



**Universidade Estadual de Campinas**

**Instituto de Química**

**Dissertação de Mestrado**

***Tratamento Térmico na Imobilização de Fases Estacionárias  
para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência***

**Autora**

Camila Rosa Moraes Vigna

**Orientadora**

Carol Hollingworth Collins

Campinas, julho de 2004

UNIDADE	10
Nº CHAMADA	17 UNICAMP
	V683t
V	EX
TOMBO BC	63774
PROC. Nº	000285 03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	12/10/03
Nº CPD	

Bib id 351417

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

V683t

Vigna, Camila Rosa Moraes.

Tratamento térmico na imobilização de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência / Camila Rosa Moraes Vigna. -- Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadora: Carol Hollingworth Collins.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fases estacionárias. 2. Tratamento térmico.
3. CLAE. I. Collins, Carol Hollingworth.
- II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

*“É a necessidade de todos estes conhecimentos práticos, a duração das experiências químicas, a assiduidade do trabalho e da observação que exigem, as despesas que ocasionam, os perigos a que nos expõem, mesmo a animosidade a este gênero de ocupação que sempre se corre o risco de contrair, que me levam a dizer aos químicos mais sensatos que o gosto pela química é uma paixão de louco”*

*La recherche de l'absolu de Balzac*

## *Agradecimentos*

*À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química, pela oportunidade de realizar este trabalho.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), pela concessão da bolsa de estudos e por todo o suporte financeiro.*

*À Prof<sup>a</sup> Carol Hollingworth Collins, por acreditar em minha capacidade de trabalho, dando-me orientação em todos os momentos, sempre com otimismo e total confiança. Pelo exemplo dado de profissionalismo, de amor ao trabalho, por me fazer valorizar a minha profissão.*

*À Prof<sup>a</sup> Isabel Cristina Sales Fontes Jardim e ao Prof Kenneth Elmer Collins, pela disponibilidade e atenção em todos os momentos que precisei, pela valiosa colaboração e pela convivência alegre.*

*À Carla Beatriz Grespan Bottoli, por ter me “acolhido” desde o início, me co-orientando e incentivado em todos os momentos, pela amizade e inestimável ajuda em meu crescimento científico e pessoal. À você minha eterna gratidão e admiração.*

*À todos os colegas e amigos do LabCrom, em especial ao Allan, Laís, Lúcia, Zahra, Dânia, Cíntia, Nilva, Vanessa e Alessandra, pelo constante apoio, carinho e alegre convivência. Neste trabalho há um pedacinho de cada um de vocês.*

*À Priscila, por ter me incentivado a fazer iniciação científica e à procurar a Prof. Carol para isso.*

*Às amigas Camila, Valéria, Viviane, Juliana, Tânia, Flavia pela certeza de poder sempre contar com a amizade e apoio e por sempre me esperarem pra almoçar enquanto eu ia desligar um “negocinho” no laboratório. Obrigada!*

*À Bel da CPG e ao Iveraldo do Desenho pela atenção, simpatia e boa vontade em ajudar.*

*À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*

*“Às palavras que eu não disse, que eu não consegui dizer, mas que vocês souberam entender”*

# Curriculum Vitae

## 1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel em Química – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – SP  
março de 1998 a junho de 2002

## 2. ESTÁGIO

Local: Rigesa Papel e Celulose - Valinhos – SP  
janeiro a julho de 1997

## 3. ATIVIDADES CIENTÍFICAS

Bolsista de iniciação científica do Programa Institucional de Bolsas CNPq/PIBIC e SAE  
Orientador: Prof Dr Carol Hollingworth Collins  
Instituto de Química – Unicamp – SP  
agosto de 1999 a julho de 2002

## 4. ATIVIDADES DIDÁTICAS

Participação no Programa de Estágio Docente II (PED II) como monitora na disciplina de QA 216 (Química Analítica II), Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).  
agosto a novembro de 2003

## 5. CURSOS

### - Validação de Métodos Analíticos

18 de setembro de 2001, 11º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), Campinas, SP.

### - Química Forense

08 de outubro de 2001, 1ª Semana de Química, Instituto de Química – Unicamp, Campinas, SP.

### - Curso avançado de Cromatografia Líquida (HPLC)

18 a 21 de outubro de 2002, Waters, São Paulo, SP

**- Eletroforese Capilar**

06 de novembro de 2002, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, SP

**- Fitoquímica**

06 a 07 de outubro de 2003, Instituto de Química – Unicamp, Campinas, SP

**- Programação Neurolinguística**

08 a 09 de outubro de 2003, Instituto de Química – Unicamp, Campinas, SP

**- Troubleshooting in HPLC**

14 de outubro de 2003, 12º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), São Luís, MA.

