25 mL de metanol e 25 mL de metanol:água 1:1 (v/v) para remoção dos resíduos dos reagentes. Em seguida, as FE capeadas: Si-Zr(PMODS)ec e Si-Ti(PMODS)ec e a FE sem metalização: Si(PMODS)ec foram transferidas para béquer de 50 mL e secas em estufa a 110 °C por 6 horas [115].



Figura 26. Sistema de refluxo para a reação de capeamento.

3.7 Caracterização físico-química do PMODS, dos suportes e das FE

O PMODS, os suportes (sílica não modificada, sílica zirconizada e sílica titanizada) e as FE preparadas foram caracterizados de acordo com os procedimentos descritos a seguir.

3.7.1 Espectroscopia de fluorescência de raios X

A quantidade de metal incorporado na sílica foi determinada através da técnica de fluorescência de raios-X, utilizando curvas analíticas para misturas de sílica não modificada, Kromasil (5 μ m) e óxido de zircônio na concentração de 4 até 22 % (m/m) em Zr e óxido de titânio de 5 até 30 % (m/m) em Ti. As concentrações de zircônio e titânio nos padrões e nos suportes foram determinadas a partir da análise de 100 mg de amostra. Para isso, a mistura de padrão e as amostras de suporte foram dispostas em celas Chemplex 1300, sustentadas por filme de Mylar[®] (Chemplex 100) com 2,5 μ m de espessura. As medidas foram feitas em triplicata. A voltagem aplicada no tubo de raios X foi de 50 kV, corrente de 50 μ A, colimador de 10 mm, com 25 % de tempo morto do detector. Os espectros foram obtidos de 0 a 40 keV, no caso dos suportes de sílica zirconizada e 0-12 keV, para os suportes de sílica titanizada, num tempo de irradiação de 300 s.

3.7.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das partículas da sílica não modificada e dos suportes metalizados foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para isso, as partículas de sílica ou sílica metalizada foram fixadas no suporte de amostra por meio de uma fita de dupla face de carbono e, em seguida, recobertas com uma fina camada de ouro. As superfícies, contendo a amostra e o ouro, foram bombardeadas com átomos de argônio, sob alto vácuo, por 120 s, para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. As fotomicrografias das partículas foram obtidas com resoluções de 1.000 até 10.000 vezes.

3.7.3 Análise elementar (determinação da porcentagem de carbono)

A determinação da percentagem de carbono após a etapa de imobilização através da análise elementar foi realizada para avaliar o grau de recobrimento efetivo do suporte cromatográfico com o polímero PMODS. O método empregado utiliza a combustão do material previamente seco com uma mistura oxidante de Pb₂O₄ e NaF, na proporção 1:1 (m/m), na presença de oxigênio, para converter os elementos da amostra em gases (CO₂, H₂O e N₂). Estes gases são homogeneizados e controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume. Após, os gases são despressurizados através de uma coluna, separados e detectados por um detector de condutividade térmica, sendo posteriormente convertidos em percentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio.

O PMODS contém 63,3 % (m/m) de carbono. A porcentagem de carbono obtida por análise elementar foi convertida em porcentagens de PMODS pela equação:

$$\% PMODS = \frac{\% C \times 100}{63,3}$$

As porcentagens de carbono foram então convertidas em massa de polímero (m_{PDMOS}) por grama do suporte (m_{suporte}), denominado de massa específica (\overline{m}_{PMODS}) de acordo com a equação:

$$\overline{m}_{PMODS} = \frac{m_{PMODS}}{m_{suporte}} = \frac{\% C}{63,3-\% C}$$

A partir da massa específica, pode-se estimar o grau do recobrimento de PMODS no suporte de sílica. Para isso, calculou-se a espessura da camada polimérica (τ) depositada na superfície e nas paredes dos poros do suporte cromatográfico, empregando a equação:

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

onde F é a fração de polímero imobilizado e d é o diâmetro médio do poro da sílica. Para tal assume-se que os poros do suporte possuem diâmetros

uniformes e que o polímero imobilizado é caracterizado por uma camada de espessura constante nas paredes dos poros do suporte.

O valor de F foi determinado a partir da equação:

$$F = \frac{\overline{m}_{POL}(MERO)}{\overline{m}_{POL}(MERO)}$$

A massa específica de polímero necessária para encher os poros do suporte, $\overline{m}_{POLIMEROporos\,cheios}$, foi determinada a partir do volume específico de poro da sílica, Vp_{suporte} = 0,86 mL g⁻¹ para a sílica não modificada, Vp_{suporte} = 0,72 mL g⁻¹ para a sílica zirconizada e Vp_{suporte} = 0,80 mL g⁻¹ para a sílica titanizada, e da densidade do polímero, ρ_{PMODS} = 0,89 g mL⁻¹ conforme apresentado na equação:

$$m_{PMODS poroscheios} = V p_{sup \, orte} \times \rho_{PMODS}$$

Portanto, para o suporte de sílica, a \overline{m}_{PMODS} é igual a 1,03 g de PMODS por g de suporte, para a sílica zirconizada \overline{m}_{PMODS} é igual a 0,64 g de PMODS por g de suporte metalizado e para a sílica titanizada \overline{m}_{PMODS} é igual a 0,71 g de PMODS por g de suporte metalizado. Porém, como já comentado anteriormente, foi utilizado um excesso de polímero: 1,25 g PMODS/ g suporte.

3.7.4 Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros

As amostras de suportes e das FE foram submetidas à determinação da área superficial específica, volume e diâmetro de poros. Estas medidas foram realizadas pela adsorção e dessorção de nitrogênio a -195,5 °C. Antes das medidas, as amostras foram desgaseificadas a 100 °C por 24 h sob vácuo. A área superficial específica (S_{BET}) foi calculada de acordo com o método BET [116] a pressões relativas (p/p₀) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p₀ são, respectivamente, as pressões de equilíbrio e pressão de saturação do

nitrogênio a -195,5 °C. O volume total de poro foi determinado empregando o método do ponto único, pela conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poro e da área superficial S_{BET} (4 Vp/S_{BET}) [116].

3.7.5 Termogravimetria

A estabilidade térmica do PMODS, dos suportes e das FE foi determinada por termogravimetria (TG), na qual 10 mg de amostra, em cadinhos de alumina, foi submetida ao aquecimento numa faixa de temperatura de 10 °C até 980 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. As medidas foram realizadas sob atmosfera oxidante em um analisador termogravimétrico, no qual foi determinada a percentagem de perda de massa da amostra com o aumento da temperatura, empregando uma microbalança. As curvas TGA foram obtidas em porcentagem de perda de massa em função da temperatura, e as curvas DTG (derivada termogravimétrica) representam a taxa de variação de massa em função da variação da temperatura, ou seja, a derivada da massa em relação à temperatura (dm/dT).

3.7.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Para avaliar a efetividade do processo de imobilização, os suportes e as FE foram avaliados através da espectroscopia na região do infravermelho de 400 a 4000 cm⁻¹, com uma taxa de amostragem de 20 scans/minuto e resolução de 4 cm⁻¹. Para isso, as amostras foram preparadas na forma de pastilhas, utilizando brometo de potássio (KBr) na concentração de 1 % (m/m).

3.7.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de silício-29 (RMN ²⁹Si)

Os suportes e as FE foram caracterizados por ressonância magnética nuclear do núcleo de ²⁹Si aplicando polarização cruzada com rotação do ângulo mágico. Estas análises foram realizadas com o intuito de avaliar possíveis alterações químicas causadas na superfície do suporte de sílica metalizada após a aplicação dos procedimentos de imobilização do PMODS. Os espectros

de ²⁹Si RMN foram obtidos a partir da utilização de um rotor de $ZrO_2 \text{ com 7} \mu \text{m}$ de diâmetro interno e uma frequência de rotação de 3500 Hz, no qual foram colocadas aproximadamente 300 mg das fases estacionárias. O tempo de contato de polarização cruzada foi de 5 ms e o tempo de intervalo de pulso 1 s. Foram acumulados 1,5 decaimentos livres induzidos (FID – *free induction decay*) com tempo de aquisição de 30 ms em número de pontos de 1 kb, que foram preenchidos até 8 kb, antes da transformada de Fourier. O alargamento da banda utilizado foi de 30 Hz e a largura espectral de aproximadamente 25 kHz.

3.8 Enchimento das colunas cromatográficas

3.8.1. Suspensão da fase estacionária

A suspensão da fase estacionária foi preparada em clorofórmio, devido a elevada densidade desse solvente, o que o torna adequado para essa finalidade, prevenindo a aglomeração de partículas da fase estacionária e a sedimentação das mesmas.

As suspensões utilizadas para fazer o enchimento das colunas foram preparadas em tubos de ensaio com rosca de vedação, utilizando uma concentração de 5 % (m/v) em clorofórmio (0,70 g de FE em 14 mL de clorofórmio). As suspensões ficaram em agitação, num agitador roto-torque, por períodos de no mínimo 12 horas.

3.8.2. Recheio das colunas com a fase estacionária

O sistema utilizado para o recheio das colunas está representado, de forma simplificada, na Figura 27 [117].

Para enchimento das colunas cromatográficas os seguintes processos foram seguidos na ordem em que aparecem:

Abertura da válvula do nitrogênio (2);

 Abertura da válvula de controle da pressão do gás (3) até se obter a pressão desejada para o enchimento (42 MPa ou 6000 psi). A pressurização é obtida por meio de uma bomba pneumática da marca Haskel;



Figura 27. Representação do sistema de enchimento das colunas [117].

 Conexão na parte inferior do reservatório (6) da coluna (7) contendo um filtro retentor poroso e as peças terminais em sua extremidade oposta, para evitar a perda da fase estacionária;

• Transferência, com o auxílio de um funil, da suspensão de fase estacionária (volume total de 14 mL) (5), contida em um tubo com rosca de vedação, para o reservatório, e enchimento do volume restante com clorofórmio e fechamento imediato da entrada superior do reservatório;

 Abertura da válvula do solvente (4) para a passagem de 200 mL do solvente propulsor (metanol previamente filtrado), que é recolhido em uma proveta (8) colocada abaixo da saída da coluna;

• Fechamento da válvula (4) após a passagem de 200 mL de metanol;

 Retirada da coluna do reservatório e conexão na extremidade superior da coluna dos seus acessórios restantes;

 Fechamento, na sequência, das válvulas de controle da pressão do gás (3) e da válvula do nitrogênio (2). A passagem de 200 mL de metanol foi empregada para favorecer o espalhamento da camada polimérica na superfície dos suportes e diminuir o tempo necessário para o condicionamento das colunas cromatográficas.

Para o esvaziamento das colunas, foi utilizado o mesmo sistema, no entanto, aplicada uma pressão de 3000 psi. Para isto, a coluna foi acoplada ao reservatório de suspensão, sem nenhum acessório em suas extremidades, para permitir a saída da fase estacionária contida no seu interior. O reservatório de suspensão foi completado com metanol, a seguir, fechado e a válvula controladora do solvente propulsor (metanol) foi aberta, deixando-a deste modo até a completa retirada da fase da coluna cromatográfica. Logo após, a coluna e seus acessórios foi retirada e lavada sequencialmente com água e detergente e água deionizada e isopropanol, sendo que para esse último solvente, foi utilizado banho de ultrassom por aproximadamente 10 minutos, pata garantir a completa remoção da sílica e a desobstrução dos poros dos filtros.

3.9 Preparo da fase móvel

Os solventes utilizados na preparação de fase móvel foram filtrados em uma membrana Durapore, 0,22 µm de poro, 47 mm de diâmetro, hidrofílica (GVWP04700 – Millipore) para retirada de qualquer material particulado. Os volumes dos solventes que compõem a fase móvel foram medidos individualmente, com o auxílio de uma proveta e, a seguir, misturados em um frasco de vidro. Após a preparação e antes da sua utilização, as fases móveis foram desgaseificadas em banho ultrassom por 20 minutos.

3.10 Condicionamento das colunas cromatográficas

Após a etapa de enchimento é necessário realizar o condicionamento do leito cromatográfico para eliminar qualquer resquício do polímero e/ou solventes utilizados no enchimento. Além disso, essa etapa favorece o rápido equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel, garantindo a repetibilidade nos tempos de retenção dos compostos eluídos. Para realizar o condicionamento das colunas foi usado o próprio cromatógrafo empregado nas caracterizações, somente conectando à coluna a bomba de fase móvel, sem

acoplá-la ao detector, para evitar que qualquer contaminante oriundo da coluna pudesse obstruir a tubulação de entrada ou a saída do detector ou, principalmente, contaminar a cela de detecção. No condicionamento das colunas, após recheio, foi utilizada fase móvel metanol:água, 80:20 (v/v), na vazão de 0,5 mL min⁻¹, durante 3 horas.

3.11 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias

3.11.1 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias por CLAE-FR

A caracterização cromatográfica foi realizada através da avaliação das fases estacionárias, pelas misturas de uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno e de uracila, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno. Além disso, as fases estacionárias cujo processo de imobilização foi otimizado, foram caracterizadas utilizando as misturas teste de Engelhardt e Jungheim [118], Tanaka e colaboradores [119], Neue *et al.* [120,121] e mistura SRM 870 [122], avaliando-se os parâmetros cromatográficos dos compostos eluídos de misturas teste sintéticas. Os parâmetros cromatográficos avaliados foram: eficiência ou N/m (número de pratos por metro de coluna), As₁₀ (fator de assimetria a 10 % da altura do pico), Rs (resolução) e k (fator de retenção).

As análises foram realizadas utilizando o detector UV-visível, em valores de comprimentos de onda adequados para cada composto. O volume de amostra injetado foi de 5 μ L, utilizando a vazão de 0,3 mL min⁻¹, valor ótimo definido pela curva de van Deemter.

As misturas testes e suas respectivas fases móveis utilizadas para a avaliação cromatográfica estão descritas a seguir:

Misturas teste 1 e 2

As misturas teste 1 e 2 foram desenvolvidas no LabCrom e foram injetadas para avaliar a melhor condição de imobilização térmica do PMODS sobre os suportes de sílica metalizada. A mistura-teste 1 foi constituída de compostos neutros de polaridades variadas: uracila (1 mg L⁻¹), benzonitrila (30 mg L⁻¹), benzeno (30 mg L⁻¹), tolueno (30 mg L⁻¹) e naftaleno (30 mg L⁻¹) e foi

empregada para avaliação da eficiência (N/m) e fator de assimetria (As₁₀), que foram escolhidos como respostas a serem otimizadas durante a realização dos planejamentos experimentais para as fases Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS). Adicionalmente, foram avaliados outros parâmetros cromatográficos como resolução (Rs) e hidrofobicidade (medida do fator de retenção, k) das fases estacionárias. A mistura teste 2 foi constituída por compostos ácidos, básicos e neutros: uracila (1 mg L⁻¹), fenol (20 mg L⁻¹), N,N-dimetilanilina (20 mg L⁻¹), naftaleno (30 mg L⁻¹) e acenafteno (50 mg L⁻¹) e foi empregada para avaliação da interação dos analitos, principalmente os de caráter básico, com o suporte cromatográfico. Estas informações foram obtidas pelo tempo de retenção e pela simetria de pico destes compostos. As duas misturas foram preparadas qualitativamente em fase móvel MeOH:H₂O (70:30, v/v) e armazenadas a 4° C em refrigerador. As estruturas químicas dos compostos que constituem as misturas teste 1 e 2 estão apresentadas na Figura 28.



Figura 28. Estruturas químicas dos compostos que constituem as misturas teste 1 e 2.

As fases estacionárias otimizadas através do planejamento experimental, Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS), e suas respectivas fases capeadas foram avaliadas com os seguintes testes descritos na literatura para caracterização de FE por CLAE-FR:

Teste de Engelhardt

A mistura teste desenvolvida por Engelhardt e Jungheim [118] foi composta por uracila (1 mg L⁻¹), anilina (15 mg L⁻¹), fenol (20 mg L⁻¹), N,N-dimetilanilina (20 mg L⁻¹), tolueno (30 mg L⁻¹) e etilbenzeno (30 mg L⁻¹). O teste empregou fase móvel MeOH:H₂O (55:45, v/v) a uma vazão ótima de 0,3 mL min⁻¹, temperatura de análise de 40 °C e detecção a 254 nm. As principais informações fornecidas por este teste são:

• Seletividade hidrofóbica ou seletividade metilênica: propriedade obtida

pela razão entre os fatores de retenção do etilbenzeno e do tolueno ($\alpha_{CH2} = k_{etilbenzeno}/k_{tolueno}$), que diferem entre si por um grupo CH₂. O valor de α_{CH2} fornece informações a respeito da hidrofobicidade das fases estacionárias.

 <u>Atividade silanofílica</u>: medida pelo fator de assimetria do pico da anilina e da N,N-dimetilanilina, mensurados a 10 % de sua altura. Além disso, a razão entre os fatores de assimetria para o pico da anilina e do fenol deve ser inferior a 1,3 [118].

As estruturas químicas dos compostos que constituem as misturas teste de Engelhardt estão apresentadas na Figura 29.



Figura 29. Estruturas químicas dos compostos que constituem a mistura teste de Engelhardt.

Teste de Tanaka

O teste desenvolvido por Tanaka e colaboradores [119] utiliza quatro misturas, sendo que cada uma emprega uma composição de fase móvel específica. As estruturas químicas dos compostos que constituem as misturas teste de Tanaka estão apresentadas na Figura 30. As condições de análise foram vazão de 0,3 mL min⁻¹, na temperatura de 40 °C. A concentração da uracila foi de 10 mg L⁻¹ e a concentração dos demais compostos foi de 20 mg L⁻¹. As misturas e as respectivas fases móveis são:

<u>Mistura A:</u> uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, o-terfenila e trifenileno. Fase móvel: metanol: H_2O , 80:20 (v/v), detecção a 254 nm.

<u>Mistura B:</u> uracila, cafeína e fenol. Fase móvel: MeOH:H₂O (30:70,v/v), detecção a 254 nm.

<u>Mistura C:</u> uracila, benzilamina e fenol. Fase móvel: MeOH:20 mmol L⁻¹ de K_2 HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,6, 30:70 (v/v), detecção a 220 nm.

<u>Mistura D:</u> uracila, benzilamina e fenol. Fase móvel: MeOH:20 mmol L⁻¹ de K_2 HPO₄/H₃PO₄, pH 2,7, 30:70 (v/v), detecção a 220 nm.



Figura 30. Estruturas químicas dos compostos que constituem as misturas teste de Tanaka.

As propriedades das FE avaliadas pelo teste de Tanaka são:

- <u>Hidrofobicidade (kPB)</u>: Medida a partir do fator de retenção do pentilbenzeno que reflete a área superficial e o recobrimento da fase.
- <u>Seletividade hidrofóbica (α_{CH2})</u>: Medida pela razão dos fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno, α_{CH2} = k_{PB}/k_{BB}. Esta é uma medida do recobrimento superficial da fase, pois a seletividade entre alquilbenzenos, diferenciados por um grupo CH₂, é dependente da quantidade de polímero imobilizado.
- <u>Seletividade estérica (α_{T/O})</u>: Medida pela razão entre os fatores de retenção do trifenileno e da *o*-terfenila, α_{T/O} = k_T/k_O. O α_{T/O} é uma medida da seletividade estérica, a qual é influenciada pelo espaçamento dos ligantes e também pela funcionalidade do polímero.
- <u>Seletividade aromática (α_{PB/O})</u> Apesar dessa medida não constar no protocolo sugerido por Tanaka e colaboradores, Horak e Lindner [123] sugeriram que a seletividade aromática pode ser medida pela razão entre os fatores de retenção do pentilbenzeno e da *o*-terfenila, da mistura. A razão fornece uma indicação da capacidade da fase estacionária em realizar interações π-π com compostos aromáticos.
- <u>Capacidade de ligação de hidrogênio (α_{C/F})</u>: Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, α_{C/F} = k_C/k_F. O α_{C/F} é uma medida da quantidade de grupos silanóis disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com os constituintes da amostra.
- <u>Capacidade de troca iônica total (α_{B/F}, pH 7,6)</u>: Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, α_{B/F}, em pH 7,6 = k_B/k_F. O valor obtido é uma estimativa da atividade silanofílica total da FE.
- <u>Capacidade de troca iônica em meio ácido (α_{B/F}, pH 2,7)</u>: Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do

fenol, $\alpha_{B/F}$, em pH 2,7 = k_B/k_F. O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais.

Teste de Neue

A mistura teste desenvolvida por Neue e colaboradores [120,121] constituída por compostos ácidos, básicos e neutros, foi analisada em fase móvel tamponada. A mistura foi composta por uracila, butilparabeno (20 mg/L), dipropilftalato (340 mg/L), naftaleno (60 mg/L), acenafteno (200 mg/L), propranolol (400 mg/L) e amitriptilina (100 mg/L) e foi analisada em FM MeOH:20 mmol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,0, 65:35 (v/v), vazão de 0,3 mL/min, temperatura de 23 °C e detecção a 254 nm. A Figura 31 mostra as estruturas químicas dos compostos constituintes desta mistura.



Dipropilftalato

Figura 31. Estruturas químicas dos compostos que constituem a mistura teste de Neue.

O teste de Neue avalia a capacidade de interação da FE com analitos polares através de interações eletrostáticas obtidas pelas seletividades entre o composto neutro e hidrofóbico, acenafteno, e os compostos polares butilparabeno e dipropilftalato (k_{acenafteno}/k_{butilparabeno} e k_{acenafteno}/k_{dipropilftalato}).

A atividade silanofílica foi avaliada em termos do fator de retenção e do fator de assimetria dos compostos propranolol (pKa = 9,5) e amitriptilina (pKa = 9,4), básicos, que se encontram protonados em pH 7. Com os dados obtidos, pode-se observar se os compostos básicos eluiram com maiores fatores de retenção, devido às fortes interações eletrostáticas com os grupos silanóis desprotonados na superfície da FE.

Teste SRM 870

A mistura teste SRM 870 [122] foi desenvolvida pelo NIST (*National Institute of Standards and Technology*) dos E.U.A. e é composta de uracila, etilbenzeno, tolueno, quinizarina e amitriptilina, na concentração de 20 mg/L, com exceção da uracila que foi de 10 mg/L. A Figura 32 mostra as estruturas químicas dos compostos constituintes da mistura teste SRM 870.



Figura 32. Estruturas químicas dos compostos que constituem a mistura teste SRM 870.

Os parâmetros avaliados pelo teste SRM 870 foram:

• <u>Hidrofobicidade</u>: determinada pelo fator de retenção do etilbenzeno (k_E).

- <u>Atividade frente à quelantes</u>: determinada pelos fatores de assimetria (As_Q) e de alargamento do pico cromatográfico do composto quinizarina (TF_Q).
- <u>Atividade silanofílica</u>: determinada pelos fatores de assimetria (As_{am}) e de alargamento do pico cromatográfico do composto básico amtriptilina (TF_{am}).

A fase móvel utilizada foi MeOH:20 mmol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,0, 80:20 (v/v), vazão de 0,3 mL/min, temperatura de 23 °C e detecção UV-Vis a 254 nm.

3.11.2 Avaliação cromatográfica das fases estacionárias por CFS

Para a realização da caracterização cromatográfica por CFS, utilizando o modelo dos parâmetros de solvatação, desenvolvido por West e Lesellier [106-110], foram utilizadas colunas cromatográficas (250 mm x 4,6 mm d.i.) feitas de aço inox que, foram preenchidas com as FE que foram preparadas seguindo os procedimentos descritos na Tabela 4 e utilizando a mesma metodologia de suspensão à alta pressão. Para efeito de comparação, foi utilizada uma coluna cromatográfica tipo C18, comercial, Kromasil, capeada, da Akzo Nobel, com as mesmas dimensões, uma FE clássica tipo monomérica com tamanho de partícula de 5 µm, 20,1 % de carbono e área superficial específica de 379 m²/g.