**- Princípios Básicos de Eletroforese Capilar**

28 a 30 de outubro de 2003, Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, SP

**- HPTLC as a tool for qualitative and quantitative analysis of herbal drugs and phytomedicines**

28 de abril de 2004, Instituto de Química – Unicamp, Campinas, SP

## **6. SUMÁRIO DA PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

Trabalhos apresentados em congressos nacionais: 12

Trabalhos apresentados em congressos internacionais: 5

## **7. TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM REVISTAS COM CORPO EDITORIAL**

- Bottoli, C.B.G.; **Vigna, C.R.M.**; Fisher, G.; Albert, K.; Collins, K.E.; Collins, C.H. "Self-Immobilization and/or Thermal Treatment for Preparation of Silica - Poly(methyloctylsiloxane) Stationary Phases" *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 217.

- Collins, K.E.; Bottoli, C.B.G.; **Vigna, C.R.M.**; Fisher, G.; Bachmann, S.; Albert, K.; Collins, C.H. "Self-Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) on HPLC Silica" *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 43.

## Resumo

**Título:** Tratamento Térmico na Imobilização de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**Autora:** Camila Rosa Moraes Vigna

**Orientadora:** Carol Hollingworth Collins

Neste trabalho foram desenvolvidas fases estacionárias (FE) para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE – FR) a partir da sorção e/ou imobilização do polímero poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) sobre suportes de sílica porosa utilizando tratamento térmico. As FE submetidas às diferentes condições de imobilização térmica foram caracterizadas com testes químicos e físicos e avaliadas cromatograficamente. O aquecimento das FE (Kromasil/PMOS e Rainin/PMOS) à altas temperaturas, entre 150 e 300 °C, promoveu uma maior cobertura do polímero na superfície e poros da sílica, confirmado pelos valores de % C obtidos para estas fases e pelos espectros de RMN <sup>29</sup>Si, que indicaram a formação de ligações químicas entre o polímero e o suporte. No aquecimento a 400 °C ocorre perda de polímero da FE durante a imobilização, prejudicando o seu desempenho cromatográfico. O tratamento térmico a 100 °C por 4 h em FE (Kromasil/PMOS) recém-preparadas pode ser utilizado com forma de acelerar a distribuição e o rearranjo do polímero na sílica, alcançando a mesma espessura da camada produzida pela auto-imobilização (adsorção irreversível de uma camada de polímero na sílica à temperatura ambiente na ausência de catalisadores que induzam a imobilização) mais rapidamente. Porém, se a FE permanecer a temperatura ambiente tempo suficiente para alcançar a monocamada, o tratamento térmico não altera essa configuração e os parâmetros cromatográficos não são afetados. A análise da influência de alguns fatores importantes no preparo de FE (Rainin/PMOS) utilizando planejamentos fatoriais mostrou que esta pode ser uma ferramenta muito útil no estudo de FE, de forma mais rápida e econômica. A análise elementar mostrou que ocorre uma maior cobertura do suporte nas FE preparadas com uma % carga de 44 % (m/m) de polímero. A análise cromatográfica resultou em FE com eficiências altas (~ 90000 N/m). Apesar disso, foram observados altas assimetrias de pico e baixas eficiências para o composto básico N,N-dimetilanilina, o que pode ser atribuído à grande quantidade de impurezas metálicas e ao maior número de grupos silanóis residuais presentes na superfície da sílica Rainin. De forma geral, os resultados obtidos para as FE preparadas utilizando tratamento térmico como método de imobilização apresentaram boas eficiências cromatográficas e estabilidade térmica comparável às FE quimicamente ligadas convencionais.

## Abstract

**Title:** Thermal Treatment for the Immobilization of Stationary Phases for High Performance Liquid Chromatography

**Author:** Camila Rosa Moraes Vigna

**Supervisor:** Carol Hollingworth Collins

In this work were developed stationary phases (SP) for Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC), using poly(methyloctylsiloxane) sorbed and/or immobilized onto the surface of a porous silica support using heat. Physical-chemical characterization and chromatographic evaluation of the SP prepared with different temperature conditions were carried out. The high temperature heating of SP (Kromasil/PMOS and Rainin/PMOS), 150 and 300 °C, promoted a larger coverage of polymer onto the silica surface, confirmed by percent carbon and <sup>29</sup>Si NMR that indicated the formation of chemical bonds between the polymer and the support. The phase heated a 400 °C presented a loss of polymer from the SP during the immobilization and was not appropriate for chromatographic use. Thermal treatment for 4 h at 100 °C of freshly prepared SP can be utilized to accelerate the distribution and rearrangement of polymer on silica, achieving the same layer thickness produced by self-immobilization (irreversible adsorption of a layer of polymer on silica at room temperature in the absence of initiators to induce the immobilization) more quickly. However, from the time that a monolayer has been formed by self-immobilization, the thermal treatment does not alter this configuration and, thus, does not change the resulting chromatographic parameters. Analysis of the influence of some important factors to prepare SP (Rainin/PMOS) through factorial planning showed that this can be an interesting way to study SP preparation, quickly and economically. The results for elemental analysis suggested a more successful covering of the support using a loading of 44% (w/w) silica/PMOS. The chromatographic evaluation showed high efficiencies and good peak shapes with neutral compounds (~ 90000 N/m). However, high asymmetries and low efficiency values were observed for a basic compound, N,N-dimethylaniline, which may be attributed to the larger amount of metal impurities and the greater number of remaining silanol groups present on the Rainin silica surface. The results obtained for the SP prepared with thermal immobilization give good chromatographic performances and thermal stabilities comparable to those of conventional bonded phase packing materials.

## Sumário

Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Figuras.....	xvi
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	1
1.2 Fases Estacionárias.....	2
1.2.2 A Sílica.....	2
1.2.2 Tipos de fases estacionárias.....	4
1.3 Colunas Cromatográficas.....	8
1.3.1 Enchimento de colunas para CLAE.....	9
1.3.2 Avaliação cromatográfica das colunas.....	9
1.4 Estabilidade química das fases estacionárias .....	15
1.5 Uso do planejamento fatorial na otimização de condições experimentais .....	16
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>3. Parte Experimental.....</b>	<b>21</b>
3.1 Condições Gerais.....	21
3.1.1 Reagentes e Solventes.....	21
3.1.2 Gases.....	21
3.1.3 Fase estacionária líquida.....	22
3.1.4 Suporte cromatográfico.....	22
3.1.5 Equipamentos.....	22
3.1.6 Tubos para colunas cromatográficas.....	23
3.2 Preparo das fases estacionárias.....	24
3.2.1 Fases estacionárias sorvidas.....	24
3.2.2 Condições de imobilização térmica das fases estacionárias.....	25

---

3.2.2.1 Imobilização térmica a altas temperaturas usando rampas de aquecimento.....	26
3.2.2.2 Estudo da influência do tempo de sorção do polímero na sílica antes da imobilização térmica.....	27
3.2.2.3 Estudo das condições de preparo das FE utilizando planejamento fatorial fracionário $2^{4+1}$ .....	28
3.2.3 Extração do excesso de polímero nas FE após imobilização térmica.....	29
3.3 Enchimento das colunas com fase estacionária.....	30
3.3.1 Preparo da suspensão.....	30
3.3.2 Procedimento de recheio das colunas com a fase estacionária.....	31
3.4 Fase móvel.....	32
3.5 Condicionamento das colunas.....	33
3.6 Avaliação cromatográfica das colunas.....	33
3.6.1 Misturas teste.....	33
3.6.2 Cálculo dos parâmetros cromatográficos.....	33
3.7 Estudo da estabilidade química das fases estacionárias.....	34
3.8 Caracterização física e química do PMOS, da sílica e das fases estacionárias.....	34
3.8.1 Testes Físicos.....	34
3.8.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	34
3.8.1.2 Medida de área superficial, volume e tamanho de poros.....	35
3.8.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{29}\text{Si}$ (RMN $^{29}\text{Si}$ ).....	35
3.8.1.4 Análise Termogravimétrica (TGA).....	36
3.8.2 Testes Químicos.....	37
3.8.2.1 Análise elementar.....	37
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>40</b>
4.1 Caracterização do polímero PMOS.....	40

4.1.1	Análise termogravimétrica (TGA) .....	40
4.1.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho .....	41
4.2	Caracterização das sílicas.....	41
4.2.1	Medida da área superficial, volume e tamanho de poros.....	41
4.2.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	42
4.2.3	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	43
4.3	Condições de imobilização térmica das fases estacionárias.....	44
4.3.1	Imobilização térmica a altas temperaturas usando rampas de aquecimento.....	44
4.3.1.1	Fases estacionárias Kromasil/PMOS.....	44
4.3.1.1.1	Avaliação cromatográfica.....	45
4.3.1.1.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>29</sup> Si (RMN <sup>29</sup> Si).....	48
4.3.1.2	Fases estacionárias (Rainin/PMOS).....	49
4.3.1.2.1	Avaliação cromatográfica.....	49
4.3.2	Estudo da influência do tempo de sorção do polímero na sílica antes da imobilização térmica.....	54
4.3.2.1	Análise termogravimétrica (TGA).....	55
4.3.2.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	55
4.3.2.3	Avaliação cromatográfica.....	56
4.3.3	Estudo das condições de preparo das fases estacionárias utilizando planejamento fatorial fracionário 2 <sup>4-1</sup> .....	63
4.3.3.1	Análise termogravimétrica (TGA).....	64
4.3.3.2	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....	65
4.3.3.3	Definição da vazão de trabalho.....	67
4.3.3.4	Avaliação cromatográfica.....	67
4.3.3.5	Cálculo dos Efeitos.....	70
4.3.3.6	Estudo da estabilidade química das fases estacionárias.....	77