Todos os compostos (solutos 1-85 da Tabela 5) foram injetados individualmente. Adicionalmente, foram injetados os solutos 86-100 (Tabela 5), para a caracterização da FE Si(PDMS). Os solutos são compostos aromáticos com diferentes polaridades, grupos funcionais, e configurações espaciais, que foram preparados em MeOH ou MeOH-THF e obtidos de vários fornecedores (todos com pureza superior a 98 %). O teste foi realizado utilizando FM CO₂ com 10 % de MeOH, temperatura de 25 °C (fase móvel subcrítica), vazão de FM de 3 mL/min, detecção a 210 nm e controle de pressão de saída mantido a 15 MPa na temperatura de 60 °C [106-110], com injeção de 1 µL de amostra. As regressões lineares e os cálculos estatísticos relacionados à caracterização

das FE por CFS foram realizadas utilizando o programa XLStat 7.5 da Addinsoft.

Os fatores de retenção (k) foram calculados baseados no tempo de retenção dos compostos (t_R), determinados pelo máximo de cada pico. Foi estabelecido como t_M o tempo de retenção do pico correspondente ao metanol, medido pelo primeiro pico negativo obtido devido a diluição do solvente e o fator de alargamento a partir da equação mostrada na Figura 18.

Tabela 4. Descrição das FE caracterizadas por CFS utilizando o modelo dos parâmetros de solvatação. As condições de preparo de cada fase estão descritas nas suas respectivas referências.

FE	Símbolo	Descrição	Preparação	Caracterização	Ref.
SiO ₂	Si	Sílica não modificada	-	S _{BET} : 303 m ² g ⁻¹ V _p : 0,86 cm ³ g ⁻¹ D _p : 11,2 nm	124
Si(PDMS)	C1	Suporte de silica e poli(dimetilsiloxano)	Imobilização térmica em ar atmosférico	S _{BET} : 227 m ² g ⁻¹ V _p : 0,69 cm ³ g ⁻¹ D _p : 9,8 nm % C: 10,6 %	125
Si(PMOS)	C8	Suporte de silica e poli(metiloctilsiloxano)	Imobilização térmica em atmosfera de N ₂	S _{BET} : 158 m ² g ⁻¹ V _p : 0,48 cm ³ g ⁻¹ D _p : 9,9 nm % C: 16,2 %	126
Si(PMTDS)	C14	Suporte de silica e poli(metiltetradecilsiloxano)	Imobilização térmica em atmosfera de N ₂	S _{BET} : 196 m ² g ⁻¹ V _p : 0,63 cm ³ g ⁻¹ D _p : 9,8 nm % C: 11,3 %	127
Si(PMODS)	C18	Suporte de sílica e poli(metiloctadecilsiloxano)	Imobilização térmica em ar atmosférico	S _{BET} : 146 m ² g ⁻¹ V _p : 0,10 cm ³ g ⁻¹ D _p : 8,8 nm % C: 22,5%	128
Si(PMODS)ec	C18ec	Suporte de sílica e poli(metiloctadecilsiloxano)	Imobilização térmica em ar atmosférico e reação de capeamento	S _{BET} : 146 m ² g ⁻¹ V _p : 0,16 cm ³ g ⁻¹ D _p : 21,8 nm % C: 23,9 %	129
Si(PMODS/PDMS)	C18/C1	Suporte de silica e poli(metiloctilsiloxano)/ poli(dimetilsiloxano)	Imobilização térmica em atmosfera de N ₂	S _{BET} : 235 m ² g ⁻¹ V _p : 0,6cm ³ g ⁻¹ D _p : 6,0 nm % C: 15,0 %	128

Tabela 4 (cont	tinuação)				
Si(PDMPS)	PHE	Suporte de silica e poli(dimetil-co-metilfenilsiloxano)	Imobilização térmica em ar atmosférico	S _{BET} : 194 m ² g ⁻¹ V _p : 0,53 cm3 g ⁻¹ D _p : 8,7 nm % C: 11,2 %	117
SiO ₂ -Ti	Si-Ti	Sílica modificada com titânio	Metalização com tetrabutóxido de titânio	S _{BET} : 186 m ² g ⁻¹ V _p : 0,49 cm ³ g ⁻¹ D _p : 8,4 nm % Ti: 7,6	130
Si-Ti(PMTDS)	Ti-C14	Suporte de sílica titanizada e poli(metiltetradecilsiloxano)	Imobilização térmica em atmosfera de N ₂	S _{BET} : 186 m ² g ⁻¹ V _p : 0,49 cm ³ g ⁻¹ D _p : 8,4 nm % C: 9,9 %	131
Si-Ti(PMODS)	Ti-C18	Suporte de sílica titanizada e poli(metiloctadecilsiloxano)	Imobilização térmica em ar atmosférico	S _{BET} : 50 m ² g ⁻¹ V _p : 0,13 cm ³ g ⁻¹ P _d : 10,4 nm % C: 23,5%	130
Si-Ti(PMODS)ec	Ti-C18ec	Suporte de sílica titanizada e poli(metiloctadecilsiloxano)	Imobilização térmica em ar atmosférico e reação de capeamento	S _{BET} : 46 m ² g ⁻¹ V _p : 0,11 cm ³ g ⁻¹ D _p : 9,8 nm % C: 24,9 %	129
SiO ₂ -Zr	Si-Zr	Sílica modificada com zircônio	Metalização com tetrabutóxido de zircônio	S _{BET} : 333 m ² g ⁻¹ V _p : 0,72 cm ³ g ⁻¹ D _p : 8,6 nm % Zr: 21,5	124
Si-Zr(PMTDS)	Zr-C14	Suporte de silica zirconizada e poli(metiltetradecilsiloxano)	Imobilização térmica em atmosfera de N ₂	S _{BET} : 166 m ² g ⁻¹ V _p : 0,36 cm ³ g ⁻¹ D _p : 6,1 nm % C: 12,4 %	132
Si-Zr(PMODS)	Zr-C18	Suporte de silica zirconizada e poli(metiloctadecilsiloxano)	Imobilização térmica em ar atmosférico	S _{BET} : 119 m ² g ⁻¹ V _p : 0,29 cm ³ g ⁻¹ D _p : 4,9 nm % C: 19,8 %	123

Tabela 4 (cont	inuação)				
Si-Zr(PMODS)ec	Zr-C18ec	Suporte de silica zirconizada e poli(metiloctadecilsiloxano)	Imobilização térmica em ar atmosférico e reação de capeamento	S _{BET} : 84 m ² g ⁻¹ V _p : 0,20 cm ³ g ⁻¹ D _p : 9,44 nm % C: 21,3%	129
Si-Zr(PDMPS)	Zr-PHE	Suporte de sílica zirconizada e poli(dimetil-co-metilfenilsiloxano)	Imobilização térmica em ar atmosférico	S _{BET} : 172 m ² g ⁻¹ V _p : 0,38 cm3 g-1 D _p : 10,9 nm % C: 10,0 %	117
Si-Zr(ODS)ec	C18ecA	Sílica zirconizada e funcionalizada com octadeciltrimetoxisilano	Silanização do suporte de silica zirconizada com C18 trifuncionalizado e reação de capeamento	S _{BET} : 120 m ² g ⁻¹ V _p : 0,29 cm ³ g ⁻¹ D _p : 4,8 nm % C: 18,5 %	133

Legenda: S_{BET}: Área superficial específica; V_p: volume de poro; D_p: diâmetro de poro; % C: percentagem de carbono. A reação de capeamento foi realizada utilizando um mistura de TMCS e HMDS.

Número	Composto	E	S	Α	В	V
1	Tolueno	0,601	0,52	0,00	0,14	0,8573
2	Etilbenzeno	0,613	0,51	0,00	0,15	0,9982
3	n-Propilbenzeno	0,604	0,50	0,00	0,15	1,1391
4	n-Butilbenzeno	0,600	0,51	0,00	0,15	1,2800
5	n-Pentilbenzeno	0,594	0,51	0,00	0,15	1,4209
6	n-Hexilbenzeno	0,591	0,50	0,00	0,15	1,5620
7	n-Heptilbenzeno	0,577	0,48	0,00	0,15	1,7029
8	n-Octilbenzeno	0,579	0,48	0,00	0,15	1,8438
9	n-Nonilbenzeno	0,578	0,48	0,00	0,15	1,9847
10	n-Decilbenzeno	0,579	0,47	0,00	0,15	2,1256
11	n-Undecilbenzeno	0,579	0,47	0,00	0,15	2,2665
12	n-Dodecilbenzeno	0,571	0,47	0,00	0,15	2,4074
13	n-Tridecilbenzeno	0,570	0,47	0,00	0,15	2,5483
14	n-Tetradecilbenzeno	0,570	0,47	0,00	0,15	2,6892
15	Alilbenzeno	0,717	0,60	0,00	0,22	1,0961
16	t-Butilbenzeno	0,614	0,49	0,00	0,16	1,28
17	Cafeína	1,500	1,60	0,00	1,35	1,3630
18	Indazol	1,180	1,25	0,54	0,34	0,9050
19	Carbazol	1,787	1,42	0,47	0,26	1,3150
20	Anisol	0,708	0,75	0,00	0,29	0,9160
21	1-Feniletanol	0,784	0,83	0,30	0,66	1,0570
22	Alcool benzílico	0,803	0,87	0,39	0,56	0,9160
23	Benzaldeído	0,820	1,00	0,00	0,39	0,8730
24	Acetofenona	0,818	1,01	0,00	0,48	1,0139
25	Propiofenona	0,804	0,85	0,00	0,51	1,1548
26	Valerofenona	0,795	0,95	0,00	0,50	1,4366
27	Coumarina	1,060	1,79	0,00	0,46	1,0620
28	Benzonitrila	0,742	1,11	0,00	0,33	0,8711
29	Nitrobenzeno	0,871	1,11	0,00	0,28	0,8906
30	Clorobenzeno	0,718	0,65	0,00	0,07	0,8288
31	Bromobenzeno	0,882	0,73	0,00	0,09	0,8910
32	lodobenzeno	1,188	0,82	0,00	0,12	0,9750
33	Fenol	0,805	0,89	0,60	0,30	0,7751
34	Eugenol	0,946	0,99	0,22	0,51	1,3540
35	Vanilina	1,040	1,04	0,32	0,67	1,1313
36	o-Xileno	0,663	0,56	0,00	0,16	0,9980
37	m-Xileno	0,623	0,52	0,00	0,16	0,9980
38	p-Xileno	0,613	0,52	0,00	0,16	0,9980
39	o-Cresol	0,840	0,86	0,52	0,30	0,9160
40	m-Cresol	0,822	0,88	0,57	0,34	0,9160
41	p-Cresol	0,820	0,87	0,57	0,31	0,9160
42		0,853	0,88	0,32	0,31	0,8975
43	m-Clorotenol	0,909	1,06	0,69	0,15	0,8975
44	p-Ciorotenol	0,915	1,08	0,67	0,20	0,8975
45		1,045	1,05	0,05	0,37	0,9490
46	m- Nitrotenol	1,050	1,57	0,79	0,23	0,9490

 Tabela 5.
 Solutos utilizados na caracterização pelo modelo dos parâmetros de solvatação [106, 109, 110].

Tabela 5 (continuação)

abela j	(Continuação)					
47	p- Nitrofenol	1,070	1,72	0,82	0,26	0,9490
48	o-Nitrobenzilálcool	1,059	1,11	0,45	0,65	1,0900
49	m- Nitrobenzilálcool	1,064	1,35	0,44	0,64	1,0900
50	p- Nitrobenzilálcool	1,064	1,39	0,44	0,62	1,0900
51	o-Nitrotolueno	0,866	1,11	0,00	0,28	1,0320
52	m-Nitrotolueno	0,874	1,10	0,00	0,25	1,0320
53	p-Nitrotolueno	0,870	1,11	0,00	0,28	1,0320
54	Benzoato de metila	0,733	0,85	0,00	0,48	1,0726
55	Benzoato de etila	0,689	0,85	0,00	0,46	1,2140
56	Benzoato de propila	0,675	0,80	0,00	0,46	1,3540
57	Benzoato de butila	0,668	0,80	0,00	0,46	1,4953
58	Benzoato de benzila	1,264	1,42	0,00	0,51	1,6804
59	Dimetilftalato	0,780	1,41	0,00	0,88	1,4290
60	Dietilftalato	0,729	1,40	0,00	0,88	1,7110
61	Dipropilftalato	0,713	1,40	0,00	0,86	1,9924
62	Dibutilftalato	0,700	1,40	0,00	0,86	2,2700
63	Naftaleno	1,340	0,92	0,00	0,20	1,0854
64	1-Metilnaftaleno	1,344	0,90	0,00	0,20	1,2260
65	2-Metilnaftaleno	1,304	0,92	0,00	0,20	1,2260
66	2-Etilnaftaleno	1,371	0,87	0,00	0,20	1,3670
67	Bifenila	1,360	0,99	0,00	0,26	1,3242
68	1-Fenilnaftaleno	1,910	1,08	0,00	0,30	1,6932
69	Benzofenona	1,447	1,50	0,00	0,50	1,4810
70	Acenafteno	1,604	1,05	0,00	0,22	1,1726
71	Acenaftileno	1,750	1,14	0,00	0,26	1,2156
72	Fluoreno	1,588	1,03	0,00	0,20	1,3570
73	Fenantreno	2,055	1,29	0,00	0,26	1,4540
74	Antraceno	2,290	1,34	0,00	0,26	1,4540
75	9-Metilantraceno	2,290	1.30	0,00	0,26	1,5950
76	Fluoranteno	2,377	1,53	0,00	0,20	1,5850
77	Pireno	2,808	1,71	0,00	0,29	1,5850
78	Criseno	3,027	1,73	0,00	0,36	1,8230
79	Benzo[a]pireno	3,625	1,98	0,00	0,44	1,9536
80	Perileno	3,256	1,76	0,00	0,42	1,9536
81	Binaftil	2,820	1.81	0,00	0,31	2,0622
82	Trifenileno	3,000	1,71	0,00	0,42	1,8234
83	o-Terfenil	2,194	1.61	0,00	0,38	1,9320
84	p-Terfenil	2,194	1.61	0,00	0,38	1,9320
85	Trifenileno	3,000	1,71	0,00	0,42	1,8234
86	2-Etilnaftaleno	1,331	0.87	0,00	0,20	1,3670
87	Naftilamina	1,670	1,26	0,20	0,57	1,1850
88	Ácido 1-naftóico	1,200	1,27	0,52	0,48	1,3007
89	Ácido 1-naftilacético	1,300	1,35	0,54	0,40	1,3007
90	Naftaleno metanol	1,640	1,19	0,27	0,64	1,2850
91	Naftaleno etanol	1,670	1,21	0,23	0,72	1,4259
92	Naftilaldeído	1,470	1.19	0.00	0.47	1,2420
93	Naftilacetato	1,130	1,25	0,00	0,62	1,4416
94	Cianonaftaleno	1,190	1,25	0,00	0,41	1,2401

Tabela s	5 (continuaçao)					
95	Naftilacetonitrila	1,430	1,44	0,00	0,53	1,3810
96	Nitronaftaleno	1,600	1,51	0,00	0,29	1,2596
97	Fluoronaftaleno	1,320	0,82	0,00	0,18	1,1030
98	Cloronaftaleno	1,540	0,92	0,00	0,15	1,2078
99	Bromonaftaleno	1,670	0,97	0,00	0,17	1,2604
100	Iodonaftaleno	1,840	1,04	0,00	0,20	1,3436

3.12 Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias

As condições de análise empregadas para os testes de estabilidade utilizaram FM que aceleram o processo de deterioração e colapso da coluna, possibilitando avaliações mais rápidas e com menor gasto de fase móvel.

3.12.1 Estabilidade em meio alcalino

A estabilidade química das fases estacionárias Si-Zr(PMODS), Si-Ti(PMODS), Si(PMODS), Si-Zr(PMODS)ec e Si-Ti(PMODS)ec, preparadas nas condições ótimas de imobilização, foram avaliadas utilizando condições drásticas de análise: fase móvel alcalina, metanol:0,050 mol/L K₂CO₃/KHCO₃, pH 10 (70:30, v/v) a 0,5 mL/min e temperatura de 50 °C [60,132], monitorando os parâmetros cromatográficos: eficiência, fator de assimetria calculado a 10 % da altura do pico e fator de retenção para o composto acenafteno. O pH do componente aquoso da fase móvel foi ajustado com uma solução de KOH diluída antes de ser misturado ao componente orgânico. A estabilidade de cada fase estacionária foi determinada em função do número de volumes de colunas eluídos através de cada coluna cromatográfica. O volume de coluna, os quais não são ocupados pelo recheio cromatográfico (V_c). O volume de coluna foi calculado a partir do t_M (t_R da uracila) e da vazão da fase móvel, conforme a Equação:

$$V_c = f \times t_M$$

na qual *f* é a vazão da fase móvel e t_M é o tempo de retenção do composto não retido (uracila).
3.12.2 Estabilidade em meio ácido

O teste de estabilidade em meio ácido (pH 1,7) foi realizado utilizando como fase móvel metanol:0,2 % de ácido trifluoroacético (50:50, v/v). A vazão utilizada foi de 0,5 mL/min e a temperatura foi de 50 °C. Para isso, a coluna foi periodicamente testada para a separação de uma mistura de etilbenzeno, quinizarina e amitriptilina. O cálculo de V_c foi realizado utilizando o mesmo procedimento descrito no teste de estabilidade em meio alcalino.

3.13 Avaliação da aplicabilidade das FE otimizadas

3.13.1 Aplicabilidade em CLAE-FR

O potencial de aplicação das FE capeadas e não capeadas foi avaliado na separação de misturas contendo fármacos de efeito psicotrópico, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), xantinas e filtros ultravioleta (UV), utilizando modos de eluição isocrático ou por gradiente, com ou sem tamponamento da FM. Para efeito de comparação foi utilizada uma coluna cromatográfica comercial tipo C18 de fase ligada e capeada, Nova-Pak da marca Waters (150 mm \times 3,9 mm), com tamanho de partícula de 4 µm, 7 % de carbono e área superficial específica de 120 m²/g [124, 129 e 131].

Separação de xantinas

Compostos pertencentes à classe das metilxantinas, como a cafeína, teobromina e teofilina são alcalóides com alto poder de estimular o sistema nervoso central (SNC). A cafeína está presente em vários medicamentos analgésicos e em diversas bebidas (chá, café, energético, etc.), devido ao seu poder estimulante. A teobromina pode ser encontrada no cacau e chocolate, sendo também empregada como vasodilatador. A teofilina é utilizada em formulações farmacêuticas para tratamento de doenças respiratórias. Essas metilxantinas são consideradas de difícil separação e muitas vezes a etapa de seleção de uma coluna cromatográfica com seletividade adequada para separação por CLAE-FR pode ser uma tarefa problemática [134].

A fase Si-Zr(PMODS) imobilizada termicamente a 120 °C por 16 h (FE otimizada) foi utilizada para separar uma mistura de cafeína, teobromina e teofilina, na concentração de 16,0 mg/L cujas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 33. A separação foi realizada utilizando o modo gradiente (solvente A: água e solvente B: MeOH:H₂O (70:30,v/v), sendo que a composição do solvente B variou de 30 % até 70 % com vazão de 0,3 mL/min, temperatura de 30 °C, detecção UV a 275 nm, com injeção de 5 μ L. Para efeito de comparação, esta mistura de metilxantinas também foi separada em uma coluna comercial de 150 \times 3,9 mm de d.i. recheada com uma fase comercial, Nova-Pak[®], com partículas de 4 μ m, empregando as mesmas condições de análises utilizadas na coluna de Si- Zr(PMODS), com exceção da vazão empregada, que foi de 1,0 mL/min.



Figura 33. Estruturas químicas das metilxantinas separadas por CLAE-FR utilizando a FE Si-Zr(PMODS).

Separação de filtros ultravioleta (UV)

Filtros solares são compostos químicos adicionados às formulações cosméticas como protetores solares, cremes, loções, etc., com a função de absorver, espalhar e/ou refletir a radiação UV solar nociva à pele [135]. Os filtros químicos ou orgânicos apresentam na sua estrutura anéis aromáticos conjugados, com um grupo doador de elétrons na posição "orto" ou "para" à um grupo receptor de elétrons e a separação por CLAE-FR é a mais utilizada [136].

A fase zirconizada, Si-Zr(PMODS), imobilizada termicamente a 120 °C por 16 h (FE otimizada) foi utilizada para separar uma mistura contendo cinco filtros UV químicos: ácido fenilbenzimidazol sulfônico (ácido 2-fenilbenzimidazol-5sulfônico), benzofenona-3 (2-hidroxi-4-metoxibenzofenona), 4-metilbenzilideno cânfora (3-(4-metilbenzilideno) cânfora), octocrileno (2-ciano-3,3-difenilacrilato de 2-etilexila) e metoxicinamato de octila (4-metoxicinamato de 2-etilexila) que são os filtros UV mais utilizados comercialmente, na concentração de 10,0 mg/L. As suas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 34. A separação foi realizada utilizando o modo isocrático de eluição, com FM MeOH:H₂O (80:20,v/v), vazão de 0,3 mL/min, temperatura de 25 °C, detecção UV a 288 nm, e volume de injeção de 5 μ L. Para efeito de comparação, esta mistura de filtros UV foi separada em uma coluna comercial de 150 \times 3,9 mm de d.i. recheada com uma fase comercial, Nova-Pak®, com partículas de 4 μ m, empregando as mesmas condições de análises utilizadas na coluna de Si-Zr(PMODS), com exceção da vazão empregada que foi de 1,0 mL/min.



Figura 34. Estruturas químicas dos filtros UV químicos separados por CLAE-FR utilizando a FE Si-Zr(PMODS).

Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e seus derivados são gerados pela combustão incompleta de material orgânico de fontes naturais ou oriundas de atividades antropogênicas. Nas últimas décadas, os HPA vêm recebendo muita atenção devido aos seus efeitos carcinogênicos e, consequentemente foram incluídos nas listas de compostos considerados poluentes prioritários segundo agências européias e americanas de proteção e monitoramento ambiental, sendo seu monitoramento de extrema importância [137]. Para a separação de HPA, a CLAE-FR é uma das técnicas mais utilizadas, usualmente acoplada a detectores de fluorescência [138,139].

A fase titanizada, Si-Ti(PMODS), imobilizada termicamente a 120 °C por 16 h (FE otimizada) foi utilizada para separar uma mistura de seis HPA: naftaleno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno, na concentração de 10,0 mg/L. As suas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 35. A separação foi realizada utilizando o modo gradiente (solvente A: MeOH:H₂O (70:30, v/v) e solvente B: acetonitrila), sendo que a composição do solvente B variou de 5% até 70 % com vazão de 1,0 mL/min, temperatura de 23 °C, detecção a 254 nm e volume de injeção de 5 µL. Para efeito de comparação, a mesma mistura de HPA também foi separada em uma coluna comercial de 150 × 3,9 mm de d.i. recheada com uma fase comercial, Nova-Pak®, com partículas de 4 µm, empregando as mesmas condições de análises utilizadas na coluna de Si-Ti(PMODS), com exceção da vazão empregada, que foi de 1,2 mL/min.



Figura 35. Estruturas químicas dos HPA separados por CLAE-FR utilizando a FE Si-Ti(PMODS).

Separação de fármacos psicoativos

CLAE-FR é amplamente utilizada na separação de produtos farmacêuticos, como fármacos psicoativos, dentre os quais as classes dos

antidepressivos e tranqüilizantes, frequentemente, estão envolvidas em análises clínicas ou forenses [140].

As fases estacionárias Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) imobilizadas termicamente a 120 °C por 16 h (FE otimizada) e suas respectivas fases capeadas, foram utilizadas para separar uma mistura contendo quatro fármacos psicoativos, amitriptilina, nortriptilina, fluoxetina e diazepam, na concentração de 10,0 mg/L. As suas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 36. A separação foi realizada utilizando o modo isocrático de eluição, com FM metanol:0,020 mol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,5, (80:20, v/v), na vazão de 0,8 mL/min, temperatura de 23 °C, detecção a 220 nm e volume de injeção de 5 μ L. Para efeito de comparação, esta mistura de fármacos também foi separada em uma coluna comercial de 150 \times 3,9 mm de d.i., recheada com uma fase comercial, Nova-Pak®, com partículas de 4 μ m, empregando as mesmas condições de análises utilizadas na coluna de Si- Zr(PMODS), com exceção da vazão empregada, que foi de 1,2 mL/min.