<b>5. Conclusões.....</b>	<b>79</b>
<b>6. Referências bibliográficas.....</b>	<b>81</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>85</b>

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Coeficientes de contraste para um fatorial $2^3$ .....	17
Tabela 2: Parâmetros estudados (fatores) e seus níveis no experimento.....	28
Tabela 3: Tabela de coeficientes de contraste para o planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$ .....	29
Tabela 4: Medida de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros, diâmetro médio das partículas das sílicas Rainin e Kromasil utilizadas.....	42
Tabela 5: % C e massa específica das fases estacionárias preparadas a partir da sílica Kromasil, submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições utilizando a mistura teste 2.....	44
Tabela 6: Parâmetros cromatográficos das FE preparadas com sílica Kromasil submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, utilizando a mistura teste 2. Valores referentes à média dos valores de 3 injeções da melhor coluna obtida.....	47
Tabela 7: Parâmetros cromatográficos das FE preparadas com a sílica Rainin submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, utilizando as misturas teste 1 e 2.....	52
Tabela 8: Caracterização química das sílicas Rainin e Kromasil.....	53
Tabela 9: % C, massa específica, $\pi_{PMOS}$ , e espessura da camada, $\tau$ , da FE Kromasil/PMOS auto-imobilizadas, com ou sem posterior tratamento térmico a 100 °C por 4h.....	54
Tabela 10: Parâmetros cromatográficos obtidos para as FE em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica a 100 °C por 4h, utilizando as misturas teste 1 e 2 e fase móvel metanol:água 50:50 (v/v). Valores referentes à média dos valores de 3 injeções da melhor coluna obtida.....	59
Tabela 11: Parâmetros cromatográficos obtidos para as FE em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica a 100 °C por 4h, utilizando as misturas teste 1 e 2 e fase móvel metanol:água 70:30 (v/v). Valores referentes à média dos valores de 3 injeções da melhor coluna obtida.....	60
Tabela 12: Parâmetros cromatográficos obtidos para as FE em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica a 100 °C por 24h, utilizando as misturas teste 1 e 2 e fase móvel metanol:água 50:50 (v/v). Valores referentes à média dos valores de 3 injeções da melhor coluna obtida.....	62

Tabela 13: Quantidade retida de PMOS para as FE submetidas às diferentes condições do planejamento fatorial utilizado.....	63
Tabela 14: Perda de massa obtida das curvas cumulativas de TGA para as fases estacionárias (Rainin/PMOS) preparadas segundo os ensaios do planejamento fatorial fracionário $2^{4+1}$ .....	64
Tabela 15: Parâmetros cromatográficos obtidos para as FE, utilizando as misturas teste 1 e 2, em função dos níveis dos fatores escolhidos. Valores referentes a média dos valores de 3 injeções da melhor coluna obtida.....	70
Tabela 16: Valores de eficiência do composto naftaleno presente na mistura teste 1, média das eficiências e desvio padrão para cada ensaio.....	71
Tabela 17: Contrastes calculados para a eficiência do composto naftaleno presente na mistura teste 1.....	72
Tabela 18: Valores de eficiência do composto acenafteno presente na mistura teste 2, média das eficiências e desvio padrão para cada ensaio.....	73
Tabela 19: Contrastes calculados para a eficiência do acenafteno presente na mistura teste 2..	74
Tabela 20: Valores de eficiência do composto N,N-dimetilanilina presente na mistura teste 2, média das eficiências e desvio padrão para cada ensaio.....	74
Tabela 21: Contrastes calculados para a eficiência do composto N,N-dimetilanilina presente na mistura teste 2.....	75
Tabela 22: Valores de assimetria do composto N,N-dimetilanilina presente na mistura teste 2, média das assimetrias e desvio padrão para cada ensaio.....	76
Tabela 23: Contrastes calculados para a assimetria da N,N-dimetilanilina presente na mistura teste 2.....	76

## **Lista de Figuras**

Figura 1: Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica.....	3
Figura 2: Formação de estruturas monoméricas.....	5
Figura 3: Preparação dos polissiloxanos.....	6
Figura 4: Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos.....	10
Figura 5: Medidas e cálculo do fator de assimetria e do fator de alargamento do pico.....	13
Figura 6: Curva da equação de van Deemter mostrando as contribuições dos vários termos e a velocidade linear ótima [1].....	14
Figura 7: Estrutura do poli(metiloctilsiloxano) (PMOS).....	22
Figura 8: Esquema da coluna cromatográfica e conexões.....	24
Figura 9: Esquema do preparo das fases estacionárias sorvidas.....	25
Figura 10: Esquema do forno controlador de temperatura utilizado para o tratamento térmico.....	25
Figura 11: Esquema do procedimento de preparo das fases estacionárias utilizando altas temperaturas e rampas de aquecimento.....	26
Figura 12: Esquema do procedimento de preparo das fases estacionárias não imobilizadas e imobilizadas termicamente após diferentes períodos de repouso.....	27
Figura 13: Sistema de extração do polímero contido nas fases estacionárias (tubo de extração, 80 x 6 mm d.i.).....	30
Figura 14: Esquema do preparo da suspensão de fase estacionária.....	31
Figura 15: Sistema de enchimento de colunas.....	31
Figura 16: Nomenclatura e deslocamentos químicos das espécies silil.....	36
Figura 17: Termogramas obtidos para o polímero PMOS em: (a)atmosfera oxidante e (b)atmosfera inerte.....	40
Figura 18: Espectro obtido na região do infravermelho para o polímero PMOS.....	41

---

Figura 19: Termogramas obtidos em atmosfera oxidante para as sílicas (a)Kromasil nua e (b)Rainin nua.....	42
Figura 20: Espectros na região do infravermelho para a (a)sílica Kromasil nua e (b)sílica Rainin nua.....	43
Figura 21: Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com FE (Kromasil/PMOS) e submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, com posterior extração: (a)temperatura ambiente (30 dias de repouso), (b)100°C-24h, (c)100°C-24h/150°C-4h, (d)100°C-24h/200°C-4h, (e)100°C-24h/300°C-4h, (f)100°C-4h/400°C-4h, (g)400°C-4h. Mistura teste 2: uracil (1), fenol (2), N,N-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafteno (5). Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL min <sup>-1</sup> , volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.....	46
Figura 22: Espectros de RMN de <sup>29</sup> Si com CP/MAS das FE tratadas termicamente a (a)100°C-24h, (b)100°C-24h/200°C-4h, (c)100°C-24h/400°C-4h e (d)400°C-4h.....	48
Figura 23: Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com FE (Rainin/PMOS) e submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, com posterior extração: (a)temperatura ambiente (30 dias de repouso), (b)100°C-24h/150°C-4h, (c)100°C-4h/200°C-4h, (d)100°C-4h/300°C-4h, (e)100°C-4h/400°C. Mistura teste 1: uracil (1), acetona (2), benzonitrila (3), benzeno (4), tolueno (5), naftaleno (6). Condições cromatográficas: FM: metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,3 mL min <sup>-1</sup> , volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.....	50
Figura 24: Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com FE (Rainin/PMOS) e submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, com posterior extração: (a)temperatura ambiente (30 dias de repouso), (b)100°C-24h/150°C-4h, (c)100°C-4h/200°C-4h, (d)100°C-4h/300°C-4h, (e)100°C-4h/400°C. Mistura teste 2: uracil (1), fenol (2), N,N-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafteno (5). Condições cromatográficas: FM: metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,3 mL min <sup>-1</sup> , volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.....	51
Figura 25: Termogramas obtidos em atmosfera inerte das FE (Kromasil/PMOS) após diferentes períodos de repouso anteriores ao tratamento térmico à 100 °C por 4h.....	55

Figura 26: Espectros de IV da (a)FE auto-imobilizada por 1 dia com posterior tratamento térmico à 100 °C por 4h, (b)FE auto-imobilizada por 25 dias, com posterior tratamento térmico, (c)FE auto-imobilizada por 33 dias, sem posterior tratamento térmico.....	56
Figura 27: Cromatogramas da FE Kromasil/PMOS em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica a 100 °C por 4h, analisadas com (a) FM metanol:água 70:30 (v/v) e (b) FM metanol:água 50:50 (v/v). Mistura teste 1: uracil (1), acetona (2), benzonitrila (3), benzeno (4), tolueno (5), naftaleno (6). Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> , volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.....	57
Figura 28: Cromatogramas da FE Kromasil/PMOS em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica à 100 °C por 4h, analisadas com (a) FM metanol: água 70:30 (v/v) e (b) FM metanol:água 50:50 (v/v),. Mistura teste 2: uracil (1), fenol (2), N,N-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafteno (5). Condições cromatográficas: vazão: 0,2 mL min <sup>-1</sup> , volume de amostra: 5 µL, detecção :UV a 254 nm.....	58
Figura 29: Cromatogramas obtido para as colunas recheadas com (a,c) FE extraída após 33 dias de auto-imobilização e (b,d) FE imobilizada termicamente à 100 °C por 4h e extraída após 25 dias de auto-imobilização. Mistura teste 1 (a,b): uracil (1), acetona (2), benzonitrila (3), benzeno (4), tolueno (5), naftaleno (6). Mistura teste 2 (c,d): uracil (1), fenol (2), N,N-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafteno (5). Condições cromatográficas: FM MeOH:H <sub>2</sub> O 50:50 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> , volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.....	61
Figura 30: Termogramas obtidos em atmosfera inerte das FE (Rainin/PMOS) dos ensaios realizados segundo o planejamento fatorial fracionário 2 <sup>4-1</sup> realizado.....	64
Figura 31: Espectros obtidos na região do infravermelho para o (a)ensaio 1, (b)ensaio 2, (c)ensaio 3, (d)ensaio 4, (e) ensaio 5, (f)ensaio 6 e (g)ensaio 8.....	66
Figura 32: Curva de van Deemter.....	67
Figura 33: Cromatogramas obtidos para as colunas recheadas com as FE (Rainin/PMOS) preparadas de acordo com o planejamento fatorial: a)ensaio 1, b)ensaio 2, c)ensaio 3, d)ensaio 4, e)ensaio 5, f)ensaio 6, g)ensaio 7 e h)ensaio 8. Mistura teste 1: uracil (1), acetona (2), benzonitrila (3), benzeno (4), tolueno (5), naftaleno (6). Condições cromatográficas: vazão: 0,3 mL min <sup>-1</sup> , volume de amostra: 5 µL, FM metanol:água 70:30 (v/v), detecção: UV a 254 nm.....	68