Figura 36. Estruturas químicas dos fármacos psicoativos separados por CLAE-FR.

3.13.2 Aplicabilidade em CFS

Com intuito de ampliar a aplicabilidade das FE otimizadas com e sem capeamento e de outras fases estacionárias baseadas em polissiloxanos preparadas anteriormente em outros trabalhos do LabCrom (Tabela 4) para utilização em CFS, foram avaliadas separações de três grupos de fármacos, e uma mistura de oito filtros UV:

- <u>Benzodiazepínicos:</u> Oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila (Figura 37).
- <u>Barbitúricos:</u> hexobarbital, secobarbital, fenobarbital, metilfenobarbital e 3-metil-5-fenil-hidantoína (Figura 38).
- <u>Anti-inflamatórios não esteroides</u>: Ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, suprofeno e indoprofeno (Figura 39).
- .<u>Filtros UV químicos</u>: 2-etil-hexil salicilato (ES), benzofenona-3 (BZ3), metoxinamato de octila (EMC), octocrileno (OCR), butilmetoxidibenzoilmetano (BDM), etil-hexil triazona (ET), bisetilexiloxifenol (EMT), drometrizol trissiloxano (DMTS) (Figura 40).



Figura 37. Estruturas químicas dos benzodiazepínicos separados por CFS.

Todas as aplicações foram realizadas com soluções dos compostos na concentração de 1 mg/L, preparadas em MeOH ou MeOH-THF. Os fármacos com pureza superior a 99 % foram obtidos de vários fornecedores, e os filtros UV foram gentilmente doados pela L'Oreal (*Chevilly Larue*, França). As separações foram realizadas utilizando FM CO₂:MeOH (90:10, v/v),

temperatura de 25 °C (subcrítico), vazão de FM de 3 mL/min, detecção a 210 nm e controle de pressão de saída mantido a 15 MPa na temperatura de 60 °C.



Figura 38. Estruturas químicas dos barbitúricos separados por CFS.



flurbiprofeno

suprofeno

Indoprofeno

Figura 39. Estruturas químicas dos anti-inflamatórios não esteroides separados por CFS.



Figura 40. Estruturas químicas dos filtros UV separados por CFS.

4. Resultados e Discussão

A seguir estão apresentados os resultados e discussão das caracterizações físicas, químicas e cromatográficas por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e por cromatografia com fluido supercrítico (CFS), além de alguns testes de aplicabilidade, das fases estacionárias listadas no item 3.6.1.

4.1 Fluorescência de raios-X

Os grupos silanóis superficiais do suporte de sílica reagem com tetrabutóxido de zircônio (IV) ou titânio (IV) conforme as etapas 1 e 2:

Etapa 1:

 $n \equiv \text{SiOH} + M(\text{OC}_4\text{H}_9)_4 \rightarrow (\equiv \text{SiO})_n M(\text{OC}_4\text{H}_9)_{4-n} + nC_4\text{H}_{10}\text{OH}$

Etapa 2:

$$(\equiv SiO)_n M(OC_4H_9)_{4-n} + (4-n)H_2O \rightarrow (\equiv SiO)_n M(OH)_{4-n} + (4-n)C_4H_{10}OH$$

onde ≡SiOH refere-se aos grupos silanóis na superfície da sílica e M representa um átomo de zircônio ou titânio.

A espectroscopia de fluorescência de raios-X foi aplicada para determinar o percentual de incorporação de metal nos suportes metalizados usando curvas analíticas obtidas a partir dos padrões das misturas de SiO₂/ZrO₂ e SiO₂/TiO₂.

O espectro de FRX mostra claramente a presença de Zr sobre a superfície da sílica zirconizada, pelos picos em 15,76 keV e 17,64 keV (Figura 41a), chamados, respectivamente, de picos K α e K β . O mesmo ocorre com os suportes de sílica titanizada com o aparecimento dos picos K α e K β em 4,50 keV e 4,93 keV (Figura 41b), respectivamente.

As intensidades dos picos K α e K β são diretamente proporcionais a concentração de metal nas amostras, ou seja, quanto maior é a concentração de metal, mais intenso são esses picos. Para a construção das curvas

analíticas (Figura 42A e 42B), foram utilizados os valores de intensidade média do pico K α do respectivo metal cada padrão e a quantidade de metal (%, m/m). As equações das curvas analíticas foram: $I_{K\alpha}(Zr) = 21,8 \% Zr - 29,3$, com R = 0,9934; e $I_{K\alpha}$ (Ti) = 2,22 % Ti – 2,04, com R = 0,9992. A concentração de Zr foi de 21,5 % (± 0,2 %) e Ti foi de 7,5 % (± 0,1 %), resultado similar aos outros valores encontrados em suportes de sílica zirconizada [111] e titanizada [112] que utilizaram a mesma metodologia. Para a preparação das FE capeadas, foram sintetizados novos lotes de Si-Zr e Si-Ti, com % de Zr e titânio de 23,5 % e 7,1 %, respectivamente.



Figura 41: Espectros de FRX dos suportes de sílica zirconizada (a) e de sílica titanizada (b).



Figura 42. Curva analítica para determinação de zircônio (A) e titânio (B) em sílica metalizada. $I_{K\alpha}$ (Zr) = 21,8 % Zr – 29,3; com R = 0,9934 e $I_{K\alpha}$ (Ti) = 2,22 % Ti – 2,04; com R = 0,9992.

4.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das partículas de sílica não modificada, sílica zirconizada e sílica titanizada foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As fotomicrografias obtidas para as amostras estão apresentadas na Figura 43.

É possível observar que, referente ao processo de síntese dos suportes, as etapas de lavagens sucessivas com tolueno e água foram eficientes para remoção do material orgânico residual, pois não há presença de resíduos de reagentes ou de aglomerados das partículas das sílicas metalizadas.





(a)

(b)



(C)

Figura 43. Fotomicrografias obtidas para (a) sílica zirconizada com ampliação de 1.000 vezes e 10.000 vezes, (b) sílica titanizada com ampliação de 1.000 vezes e 10.000 vezes e (c) sílica não modificada com ampliação de 1.000 vezes e 10.000 vezes.

4.3 Planejamento experimental: avaliação da imobilização térmica do PMODS sobre suportes metalizados

As fases estacionárias foram preparadas utilizando-se excesso de carga de PMODS, de acordo com o procedimento descrito no item 3.6.2. Após a sorção do polímero ao suporte, as FE foram submetidas à etapa de imobilização térmica, variando-se a temperatura e o tempo em 11 experimentos, sendo que os intervalos de tempo e temperatura foram determinados utilizando testes univariados, levando em consideração a estabilidade térmica do polímero PMODS (até 175 °C).

A Tabela 6 apresenta a percentagem de carbono (% de C), a espessura da camada polimérica (τ) e os parâmetros cromatográficos obtidos a partir das separações das misturas testes 1 e 2 pela fase estacionária Si-Zr(PMODS). Os cromatogramas relativos à separação dos compostos da mistura teste 1 estão mostrados na Figura 44.

Experimento	Variáveis		Parâmetros cromatográficos				% C	τ (nm)
-	Temperatura (°°C)	Tempo (h)	N/mª	As ^a	As ^b	k ^a		
1	80	8	46300	1,6	2,9	3,3	17,2	1,53
2	120	8	48900	1,6	2,6	4,3	19,2	1,87
3	80	16	85400	1,2	4,1	3,5	15,7	1,31
4	120	16	89900	1,1	2,1	5,0	19,8	1,99
5	100	12	52400	1,8	3,0	4,2	17,8	1,62
6	100	12	52250	1,7	3,2	4,2	17,8	1,62
7	100	12	52650	1,8	3,4	4,1	17,7	1,61
8	72	12	9500	0,7	4,1	3,5	14,6	1,17
9	128	12	60900	1,3	2,6	4,6	18,4	1,73
10	100	6,4	78350	1,0	2,8	3,8	18,8	1,80
11	100	17,6	18300	1,8	2,3	4,3	18,2	1,53

Tabela 6. Matriz do planejamento composto central para as condições de tempo e temperatura de imobilização da fase Si-Zr(PMODS).

(a) Calculado para o pico do naftaleno; (b) calculado para o pico da N,N-dimetilanilina.



Figura 44. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste 1 pelas fases estacionárias Si-Zr(PMODS) imobilizadas termicamente, em estufa, em diferentes condições experimentais. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L, FM: MeOH:H₂O (80:20,v/v); vazão 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

O desempenho cromatográfico das fases Si-Zr(PMODS) imobilizadas termicamente, a partir das condições de tempo e temperatura, apresentaram eficiências (N/m) que variaram de 9.500 até 89.900 pratos m⁻¹. Os experimentos 3, 4, 9 e 10 apresentaram fator de assimetria (As) dentro dos limites aceitáveis, entre 0,8 e 1,3 [2,3], para o composto apolar naftaleno. Já os experimentos 1, 2, 5-7, 8 e 11 apresentaram fator de assimetria inadequado. A partir dos resultados de eficiência de coluna e fator de assimetria para o pico do naftaleno

obtidos para as fases Si-Zr(PMODS) imobilizadas termicamente, foram ajustados os respectivos modelos quadráticos para determinar uma condição ou uma região ótima de imobilização, empregando software de tratamento estatístico de dados STATISTICA[®]. Os modelos matemáticos que explicam as variações ocorridas na execução dos experimentos, no nível de 95 % de confiança, para eficiência e assimetria, estão apresentados abaixo:

Eficiência (N/m X 1000) = 52,1 (±0,10) - 9,9x₁ (±0,07) - 0,5x₂ (±0,07) - 1,9x₁² (±0,08) - 4,7x₂² (±0,08) + 0,5x₁x₂ (±0,09)

Assimetria (As) = 1,76 (±0,03) + 0,10x₁ (±0,02) + 0,04x₂ (±0,02) - 0,34x₁² (±0,02) - 0,14x₂² (±0,03) - 0,03x₁x₂ (±0,01)

A validade da equação ajustada para a eficiência de coluna obtidas pelas fases Si-Zr(PMODS) foram avaliadas pela análise da variância (ANOVA). Os dados da ANOVA para as eficiências de coluna estão dispostos na Tabela 7. A partir da ANOVA, a regressão quadrática dos dados de eficiências para as colunas das fases Si-Zr(PMODS) imobilizadas termicamente foi estatisticamente significativa, uma vez que a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos (MQ_{reg}/MQ_{res} = 6,65) foi maior que o valor do teste F tabelado (F_{5,5,95%} = 5,05). O modelo quadrático também não apresentou falta de ajuste, pois a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e o erro puro experimental (MQ_{fai}/MQ_{ep} = 1,71) apresentou menor valor que o F_{3.2.95%} tabelado = 19,16. Isto implica que o modelo quadrático ajustado aos dados de eficiência de coluna obtidos para as diferentes condições de imobilização térmica do PMODS (Tabela 7) sobre o suporte de sílica zirconizada explica, de forma satisfatória, as variações ocorridas nos resultados e mais de 89 % das variações ocorridas nas respostas podem ser explicadas pelo modelo descrito na Equação de eficiência de separação.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de	Média Quadrática
(FV)	(SQ)	liberdade (ບ)	(MQ)
Regressão	77,85	5	15,57
Resíduos	11,71	5	2,34
Falta de Ajuste	9,07	3	2,27
Erro Puro	2,64	2	1,32
Total	89,56	10	

Tabela 7. Análise da variância do modelo quadrático ajustado às eficiências de coluna para o composto naftaleno obtidas pelas fases Si-Zr(PMODS) imobilizadas termicamente.

A superfície de resposta da imobilização térmica de PMODS sobre partículas de sílica zirconizada (Figura 45A) foi medida pela eficiência do pico do composto naftaleno. A região ótima foi compreendida por eficiências de coluna superiores a 82.000 pratos/m e fatores de assimetria entre 0,9 e 1,1 (Figura 45B) para imobilização na temperatura de 120 °C por 16 h. Nestas condições, fases Si-Zr(PMODS) imobilizadas termicamente foram preparadas para caracterizações físico-químicas e cromatográficas e testes de estabilidade em FM alcalina e ácida.



Figura 45. Superfície de resposta para a imobilização térmica do PMODS no suporte de sílica zirconizada: (A) eficiência e (B) fator de assimetria.

A Tabela 8 mostra as diferentes condições de tempo e temperatura utilizadas na imobilização térmica da fase estacionária Si-Ti(PMODS), assim como os parâmetros cromatográficos obtidos, % de carbono, e a espessura da camada polimérica (τ). Os cromatogramas relativos à separação dos compostos da mistura teste 1 estão mostrados na Figura 46. Assim como para

a FE Si-Zr(PMODS), os intervalos de tempo e temperatura foram determinados utilizando testes univariados, levando em consideração a estabilidade térmica do polímero PMODS (até 175 °C), medido por termogravimetria. Os melhores resultados foram obtidos para a FE produzida no experimento 4, no qual a eficiência cromatográfica foi superior a 81.000 N/m e picos simétricos foram obtidos para o composto neutro naftaleno e para o composto básico N,Ndimetilanilina. Esta FE também apresentou o maior % de carbono incorporado, 23,5 %. O experimento 9 apresentou os menores valores de eficiência e valores de assimetria inadequados. A repetibilidade do procedimento foi avaliada através da análise do ponto central, realizado em triplicata (experimentos 5, 6 e 7). A estimativa do desvio padrão relativo foi de 0,5 % para recobrimento polimérico (em termos de percentagem de carbono), resultados considerados satisfatórios. As superfícies de resposta para eficiência (Figura 47A) e assimetria (Figura 47B), determinadas para o composto naftaleno, apresentaram valores superiores a 80.000 pratos/m e fatores de assimetria entre 1,0 e 1,2 e apresentaram região ótima para as condições de preparação da FE Si-Ti(PMODS) na temperatura de 120 °C por 16 h.

	Variáveis		Parâmetros				% C	τ
Experimento			cromatográficos					(nm)
-	Temperatura (°C)	Tempo (h)	N/m ^a	As ^a	As ^b	k ^a		
1	80	8	73600	0,9	1,6	6,4	16,4	0,65
2	120	8	79200	1,1	3,3	5,5	22,4	1,11
3	80	16	75700	0,8	2,0	7,5	16,8	0,67
4	120	16	81700	1,1	1,2	6,1	23,5	1,17
5	100	12	78500	0,6	1,7	10,2	19,5	0,86
6	100	12	78200	0,7	1,3	10,3	19,5	0,86
7	100	12	78800	0,7	1,4	10,2	19,4	0,85
8	72	12	73200	0,8	2,4	5,4	16,3	0,64
9	128	12	50800	0,6	3,1	16,4	17,5	0,72
10	100	6,4	78200	0,8	3,5	8,4	18,4	0,78
11	100	17,6	75600	0,9	3,9	10,9	20,6	0,94

Tabela 8. Matriz do planejamento composto central para as condições de tempo e temperatura de imobilização da fase Si-Ti(PMODS).

(a) Calculado para o pico do naftaleno; (b) calculado para o pico da N,N-dimetilanilina.



Figura 46. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste 1 pelas fases estacionárias Si-Ti(PMODS) imobilizadas termicamente, em estufa, em diferentes condições experimentais. Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L, FM: MeOH:H₂O (80:20,v/v); vazão 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C, Identificação dos picos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

Os modelos matemáticos que explicam as variações ocorridas na execução dos experimentos, no nível de 95 % de confiança, estão apresentados a seguir:

Eficiência (N/m X 1000) = 78,5 (±0,17) - 2,5x₁ (±0,11) + 0,11x₂ (±0,10) - $6,2x_1^2$ (±0,13) + $1,2x_2^2$ (±0,13)

Assimetria = 0,67 (±0,03) - 0,03x₁ (±0,02) - 0,03x₂ (±0,02) - 0,07x₁² (±0,02) - 0,14x₂² (±0,02)



Figura 47. Superfície de resposta para a imobilização térmica do PMODS no suporte de sílica titanizada: (A) eficiência e (B) fator de assimetria.

A validade da equação ajustada para a eficiência de coluna obtidas pelas fases Si-Ti(PMODS) foram avaliadas pela análise da variância (ANOVA) e a regressão quadrática dos dados de eficiências para as colunas das fases Si-Ti(PMODS) imobilizadas termicamente foi estatisticamente significativa e o modelo quadrático também não apresentou falta de ajuste com um nível de confiança de 95 %.

4.4 Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros

Os valores de área superficial específica, volume específico de poros e diâmetro médio de poros estão descritos na Tabela 9. A partir da Tabela 9 percebe-se que após o processo de metalização, há redução do volume e diâmetro de poros das partículas. Por outro lado, ocorreu aumento da área superficial. Assim, percebe-se que, o processo de metalização, no qual há incorporação do metal a estrutura da sílica, não altera significativamente as características da sílica Kromasil (sílica nua), permanecendo em ambos os materiais a característica de material mesoporoso [111,141]. A curva de dessorção dos suportes pode ser associada à isoterma tipo A ou tipo H1 (IUPAC), o que é característico de materiais com poros cilíndricos [142]. A área

superficial específica da fase Si-Zr(PMODS) apresentou uma redução de aproximadamente 35 % do valor inicial da área superficial do suporte de sílica zirconizada.Também ocorreu diminuição do volume e diâmetro de poros, sugerindo que a maior quantidade de polímero PMODS foi imobilizado dentro dos poros do suporte de sílica zirconizada, com redução dos volumes de poros em relação ao volume de poro inicial do suporte de aproximadamente 40 %. A FE Si-Ti(PMODS) apresentou redução de aproximadamente 83 % para área superficial específica. Após o processo de capeamento, houve diminuição de aproximadamente 13 % no valor da área superficial da fase zirconizada e aproximadamente 8% no valor de área superficial da fase titanizada, aumento no diâmetro de poro e diminuição do volume de poros para ambas as FE.

FE	S _{BET} (m²/g)	V _p (cm³/g)	D _p (nm)
Sílica Kromasil	306	0,86	11,22
Sílica zirconizada (Si-Zr)	333	0,72	8,64
Sílica titanizada (Si-Ti)	312	0,80	5,30
Si-Zr (PMODS)	119	0,29	4,90
Si-Zr (PMODS)ec	103	0,19	9,43
Si-Ti (PMODS)	49,8	0,13	5,10
Si-Ti(PMODS)ec	45,9	0,11	9,80

Tabela 9. Área superficial específica (S_{BET}), volume de poro (V_p) e diâmetro de poros (D_p) da sílica Kromasil (sílica nua), suportes metalizados e das fases estacionárias otimizadas.

4.5 Termogravimetria

As curvas TG/DTG (DTG – derivada termogravimétrica: derivada da massa em função da temperatura) obtidas para a sílica não modificada, para os suportes metalizados e para as fases estacionárias estão descritos a seguir:

As perdas de massas dos suportes estão relacionadas principalmente aos processos de desidratação e desidroxilação das partículas de sílica (Figura 48a) e das sílicas metalizadas (Figura 48b e Figura 48c). Ocorre a evaporação das moléculas de água fisicamente adsorvidas à superfície externa do suporte de 50°C até aproximadamente 150 °C, com exceção da sílica modificada (até aproximadamente 100°C). A segunda perda de massa ocorre entre 150 e 600 °C, devido à evaporação de moléculas de água mais internas aos suportes. A partir de 600 °C ocorre o processo de desidroxilação nos materiais, devido à remoção de grupos hidroxilas da sílica e do óxido metálico. A perda de massa total foi inferior a 10 % da massa inicial das sílicas metalizadas, indicando uma boa resistência térmica dos suportes cromatográficos.



(C)

Figura 48. Curvas TG e DTG obtidas para os suportes de sílica não modificada e sílica metalizada, sob atmosfera oxidante (O₂) (100 mL min⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 10 °C a 700 °C para o suporte de sílica não modificada e de 10 °C a 1000 °C para os suportes metalizados, utilizando-se aproximadamente 10 mg de amostra. Em (a) sílica não modificada; (b) sílica zirconizada e (c) sílica titanizada.

A TG também foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica do PMODS. As perdas de massas do PMODS ocorreram principalmente a partir de 175 °C, início da degradação do polímero, como pode ser visto na Figura 49. A partir dessa temperatura podem ser observados picos de degradação (curva pontilhada), dentro da faixa de 175 a 600 °C, devido à perda de monômeros e oligômeros de sua estrutura. Na temperatura de 600 °C há degradação total do polímero e da matéria orgânica, tendo-se como resíduo apenas a sílica. Em função desses resultados, a faixa de aplicação do PMODS para a utilização como fase estacionária fica limitada a uma temperatura máxima ao redor de 150 °C, para garantir que a sua estrutura inicial não seja afetada pela alteração da temperatura durante o preparo da fase estacionária.



Figura 49. Curvas TG e DTG obtidas para o PMODS, sob atmosfera oxidante (O₂) (100 mL min⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 10 °C a 980 °C, utilizando-se aproximadamente 10 mg de amostra.

As FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) apresentaram perdas de massas ao longo da faixa de temperatura de 25 a 600 °C (Figura 50). As principais perdas estão relacionadas à degradação do PMODS, a desidratação e desidroxilação dos grupos superficiais, Si-OH e M-OH do suporte cromatográfico. A degradação das fases teve início em aproximadamente 240 °C para a FE Si-Zr(PMODS) e 270 °C para a FE Si-Ti(PMODS), superior ao início da degradação do PMODS que foi de 175 °C. Para as FE capeadas (Figura 51), a fase zirconizada apresentou aumento na estabilidade térmica, com início da degradação em aproximadamente 300 °C, enquanto que a fase titanizada apresentou início de degradação em torno de 225 °C, o que leva a inferir que antes e após o capeamento há mudanças da estabilidade térmica das FE, de acordo com o tipo de suporte metalizado: a FE Si-Ti(PMODS) apresentou maior estabilizade térmica antes do capeamento, no entato, após o capeamento, a FE Si-Zr(PMODS)ec apresentou maior estabilidade térmica.



Figura 50. Curvas TG e DTG obtidas para as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS), sob atmosfera oxidante (O_2) (100 mL min⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 10 °C a 980 °C, utilizando-se aproximadamente 10 mg de amostra. Em (a) FE Si-Zr(PMODS) e (b) Si-Ti(PMODS).



Figura 51. Curvas TG e DTG obtidas para as FE Si-Zr(PMODS)ec e Si-Ti(PMODS)ec, sob atmosfera oxidante (O₂) (100 mL min⁻¹), a uma razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹, de 10 °C a 980 °C, utilizando-se aproximadamente 10 mg de amostra. Em (a) FE Si-Zr(PMODS)ec e (b) Si-Ti(PMODS)ec.

4.6 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros de infravermelho das sílicas metalizadas com zircônio (Figura 52) e titânio (Figura 53) apresentaram bandas características semelhantes àquelas encontradas nas amostras de sílica Kromasil (sílica nua,

na região de 3500, 1645, 1100, 980, 790 e 460 cm⁻¹). As bandas alargadas em torno de 3450-3900 cm⁻¹ podem ser atribuídas ao estiramento vibracional dos grupos hidroxilas livres que ocorrem na superfície de sílicas amorfas [143]. Essa banda também usualmente se sobrepõe as bandas de hidroxilas da água adsorvida ao material [144]. A banda em 1640-1650 cm⁻¹ pode ser atribuída à deformação angular dos grupos OH de água adsorvida [145]. Já a banda acentuada em 1100 cm⁻¹ foi atribuída ao estiramento das ligações siloxano, Si-O-Si [146]. A banda na região de 790 cm⁻¹ é atribuída às vibrações das ligações Zr-O e Ti-O, porém essa região também é típica do estiramento simétrico dos grupos Si-O, bem como a banda na região em torno de 465 cm⁻¹. [146].

A presença do polímero, PMODS (Figura 54), imobilizado nas FE (Figura 55 e Figura 56) foi confirmado pelo aparecimento do tripleto em 2850-2900 cm⁻¹ atribuído ao estiramento dos grupos CH_2 e CH_3 [147]. O espectro de absorção no infravermelho das FE capeadas apresentou, além das bandas listadas, significante redução das bandas em forma de ombro na região entre 970–980 cm⁻¹, atribuídas às vibrações dos grupos OH dos silanóis, o que sugeriu a eficiência da reação de capeamento [133] (Figura 57 e Figura 58).



Figura 52. Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos para as amostras de sílica não modificada e de sílica zirconizada, utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m).



Figura 53. Espectros de absorção na região do infravermelho obtidos para as amostras de sílica não modificada e de sílica titanizada, utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m).



Figura 54. Espectros de absorção na região do infravermelho do PMODS, utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m).



Figura 55. Espectros de absorção na região do infravermelho da FE Si-Zr(PMODS), utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m).



Figura 56. Espectros de absorção na região do infravermelho da FE Si-Ti(PMODS), utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m).



Figura 57. Espectros de absorção na região do infravermelho da FE Si-Ti(PMODS)ec, utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m).



Figura 58. Espectros de absorção na região do infravermelho da FE Si-Ti(PMODS)ec, utilizando pastilha de KBr, 1 % (m/m).

4.7 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de silício-29 (RMN ²⁹Si)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de silício-29 (RMN ²⁹Si) foi empregada para identificação estrutural das diferentes espécies de silício presentes nos suportes e nas fases estacionárias.

Os espectros de RMN ²⁹Si obtidos para a sílica não modificada e para as sílicas metalizadas estão apresentados na Figura 59.



(C)

Figura 59. Espectros de RMN de ²⁹Si obtidos para a sílica não modificada (SiO₂) (a), sílica zirconizada (Si-Zr) (b) e sílica titanizada (Si-Ti) (c).

É possível observar que os três espectros (Figura 59) apresentam picos em -92, -100 e -109 ppm, atribuídos aos grupos silanóis geminais (Q^2), aos silanóis livres e vicinais (Q^3), e às ligações do tipo siloxano (Q^4), respectivamente. Pode-se observar uma diminuição na razão Q^3/Q^4 no espectro dos suportes metalizados em relação ao espectro da sílica não modificada, indicando que a incorporação de zircônio ou titânio na sílica ocorre principalmente nos grupos Q^3 correspondentes aos silanóis vicinais ou livres.

A Figura 60 apresenta as espécies de silício que podem ser encontradas nos espectros dos suportes e/ou das fases estacionárias [148].



Figura 60. Espécies de silício que podem ser encontradas nos espectros dos suportes e/ou fases estacionárias e seus respectivos valores de deslocamento químico. As ligações Si-O representam ligações Si-O-SiΞ.

Os espectros de RMN obtidos para as FE Si-Zr(PMODS) e para a FE Si-Ti(PMODS) capeadas e não capeadas estão apresentados na Figura 61 e 62, respectivamente.



Figura 61. Espectros de RMN de ²⁹Si obtidos para as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Zr(PMODS)ec.





Nos espectros das FE pode-se verificar diminuição das espécies Q² e a redução da razão entre as espécies Q³/Q⁴, indicando que a quantidade total de grupos silanóis diminuiu após a incorporação do polímero PMODS. Comparando os espectros de RMN de ²⁹Si das fases estacionárias com o

suporte de sílica metalizada, pode-se perceber que ocorreu um aumento da intensidade dos sinais na faixa de -10 a -30 ppm, que são sinais de silício relacionadas ao PMODS da fase estacionária. Os sinais que aparecem nessa região do espectro de RMN das FE podem ser relacionados ao ambiente químico das espécies de silício presentes, agora associadas às cadeias do PMODS que estão fracamente ligadas ou fisicamente adsorvidas ($D_1 e D_1^H$) e/ou também químicamente ligadas (D^2) à superfície do suporte [148,149].

A ressonância magnética nuclear de ²⁹Si das FE Si-Zr(PMODS)ec e Si-Ti(PMODS)ec revelou a efetividade da reação de capeamento pelo aparecimento do grupo trimetilsilil (M) na região de +14 ppm [115], além da redução nas quantidades de silanóis livres (Q^n). Sinais das estruturas SiO₄ (Q^4) e dos grupos silanóis isolados (Q^3) podem ser detectados em ambas as FE, entretanto, a razão Q^3/Q^4 foi alterada nas FE capeadas (ec). Além disso, nas FE capeadas, os sinais dos silanóis geminais (Q^2) desapareceram completamente.

4.8 Caracterização cromatográfica das FE otimizadas por CLAE-FR

4.8.1 Escolha da vazão ótima

As FE otimizadas através do planejamento experimental foram submetidas a caracterização por CLAE-FR utilizando os testes de Engelhardt [118], Tanaka [119], Neue [120,121] e SRM 870 [122]. A etapa preliminar foi de determinação da vazão ótima de FM, ou seja, a vazão em que se obtêm análises com valores mais elevados de eficiência.

A Figura 63 mostra a curva de van Deemter (gráfico de H, altura de prato *versus* velocidade linear de FM, μ) obtida com a FE Si-Zr(PMODS), utilizandose os valores de H (μ m) calculados para o naftaleno, a partir da separação da mistura teste 1. Apesar do ponto mínimo da curva ter sido obtido em uma vazão de aproximadamente 0,25 mL/min, foi estabelecido que a vazão de fase móvel a ser utilizada seria de 0,3 mL/min por ainda apresentar eficiências adequadas (acima de 75,000 N/m) em um menor tempo de análise.



Figura 63. Curva de van Deemter obtida para a fase estacionária preparada a partir da imobilização do PMODS sobre sílica zirconizada, Si-Zr(PMODS), empregando temperatura de 120 °C por 16 horas.

A FE Si-Ti(PMODS) também apresentou vazão ótima de fase móvel de 0,3 mL/min, com eficiências acima de 78,000 N/m.

4.8.2 Separação das misturas teste 1 e 2

As misturas teste 1 e 2, desenvolvidas no LabCrom, são utilizadas rotineiramente como uma forma de avaliação geral do desempenho cromatográfico das FE preparadas, além de serem utilizadas para determinação das condições ótimas de imobilização através da utilização do planejamento experimental. Os cromatogramas obtidos a partir da separação dos compostos das mistura teste 1, empregando as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento estão apresentados na Figura 64.

A mistura teste 1 é constituída por compostos neutros de diferentes polaridades, cuja separação é considerada simples. Por isso, além de fornecer ferramentas para otimização do processo de imobilização pelo uso do planejamento experimental, também é utilizada como uma forma de se avaliar a qualidade do enchimento da coluna, principalmente com relação à eficiência e a assimetria dos picos.

A Tabela 10 mostra os valores de eficiência (N/m) e assimetria (As₁₀) para as fases estacionárias Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento.



Figura 64. Cromatogramas obtidos na separação dos compostos da mistura teste 1 empregando as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: MeOH:H₂O (70:30,v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

Parâmetro	Si-Zr(PMODS)	Si-Zr(PMODS)ec	Si-Ti(PMODS)	Si-Ti(PMODS)ec
N/m (benzonitrila)	40100	32700	40050	20200
N/m (benzeno)	71900	56200	72550	31350
N/m (tolueno)	84600	62900	75850	32350
N/m (naftaleno)	89900	65550	79200	52900
(As ₁₀) (benzonitrila)	1,7	1,3	1,8	1,6
(As ₁₀) (benzeno)	1,4	1,1	1,7	1,0
(As ₁₀) (tolueno)	1,2	1,1	1,2	0,9
(As ₁₀) (naftaleno)	1,1	1,0	1,1	0,9
k (benzonitrila)	0,6	0,8	0,5	0,6
k (benzeno)	1,8	2,0	1,9	2,8
k (tolueno)	3,3	3,7	2,8	5,2
k (naftaleno)	5,0	5,6	5,9	8,0
Rs (todos os picos)*	≥ 2,9	≥ 2,6	≥ 3,9	≥ 2,9

Tabela 10. Valores de eficiência (N/m), assimetria (As₁₀), retenção (k) e resolução (Rs) obtidos para as fases estacionárias Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec).

* Valor mínimo

As FE otimizadas capeadas e não capeadas apresentaram resolução acima de 2,6 para todos os picos da mistura teste 1 e os valores de eficiência obtidos para o composto mais retido, o naftaleno, foram maiores que 52000 pratos/m, conforme apresentado na Tabela 10. Com relação à assimetria do naftaleno, as FE apresentaram valores entre 0,9 e 1,1 (Tabela 10), dentro da faixa aceitável [2,3]. O procedimento de capeamento aumentou a retenção das FE para todos os compostos, devido à incorporação dos grupos metila, que atribuíram maior hidrofobicidade às FE. A etapa de capeamento reduziu os valores de eficiência das colunas, o que pode estar relacionado a perdas de FE (PMODS) devido ao estresse térmico durante o período de 48 horas.

A Figura 65 apresenta os cromatogramas obtidos na separação da mistura teste 2, empregando-se as fases estacionárias Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento. A mistura teste 2, assim como a mistura teste 1, foi desenvolvida no LabCrom e é constituída pelos por compostos neutros (naftaleno e acenafteno), ácido (fenol) e básico (N,N-dimetilanilina), portanto, a análise desta mistura fornece informações com relação à acidez e polaridade da fase estacionária empregada.



Figura 65. Cromatogramas obtidos na separação dos compostos da mistura teste 2 empregando as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: MeOH:H₂O (70:30,v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

As fases estacionárias foram analisadas empregando FM MeOH: H_2O (70:30,v/v) e suas separações apresentaram resolução acima de 1,4 para todos os picos da mistura teste 2, com separação de todos os compostos (Tabela 11). As FE capeadas apresentaram redução da assimetria para o pico

do composto N,N-dimetilanilina, (Tabela 11). A ocorrência de interações por meio de troca iônica com os zirconóis e/ou titanóis presentes, indicou que este composto está interagindo com os suportes metalizados e essa interação é mais pronunciada para o suporte de sílica zirconizada ($As_{10} = 4,7$, antes do capeamento).

Parâmetro	Si-Zr(PMODS)	Si-Zr(PMODS)ec	Si-Ti(PMODS)	Si-Ti(PMODS)ec
N/m (fenol)	8500	6028	24100	10400
N/m (N,N-dimetilanilina)	47500	47200	45100	22300
N/m (naftaleno)	88500	50900	90700	31400
N/m (acenafteno)	91850	59300	97190	29500
(As ₁₀) (fenol)	2,8	2,4	1,8	1,7
(As ₁₀)(N,N-dimetilanilina)	4,7	2,1	2,3	2,0
(As ₁₀) (naftaleno)	2,1	1,2	1,1	0,9
(As ₁₀) (acenafteno)	1,7	1,1	0,9	0,8
k (fenol)	0,5	0,5	0,4	0,4
k (N,N-dimetilanilina)	2,9	2,9	3,5	3,8
k (naftaleno)	4,7	5,0	5,6	7,9
k (acenafteno)	11,7	12,4	13,0	20,1
Rs (todos os picos)	≥ 1,6	≥ 1,4	≥ 2,2	≥ 2,4

Tabela 11. Valores de eficiência (N/m), assimetria (As₁₀), retenção (k) e resolução (Rs) obtidos para as fases estacionárias Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec).

Os suportes apresentam em sua estrutura os grupos silanóis e metalóis ácidos. Após a incorporação de zircônio ou titânio, que são ácidos de Lewis, houve um aumento da acidez do suporte cromatográfico [113] e, sendo que a N,N-dimetilanilina, uma base fraca, a amina protonada (pKa 5,1) deve interagir por troca iônica com os sítios ácidos do suporte cromatográfico: silanóis, zirconóis ou titanóis.

Como o fator de retenção das FE antes e após o capeamento não sofreu alteração para a FE zirconizada e quase não apresentou variação para a FE titanizada, não é possível inferir se o processo de capeamento foi significativo e se os grupos metila recobriram grande parte dos sítios ativos dos suportes. Porém, considerando que a N,N-dimetilanilina se caracteriza por um composto de difícil separação, convém realizar testes cromatográficos específicos para
medir a acidez e a quantidade de silanóis e/ou metalóis presentes. Por outro lado, uma alternativa para a redução do fator de assimetria da N,N-dimetilanilina utilizando FE metalizada seria a aplicação de FM tamponada com fosfato na faixa de pH 7,0, um vez que como o pKa da N,N-dimetilanilina protonada é 5,1, e sabe-se que em pH acima de 6,1, a amina encontra-se na forma neutra, e as interações por troca iônica com os sítios ativos do suporte são minimizadas [117].

4.8.3 Mistura teste de Engelhardt

Os cromatogramas obtidos na separação da mistura teste de Engelhardt estão apresentados na Figura 66.

No teste de Engelhardt [118] (Tabela 12), a seletividade hidrofóbica (α_{CH2}), para a FE Si-Zr(PMODS) obtida pela razão entre o fator de retenção do etilbenzeno (k_E) e do tolueno (k_T), foi 3,2, indicando que a FE tem capacidade de separar compostos que diferem somente por um grupo metilênico. A atividade silanofílica, medida pelos fatores de assimetria da anilina e da N,N-dimetilanilina (As_A = 3,4 e As_N = 5,4), a sua ordem de eluição e a razão dos fatores de assimetria da anilina e do fenol (As_A/As_P = 1,2) indicam que a FE apresenta significante atividade silanofílica [118]. Para a FE Si-Ti(PMODS), o teste de Engelhardt indicou α_{CH2} de 2,5. Essa capacidade é menor quando comparada com a FE Si-Zr(PMODS). Em relação à atividade silanofílica, os valores encontrados para As_A e As_N foram respectivamente 2,1 e 3,7, valores mais baixos, quando comparados com a FE Si-Zr(PMODS). A ordem de eluição e a razão entre o fator de assimetria da anilina e fenol (As_A/As_P) foi de 1,4, indicando que a FE apresenta moderada atividade silanofílica.

Após a reação de capeamento, o teste de Engelhardt [118] (Tabela 12), mostra que os valores de seletividade hidrofóbica (α_{CH2}) quase não foram alterados para a FE titanizada, mas com alteração para a FE zirconizada. Há redução significativa no fator de assimetria dos solutos básicos anilina (A) e N,N-dimetilanilina (N), o que indica que a reação de capeamento reduziu a quantidade de silanóis e/ou zirconóis e titanóis nas FE capeadas.



Figura 66. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste de Engelhardt, utilizando as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: MeOH:H₂O (55:45, v/v); vazão:0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) anilina, (4) tolueno, (5) N,N-dimetilanilina, (6) etilbenzeno.

Tabela 12. Dados obtidos para o teste de Engelhardt antes e após a reação de capeamento (ec).

FE	α_{CH2}	As _A	As _N	As _A /As _P
Si–Zr(PMODS)	3,2	3,4	5,4	1,2
Si–Zr(PMODS)ec	2,2	1,3	1,4	1,0
Si–Ti(PMODS)	2,5	2,1	4,5	1,4
Si-Ti(PMODS)ec	1,7	1,1	3,6	1,1

4.8.4 Mistura teste de Tanaka

A mistura A do teste de Tanaka [119] foi empregada para avaliar diferentes propriedades das FE: hidrofobicidade ($k_{pentilbenzeno}$), seletividade hidrofóbica ($\alpha_{CH2} = k_{pentilbenzeno}/k_{butilbenzeno}$), seletividade estérica ($\alpha_{T/O} = k_{trifenileno}/k_{o-terfenila}$) e a seletividade aromática ($\alpha_{PB/O} = k_{pentilbenzeno}/k_{o-terfenila}$) [123]. Essa mistura foi constituída de uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, trifenileno e *o*-terfenila. O cromatogramas obtidos na separação da mistura A do protocolo de Tanaka estão apresentados na Figura 67.

Como se pode observar nos cromatogramas obtidos na separação da mistura A, todas as FE apresentaram aproximadamente a mesma separação para o par butilbenzeno e pentilbenzeno, e, consequentemente, valores de seletividade hidrofóbica (α_{CH2}) semelhante (Tabela 13). Seus valores são semelhantes aos obtidos para as FE C18 testadas por Tanaka e colaboradores [119], que apresentaram valores entre 1,1 e 1,3 e pelas FE quimicamente ligadas tipo poliméricas e fases estacionárias híbridas do tipo C18 testadas por Euerby e colaboradores [150-152]. As FE apresentaram hidrofobicidade (kpentilbenzeno) comparável as FE C18 testadas por Tanaka e colaboradores [119] e por Euerby e Petersson [152]. Após o capeamento, houve diminuição do valor de k_{pentilbenzeno} para a FE zirconizada e um aumento do mesmo parâmetro para a FE titanizada, devido ao maior % de carbono dessa fase, porém, ainda comparáveis com as FE C18 testadas por Tanaka e colaboradores [119] e por Euerby e Petersson [152]. Os valores de seletividade hidrofóbica (α_{CH2}) permaneceram quase que inalterados antes e após a reação de capeamento, confirmando os resultados obtidos pelo teste de Engelhardt.

	•						
FE	k _{pentilbenzeno}	$\alpha_{CH2}{}^{a}$	$\alpha_{T/O}{}^{b}$	$\alpha_{PB/O}^{c}$	$\alpha_{C/P}^{d}$	α _{B/P(pH 7.6)} e	α _{B/P(pH 2.7)} e
Si–Zr(PMODS)	7,1	1,2	1,3	0,8	1,4	0,8	2,1
Si–Zr(PMODS)ec	7,6	1,1	1,2	0,8	0,3	0,6	1,7
Si–Ti(PMODS)	6,9	1,3	1,6	0,8	0,7	2,0	1,8
Si–Ti(PMODS)ec	9,2	1,1	1,2	0,7	0,4	0,9	1,4

Tabela 13. Dados obtidos para o Teste de Tanaka antes e após a reação de capeamento (ec).

 ${}^{a}\alpha_{CH2} = k_{pentilbenzeno}/k_{butilbenzeno;} {}^{b}\alpha_{T/O} = k_{trifenileno}/k_{o-terfenila}; {}^{c}\alpha_{PB/O} = k_{pentilbenzeno}/k_{o-terfenila};$ terfenila; ${}^{d}\alpha_{C/F} = k_{cafe(na}/k_{fenol}; {}^{e}\alpha_{B/F} = k_{benzilamina}/k_{fenol}$



Figura 67. Cromatogramas obtidos na separação da mistura A do protocolo de Tanaka, utilizando as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: metanol:H₂O, 80:20 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) pentilbenzeno, (4) o-terfenil e (5) trifenileno.

A separação da mistura A do teste de Tanaka [119] (Tabela 13) também indicou que a seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$), obtida pelo fator de separação do composto não-planar o-terfenil e do composto altamente planar trifenileno apresentou valores de 1,2 e 1,6, respectivamente. Esses valores indicam que as FE tem a capacidade de separar compostos de polaridades similares que diferem pela configuração espacial, com ordem de eluição típica de fases poliméricas do tipo octadecil (ODS), nas quais a molécula não planar do hidrocarboneto policíclico aromático o-terfenil elui mais rapidamente que a

molécula planar do trifenileno, uma vez que essas fases apresentam uma "cavidade" na sua estrutura [153]. Por outro lado, o valor obtido por $\alpha_{T/O}$ é menor do que o esperado para fases poliméricas do tipo C18 [154,155]. Essa característica da FE pode estar relacionada com uma boa cobertura polimérica sobre os suportes [156]. Os valores de seletividade aromática das FE ($\alpha_{PB/O}$) foram similares aos obtidos por Euerby *et al.* [157] durante a caracterização das FE comerciais do tipo fenil ($\alpha_{PB/O} < 1$) e que as FE capeadas e não capeadas apresentam a capacidade de realizar interações com compostos que apresentam elétrons π e separar compostos como hidrocarbonetos aromáticos.

A partir da separação dos compostos da mistura teste B de Tanaka (Figura 68) pode-se avaliar a capacidade de formação de ligação de hidrogênio das FE, obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol $(\alpha_{C/F})$. Os grupos silanóis residuais foram medidos através das interações por ligação de hidrogênio entre a FE, a cafeína e o fenol. A eluição desses compostos revelou valor de $\alpha_{C/P}$ = 0,7, indicando que há silanóis/titanóis residuais presentes na FE Si-Ti(PMODS), valor superior ao encontrado para FE comerciais [151,152], porém mais baixo quando comparado a FE Si-Zr(PMODS), cujo $\alpha_{C/P}$ foi de 1,4. Por outro lado, a reação de capeamento promoveu boa proteção dos silanóis residuais na superfície das fases estacionárias. Este fato contribuiu para a redução das interações por ligação de hidrogênio, quando comparadas com as mesmas fases não capeadas. Como resultado, ocorreu a inversão na ordem de eluição dos solutos cafeína e fenol, resultando em $\alpha_{C/P}$ menor que a unidade. Este valor é similar aos valores encontrados para FE comerciais que foram submetidas à reação de capeamento [119,152], indicando que os grupos metila obtidos por meio da reação de capeamento recobriram grande parte dos silanóis e/ou zirconóis ou titanóis dos suportes cromatográficos.

A atividade silanofílica total e a acidez dos grupos silanóis residuais das FE foram analisadas por meio da mistura contendo um composto básico, a benzilamina, (pK_a 9,7) e um composto ácido (fenol, pK_a 9,9), que são analisados em FM metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹ 30:70 (v/v), tamponada, em diferentes valores de pH : pH 7,6 e pH 2,7.

114



Figura 68. Cromatogramas obtidos na separação da mistura B do protocolo de Tanaka, utilizando as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; FM: MeOH:H₂O (30:70, v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C, Compostos teste: (1) uracila, (2) fenol e (3) cafeína.

Quando se utiliza FM a pH 7,6, a maioria dos grupos silanóis está na forma desprotonada (Si-O⁻), e assim, deve interagir com a benzilamina por meio do mecanismo de troca iônica, uma vez que esta se encontra protonada, retendo-a fortemente ou até mesmo irreversivelmente.

A Figura 69 mostra os cromatogramas das FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento utilizando como FM metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹, pH 7,6, 30:70 (v/v). O valor de $\alpha_{B/P(7.6)}$ = 0,8 mostra que a FE apresenta baixa propriedade de realizar troca iônica, com eluição da benzilamina com um pico simétrico (As= 1,3). Já a FE Si-Ti(PMODS) apresentou $\alpha_{B/P(pH7.6)}$ = 2,0, o que indica que a FE apresenta a propriedade de realizar troca iônica total quando essa faixa de pH for utilizada, resultando em pico da benzilamina com assimetria, $As_B = 2,5$, e somente o recobrimento polimérico não é suficiente para suprimir a atividade silanofílica da FE nessa faixa de pH. Após a reação de capeamento, há diminuição significativa dos valores de $\alpha_{B/P(7.6)}$, com valores de 0,6 e 0,9 para as fases zirconizada e titanizada, respectivamente, indicando a eficiência da reação de capeamento e por consequência a diminuição da atividade silanofílica das FE.



Figura 69. Cromatogramas obtidos na separação da mistura C do protocolo de Tanaka, utilizando as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; fase móvel: metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹, pH 7,6, 30:70 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm em (a) e (b) e 220 nm em (c) e (d) e temperatura de 40 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) benzilamina e (3) fenol.