Figura 34: Cromatogramas obtidos para as colunas recheadas com as FE (Rainin/PMOS) preparadas de acordo com o planejamento fatorial: a)ensaio 1, b)ensaio 2, c)ensaio 3, d)ensaio 4, e)ensaio 5, d)ensaio 6, e)ensaio 7 e f) ensaio 8. Mistura teste 2: uracil (1), fenol (2), N,N-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafteno (5). Condições cromatográficas: vazão: 0,3 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra: 5 µL, FM metanol:água 70:30 (v/v) detecção: UV a 254 nm..... 69

Figura 35: Avaliação da estabilidade das FE dos ensaios 3, 4 e 7 do planejamento fatorial realizado, em função do (a)fator de retenção, (b)assimetria e (c)eficiência do composto naftaleno em fase móvel metanol: tampão carbonato (50:50 v/v), pH 8,4, a 60 °C..... 78

# 1. Introdução

## 1.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura por meio da distribuição deles entre duas fases, uma que permanece estática, a Fase Estacionária (FE), e outra que se move através dela, a Fase Móvel (FM). O desenvolvimento cromatográfico se dá através das interações diferentes dos componentes da amostra com a FE e, dependendo do tipo de cromatografia, com a FM. Desta forma, cada um dos componentes é seletivamente retido pela FE, resultando em migrações diferenciais destes componentes [1].

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) tem valor reconhecido e seu emprego em vários laboratórios é considerado indispensável. O crescimento explosivo desta técnica deve-se à detectabilidade do método, sua pronta adaptabilidade para determinações quantitativas, a possibilidade de separação de espécies não voláteis e termicamente instáveis e sua aplicabilidade em vários campos da ciência e tecnologia: análises de alimentos, farmacêuticas, clínicas, toxicológicas, bioquímicas, ambientais e outras [2,3]. A única exigência da CLAE é que a amostra seja solúvel na FM. No entanto, a CLAE utiliza instrumentos caros e sofisticados. Também não se pode desprezar o custo elevado das FM (de alto grau de pureza), das FE ou das colunas prontas e da reposição periódica de componentes diversos da coluna ou do equipamento [4].

Na CLAE em fase reversa, a FM é bombeada sob alta pressão a uma vazão controlada. Uma pequena quantidade da amostra é introduzida por meio de uma válvula de injeção, sendo arrastada pela FM através da coluna e do detector. A interação entre o soluto e a FE pode ocorrer de várias formas, através de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, atrações eletrostáticas e hidrofóbicas, entre outros [2]. A separação dos componentes da amostra ocorre devido às diferenças entre os coeficientes de distribuição da amostra entre a FM líquida e a FE [5,6]. Para detectar a composição do eluato (FM + componente da amostra), existem vários detectores que podem ser colocados na saída da coluna e que são utilizados para identificar e quantificar os componentes da amostra.

A forma mais tradicional da cromatografia líquida empregava um sorvente polar (FE) como, por exemplo, a sílica ou alumina, e uma fase móvel apolar composta basicamente de um hidrocarboneto alifático, juntamente com pequenas quantidades de um hidrocarboneto clorado, como por exemplo, o clorofórmio ou um álcool, como o isopropanol. Hoje esta modalidade de cromatografia líquida é denominada como Cromatografia Líquida em Fase Normal (CLFN) e o seu princípio de separação se

baseia na interação dos grupos funcionais dos respectivos analitos com os sítios polares de adsorção da sílica cromatográfica ou de grupos polares ligados ou adsorvidos na sílica. A CLFN, na sua concepção original, têm perdido sua importância e vem sendo substituída pela Cromatografia Líquida de Fase Reversa (CLFR) [6].