A Figura 70 mostra os cromatogramas das FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento utilizando como FM metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹, pH 2,7, 30:70 (v/v). Nesse valor de pH, os grupos silanóis estão não-dissociados, enquanto a benzilamina está protonada com a carga positiva. O resultado de $\alpha_{B/P}$ = 2,1 foi semelhante a FE tipo C18 não capeadas que apresentam $\alpha_{B/P}$ de aproximadamente 2,5 [152]. Uma vez que a retenção do soluto básico benzilamina não foi irreversível, a FE não apresenta acidez elevada, com baixa capacidade de realizar troca iônica em fases móveis tamponadas ácidas ou neutras. Esse fato sugere que a presença de zircônio na superfície da sílica, o qual aumenta a acidez dos silanóis adjacentes e, consequentemente, aumenta as interações entre a FE e bases fracas como a benzilamina não afeta significativamente a retenção de compostos básicos. A FE Si-Ti(PMODS) apresentou valor de $\alpha_{B/P}$ em pH 2,7 de 1,8. Mais uma vez, não houve retenção irreversível da benzilamina e podese dizer que as interações entre o soluto e os silanóis/titanóis residuais podem ser consideradas moderadas e a FE poderia ser utilizada para separar compostos básicos em faixas de pH ácidas à neutras.

A presença de metal, no caso titânio, na superfície da sílica, o qual poderia aumentar a intensidade da interação entre a FE e compostos básicos, como a benzilamina, não afetou a retenção desse soluto básico, confirmando que o processo de imobilização térmica possibilitou a obtenção de uma FE com bom desempenho cromatográfico devido ao recobrimento da superfície do suporte pelo PMODS.

Após a reação de capeamento, há diminuição dos valores de $\alpha_{B/P(2.7)}$, com valores de 1,8 e 1,4 para as fases zirconizada e titanizada, respectivamente, confirmando a eficiência da reação de capeamento e, por consequência, a diminuição da atividade silanofílica das FE devido a melhor proteção dos grupos silanóis ou metalóis residuais.

117



Figura 70. Cromatogramas obtidos na separação da mistura D do protocolo de Tanaka, utilizando as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; fase móvel: metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹, pH 2,7, 30:70 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) benzilamina e (3) fenol.

4.8.5 Mistura teste de Neue

Os cromatogramas obtidos na separação da mistura teste de Neue estão apresentados na Figura 71.

O teste de Neue [120,121] (Tabela 14) para a FE Si-Zr(PMODS) revelou o mesmo valor (4,3) para as razões entre $k_{acenafteno}/k_{butilparabeno}$ e $k_{acenafteno}/k_{dipropilftalato}$, o que demonstra que compostos polares como butilparabeno e dipropilftalato eluem antes do composto apolar acenafteno, indicando que as interações da FE com compostos polares é baixa, porém a FE não apresentou a propriedade de separar esses dois compostos. A atividade silanofílica da FE foi avaliada pela assimetria dos compostos básicos propranolol (pKa = 9,5) e amitriptilina (pKa = 9,4), que se encontram desprotonados quando FM tamponada em pH 7,0 é utilizada. Porém, os dois compostos eluiram com picos simétricos, 1,2 e 1,1, respectivamente, similar aos resultados obtidos pelos testes anteriores, e confirmando mais uma vez que o processo de imobilização térmica do polímero foi eficiente. No entanto, os fatores de retenção destes dois compostos k_p = 10,9 e k_{am} = 38,7 indicam que há a ocorrência de interações iônicas nessa faixa de pH de FM.



Figura 71. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste de Neue, utilizando as FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento (ec). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; fase móvel: metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹ 65:35 (v/v) pH 7,0; vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos teste: (1) uracila, (2) butilparabeno, (3) dipropilftalato, (4) naftaleno, (5) acenafteno, (6) propranolol e (7) amitriptilina.

A FE Si-Ti(PMODS) (Tabela 14) não possui a capacidade de separar os compostos polares butilparabeno e dipropilftalato, pois as razões entre $k_{acenafteno}/k_{butilparabeno}$ e $k_{acenafteno}/k_{dipropilftalato}$ são de 8,2. No entanto, as interações da FE com compostos polares são baixas. Os compostos polares propanolol e amitriptilina eluiram com picos simétricos, 1,1 e 0,9, respectivamente indicando bom recobrimento polimérico para a FE. Assim como a FE Si-Zr(PMODS), os elevados fatores de retenção destes dois compostos, $k_p = 29,5$ e $k_{am} = 45,9$, indicam que há a ocorrência de interações iônicas mais intensas quando FM tamponada nessa faixa de pH é utilizada.

Os resultados do teste de Neue [120,121] para as FE capeadas (Tabela 14) indicaram que não houve alteração nos parâmetros relacionados a retenção do acenafteno, butilparabeno e dipropilftalato, medido pela razões $k_{acenafteno}/k_{butilparabeno}$ e $k_{acenafteno}/k_{dipropilftalato.}$ Porém, como já indicado anteriormente pelos testes de Tanaka e Engelhardt, houve diminuição significativa na quantidade de silanóis residuais após o capeamento, evidenciada pela diminuição do fator de retenção dos compostos básicos propanolol e amitriptilina (k_p e k_{am}).

Tabela 14. Dados obtidos para a mistura teste de Neue antes e após a reação de capeamento (ec).

FE	k _{acenafteno} /k _{butilparabeno}	k _{acenafteno} /k _{dipropilftalato}	k _p	k _{am}	\mathbf{As}_{p}	\mathbf{As}_{am}
Si–Zr(PMODS)	4,3	4,3	10,9	38,7	1,2	1,1
Si–Zr(PMODS)ec	4,0	4,0	5,8	12,6	1,0	1,0
Si-Ti(PMODS)	8,2	8,2	29,5	45,9	1,1	0,9
Si-Ti(PMODS)ec	7,9	7,9	12,9	15,7	1,0	0,9

4.8.6 Mistura SRM 870

Os cromatogramas obtidos na separação da mistura SRM 870 [122] pelas FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) estão apresentados na Figura 72.



Figura 72. Cromatogramas obtidos na separação da mistura teste SRM 870, utilizando as FE Si-Zr(PMODS) (a) e Si-Ti(PMODS) (b). Condições cromatográficas: volume de injeção: 5 μ L; fase móvel: metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹, pH 7,0, 80:20 (v/v); vazão: 0,3 mL min⁻¹; detecção a 254 nm e temperatura de 23 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) tolueno, (3) etilbenzeno, (4) quinizarina e (5) amitriptilina.

A separação da mistura SRM 870 [122] revelou que a FE Si-Zr(PMODS) (Tabela 15) apresenta certa hidrofobicidade ($k_E = 0.8$). A assimetria e o fator de alargamento (Tf) do composto quinizarina, As_Q = 2,7 e Tf_Q = 2,6, indicam alta atividade frente a quelantes. Por outro lado, o fator de assimetria e alargamento da amitriptilina (As_{AM} = 1,6 e Tf_{am} = 1,4) indicam que a FE apresenta baixa atividade silanofílica em relação à separação desse composto básico e poderia ser utilizada na separação de fármacos e seus metabólitos com estrutura semelhante a amitriptilina.

Para a FE Si-Ti(PMODS) (Tabela 15), o fator de retenção do etilbenzeno ($k_E = 1,2$) no teste SRM 870 indica que a FE apresenta hidrofobicidade inferior à fases estacionárias comerciais [157]. O fator de assimetria e o fator de alargamento e do composto quinizarina ($As_Q = 1,2$ and $Tf_Q = 1,0$) indicam que a FE apresenta baixa atividade frente quelantes. O fator de assimetria e o fator de alargamento da amitriptilina ($As_Q = 0,6$ and $Tf_Q = 1,3$) indicam, por outro lado, que a FE poderia ser aplicada na separação de compostos básicos como fármacos utilizados como antidepressivos e seus metabólitos com estrutura similar a amitriptilina, assim como a FE Si-Zr(PMODS).

A separação da mistura SRM 870 [122] após a reação de capeamento (Tabela 15), revelou que o fator de retenção do etilbenzeno (k_E) permaneceu

quase inalterado após o capeamento, sendo similar ao encontrado para FE comerciais capeadas [157]. A redução do fator de assimetria e de alargamento da quinizarina (As_Q) e (Tf_Q), após a reação de capeamento, indicam que houve redução da atividade das FE frente a presença de agentes quelantes. O fator de assimetria e alargamento da amitriptilina (As_{am}) e (Tf_{am}) indicam que após o capeamento houve redução dos grupos silanóis residuais e que as FE capeadas poderiam ser utilizadas na separação de compostos básicos com estrutura similar a esse fármaco e seus metabólitos, apresentando picos com simetria adequada.

Tabela 15. Dados obtidos para a mistura SRM 870 antes e após a reação de capeamento (ec).

FE	k _E	Asq	Tf_Q	As_{am}	Tf _{am}
Si–Zr(PMODS)	0,8	2,7	2,6	1,6	1,4
Si–Zr(PMODS)ec	0,9	2,3	2,2	1,3	1,1
Si–Ti(PMODS)	1,2	1,2	1,0	0,6	1,3
Si-Ti(PMODS)ec	1,4	1,0	0,9	1,1	1,1

4.9 Caracterização cromatográfica das FE por CFS

A seguir são apresentados os resultados e discussão dos dados referentes à caracterização cromatográfica das FE desenvolvidas nesse trabalho (item 3.6.1) e de outras FE desenvolvidas em trabalhos anteriores do LabCrom, envolvento a imobilização de polímeros polissiloxanos na superfície de sílica e de sílica modificada com zircônio e titânio empregando a CFS e o modelo dos parâmetros de solvatação. A descrição completa das FE caracterizadas está relacionada na Tabela 4.

4.9.1 Seleção dos grupos de solutos

Com o intuito de se obterem resultados significativos das regressões lineares múltiplas, o número de solutos dos testes deve ser suficientemente adequado para garantir a significância estatística dos valores calculados para cada constante. Em geral, o mínimo de quatro compostos por descritor é recomendado, uma vez que um número reduzido de solutos é fortemente influenciado pela presença de *outiliers* [107]. Dessa forma, a seleção dos solutos foi baseada em valores adequados de retenção, de acordo com a polaridade das FE estudadas. Os solutos devem apresentar diferentes propriedades físico-químicas e estruturais (presença de grupos funcionais, variados tamanhos de cadeia e diferentes configurações espaciais), ter seus descritores de Abraham [107] relacionados na literatura e apresentar detecção na faixa UV (210-260 nm).

Os solutos 1-85 selecionados para a caracterização pelo modelo dos parâmetros de solvatação (Tabela 5) foram cromatografados utilizando as colunas descritas na Tabela 4. Adicionalmente, os solutos 86-100 (compostos naftênicos) foram cromatografados utilizando a FE Si(PDMS), com o objetivo de se aumentar a precisão do modelo, uma vez que essa FE apresentou baixa retenção para os solutos benzênicos na CFS. A Figura 73 apresenta a distribuição dos valores dos descritores para os grupos de solutos utilizados. É possível observar que cada descritor cobre uma ampla faixa de valores sem a formação de agrupamentos, com exceção do descritor A, uma vez que vários solutos apresentam valor de A igual à zero.

Uma condição necessária para a aplicação do modelo considera que as variáveis utilizadas na regressão sejam independentes, ou seja, que os descritores utilizados na equação que o descreve sejam o mais ortogonais possível. Nesse sentido, correlação cruzada deve ser evitada uma vez que pode haver dificuldade de interpretação dos coeficientes obtidos, pois a regressão multilinear não apresenta a capacidade de distinguir descritores correlacionados. Dessa forma é necessário verificar se o grupo de solutos selecionados minimiza a correlação entre as variáveis. A Tabela 16 apresenta a matriz de correlação para os solutos 1-85 (Tabela 5). Pela interpretação da matriz de correlação é possível observar que a maior correlação é apresentada pelos descritores E e S (0,747) mas essa correlação é esperada, visto que o grupo de solutos é constituído de solutos aromáticos. A Figura 74 descreve a correlação entre os descritores E e S para os solutos 1-85 (Tabela 5) na qual pode ser observado que a correlação entre os descritores é altamente influenciada pelos solutos do grupo dos HPA, que atuam como "alavancas" (do



inglês *levers*), porém não há correlação significativa, pois quando os solutos são eliminados a covariância entre as duas variáveis cai para 0,582.

Figura 73. Distribuição dos valores dos descritores em relação aos solutos descritos na Tabela 5.

Variáveis	E	S	Α	В	V
E	1,000	0,747	-0,119	0,067	0,284
S	0,747	1,000	0,155	0,487	0,100
А	-0,119	0,155	1,000	0,054	-0,410
В	0,067	0,487	0,054	1,000	0,065
V	0,284	0,100	-0,410	0,065	1,000

Tabela 16. Matriz de covariância dos descritores dos solutos 1-85 (Tabela 5).





Com a aplicação da análise de componentes principais (PCA, do inglês principal component analysis) pode-se verificar se há similaridade de informações no conjunto de solutos selecionados. A ACP foi realizada utilizando os solutos 1-85, da Tabela 5, para a separação com as colunas Si(PDMS), Si(PMOS), Si-Zr(PMTDS), Si-Ti(PMODS), Si-Ti(PMODS)ec e Si-Zr(PMODS). Os dados foram centrados na média e reduzidos e o método utilizado para sua construção foi o de Pearson (n). Como pode-se observar na Figura 75, há boa distribuição dos solutos no gráfico PC1-PC2 (escores), com pequenas áreas com sobreposições. O gráfico PC1-PC2 foi capaz de explicar mais de 95 % da informação descrita por esse grupo de solutos (1-85, Tabela 5).

Com todas as informações sumarizadas anteriormente, acredita-se que o conjunto de solutos selecionados está adequado para a caracterização das FE descritas na Tabela 4, apresentando boa capacidade de prever o valor dos coeficientes *e*, *s*, *a*, *b*, e *v*, com boa precisão. Um conjunto maior ou menor de solutos poderia modificar a precisão. Em concordância com trabalhos anteriores [106,108,109], um mínimo de 50 solutos deveria ser suficiente. Dessa forma, na seleção do grupo de solutos, procurou-se esclarecer duas perguntas: que informações podem ser extraídas do conjunto de solutos selecionado e quantos solutos deveriam ser utilizados.

4.9.2 Avaliação estatística do modelo

Os coeficientes e os parâmetros estatísticos das regressões multilineares estão sumarizados na Tabela 17. A qualidade dos parâmetros estatísticos está adequada, segundo os valores do coeficiente de correlação global (R), coeficiente de correlação ajustado (R²), estimativa do erro padrão (sd), tendência à falta de ajuste e teste estatístico de Fisher (F). A significância estatística de cada coeficiente foi avaliada utilizando "*t-ratio*", o qual é definido como a razão entre o coeficiente da regressão e seu erro padrão.

Em cada uma das regressões lineares realizadas, alguns poucos *outliers* foram eliminados, uma vez que apresentaram resíduos elevados. Esses solutos foram diferentes para cada uma das 19 FE, com exceção de alguns solutos básicos. Todos os demais apresentaram retenção adequada para serem separados, inclusive para os solutos alquilbenzenos e as fases estacionárias mais polares. Variáveis independentes E, S, A, B e V consideradas não significativas com um intervalo de confiança de 95 % foram retiradas do modelo.

Os valores do coeficiente de correlação global (R) e coeficiente de correlação ajustado (R²) apresentaram boa qualidade, variando entre 0,936 e 0,987, com estimativa do erro padrão (sd) entre 0,044 e 0,098. Estes resultados podem ser considerados adequados e confirmam que o modelo dos parâmetros de solvatação pode ser utilizado para caracterização de FE preparadas por imobilização de polissiloxanos com diferentes polaridades.

Desvios dos valores experimentais para os valores previstos estão geralmente dentro das incertezas indicadas pelo modelo, mas, para alguns solutos, existe uma tendência sistemática nos dados. Pode ser atribuído ao fato de que alguns solutos apresentam menor ou maior valor de retenção daquela prevista pelo modelo ou ainda aqueles que não são bem previstos em todas as FE. Este fato pode ser observado na Figura 76, que mostra os resíduos normalizados para 15 solutos separados por FE com diferentes características (polaridade, presença de metal no suporte cromatográfico, tipo de polímero imobilizado, comprimento da cadeia polimérica), onde se pode verificar que os desvios apresentados não estão relacionados a erros experimentais, mas são devido ao limite de adequação e/ou precisão dos descritores ou ainda devido a algumas interações moleculares que não estão previstas pelo modelo dos parâmetros de solvatação como, por exemplo, as interações eletrostáticas.

Interações eletrostáticas não estão incluídas no modelo e, em alguns casos, certos compostos com caráter ácido ou básico foram excluídos da modelagem por se apresentarem como *outliers*. Mais especificamente compostos contendo nitrogênio na sua estrutura (caráter básico) apresentaram retenção excessiva e foram excluídas das regressões. Isso pode ser explicado devido ao fato de que o pH da FM subcrítica utilizada tende a ser ácida (provavelmente tem pH < 5) [158]. Neste caso, os grupos silanóis estariam parcialmente dissociados, enquanto as bases contendo nitrogênio deveriam estar na sua forma catiônica. Essas suposições podem ser confirmadas pelos elevados fatores de alargamento (TF) dos solutos básicos separados nas FE SiO₂, Si-Zr e Si-Ti quando comparadas com as FE recobertas com polímero ou com as FE capeadas, uma vez que esses óxidos apresentam maior quantidade de silanóis e/ou zirconóis e titanóis na sua estrutura (Tabela 18).



Observações (PC1 X PC2 : 95,7 %)

Figura 75. PCA dos fatores de retenção (log k) dos solutos 1-85 para as colunas Si(PDMS), Si(PMOS), Si-Zr(PMTDS), Si-Ti(PMODS), Si-Ti(PMODS)ec e Si-Zr(PMODS). Dados centrados na média e reduzidos; Método utilizado: Pearson (n).

FE	С	е	s	а	b	V	n	R	R^2	sd	F	и
SiO ₂	-1,074	0,367	-0,223	1,346	0,704	-	69	0,946	0,942	0,085	277,0	1,578
	0,027	0,029	0,061	0,053	0,084							
Si(PDMS)	-1,050	0,229	-	0,812	0,231	0,067	72	0,943	0,940	0,059	278,0	0,877
	0,027	0,010		0,035	0,037	0,017						
Si(PMOS)	-0,863	0,417	-0,213	0,570	-0,253	0,328	71	0,981	0,980	0,044	688,7	0,846
	0,022	0,015	0,031	0,028	0,043	0,013						
Si(PMTDS)	-0,950	0,458	-0,267	0,824	-	0,261	73	0,936	0,933	0,085	249,8	1,014
	0,043	0,023	0,043	0,053		0,024						
Si(PMODS)	-0,651	0,626	-0,359	0,442	-0,507	0,425	68	0,979	0,977	0,075	619,5	1,074
	0,033	0,024	0,051	0,044	0,064	0,020						
Si(PMODS)ec	-0,848	0,648	-0,250	0,738	-0,327	0,309	68	0,985	0,984	0,054	818,4	1,109
	0,027	0,021	0,043	0,036	0,054	0,016						
Si(PMODS/PDMS)	-0,559	0,449	-0,317	0,402	-0,167	0,210	68	0,960	0,957	0,054	301,3	0,732
	0,028	0,020	0,042	0,038	0,045	0,016						
Si(PDMPS)	-1,083	0,376	-0,170	0,968	0,493	0,117	65	0,968	0,965	0,055	353,3	1,168
	0,029	0,021	0,043	0,041	0,058	0,017						
Si-Ti	-1,018	0,286	-	1,289	0,665	-0,091	68	0,961	0,951	0,083	387,3	1,481
	0,041	0,014		0,049	0,052	0,025						
Si-Ti(PMTDS)	-0,898	0,515	-0,305	1,027	0,174	0,228	72	0,942	0,937	0,089	212,9	1,223
	0,045	0,032	0,065	0,061	0,078	0,026						

 Tabela 17.
 Descrição do modelo dos parâmetros de solvatação para as FE estudadas.

FE	С	е	S	а	b	V	n	R	R ²	sd	F	и
Si-Ti(PMODS)	-0,833	0,549	-0,217	0,716	-0,381	0,400	68	0,975	0,972	0,063	474,3	1,080
	0,033	0,025	0,051	0,043	0,067	0,019						
Si-Ti(PMODS)ec	-0,756	0,587	-0,270	0,264	-0,721	0,420	67	0,983	0,982	0,059	706,8	1,088
	0,032	0,020	0,038	0,038	0,050	0,018						
Si-Zr	-1,142	0,225	0,145	1,329	0,251	-	67	0,963	0,960	0,076	400,8	1,379
	0,025	0,028	0,056	0,049	0,076							
Si-Zr(PMTDS)	-0,919	0,466	-0,089	1,069	-0,696	0.428	69	0.987	0.986	0.048	949.3	1.427
	0,024	0,032	0,039	0,034	0,051	0.014						
Si-Zr(PMODS)	-0,815	0,566	-0,250	1,052	-0,535	0,425	71	0,980	0,978	0,059	624,5	1,399
	0,030	0,030	0,043	0,038	0,054	0,017						
Si-Zr(PMODS)ec	-0,904	0,527	-0,178	0,758	-0,783	0,471	72	0,978	0,977	0,064	597,4	1,311
	0,033	0,023	0,046	0,040	0,056	0,019						
Si-Zr(PDMPS)	-1,001	0,285	0,106	1,163	-	0,153	71	0,975	0,973	0,057	639,4	1,219
	0,028	0,016	0,028	0,036		0,017						
Si-Zr(ODS)ec	-1,104	0,658	-0,257	0,961	-0,599	0,441	70	0,977	0,976	0,073	552,3	1,406
	0,038	0,027	0,053	0,047	0,063	0,022						
Kromasil C18ec	-1,072	0,543	-0,205	-0,408	-0,754	0,473	79	0,964	0,962	0,098	392,2	1,138
	0,048	0,031	0,063	0,061	0,072	0,028						

Tabela 17 (Continuação)

Números em *itálico*: incerteza (com 95 % de confiança); **n**: número de solutos considerados na regressão; **R**: coeficiente de correlação; \mathbf{R}^2 : coeficente de correlação ajustado; **sd**: estimativa do erro padrão; **F**: teste estatístico de Fisher; **u**: comprimento do vetor de solvatação.



Figura 76. Gráfico dos resíduos normalizados calculados para 15 solutos representativos separados nas FE SiO₂, Si(PMOS), Si(PDMPS), Si-Ti(PMTDS) e Si-Zr(PMODS)ec.

Tabela	18. T	empos	de	retenção) (t _R ,	min)	e f	ator	de	alarga	me	ento (T	F)	para
alguns :	solutos	básico	s co	ontendo	nitrog	gênio	na	sua	est	rutura	е	alguns	sol	utos
contend	lo oxigé	ènio na	sua	estrutura	a.									

FE	Cafe	eína	Inda	zol	Cark	azol	1-Fen	iletanol	Álcool	ol Benzílico	
	t _R	Tf	t _R	Tf	t _R	Tf	t _R	Tf	t _R	Tf	
SiO ₂	2,1	2,4	2,2	2,3	1,2	1,8	0,6	1,9	1,0	1,8	
Si(PMTDS)	3,7	0,7	3,8	0,7	2,1	0,7	1,6	0,7	1,8	0,7	
Si(PMODS)ec	1,5	1,4	1,9	1,6	6,4	1,8	1,3	1,6	1,4	1,6	
Si(PMODS/PDMS)	2,6	0,9	1,7	0,8	1,6	0,8	1,1	0,8	1,2	0,8	
Si(PDMFS)	4,1	1,6	1,1	0,9	1,8	1,3	1,2	1,0	2,0	1,3	
Si-Ti	2,1	2,6	2,2	2,4	1,2	1,8	0,5	1,8	1,00	1,7	
Si-Ti(PMTDS)	3,7	0,8	1,3	0,7	2,5	0,8	1,7	0,7	1,7	0,8	
Si-Zr	2,1	2,8	2,2	2,5	1,2	1,6	0,6	1,7	1,0	1,4	
Si-Zr(PDMFS)	2,6	1,4	1,1	0,8	1,1	0,8	1,5	1,0	1,7	1,0	
Si-Zr(ODS)ec	1,8	1,7	1,1	1,1	2,6	1,1	1,2	0,8	1,2	1,3	
Kromasil C18ec	0,8	1,8	0,9	1,3	1,2	1,4	1,0	1,1	0,8	0,9	

4.9.3 Interpretação dos coeficientes

Todos os coeficientes se apresentaram como valores suficientemente mais altos que a suas incertezas, exceto para o coeficiente *s* das FE Si(PDMS) e Si-Ti, o coeficiente *b* das FE Si(PMTDS) e Si-Zr(PDMPS) e o coeficiente *v* das FE SiO₂ e Si-Zr. Estes que foram removidos do modelo, pois não foram estatisticamente significativos num nível de confiança de 95 % (Tabela 17).

Para um sistema cromatográfico com FM não aquosa e para FE tipo octadecil, como Kromasil C18, os coeficientes *e* e *v* são positivos, enquanto todos os outros são negativos (*s*, *a* e *b*) [104,106]. O valor do coeficiente *e* expressa a tendência da FE de interagir com solutos que apresentam pares de elétrons π e n. Todas FE estudadas apresentam *e* positivo, o que indica que essas interações são mais intensas com a FE (Figura 77). Isto pode ser explicado pelo fato dos solutos serem constituídos por compostos aromáticos e seus valores são mais altos para as FE apolares do que para as FE polares (SiO₂, Si-Zr e Si-Ti). Outra informação interessante se deve a relação linear entre o aumento da cadeia alquila e os valores de *e*, como pode ser visto na Figura 78.

O coeficiente *s* expressa a tendência da FE em interagir com solutos dipolares e/ou polarizáveis. A Figura 79 mostra que as regressões lineares revelaram *s* negativos para todas as FE com exceção das fases de caráter mais polar, Si-Zr e Si-Zr(PDMPS). A FE de sílica titanizada, Si-Ti, e a fase fenil não metalizada, Si(PDMPS), apresentaram valores de *s* não significativos e por isso foram retiradas do modelo. Valores negativos do coeficiente *s* indicam que as interações do tipo dipolo-dipolo são mais favoráveis de ocorrer entre solutos e FM, se a FE tem caráter mais apolar, e valores não significativos de *s* não informam se essas interações (dipolo-dipolo e dipolo-induzido) não ocorrem, mas que essas interações são igualmente distribuídas entre soluto e FE e soluto e FM.

É interessante notar que os valores dos coeficientes *e* e *s* estão correlacionados de forma complementar, o que significa que parte da informação descrita pelo coeficiente *e* também aparece no coeficiente *s*, uma vez que os dois coeficientes representam propriedades de interação similares, como mostrado na Figura 80.



Figura 77. Distribuição dos valores do coeficiente *e* para as FE estudadas com as suas incertezas (nível de confiança de 95 %).







Figura 80. Distribuição dos valores dos coeficientes e e s para as FE



Figura 79. Distribuição dos valores do coeficiente s para as FE estudadas com as suas incertezas (nível de confiança de 95 %). -0,4

0,7 0,6

s O



O coeficiente *a* expressa a capacidade da FE interagir com compostos que apresentaram caráter ácido. Todas as FE estudadas apresentam coeficiente *a* positivo, exceto a FE Kromasil C18 (Figura 81). Os valores mais altos podem ser encontrados para as FE mais polares. No entanto, pode-se inferir que as FE, com exceção da FE Kromasil C18, ainda apresentam certo "caráter polar", quando comparadas com FE do tipo alquila [106]. No entanto, esse caráter polar não prejudicou o desempenho das FE na separação de compostos contendo oxigênio na sua estrutura, com capacidade de realizar ligações de hidrogênio, como 1-feniletanol ou álcool benzílico, uma vez que esses compostos apresentaram picos cromatográficos sem fator de alargamento (Tabela 18). Para os suportes cromatográficos, os valores encontrados são similares a FE com grupo amida embutido, os quais interagem fortemente com solutos ácidos [106].



Figura 81. Distribuição dos valores do coeficiente *a* para as FE estudadas com as suas incertezas (nível de confiança de 95 %).

O coeficiente *b* é uma medida da capacidade da FE de interagir com solutos básicos por meio de ligações de hidrogênio. Para as FE estudadas, todos os valores de *b* são negativos, enquanto que para os suportes, os valores encontrados são positivos, uma vez que, com o processo de imobilização do PMODS, há redução significativa na quantidade de grupos silanóis e/ou zirconóis e titanóis (Figura 82). É possível observar, por outro lado, que após o capeamento, há diminuição dos valores de *b*, relacionado à efetividade da reação de capeamento, confirmando os resultados obtidos através da caracterização utilizando CLAE [129].



Figura 82. Distribuição dos valores do coeficiente *b* para as FE estudadas com as suas incertezas (nível de confiança de 95 %).

O coeficiente v expressa interações por forças dispersivas. Se seu valor é positivo, há combinação de forças de dispersão exógenas ou forças de dispersão endógenas se seu valor é negativo e representam somente interações dos solutos com a FE, visto que a FM utilizada não apresenta efeitos de interação em cavidade, pois as forças de coesão na mistura CO_2 :MeOH 90:10 (v/v) subcrítica é baixa e negligenciável. Todas as FE estudadas apresentaram valores de *v* positivos, com exceção da FE Si-Ti, sendo que fases apolares (com grupos alquila na sua estrutura) e fases moderadamente polares (com grupos aromáticos na sua estrutura) apresentaram maiores valores (Figura 83). Dessa forma, esse coeficiente pode ser utilizado para determinar a hidrofobicidade das FE. A Figura 84 evidencia esses resultados, uma vez que, à medida que os valores de *v* e do tamanho da cadeia alquila do polímero aumentam, maior é a seletividade da FE para separar uma mistura de alquilbenzenos lineares ($n-C_{11}$ até $n-C_{15}$). FE obtidas pela imobilização de polissiloxanos (do tipo fenil: Si(PDMPS), C1: Si(PDMS), C8: Si(PMOS) e C14: Si(PMTDS)) e a fase estacionária de sílica titanizada (Si-Ti) foram utilizadas para efeito de comparação.



Figura 83. Distribuição dos valores do coeficiente *v* para as FE estudadas com as suas incertezas (nível de confiança de 95 %).



Figura 84. Cromatogramas obtidos na separação de uma mistura de alquilbenzenos (n-C₁₁ até n-C₁₅). FM: CO₂:MeOH (90:10, v/v); temperatura: 25 °C; pressão de saída: 150 bar; vazão: 3 mL/min e detecção: 210 nm. FE:Si-Ti, Si(PDMPS); Si(PDMS); Si(PMOS); Si(PMTDS) e Si(PMODS).

Relacionando os valores do coeficiente *v* com os resultados obtidos pela caracterização física (% de cabono), pode-se observar que a melhor correlação é obtida para as FE titanizadas (Figura 85). No entanto, é de se esperar que a relação entre o coeficiente *v e* espessura de filme, (τ , nm) (Figura 86) revele informações similares, uma vez que se utiliza a porcentagem (%) de carbono para se calcular a espessura de filme, o que é evidenciado quando se relaciona esses dois parâmetros (Figura 87).



Figura 85. Correlação entre o coeficiente *v* e o % de carbono. (\blacktriangle) representam FE não metalizadas; (\bullet) representam FE titanizadas e (\blacklozenge) representam FE zirconizadas.

A relação entre o fator de retenção do butilbenzeno (k_{PB}), obtida pelo teste de Tanaka, e o coeficiente *v* indicou que há uma boa correlação ($R^2 > 0,9$) entre os dois parâmetros, porém essa boa correlação só ocorre para as FE metalizadas (Figura 88).



Figura 86. Correlação entre o coeficiente v e os valores de espessura de camada polimérica (τ , nm). (\blacktriangle) representam FE não metalizadas; (\bullet) representam FE titanizadas e (\blacklozenge) representam FE zirconizadas.







Figura 88. Correlação entre k_{PB} obtido pelo teste de Tanaka o coeficiente *v*. (\blacktriangle) representam FE não metalizadas; (\bullet) representam FE titanizadas e (\blacklozenge) representam FE zirconizadas.

4.9.4 Interpretação gráfica dos dados

A Figura 89 mostra o diagrama do "tipo aranha" para todas as FE caracterizadas, onde o tamanho de cada bolha está relacionado ao tamanho do vetor *u* (Tabela 17). A FE quimicamente ligada e capeada Kromasil C18 (KrC18ec) está posicionada mais distante das demais FE. É possível observar também:

- O diagrama apresenta duas regiões distintas: uma região com FE que apresentam maiores valores do coeficiente e, sendo consideradas fases mais apolares e outra região na direção quase oposta onde se encontram as FE mais polares e que apresentam maiores valores dos coeficientes a e b.
- Uma região (flecha vermelha) onde se pode encontrar os maiores valores do coeficiente e, caracterizando FE mais retentivas.
- Uma região (flecha azul) onde estão localizadas as FE capeadas que resultam em menores valores de *b* e, consequentemente, são fases que apresentam maior simetria de pico na separação de compostos básicos.

- Uma região (flecha verde) onde estão localizadas as FE sem recobrimento polimérico e as FE tipo fenil e, consequentemente, são fases que apresentam menor simetria de pico na separação de compostos básicos.
- Pode-se verificar também a sugestão de três linhas quase verticais e paralelas representando a tendência de alinhamento entre as FE não metalizadas, zirconizadas e titanizadas, que caracterizam três diferentes grupos: cada tipo de metalização ou a sua ausência.
- A distribuição das FE em regiões específicas permite selecionar uma coluna cromatográfica mais adequada para uma determinada aplicação, baseada nas propriedades das FE assim distribuídas: fases mais ou menos polares, mais ou menos retentivas, com maior seletividade, melhor simetria de pico para compostos básicos, etc.



Figura 89. Diagrama do "tipo aranha" para o espaço de cinco dimensões representando os coeficientes *e*, *s*, *a*, *b* e *v* para as FE estudadas obtidos pelo modelo dos parâmetros de solvatação. Bolhas em rosa indicam FE sem metalização; bolhas em azul indicam FE titanizadas e bolhas em verde indicam FE zirconizadas. A identificação completa das FE encontra-se na Tabela 4.

4.10 Avaliação da estabilidade química das FE

As fases estacionárias otimizadas, Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) e suas respectivas fases capeadas foram submetidas a passagem de fase móvel MeOH:0,05 mol/L K₂CO₃/KHCO₃, pH 10, 70:30 (v/v), a uma vazão de 0,5 mL/min, na temperatura de 50 °C. Os desempenhos cromatográficos das fases estacionárias metalizadas foram comparados ao de uma fase estacionária obtida pela imobilização térmica do polímero PMODS em sílica nua, Si(PMODS), utilizando as mesmas condições de imobilização (16 h e 120 °C).

A estabilidade das colunas cromatográficas foi avaliada em termos dos parâmetros cromatográficos: eficiência, assimetria e fator de retenção, para o soluto acenafteno, sendo o volume de fase móvel que passou pela coluna, expresso em termos do volume de coluna (V_c), calculado para o composto não retido uracila, que foi 0,66 mL para a FE titanizada e 0,57 mL para a FE zirconizada. Pode-se perceber, ao analisar as Figuras 90a e 91a, que as fases estacionárias Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) apresentaram estabilidade química superior a FE Si(PMODS), o que indica que a presença de metal no suporte cromatográfico aumentou a vida útil das FE quando FM alcalinas são utilizadas. O número de volumes de coluna foi superior ao encontrado para FE comerciais [159] e similar a FE baseada em Si-Zr com o polissiloxano C14 imobilizado [132]. A FE titanizada apresentou desempenho ligeiramente melhor do que a FE Si(PMODS). A FE zirconizada apresentou desempenho superior, com perda de estabilidade somente após a passagem de mais de 1200 volumes de coluna.

O fator de assimetria das FE testadas aumenta com a perda da eficiência (Figuras 90b e 91b). Os valores do fator de retenção permanecem quase inalterados durante os testes, indicando que as cadeias alquila do polímero não foram hidrolisadas. A percentagem de carbono antes e após a realização do teste de estabilidade em condições alcalinas permaneceu praticamente constante, o que comprova que a perda da eficiência está relacionada à dissolução da sílica.

Os resultados do teste de estabilidade frente à fase móvel alcalina (MeOH/0,050 mol/L K₂CO₃/KHCO₃, pH10, 70:30, v/v) na temperatura de 50 $^{\circ}$ C para as FE capeadas, utilizando como soluto o acenafteno, mostrou que após a

143



Figura 90. Teste de estabilidade da FE Si-Zr(PMODS) antes e após a reação de capeamento em termos de eficiência (a) e fator de assimetria (b). Fase móvel: metanol:0,05 mol/L K₂CO₃/KHCO₃, pH 10, vazão 0,5 mL/min; volume de injeção: 5 μ L; temperatura: 50 °C; detecção: 254 nm; soluto teste: acenafteno. A estabilidade da FE Si(PMODS) é mostrada para efeito de comparação.



Figura 91. Teste de estabilidade da FE Si-Ti(PMODS) antes e após a reação de capeamento em termos de eficiência (a) e fator de assimetria (b). Fase móvel: metanol:0,05 mol/L K₂CO₃/KHCO₃, pH 10, vazão 0,5 mL/min; volume de injeção: 5 μ L; temperatura: 50 °C; detecção: 254 nm; soluto teste: acenafteno. A estabilidade da FE Si(PMODS) é mostrada para efeito de comparação.

reação de capeamento houve um considerável aumento na estabilidade química em termos de eficiência. A FE Si-Zr(PMODS)ec permaneceu estável até mais de 1700 volumes de coluna (Vc=0,57 mL) (Figura 90a), enquanto a

FE Si-Ti(PMODS)ec resistiu a mais de 1500 volumes de coluna (Vc=0,66 mL) (Figura 91a), o que representou um aumento de estabilidade em de 150 % para a FE zirconizada e 155 % para a FE titanizada. Esse fato pode ser explicado pela presença dos grupos trimetilsilil na estrutura das FE capeadas, que reduziu significativamente o número de hidroxilas residuais, diminuindo assim a dissolução dos suportes. Em relação ao fator de assimetria do acenafteno, foi possível verificar alteração significativa do fator de assimetria após a passagem de mais de 1500 volumes de coluna para a fase zirconizada (Figura 90b) e após 1400 volumes de coluna para a fase titanizada (Figura 91b). Como esperado, não houve variação significativa do fator de retenção do acenafteno (Figura 92), para nenhuma das FE estudadas.



Figura 92. Teste de estabilidade da FE Si-Zr(PMODS) (a) e Si-Ti(PMODS) (b) antes e após a reação de capeamento em termos do fator de retenção. Fase móvel: metanol:0,05 mol/L K₂CO₃/KHCO₃, pH 10, vazão 0,5 mL/min; volume de injeção: 5 μ L; temperatura: 50 °C; detecção: 254 nm; soluto teste: acenafteno.

Assim, a reação de capeamento representa uma importante etapa para o aumento da estabilidade química das FE metalizadas. Esses resultados podem ser comparados com a estabilidade química de fases comerciais do tipo C18 [36,159,160], na qual a estabilidade química das FE capeadas pode ser consideradas similares ou superiores às FE comerciais do tipo C18.

A estabilidade das FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) em fase móvel ácida (metanol: 0,2 % ácido trifluoroacético) (50:50, v/v) pH 1,7 foi realizada até a passagem de mais de 10.000 volumes de coluna para a FE Si-Zr(PMODS)
$(V_c = 0,57 \text{ mL})$ e mais de 8.000 volumes de coluna ($V_c = 0,55 \text{ mL}$) para a FE Si-Ti(PMODS) a uma temperatura de 50 ^oC. Não ocorreu variação significativa nos valores de eficiência e assimetria do soluto básico amtriptilina, porém o fator de retenção apresentou queda de 27 % para a FE Si-Zr(PMODS) e 18 % para a FE Si-Ti(PMODS), enquanto que a FE Si(PMODS) apresentou queda de eficiência de 20 % (Figura 93). A ótima estabilidade de ambas as fases estacionárias em pH ácido, mesmo quando altas temperaturas são aplicadas, pode ser explicada pelo fato de que a ligação Si-C nas FE é mais estável do que nas FE comerciais devido ao impedimento estérico obtido pela imobilização do polímero [127,161].



Figura 93. Teste de estabilidade da FE Si-Zr(PMODS) (a) e Si-Ti(PMODS) (b) em termos do fator de retenção. Fase móvel: metanol: 0,2 % ácido trifluoroacético) (50:50, v/v) pH 1,7, vazão 0,5 mL/min; volume de injeção: 5 µL; temperatura: 50 °C; detecção: 254 nm; soluto teste: amitriptilina.

4.11 Avaliação da aplicabilidade das FE otimizadas

4.11.1 Aplicabilidade em CLAE-FR

Separação de xantinas

A Figura 94 mostra a separação da mistura das três metilxantinas estudadas (teobromina, teofilina e cafeína) pela FE Si-Zr(PMODS) e na FE comercial tipo C18 capeada utilizada para comparação, com eluição por gradiente. Pode- se observar na Figura 94a que, apesar da utilização de uma coluna com dimensões reduzidas, ocorreu separação adequada dos picos

cromatográficos, com boa resolução e simetria. Entretanto, como mostrado na Figura 94b, a FE comercial também pode separar a mistura de metilxantinas em picos com boa resolução e num tempo reduzido de análise. Esses resultados sugerem que a FE Si-Zr(PMODS) poderia ser utilizada na separação desses compostos como uma alternativa à FE comerciais.

Separação de filtros ultravioleta (UV)

A cromatografia líquida de alta eficiência é utilizada na separação de filtros UV presentes em cosméticos como protetores solares, cremes, loções e outras formulações. A Figura 95 mostra a separação obtida na FE Si-Zr(PMODS) de cinco filtros UV amplamente utilizados. O uso de uma coluna cromatográfica com dimensões reduzidas (60 mm x 3,9 mm) (Figura 95a) não prejudicou a separação dos compostos em modo isocrático, sem a necessidade do uso de tampão (FM: MeOH: H₂O (80:20, v/v)). A separação apresentou boa resolução, num tempo relativamente rápido, com desempenho superior quando comparada com uma coluna C18 comercial (Figura 95b).



Figura 94. Cromatogramas obtidos na separação de três metilxantinas em: (a) FE Si-Zr(PMODS) (60 mm x 3,9 mm, 5 μ m) e (b) FE C18 comercial (150 mm x 3,9 mm, 4 μ m). Eluição por gradiente. Fase móvel: A: metanol: H₂O e B: MeOH: H₂O (70:30,v/v). A concentração do solvente B foi linearmente aumentado na proporção de 30 % até 70 % a uma vazão de 0,3 mL/min em (a) e 1,0 mL/min em (b). Volume de injeção: 5 μ L; temperatura: 30 °C; detecção: 275 nm. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) teobromina, (3) teofilina e (4) cafeína.



Figura 95. Cromatogramas obtidos na separação de filtros UV na FE Si– Zr(PMODS) (60 mm x 3,9 mm, 5 μ m) (a) e na FE C-18 comercial (150 mm x 3,9 mm, 4 μ m) (b). Fase móvel: MeOH: H₂O (80:20, v/v), 0,3 mL/min, para (a) e 1,0 mL/min para (b), volume de injeção: 5 μ L, detecção: 288 nm, temperatura: 25 °C. Identificação dos picos: (1) uracila, (2) ácido fenilbenzilimidazol sulfônico, (3) benzofenona-3 (2-hidróxi-4-metoxi-benzofenona), (4) 4-metilbenzilideno cânfora, (5) octocrileno (2-etilexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato, (6) octilmetoxicinamato, e (*) produto de degradação.

Separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)

A Figura 96 compara a separação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (naftaleno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoranteno e pireno) na coluna recheada com FE Si-Ti(PMODS) e utilizando uma coluna C18 comercial através do modo de eluição por gradiente. Nessa separação, pode-se perceber que, apesar do uso de uma coluna cromatográfica de dimensões reduzidas (Figura 96a), obteve-se uma separação com boa resolução e picos razoavelmente simétricos, comparável a coluna C18 comercial (Figura 96b).



Figura 96. Cromatogramas obtidos naa separação de seis HPA em: (a) FE Si-Ti(PMODS) (60 mm x 3,9 mm, 5 µm) e (b) FE C18 comercial (150 mm x 3,9 mm, 4 µm). Eluição por gradiente. Fase móvel: A: MeOH: H₂O (70:30, v/v) e B: acetonitrila. A concentração do solvente B foi linearmente aumentada na proporção de 5 % até 70 % a uma vazão de 1,0 mL/min em (a) e 1,2 mL/min em (b). Volume de injeção: 5 µL; temperatura: 23 °C; detecção: 254 nm. Identificação dos picos: (1) naftaleno, (2) acenafteno, (3) fenantreno, (4) antraceno, (5) fluoranteno e (6) pireno.

Separação de fármacos psicoativos

A Figura 97 mostra a separação de quatro fármacos utilizados como drogas de efeito psicotrópico: diazepam, amitriptilina, nortriptilina e fluoxetina, frequentemente envolvidas em análises clínicas e forenses. Apesar do uso de colunas cromatográficas com dimensões reduzidas (60 mm x 3,9 mm) (Figura 97a e 97b) foi possível realizar a separação em modo isocrático utilizando como fase móvel uma mistura de metanol: 0,020 mol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 7,5, 80:20 (v/v). A separação dos compostos apresentou boa resolução e tempo de análise razoável, com picos simétricos quando comparados com uma coluna C18 comercial (Figura 97e).

As áreas de bioanalítica requerem o uso de FE que separam compostos com picos simétricos e com alta eficiência para análises quantitativas. É possível observar que as FE capeadas (Figura 97c e 97d) diferentes fatores de retenção, e principalmente separaram os analitos com picos mais simétricos quando comparados com as FE não capeadas (Figura 97a e 97b).



Figura 97. Cromatogramas obtidos na separação de quatro fármacos utilizados como fármacos psicoativos: (a) FE Si-Zr(PMODS), (b) FE Si-Ti(PMODS), (c) FE Si-Zr(PMODS)ec, (d) FE Si-Ti(PMODS)ec e (e) FE C18 comercial (150 mm x 3.9 mm, 4 μ m). Eluição isocrática. Fase móvel: metanol: 0,020 mol/L K₂HPO₄/KH₂PO₄ 80:20 (v/v), pH 7,5 a uma vazão de 0,8 mL/min em (a-d) e 1,2 mL/min em (e). Volume de injeção: 5 μ L; temperatura: 23 °C; detecção em 220 nm. Identificação dos picos: (1) diazepam, (2) amitriptilina, (3) fluoxetina e (4) nortriptilina.

A melhora no fator de assimetria está relacionada diretamente com o processo de capeamento, sugerindo que as FE capeadas apresentam grande potencialidade para serem aplicadas na separação de fármacos com características básicas e confirmam que a quantidade de silanóis e/ou zirconóis e titanóis foi significativamente reduzida.

4.11.2 Aplicabilidade em CFS

As FE Si-Zr(PMODS) e Si-Ti(PMODS) otimizadas com e sem capeamento e outras fases estacionárias baseadas em polissiloxanos preparadas anteriormente por outros trabalhos do LabCrom (Tabela 4) foram aplicadas para separação de três grupos de fármacos: benzodiazepínicos (oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila), barbitúricos (hexobarbital, secobarbital, fenobarbital, metilfenobarbital e 3-metil-5-fenil-hidantoína), anti-inflamatórios não esteroides: ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, suprofeno e indoprofeno e filtros UV químicos (2-etil-hexil salicilato (ES), benzofenona-3 (BZ3), metoxinamato de octila (EMC), octocrileno (OCR), butilmetoxidibenzoilmetano (BDM), etilexil triazona (ET), bis-etilexiloxifenol (EMT), drometrizol trissiloxano (DMTS)) utilizando CFS. A aplicabilidade em CFS foi realizada comparando-se três diferentes características das FE:

- Efeito do comprimento da cadeia alquila;
- Efeito da presença de metal na estrutura;
- Presença ou ausência de capeamento.