Na Cromatografia Líquida de fase reversa, uma fase estacionária não polar é utilizada em conjunto com uma fase móvel polar, contendo água e um modificador orgânico miscível. Aproximadamente entre 70 e 80 % das separações utilizam essa modalidade da cromatografia líquida. A sua popularidade se deve grandemente à versatilidade dessa modalidade na qual a preparação das amostras é fácil de ser realizada, o equilíbrio das fases é rápido, os tempos de retenção são reprodutíveis e os princípios básicos do mecanismo de retenção podem ser facilmente compreendidos. Além disso, é muito aplicada à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas [7], em vários campos da ciência e tecnologia. A maioria das fases estacionárias tem como suporte cromatográfico a sílica, mas fases poliméricas e outros substratos inorgânicos como, por exemplo, a zircônia, têm sido utilizados como suporte com sucesso [6]. Dessa forma, graças à introdução de numerosos materiais para FR, têm-se conseguido um grande progresso nas separações por CLAE.

## **1.2 Fases Estacionárias**

### **1.2.2 A Sílica**

As fases estacionárias utilizadas em CLAE são constituídas por partículas pequenas e de resistência mecânica tal que suportem as elevadas pressões as quais são submetidas durante o enchimento das colunas e durante a passagem da fase móvel no processo de análise. As partículas também devem apresentar distribuição de tamanho dentro de uma faixa restrita para que haja homogeneidade no leito da coluna [8,9].

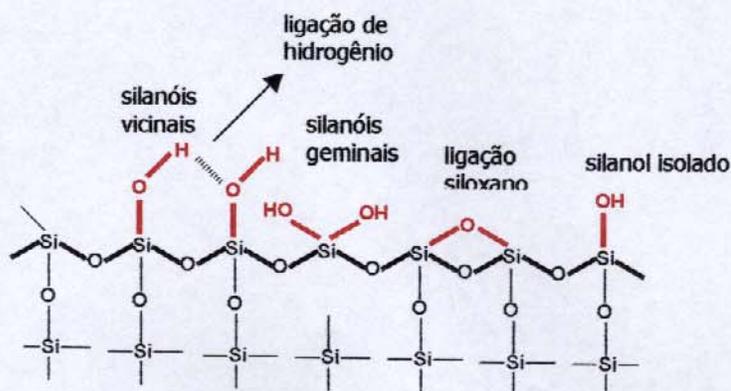
A sílica ainda é o material mais utilizado como suporte cromatográfico para as colunas de CLAE [10], devido ao fato da mesma apresentar características favoráveis como: estabilidade mecânica às pressões utilizadas no enchimento das colunas, suscetibilidade de modificação química da sua superfície a fim de produzirem materiais de diferentes seletividades, estabilidade química na maioria das condições de operação e resistência a uma grande variedade de solventes. Além disso, a sílica é disponível comercialmente em uma larga faixa de tamanho de partícula, especialmente com diâmetro inferior a 20  $\mu\text{m}$ , nas formas irregulares e esféricas, com estrutura de poros bem controlada através dos procedimentos de síntese, diâmetros de partícula distribuídos em uma faixa restrita e

grande área superficial, o que permite uma melhor distribuição das fases líquidas em suas superfícies [8].

A sílica é composta por átomos de silício internos os quais tendem a manter sua coordenação tetraédrica com o oxigênio formando a ligação siloxano ( $\text{Si-O-Si}$ ). Os átomos de silício mais externos completam seu número de coordenação através da ligação com grupos hidroxilas, formando os chamados grupos silanóis ( $\text{Si-OH}$ ). Na superfície também podem existir grupos siloxanos expostos, que são relativamente estáveis. Os grupos silanóis são considerados como fortes sítios de adsorção no processo cromatográfico, além de serem responsáveis pela reatividade da sílica frente aos diversos agentes sililantes.

Os silanóis podem se distribuir na superfície da sílica em três diferentes formas: vicinais ou ligados (dois grupos hidroxila sobre dois átomos de silício vizinhos), geminais (dois grupos hidroxila originários do mesmo átomo de silício) e isolados ou livres (um grupo hidroxila sobre um átomo de silício). Estes grupos silanóis apresentam caráter ácido [11,12]. Um modelo da estrutura da sílica está mostrado na Figura 1.

A concentração dos grupos silanóis na superfície da sílica depende muito da forma de obtenção do óxido. O valor de  $8 \mu\text{mol m}^{-2}$  é o valor mais aceito, mas valores maiores ou menores são possíveis, dependendo do tratamento que o material sofreu [13].