Separação de benzodiazepínicos

A separação da mistura de cinco benzodiazepínicos (oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila) utilizando as FE SiO₂, Si(PDMS), Si(PMOS), Si(PMTDS), Si(PMODS) e KrC18ec está mostrada na Figura 98, onde foi avaliado o efeito do tamanho da cadeia alquila. É possível perceber que todas as FE apresentam diferentes ordens de eluição, sendo que as fases mais seletivas são Si(PDMS) e Si(PMOS). No entanto, a FE Si(PMOS)

apresentou melhor desempenho cromatográfico em relação ao parâmetro fator de alargamento (TF) (Tabela 19).



Figura 98. Cromatogramas obtidos na separação de cinco benzodiazepínicos: oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila, por CFS, utilizando as FE KrC18ec (a), SiO₂ (b), Si(PDMS) (c), Si(PMOS) (d), Si(PMTDS) (e) e Si(PMODS)(f). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min .Volume de injeção: 20 μ L; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.

FE	Оха	Lor	Loflazepato	Diaz	Cloraz	
	TF	TF	TF	TF	TF	CS
SiO ₂	ns	2,3	2,0	1,2	2,8	4
Si(PDMS)	2,3	2,3	0,9	0,9	0,9	3
Si(PMOS)	1,1	1,1	1,2	0,9	0,8	3
Si(PMTDS)	3,5	3,8	0,7	0,6	0,8	3
Si(PMODS)	0,9	1,2	0,9	0,9	0,9	2
Si(PDMPS)	3,3	4,6	1,4	1,1	1,5	3
Si-Zr(PDMPS)	3,0	4,2	1,2	1,1	1,5	3
Si-Ti(PMODS)	1,9	2,1	1,2	1,6	3,8	2
Si-Ti(PMODS)ec	2,1	2,3	1,3	1,3	3,5	2
Kromasil C18ec	1,2	1,2	1,5	0,8	0,9	2

Tabela 19. Fator de alargamento (TF) para os cinco benzodiazepínicos: oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila separados por CFS.

Oxa: oxazepam; Lor: lorazepam; Loflazepato: loflazepato de etila; Diaz: diazepam; Cloraz: clorazepam; ns: não separado; cs: compostos separados.

Em relação ao efeito da metalização, avaliada para as FE tipo fenil Si(PDMPS) e Si-Zr(PDMPS) (Figura 99) pode-se verificar que quase não há mudança em relação ao perfil de separação cromatográfica, com praticamente a mesma seletividade para ambas as FE. O fator de alargamento (TF) apresentou melhores resultados para a FE zirconizada (Tabela 19).



Figura 99. Cromatogramas obtidos na separação de cinco benzodiazepínicos: oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila, por CFS, utilizando as FE Si(PDMPS) (a) e Si-Zr(PDMPS)(b). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min. Volume de injeção: 20 µL; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.

A utilização de FE capeada e não capeada mostrou diferentes seletividades na separação dos benzodiazepínicos (Figura 100) e o fator de alargamento (TF) também permaneceu quase inalterado (Tabela 19).



Figura 100. Cromatogramas obtidos na separação de cinco benzodiazepínicos: oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila, por CFS, utilizando as FE Si-Ti(PMODS) (a) e Si-Ti(PMODS)ec (b). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min .Volume de injeção: 20 μ L; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.

Separação de barbitúricos

A Figura 101 mostra a separação de uma mistura de cinco barbitúricos (hexobarbital, secobarbital, fenobarbital, metilfenobarbital e 3-metil-5-fenilhidantoína) utilizando as FE SiO₂, Si(PDMS), Si(PMOS), Si(PMTDS), Si(PMODS) e KrC18ec. O tamanho da cadeia alquila não influenciou a ordem de eluição dos compostos, porém as diferentes FE apresentaram diferentes fatores de retenção. A FE Si(PDMS) apresentou melhor desempenho cromatográfico (Tabela 20) ao separar o maior número de compostos e por apresentarem melhores resultados para o parâmetro cromatográfico fator de alargamento (TF). Todas as FE apresentaram desempenho superior quando comparada a FE comercial.



(e)

(f)

Figura 101. Cromatogramas obtidos na separação de cinco barbitúricos: hexobarbital, secobarbital, fenobarbital, metilfenobarbital e 3-metil-5-fenil-hidantoína, por CFS, utilizando as FE KrC18ec (a), SiO₂ (b), Si(PDMS)(c), Si(PMOS) (d), Si(PMTDS) (e) e Si(PMODS)(f). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min .Volume de injeção: 20 μ L; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.

FE	Feno	Seco	Metilfenilb	Hexo	3-MFH	
	TF	TF	TF	TF	TF	CS
SiO ₂	2,5	1,7	1,7	1,6	2,0	2
Si(PDMS)	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	3
Si(PMOS)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	2
Si(PMTDS)	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	3
Si(PMODS)	1,5	1,0	1,0	0,9	1,0	2
Si(PDMPS)	1,6	1,6	1,5	1,3	1,4	2
Si-Zr(PDMPS)	1,2	1,2	1,2	1,3	1,4	2
Si-Ti(PMODS)	1,2	1,0	1,1	1,1	2,9	2
Si-Ti(PMODS)ec	1,2	1,1	1,6	1,1	2,4	2
Kromasil C18ec	ns	ns	ns	ns	ns	0

Tabela 20. Fator de alargamento (TF) para os cinco benzodiazepínicos: oxazepam, lorazepam, diazepam, clorazepato e loflazepato de etila separados por CFS.

Feno: fenilbarbital; Seco: secobarbital; Metilfenilb: metilfenilbarbital; Hexo: hexobarbital; 3-MFH: 3-metil-5-fenil-hidantoína; ns: não separado cs: compostos separados.

O efeito da metalização foi avaliado para as FE do tipo fenil Si(PDMPS) e Si-Zr(PDMPS) (Figura 102), onde foi possível verificar que a FE não metalizada mostrou melhor desempenho de separação, porém a FE metalizada apresentou com picos cromatográficos com menor fator de alargamento (TF) (Tabela 20).



(a)

(b)

Figura 102. Cromatogramas obtidos na separação de cinco barbitúricos: hexobarbital, secobarbital, fenobarbital, metilfenobarbital e 3-metil-5-fenil-hidantoína, por CFS, utilizando as FE Si(PDMPS) (a) e Si-Zr (PDMPS) (b). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min .Volume de injeção: 20 μ L; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.

O desempenho da FE Si-Ti(PMODS) não capeada foi melhor quando comparada a FE capeada (Figura 103) em relação ao fator de alargamento (TF) (Tabela 20).



(a)

(b)

Figura 103. Cromatogramas obtidos na separação de cinco barbitúricos: hexobarbital, secobarbital, fenobarbital, metilfenobarbital e 3-metil-5-fenil-hidantoína, por CFS, utilizando as FE Si-Ti(PMODS) (a) e Si-Ti(PMODS)ec (b). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min .Volume de injeção: 20 μ L; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.

Separação de anti-inflamatórios não esteroides

A separação da mistura de seis anti-inflamatórios não esteroides (ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, suprofeno e indoprofeno) utilizando as FE SiO₂, Si(PDMS), Si(PMOS), Si(PMTDS), Si(PMODS) e KrC18ec está mostrada na Figura 104. Todas as FE apresentaram a mesma ordem de eluição, sendo que as fases mais seletivas são Si(PMOS) e Si(PMODS). A FE Si(PMOS) apresentou melhor desempenho cromatográfico em relação ao parâmetro fator de alargamento (TF) e ao número de compostos separados (Tabela 21).

Em relação ao efeito da metalização, avaliada para as FE tipo fenil Si(PDMPS) e Si-Zr(PDMPS) pode-se perceber que a FE não metalizada apresentou melhor separação cromatográfica (Tabela 21). A presença de metal, nesse caso zircônio, alterou completamente o perfil de separação, piorando o desempenho cromatográfico. O mesmo ocorreu em relação à metalização com titânio utilizada para verificar o desempenho das FE SiTi(PMODS) antes e após a reação de capeamento (Tabela 21). Os cromatogramas das separações utilizando as FE Si(PDMPS) e Si-Ti(PMODS) estão mostrados nas Figuras 105a e 105 b, respectivamente.



Figura 104. Cromatogramas obtidos na separação de seis anti-inflamatórios não esteroides: ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, suprofeno e indoprofeno, por CFS, utilizando as FE KrC18ec (a), SiO₂ (b), Si(PDMS) (c), Si(PMOS) (d), Si(PMTDS) (e) e Si(PMODS) (f). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min .Volume de injeção: 20 μ L; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.

FE	lbup	Indop	Cetop	Suprof	Fenop	Flurbip	
	TF	TF	TF	TF	TF	TF	CS
SiO ₂	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0
Si(PDMS)	1,4	2,0	1,7	1,9	1,8	2,1	4
Si(PMOS)	0,9	1,1	1,0	1,1	1,0	0,9	5
Si(PMTDS)	1,5	2,8	1,0	1,0	0,8	1,8	1
Si(PMODS)	0,9	1,0	1,0	1,0	0,8	0,7	3
Si(PDMPS)	1,9	2,7	2,0	2,6	2,3	2,3	4
Si-Zr(PDMPS)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0
Si-Ti(PMODS)	3,0	2,2	ns	ns	ns	ns	2
Si-Ti(PMODS)ec	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0
Kromasil C18ec	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0

Tabela 21. Fator de alargamento (TF) para os anti-inflamatórios não esteroides: ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, suprofeno e indoprofeno separados por CFS.

Ibup: ibuprofeno; Indop: indoprofeno; Ceto: cetoprofeno; Suprof: suprofeno, Fenop: fenoprofeno; Flurbip: flurbiprofeno; ns: não separado, cs: compostos separados.



Figura 105. Cromatogramas obtidos na separação de seis anti-inflamatórios não esteroides: ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, cetoprofeno, suprofeno e indoprofeno e 3-metil-5-fenil-hidantoína, por CFS, utilizando as FE Si(PDMPS) (a) e Si-Ti(PMODS) (b). Fase móvel: CO_2 : MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min. Volume de injeção: 20 µL; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.

Separação de filtros UV químicos

O tamanho da cadeia alquila influenciou a ordem de eluição dos compostos e a seletividade na separação de uma mistura de oito filtros UV químicos (2-etil-hexil salicilato, benzofenona-3, metoxinamato de octila,

octocrileno, butilmetoxidibenzoilmetano, etilexil triazona, bis-etilexiloxifenol, drometrizol trissiloxano) utilizando as FE SiO₂, Si(PDMS), Si(PMOS), Si(PMTDS), Si(PMODS) e KrC18ec (Figura 106). A Figura 107 mostra a ordem de eluição dos oito filtros UV químicos A FE Si(PMODS) apresentou melhor desempenho (Tabela 22) ao separar o maior número de compostos e em relação ao parâmetro cromatográfico fator de alargamento (TF). Todas as FE apresentaram desempenho semelhante à FE comercial, com exceção da FE polar SiO₂.

O efeito da metalização foi avaliado para as FE do tipo fenil Si(PDMPS) e Si-Zr(PDMPS) (Figura 108). As duas FE com e sem metalização apresentação diferentes seletividades e picos cromatográficos com diferentes fatores de alargamento (Tabela 22). A influência da reação de capeamento mostrou que as FE Si-Ti(PMODS) e Si-Ti(PMODS)ec apresentam diferentes seletividades (Figura 109), sendo que a FE capeada apresentou melhor desempenho cromatográfico. Todas as FE apresentaram fatores de alargamento (TF) melhores quando comparadas com a FE comercial (Tabela 22).

Tabela 22. Fator de alargamento (TF) para os filtros UV químicos: 2-etil-hexil salicilato (ES), benzofenona-3 (BZ3), metoxinamato de octila (EMC), octocrileno (OCR), butilmetoxidibenzoilmetano (BDM), etilexil triazona (ET), bis-etilexiloxifenol (EMT), drometrizol trissiloxano (DMTS) separados por CFS.

FE	ES	BZ3	EMC	OCR	BDM	ET	EMT	DMTS	
	TF	CS							
SiO ₂	2,4	3,0	2,4	1,6	1,6	1,9	nc	2,4	2
Si(PDMS)	0,9	1,0	0,9	1,0	1,2	1,1	1,4	0,9	4
Si(PMOS)	0,8	0,9	0,9	0,8	1,1	1,1	0,8	1,1	3
Si(PMTDS)	0,7	1,0	0,7	1,0	1,1	0,9	0,8	0,8	4
Si(PMODS)	0,9	0,9	0,9	0,9	1,3	1,2	0,9	0,9	5
Si(PDMPS)	1,0	0,8	0,8	1,5	1,4	ns	ns	0,8	4
Si-Zr(PDMPS)	1,4	1,0	0,9	0,8	0,9	1,4	ns	0,9	3
Si-Ti(PMODS)	1,1	2,8	1,1	0,8	ns	ns	ns	ns	2
Si-Ti(PMODS)ec	2,5	3,6	1,0	1,0	ns	ns	ns	1,0	4
Kromasil C18ec	1,4	2,4	1,4	2,4	1,9	1,5	1,5	1,6	2

ns: não separado; cs: compostos separados.



Figura 106. Cromatogramas obtidos na separação de oito filtros UV químicos: 2-etil-hexil salicilato (ES), benzofenona-3 (BZ3), metoxinamato de octila (EMC), octocrileno (OCR), butilmetoxidibenzoilmetano (BDM), etilexil triazona (ET), bisetilexiloxifenol (EMT), drometrizol trissiloxano (DMTS), por CFS, utilizando as FE KrC18ec (a), SiO₂ (b), Si(PDMS) (c), Si(PMOS) (d), Si(PMTDS) (e) e Si(PMODS) (f). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min .Volume de injeção: 20 µL; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.



Figura 107. Ordem de eluição dos oito filtros UV químicos: 2-etil-hexil salicilato (ES), benzofenona-3 (BZ3), metoxinamato de octila (EMC), octocrileno (OCR), butilmetoxidibenzoilmetano (BDM), etilexil triazona (ET), bis-etilexiloxifenol (EMT), drometrizol trissiloxano (DMTS), por CFS, separados nas FE Si(PDMS), Si(PMOS), Si(PMTDS), Si(PMODS) e Si(PDMFS).



Figura 108. Cromatogramas obtidos na separação de oito filtros UV químicos: 2-etil-hexil salicilato (ES), benzofenona-3 (BZ3), metoxinamato de octila (EMC), octocrileno (OCR), butilmetoxidibenzoilmetano (BDM), etilexil triazona (ET), bisetilexiloxifenol (EMT), drometrizol trissiloxano (DMTS), por CFS, utilizando as FE Si(PDMPS) (a) e Si-Zr (PDMPS) (b). Fase móvel: CO₂: MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min. Volume de injeção: 20 μ L; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.



Figura 109. Crómatogramas obtidos na separação de oito filtros UV químicos: 2-etil-hexil salicilato (ES), benzofenona-3 (BZ3), metoxinamato de octila (EMC), octocrileno (OCR), butilmetoxidibenzoilmetano (BDM), etilexil triazona (ET), bisetilexiloxifenol (EMT), drometrizol trissiloxano (DMTS), por CFS, utilizando as FE Si-Ti(PMODS) (a) e Si-Ti(PMODS)ec (b). Fase móvel: CO_2 : MeOH 90:10 (v/v) a uma vazão de 3,0 mL/min. Volume de injeção: 20 µL; temperatura: 25 °C; detecção em 210 nm e pressão de saída: 15 MPa.

5. Conclusões

A preparação dos suportes de sílica metalizada com zircônio e titânio e a imobilização térmica do PMODS (poli(metiloctadecilsiloxano)) através da aplicação do planejamento composto central produziu fases estacionárias (FE) com elevada eficiência e baixo fator de assimetria para os diversos testes de avaliação aplicados. A caracterização físico-química (espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de ²⁹Si) confirmou que a quantidade de grupos silanóis foi reduzida após o processo de imobilização, enquanto a caracterização cromatográfica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (utilizando misturas teste de Engelhardt, Tanaka, Neue e SRM 870) mostrou que as fases apresentam desempenho equivalente ou superior a fases disponíveis comercialmente do tipo fase ligada e equivalentes a estas. A presença de zircônio ou titânio nos suportes cromatográficos melhorou a estabilidade química das FE, principalmente em fases móveis alcalinas (pH 10).

A reação de capeamento com os reagentes TMCS e HMDS reduziu a quantidade de grupos silanóis, zirconóis e titanóis das FE, como observado pela caracterização físico-quimica e cromatográfica, incluindo testes com cromatografia em fluido supercrítico (CFS). A estabilidade química dessas fases estacionárias foi aumentada quando comparada a estabilidade das mesmas fases não capeadas.

As fases estacionárias apresentaram excelente desempenho para a separação por CLAE de algumas classes de compostos como fármacos, xantinas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e filtros UV, com desempenho superior ou equivalente a FE disponíveis comercialmente.

Diferentes FE baseadas em polissiloxanos (fenil, C1, C8, C14, C18) termicamente imobilizados sobre suportes de sílica nua, zirconizada e titanizada foram caracterizadas utilizando o modelo dos parâmetros de solvatação e CFS. Os resultados obtidos mostraram que o uso do modelo dos parâmetros de solvatação pode ser empregado para FE com diferentes faixas de polaridade e propriedades.

As FE caracterizadas apresentaram diferentes seletividades que foram confirmadas através de aplicações utilizando a CFS para separação de

compostos de interesse da indústria farmacêutica e de cosméticos, ampliando aplicabilidade de FE imobilizadas para essa modalidade de separação cromatográfica.

6. Referências Bibliográficas

[1] J. M. Miller, **Chromatography: Concepts and Contrasts**, John Wiley & Sons, Hoboken, 2005.

[2] C. H. Collins, G. L. Braga, P. S. Bonato, **Fundamentos de Cromatografia**, Editora da UNICAMP, Campinas, 2006.

[3] V.R. Meyer, **Practical High Performance Liquid Chromatography**, 2^a ed., John Wiley & Sons, New York, 1996.

[4] H.A. Claessens, M.A. van Straten, Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 1060 (2004) 23-41.

[5] E. Tonhi, K. E. Collins, I. C. S. F. Jardim, C. H. Collins, Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados, **Quim. Nova** 25 (2002) 616-623.

[6] L. Maldaner, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, **Quim. Nova** 33 (2010) 1559-1568.

[7] A. M. Faria, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, State-of-the-art in immobilized polymer stationary phases for high-performance liquid chromatography, **J. Braz. Chem. Soc.** 20, (2009) 1385-1398.

[8] E. M. Borges, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, Possibilidades e limitações no uso da temperatura em cromatografia líquida de fase reversa, **Quim. Nova** 33 (2010) 945-953.

[9] T. Teutenberg, K. Hollebekkers, S. Wiese, A. Boergers, Temperature and pH-stability of commercial stationary phases, **J. Sep. Sci.** 2009, 32, 1262-1274.

[10] K.K. Unger, U. Trudinger, em **High Performance Liquid Chromatography,** P. R. Brown, R. A. Hartwick, eds., Wiley, New York, 1989.

[11] J. J. Kirkland, M. A. van Straten, High pH mobile phase effects on silicabased reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns, **J. Chromatogr. A** 691 (1995) 3-19.

[12] J. J. Kirkland, J. W. Henderson, J. J. DeStefano, M. A. van Straten, H. A. Claessens, Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 762 (1997) 97-112.

[13] L. Ma, P. W. Carr, Loss of bonded phase in reversed-phase liquid chromatography in acidic eluents and practical ways to improve column stability, **Anal. Chem.** 2007, 79, 4681-4686.

[14] C. Stella, S. Rudaz, J. L. Veuthey, A. Tchapla, Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part I, **Chromatographia** 53 (2001) S-113-S-131.

[15] C. R. Silva, I. C. S. F. Jardim, C. H. Collins, C. Airoldi, Novas fases estacionárias à base de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência, **Quim. Nova** 27 (2004) 270-276.

[16]http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=pt_BR&cid=513769, acessado em Janeiro 2013.

[17]http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=513767&locale=pt_BR, acessado em Janeiro de 2013.

[18] http://www.kromasil.com/technical_evidence/eternity/movie.php, acessada em Janeiro de 2013.

[19]http://www.bvr.by/kscms/uploads/editor/file/gemini.pdf,acessada em Janeiro de 2013.

[20]http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10163613, acessada em Março de 2013.

[21] K. K. Unger, R. Skudas, M. M. Schulte, Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal, **J. Chromatogr. A** 1184 (2008) 393-415.

[22] A. M. Faria, C. B. G. Bottoli, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas, **Quim. Nova** 29 (2006) 300-309.

[23] A. M. Siouffi, Silica gel-based monoliths prepared by the sol–gel method: facts and figures, **J. Chromatogr. A**, 1000 (2003) 801-818.

[24] N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, N.Tanaka, Chromatographic characterization of macroporous monolithic silica prepared via sol-gel process, **Colloids Surf. A** 187 (2001) 273-279.

[25] R. G. C. da Silva, C.H. Collins, C.B.G. Botolli, Cromatografia líquida capilar: estado da arte e aplicações, **Quim. Nova** 34 (2011) 841-849.

[26] J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P. W. Carr, Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, **J. Chromatogr. A** 1028 (2004) 1-30.

[27] J. Nawrocki, C. Dunlap, J. J. Zhao, C.V. McNeff, A. McCormick, P. W. Carr, Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, **J. Chromatogr. A** 1028 (2004) 31-62.

[28] B. W. Wenclawiak, S. Giegold, T. Teutenberg, High-temperature liquid chromatography, **Anal. Lett.** 41 (2008) 1097-1105.

[29] V. Zizkovsky, R. Kucera, J. Klimes, Potential employment of non-silicabased stationary phases in pharmaceutical analysis, **J. Pharm. Biomed. Anal.** 44 (2007) 1048-1055.

[30] J. J. Pesek, M.T. Matyska, Modified aluminas as chromatographic supports for high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 952 (2002) 1-11.

[31] V. Zizkovsky, R. Kucera, J. Klimes, J. Dohnal, Titania-based stationary phase in separation of ondansetron and its related compounds **J. Chromatogr. A** 1189 (2008) 83-91.

[32] C. J. Dunlap, C.V. McNeff, D. Stoll, P.W. Carr, Peer, Zirconia Stationary Phases for Extreme Separations, **Anal. Chem**. 73 (2001) 598-607.

[33] J. Dai, X. Yang, P. W Carr, Comparison of the chromatography of octadecyl silane bonded silica and polybutadiene-coated zirconia phases based on a diverse set of cationic drugs, **J. Chromatogr. A** 1005 (2003) 63-82.

[34] A. M. Faria, I. C. S. F. Jardim, K. E. Collins, C. H. Collins, Immobilized polymeric stationary phases using metalized silica supports, **J. Sep. Sci.** 29 (2006), 782-789.

[35] C. R. Silva, C. H. Collins, K.E. Collins, C. Airoldi, An overview of the chromatographic properties and stability of C18 titanized phases, **J. Sep. Sci**. 29 (2006) 790-800.

[36] C. H. Collins, C. R. Silva, A. M. Faria, K. E. Collins, I. C. S. F Jardim, The search for more pH stable stationary phases for high performance liquid chromatography, **J. Braz. Chem. Soc.** 20 (2009) 604-612.

[37] C. R. Silva, C. Airoldi, K.E. Collins, C.H. Collins, Preparation and characterization of a new C_{18} urea phase based on titanized silica, **J. Chromatogr. A** 1087 (2005) 29-37.

[38] C. R. Silva, C. Airoldi, K.E. Collins, C.H. Collins, Titanized silicas, modified by C18, as promising stationary phases for high pH separations, **J. Chromatogr. A** 1073 (2005) 155-162.

[39] J. J. Kirkland, Development of some stationary phases for reversed-phase HPLC, **J. Chromatogr. A** 1060 (2004) 9-21.

[40] U. D. Neue, **Columns: Theory, Technology and Practice**, Wiley-VCH, New York, 1997.

[41] E. Lesellier, C. West, Description and comparison of chromatographic tests and chemometric methods for packed column classification, **J. Chromatogr. A** 1158 (2007) 329-360.

[42] J. J. Pesek, M. T. Matyska, R. J. Yu, Synthesis and characterization of endcapped C18 stationary phases using a silica hydride intermediate, **J. Chromatogr. A** 947 (2002) 195-203.

[43] L. C. Sander, S. A. Wise, Recent advances in bonded phases for liquid chromatography, **Crit. Rev. Anal. Chem.** 18 (1987) 299-417.

[44] J. E. Haky, A. R. B. M Dunn, Comparison of polybutadiene-coated alumina and octadecyl-bonded silica for separations of proteins and peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 541 (1991) 303-315.

[45] K. K. Unger, N. Becker, P. Roumellotis, Structure and proprieties of nalkykdimethylsilyl bonded silica reversed-phase packings, **J. Chromatogr.** 149 (1978) 211-224.

[46] J. J Kirkland, J. J. DeStefano, Controlled surface porosity supports with chemically-bonded organic stationary phases for gas and liquid chromatography, **J. Chromatogr. Sci.** 8 (1970) 309-314.

[47] L. Li, P. W. Carr, J. F. Evans, Studies of retention and stability of a horizontally polymerized bonded phase for reversed-phase liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 868 (2000) 153-167.

[48] J. J. Kirkland, J. L. Glajch, R. D. Farlee, Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings, **Anal. Chem.** 61(1989) 2-11.

[49] J.J. Kirkland, J. C. H. Dilks, J.W. Henderson, Technologies for improved C18 stationary phases in reversed-phase HPLC separations, **LC-GC** 11 (1993) 290-297.

[50] G. P. O'Sullivan, N. M. Scully, J. D. Glennon, Polar-embedded and polarendcapped stationary phases for LC, **Anal. Lett.**, 43 (2010) 1609–1629.

[51] J. J. Kirkland, J. B. Adams Jr., M. A. van Straten, H. A. Claessens, Bidentate silane stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography, **Anal. Chem.** 70 (1998) 4344-4352.

[52] G. Schomburg, J. Köhler, H. Figge, A. Deege, U. Bien-Vogelsang, Immobilization of stationary liquids on silica particles by gamma-radiation, **Chromatographia**, 18 (1984) 265-279.

[53] U. Bien-Vogelsang, A. Deege, H. Figge, J. Köhler, G. Schomburg, Syntheses of stationary phases for reversed-phases LC using silanization and polymer coating, **Chromatographia**, 19 (1984) 170-179.

[54] G. Schomburg, Polymer coating of surfaces in column liquid chromatography and capillary electrophoresis, **Trends Anal. Chem.** 10 (1991)163-169.

[55] L. Janus, B. Carbonnier, A. Deratani, M. Bacquet, G. Crini, J. Laureyns, M. Morcellet, New HPLC stationary phases based on (methacryloyloxypropyl-beta-cyclodextrin-co-N-vinylpyrrolidone) copolymers coated on silica. Preparation and characterisation, **New J. Chem.** 17 (2003) 307-312.

[56] B. Carbonnier, L. Janus, Y. Lekchiri, M. Morcellet, Coating of porous silica beads by in situ polymerization/crosslinking of 2-hydroxypropyl beta-cyclodextrin for reversed-phase high performance liquid chromatography applications, **J. Appl. Polym. Sci**. 91 (2004) 1419-1426.

[57] J. Kohler, Poly(vinylpyrrolidone)-coated silica- A versatile, polar stationary phase for HPLC, **Chromatographia** 21 (1986) 573-582.

[58] A. Kurganov, Y. Puchkova, V. Davankov, F. Eisenbeiss, Polyvinylpyrrolidone-coated silica packings for chromatography of proteins and peptides, **J. Chromatogr. A** 663 (1994) 163-174.

[59] Y. Mao, B. M. Fung, Use of alumina with anchored polymer coating as packing material for reversed-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 790 (1997) 9-15.

[60] D. A. Fonseca, K.E. Collins, C.H. Collins, Titanized silica-based stationary phases prepared with thermally and microwave-immobilized poly(methyloctylsiloxane), **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 209-215.

[61] C. B. G. Botolli, C. R. M. Vigna, G. Fischer, K. Albert, K. E. Collins, C.H. Collins, Self-immobilization and/or thermal treatment for preparing silica-poly(methyloctylsiloxane) stationary phases, **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 217-223.

[62] T. A. Anazawa, I. C. S. F. Jardim, Polymethyloctylsiloxane adsorbed on porous sílica as a packing material for reversed-phase high-performance liquid-chromatography, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 17 (1994) 1265-1279.

[63] T. A. Anazawa, I. C. S. F. Jardim, The chromatographic behavior of coated stationary phases with different silicas, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 21 (1998) 645-655.

[64] M. Petro, D. Berek, Polymers immobilized on silica-gels as stationary phases for liquid-chromatography, **Chromatographia** 37 (1993) 549-561.

[65] C. B. G. Bottoli, **Sorção, Imobilização e Extração de Polissiloxanos em Sílicas Porosas para Uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2002.

[66] L. F. C. Melo, C. H. Collins, K. E. Collins, I. C. S. F. Jardim, Stability of high-performance liquid chromatography columns packed with poly(methyloctylsiloxane) sorbed and radiation-immobilized onto porous silica and zirconized silica, **J. Chromatogr. A** 869 (2000) 129-135.

[67] L. R. S. Morais, I. C. S. F. Jardim, Characterization of a new stationary phase based on microwave immobilized polybutadiene on titanium oxide-modified silica, **J. Chromatogr. A** 1073 (2005) 127-135.

[68] E. Tonhi, K. E. Collins, C.H. Collins, High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica: II. Chromatographic evaluation, **J. Chromatogr. A** 948 (2002) 109-119.

[69] M. A. Kapor, **Preparação de Fases Estacionárias SiO₂ (PMOS)**, **Sorvidas e Imobilizadas por Micro-ondas para Cromatográfica Líquida de Alta Eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2001.

[70] United States Pharmacopeia – National Formulary (USP-NF).

[71] K. Anton, C. Berger (ed.), **Supercritical Fluid Chromatography with Packed Columns: Techniques and Applications**, Marcel Dekker, New York, 1997, chapter 1.

[72] E. M. Carrilho, M. C. H. Tavares, F. M. Lanças, Fluidos supercríticos em química analítica. I. Cromatografia com fluido supercrítico: conceitos termodinâmicos, **Quim. Nova** 24 (2001) 509-515.

[73] http://www.usp.br/gpqa/scf.asp, acessado em Janeiro 2013.

[74] J. W. King, H. H. Hilll, M. L. Lee, em **Physical Methods of Chemistry**, B. W. Rossiter, R.C. Baetzold, eds., 2nd ed., Vol. 10, John Wiley & Sons, New York, 1993.

[75] A. A. Clifford, em **Practical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction**, **Chromatography: Principles and Practice**, M. Caude, D. Thiébaut, eds., Vol. 2, CRC Press, Amsterdam, 1999.

[76] A. G. Perrenoud, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Comparison of ultra-high performance supercritical fluid chromatography and ultra-high performance liquid chromatography for the analysis of pharmaceutical compounds, **J. Chromatogr. A**, 1266 (2012) 158-167.

[77] H. G. Janssen, P. J. Schoenmakers, C.A. Cramers, Effects of modifiers in packed and open-tubular supercritical fluid chromatography, **J. Chromatogr.** 552 (1991) 527-537.

[78] C.West, E. Lesellier, Effects of modifiers in subcritical fluid chromatography on retention with porous graphitic carbon, **J. Chromatogr. A** 1087 (2005) 64-76.

[79]E.Lesellier, Retention mechanisms in super/subcritical fluid chromatography on packed columns, **J. Chromatogr. A** 1216 (2009) 1881-1890.

[80] L. T. Taylor, Supercritical fluid chromatography for the 21st century, **J. Supercrit. Fluids** 47 (2009) 566-573.

[81] M. R. Gama, R. G. C. Silva, C.B.G.Botolli, Hydrophilic interaction chromatography, **Trends Anal. Chem.** 37 (2012) 48-60.

[82] A. S Pereira, A. J. Giron, A. E. Admasu, P. Sandra, Green hydrophilic interaction chromatography using ethanol-water-carbon dioxide mixtures, **J. Sep. Sci.** 33 (2010) 834-837.

[83] T. A. Berger, Density of methanol-carbon dioxide mixtures at 3 temperatures-comparison with vapor-liquid-equilibria measurements and results obtained from chromatography, **J. High Resolut. Chromatogr.** 14 (1991) 312-316.

[84] T. Berger, **Packed Columns**, Royal Society of Chemistry (RSC), Letchworth, 1995.

[85] T. L. Chester, J. D. Pinkston, Supercritical fluid and unified chromatography, **Anal. Chem.** 76 (2004) 4606–4613.

[86] C. F. Poole, Stationary phases for packed-column supercritical fluid chromatography, **J. Chromatogr. A** 1250 (2012) 157-171.

[87] E. Lesellier, Supercritical fluid chromatography for bioanalysis: practical and theoretical considerations, **Bioanalysis** 3 (2011) 125-131.

[88] S. Albaseer, Y. R. Nageswara, Y.V. Swamy, K. Mukkanti, An overview of sample preparation and extraction of synthetic pyrethroids from water, sediment and soil, **J. Chromatogr. A** 1217 (2010) 5537-5554.

[89] E. M. Carrilho, M. C. H. Tavares, F. M. Lanças, Fluidos supercríticos em química analítica. II. Cromatografia com fluido supercrítico: instrumentação, **Quim. Nova 26 (2003) 687-693.**

[90] C. F.Poole, Supercritical fluid chromatography and supercritical fluid extraction, **J. Biochem. Biophys. Methods** 43 (2000) 1-2.

[91] P. Carroud, D. Thiébaut; M. Caude; R. Rosset, Supercritical fluid chromatography: light-scattering detector-a promising coupling for polar compounds analysis with packed-columns, **J. Chromatogr. Sci.** 25 (1987) 395-398.

[92] E. Lesellier, E. Destandau, C. Grigoras, L. Fougère, C. Elfakir, Fast separation of triterpenoids by supercritical fluid chromatography/evaporative light scattering detector, **J. Chromatogr. A** 1268 (2012) 157-165.

[93] E. Lesellier, A. Valarché, C. West, M. Dreux, Effects of selected parameters on the response of the evaporative light scattering detector in supercritical fluid chromatography, **J. Chromatogr. A** 1250 (2012) 220-226.

[94] W. Asche, Mobile phases for supercritical fluid chromatography, **Chromatographia**, 11(1978) 411-412.

[95] Y. Hsieh, F. Li, Supercritical fluid chromatography/tandem mass spectrometric methods for pharmaceutical analysis, **Am. Pharm. Rev.** 10 (2007) 10–14.

[96] A. G. Perrenoud, J. Boccard, J. Veuthey, D. Guillarme, Analysis of basic compounds by supercritical fluid chromatography: Attempts to improve peak shape and maintain mass spectrometry compatibility, **J. Chromatogr. A** 1262 (2012) 205-213.

[97] D. Mangelings, Y. Vander Heyden, Chiral separations in sub and supercritical fluid chromatography, **J. Sep. Sci.** 31 (2008) 1252.

[98] H. Fischer, O. Gyllenhaal, J. Vessman, K. Albert, Reaction monitoring of aliphatic amines in supercritical carbon dioxide by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and implications for supercritical fluid chromatography, **Anal. Chem.** 75 (2003) 622-626.

[99] Z. J. Dijkstra, A. R. Doornbos, H. Weyten, J. M. Ernsting, C.J. Elsevier, J.T.F. Keurentjes, Formation of carbamic acid in organic solvents and in supercritical carbon dioxide, **J. Supercrit. Fluids** 41 (2007) 109-114.

[100] E. Lesellier, A. Tchapla, A.M. Krstulovic, Use of carotenoids in the characterization of octadecylsilane bonded columns and mechanism of retention of carotenoids on monomeric and polymeric stationary phases, **J. Chromatogr. A** 645 (1993) 29-39.

[101] E. Lesellier, A. Tchapla, A simple subcritical chromatographic test for an extended ODS high performance liquid chromatography column classification, **J. Chromatogr. A** 1100 (2005) 45-59.

[102] E. Lesellier, C. West, A. Tchapla, Classification of special octadecylbonded phases by the carotenoid test, **J. Chromatogr. A** 1111 (2006) 62-70.

[103] M. H. Abraham, A. Ibrahim, A. M. Zissimos, Determination of sets of solute descriptors from chromatographic measurements, **J. Chromatogr. A** 1037 (2004) 29-47.

[104] C. F. Poole, S.K. Poole, Column selectivity from the perspective of the solvation parameter model, **J. Chromatogr. A** 965 (2002) 263-299.

[105] M. Vitha, P. W. Carr, The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography, J. Chromatogr. A 1126 (2006) 143-194.

[106] C. West, E. Lesellier, Characterization of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model: I. Alkylsiloxane-bonded stationary phases, **J. Chromatogr. A** 1110 (2006) 181-190.

[107] C. West, E. Lesellier, em E. Grushka and N. Grinberg (Eds.), **Advances in Chromatography**, volume 48, CRC Press, Boca Raton, 2009.

[108] C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography by the solvation parameter model: II. Comparison tools, **J. Chromatogr. A** 1110 (2006) 191-199.

[109] C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model: III. Polar stationary phases, **J. Chromatogr. A** 1110 (2006) 200-213.

[110] C. West, E. Lesellier, Characterisation of stationary phases in subcritical fluid chromatography with the solvation parameter model IV: Aromatic stationary phases, **J. Chromatogr. A** 1115 (2006) 233-245.

[111] A. M. Faria, D.R. Magalhães, K. E. Collins, C. H. Collins, Characterization of zirconized silica supports for HPLC, **Anal. Chim. Acta** 550 (2005) 137-143.

[112] A. M. Faria, D. R. Magalhães, C. H. Collins, Characterization of titanizedsilica chromatographic supports for high performance liquid chromatography (HPLC), **Rev. Matér.** 9 (2004) 344-354.

[113] A. M. Faria, Desenvolvimento de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa a partir da Adsorção e Imobilização do Poli(metiltetradecilsiloxano) sobre Sílica Metalizada, Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2006.

[114] K. E. Collins, A. C. Franchon, I. C. S. F. Jardim, E. Radovanovic, M.C. Gonçalves, The effects of inner surface roughness of microbore column blanks on column performance, **LC–GC North Am.** 18 (2000) 106-117.

[115] A. M. Faria, C. R. Silva, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, Development of a polymer-coated stationary phase with improved chemical stability in alkaline mobile phases, **J. Sep. Sci.** 31 (2008) 953-960.

[116] S. J. Gregg, K. S. W. Sing, **Adsorption, Surface Area and Porosity**, 2^a ed., London, Academic Press, 1982.

[117] M. P. Segato, **Preparo, Caracterização e Aplicação de Fases Estacionárias de Poli(dimetilsiloxano-co-metilfenilsiloxano) Sorvidas e Imobilizadas sobre Sílica e Sílica Zirconizada**. Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP, Campinas, SP, 2011.

[118] H. Engelhardt, M. Jungheim, Comparison and characterization of reversed phases, **Chromatographia** 29 (1990) 59-68.

[119] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, Chromatographic characterization of silica C18 packing materials-correlation between behavior of stationary phases , **J. Chromatogr. Sci.** 27 (1989) 721-728.

[120] U. D. Neue, E. Serowik, P. Iraneta, B. A. Alden, T. H. Walter, Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: I. Assessment of the reproducibility of reversed-phase packings, **J. Chromatogr. A** 849 (1999) 87-100.

[121] U. D. Neue, B. A. Alden, T. H. Walter, Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: II. Classification of reversed-phase packings, **J. Chromatogr. A** 849 (1999) 101-116.

[122] L. C. Sander, S. A. Wise, A new standard reference material for column evaluation in reversed-phase liquid chromatography, **J. Sep. Sci.** 26 (2003) 283-294.

[123] J. Horak, W. Lindner, Investigations on the chromatographic behavior of hybrid reversed-phase materials containing electron donor–acceptor systems: I. Contribution of sulfur–aromatic interactions, **J. Chromatogr. A** 1043 (2004) 177-194.

[124] C. G. A. da Silva, C. H. Collins, Preparation and characterization of a poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto zirconized silica stationary phase for high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. **A** 1232 (2012) 248-256.

[125] E. Tonhi, K. E. Collins, C. H. Collins, High-performance liquid chromatographic stationary phases based on polysiloxanes with different chain lengths thermally immobilized on silica supports, **J. Chromatogr. A** 1119 (2006) 135-139.

[126] C. R. M. Vigna, C. B. G. Bottoli, K. E. Collins, C. H. Collins, Preparation of stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography using thermal treatments at high temperature, **J. Chromatogr. A** 1156 (2007) 60-67.

[127] E. M. Borges, C.H. Collins, Characterization of several stationary phases prepared by thermal immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) onto silica surfaces, **J. Chromatogr. A** 1218 (2011) 4378-4388.

[128] C. G. A. da Silva, E. S. da Silva Júnior, C. H. Collins, Optimization of the thermal immobilization of poly(methyloctadecylsiloxane) and poly (dimethylsiloxane) onto silica stationary phases using central composite design and response surface methodologies, **Braz. J. Anal. Chem.** 7 (2012) 304-308.

[129] C. G. A. da Silva, C. H. Collins, Improved chemical stabilities for endcapped high performance liquid chromatography stationary phases based on poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto metalized silicas, **J. Chromatogr. A** 1260 (2012) 81-87.

[130] C. G. A. da Silva, C. H. Collins, **Microchem. J.**, *in press.* doi: 10.1016/j.microc.2012.03.009.

[131] A. M. Faria, K. E. Collins, C. H. Collins, Enhanced stability stationary phases based on poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto doubly titanized silica particles, **Chromatographia** 67 (2008) 357-363.

[132] A. M. Faria, K. E. Collins, C. H. Collins, New stationary phases for highperformance liquid chromatography based on poly(methyltetradecylsiloxane) thermally immobilized onto zirconized silica, **J. Chromatogr. A** 1122 (2006) 114-122.

[133] C. R. Silva, C. A. Airoldi, K.E. Collins, C. H. Collins, A new generation of more pH stable reversed phases prepared by silanization of zirconized silica, **J. Chromatogr. A** 1191 (2008) 90-98.

[134] H. Nakakuki, H. Horie, Y. Yamauchi, K. Kohata, Rapid analysis of methylated xanthines in teas by an improved high-performance liquid chromatographic method using a polyvinylpolypyrroridone pre-column, **J. Chromatogr. A** 848 (1999) 523-527.

[135] J. F. Nash, P. R. Tanner, Sunscreen, **Cosmet. Sci. Technol.** 30 (2006) 131-151.

[136] L. M. Peruchi, S. Rath, Development and application of a HPLC method for eight sunscreen agents in suncare products, **Int. J. Cosmet. Sci.** 34 (2012) 226-233.

[137] M. P. Colombini, R. Fuoco, S. Giannarelli, M. Termine, C. Abete, M. Vincentini, S.Berti, Determination of polyaromatic hydrocarbons in atmospheric particulate samples by HPLC with fluorescence detection: A field application, **Microchem. J.** 59 (1998) 228–238.

[138] D. Thompson, D. Jolley, W. Maher, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons inoyster tissues by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection, **Microchem. J.** 47 (1993) 351–362.

[139] S. A. V. Tfouni, R. M. D. Machado, M. C. R. Camargo, S. H. P. Vitorino, E. Vicente, C. G. Toledo, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection, **Food Chem.** 101 (2007) 334–338.

[140] M. Wózniakiewicza, R. Wietecha-Posłusznya, A. Garbacika, P. Koscielniak, Microwave-assisted extraction of tricyclic antidepressants from human serum followed by high performance liquid chromatography determination, **J. Chromatogr. A** 1190 (2008) 52–56.

[141] D. H. Everett, em K. K. Unger, J. Rouquerol, K. S. W. Sing, H. Kral, **Studies in Surface Science and Catalysis**, volume 39, Elsevier Science Publishers, Amsterdan, 1988.

[142] Z. G. Wu, Y. X. Zhao, D. S. Liu, The synthesis and characterization of mesoporous silica–zirconia aerogels, **Microporous Mesopororous Mater.** 68 (2004) 127-132.

[143] K. K. Unger, Surface structure of amorphous and crystalline porous silicas: status and prospects. In: **Colloidal Sílica. Fundamentals and Applications**. H.E. Berna, W.O. Roberts (Eds), Boca Raton, CRC Press, 2006.

[144] B. A. Morrow, Surface Groups on Oxides, **Stud. Surf. Sci. Catal.** 57A (1990) 161A-224A.

[145] N. B. Colthup. L. H. Daly, S. E. Wiberley. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**, 2nd ed. Academic Press, New York, 1975.

[146] C. Aroldi, R. F. Farias, O uso de sílica gel organofuncionalizada como agente sequestrante para metais, **Quim. Nova** 23 (2000) 496-503.

[147] R. Silverstein, F.X. Webster, D. Kiemle, **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 7th ed., Wiley, New York, 2003.

[148] S. Bachmann, L. F. C. Melo, R. B. Silva, T. A. Anazawa, I. C.S. F. Jardim, K. E. Collins, C. H. Collins, K. Albert, Synthesis and Solid-State NMR Investigations of Radiation-Immobilized Polysiloxanes on Bare, Titanium-Grafted, and Zirconium-Grafted Silicas, **Chem. Mater.** 13 (2001) 1874-1879.

[149] E. Tonhi, S. Bachmann, K. Albert, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H.Collins, High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica: I. Physical and chemical characterizations, **J. Chromatogr. A** 948 (2002) 97-107.

[150] E. Cruz, M. R. Euerby, C. M. Johnson, C .A. Hackett, Chromatographic classification of commercially available reverse-phase HPLC columns, **Chromatographia** 44 (1997) 151-161.

[151] M. E. Euerby, P. Petersson, A classification of commercially available RPLC columns-A tool for rational selection, **LC–GC Europe** 13 (2000) 665-683.

[152] M. E. Euerby, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis, **J. Chromatogr. A** 994 (2003) 13-36.

[153] K. Jinno, K. Yahamoto, H. Nagashima, T. Ueda, K. Itoh, Silicas chemically bonded with multidentate phenyl groups as stationary phases in reversed-phase liquid chromatography used for non-planarity recognition of polycyclic aromatic hydrocarbons, **J. Chromatogr. A** 517 (1990) 193-207.

[154] A. K. Mallik, M. M. Rahman, M. Czaun, M. Takafuji, H. Ihara, Facile synthesis of high-density poly(octadecyl acrylate)-grafted silica for reversed-phase high-performance liquid chromatography by surface-initiated atom transfer radical polymerization, **J. Chromatogr. A** 1187 (2008) 119-127.

[155] A. K. Mallik, M. Takafuji, H. Ihara, Molecular-shape selectivity tuned by donor–acceptor type copolymers as organic phase in reversed-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 1216 (2009) 74337439.

[156] L. Maldaner, I. C. S. F. Jardim, A new thermally immobilized fluorinated stationary phase for RP-HPLC, **J. Sep. Sci.** 33 (2010) 174-181.

[157] M. R. Euerby, P. Petersson, W. Campbell, W. Roe, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing phenyl moieties using principal component analysis, **J. Chromatogr. A** 1154 (2007) 138-151.

[158] D. Wen, S. V. Olesik, Characterization of pH in liquid mixtures of methanol/H₂O/CO₂, **Anal. Chem.** 72 (2000) 475-480.

[159] D. A. Fonseca, H. R. Gutierrez, K. E. Collins, C. H. Collins, Rapid method for evaluating reversed-phase high-performance liquid chromatography column stability, **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 149-155.

[160] M. R. Euerby, P.J. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis, **J. Chromatogr. A** 1088 (2005) 1-15.

[161] E. M. Borges, C. G. A. Silva, C. H. Collins, Chromatographic evaluation of some stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized onto silica, **Microchem. J.** 96 (2010) 120-125.