**Figura 1:** Tipos de silanóis presentes na superfície da sílica-gel.

Apesar da ampla aplicação das fases estacionárias baseadas em sílica, certas propriedades deste material restringem a sua utilização em uma série de separações cromatográficas. Uma delas restringe a sua utilização em uma faixa de pH de 2 até 8, devido à instabilidade da camada líquida da FE e da superfície da sílica tanto frente a fases móveis ácidas como básicas, que reagem lentamente com estas superfícies até dissolvê-las, causando perda de fase cromatográfica e, em casos extremos,

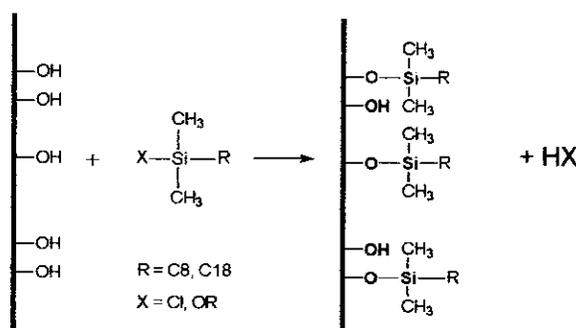
colapso da estrutura da coluna. A segunda propriedade está relacionada a não homogeneidade da superfície da sílica. Esta superfície pode conter impurezas, como alguns metais, e exibir variações no tipo e na reatividade de seus grupos silanóis [14] que, podem afetar o mecanismo de retenção de maneira indesejável, ao interagir com moléculas bio-orgânicas ou solutos básicos, adsorvendo-os. Muitas vezes esta adsorção pode ser irreversível e os compostos depositados na superfície cromatográfica podem restringir o transporte de massa, bloquear os sítios ativos de interação normal e criar sítios ativos não específicos, afetando o desempenho da coluna, podendo até levá-la a uma deterioração irreversível. Quando a adsorção é irreversível, pode modificar o comportamento do leito cromatográfico, levando a problemas de picos largos, assimétricos e com cauda, que são difíceis de serem tratados quantitativamente, além de poderem se sobrepor ou interferir nos picos de outros analitos com tempos de retenção similares [11].

### **1.2.2 Tipos de fases estacionárias**

Várias pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de se minimizar as interações com os silanóis residuais da sílica, melhorando a estabilidade química e a eficiência das fases estacionárias, para que possam ser utilizadas com os mais variados tipos de amostras. As FE utilizadas para esse fim podem ser produzidas por ligações covalentes dos grupos silanóis da superfície da sílica com grupos funcionais ativos (alcoxi/cloro) presentes nos agentes sililantes, sendo conhecidas como fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL) [6], ou, através do recobrimento do suporte com diferentes tipos de polímeros [15].

Fatores importantes exercem influência na estrutura de fases quimicamente ligadas, tais como tipo e funcionalidade do modificador silano. Os clorossilanos são mais reativos que os alcoxissilanos e, dessa forma, a preparação dessas fases, na maioria dos casos, utiliza os clorossilanos juntamente com um catalisador, que pode ser uma base receptora de prótons [16]. Independente do tipo de agente sililante utilizado, é impossível conseguir reagir todos os grupos silanóis presentes na superfície da sílica. Mesmo quando um agente sililante monofuncional é utilizado, empregando condições de reação otimizadas, o grau de recobrimento geralmente não ultrapassa o valor de  $4 \mu\text{mol m}^{-2}$ , indicando que apenas 50 % dos silanóis presentes reagem, devido ao impedimento estérico na reação com os agentes sililantes. Apesar desses silanóis não estarem disponíveis para reagirem com as moléculas dos agentes sililantes, alguns são suficientemente acessíveis para interagirem com os analitos durante a separação cromatográfica. Os mesmos contribuem com o aumento da retenção e alargamento de pico de compostos básicos [6].

A grande maioria das fases ligadas, como por exemplo as do tipo C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub> disponíveis comercialmente, são preparadas utilizando os silanos monofuncionais. A principal razão desta escolha é a busca de uma melhor reprodutibilidade na preparação de diferentes lotes de sílica modificada. Apesar disso, com agentes sililantes di ou trifuncionais, os traços de água presentes tanto na superfície da sílica, como no solvente de reação, são suficientes para promover uma polimerização e aumentar consideravelmente a quantidade de grupos orgânicos imobilizados [6]. Os estudos de estabilidade demonstram que as fases poliméricas podem ser mais estáveis em relação as fases monoméricas. Por outro lado, as fases monoméricas (Figura 2) parecem ser as preferidas pelo fato do seu preparo ser mais fácil de ser reproduzido [6].

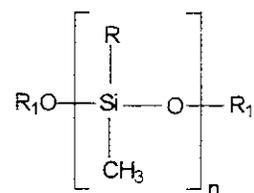


**Figura 2:** Formação de estruturas monoméricas.

A preparação de fases estacionárias através da deposição e imobilização de polialquilsiloxanos sobre a superfície da sílica cromatográfica foi inicialmente desenvolvida por Schomburg et al. na década de 80 [17]. O principal objetivo deste procedimento é recobrir totalmente a superfície da sílica com uma fina camada do polímero, deixando os poros acessíveis e, assim, bloquear os grupos silanóis. As principais vantagens destas FE sobre as FE quimicamente ligadas são: maior recobrimento dos sítios ativos do suporte, a possibilidade de maior seletividade da FE pela escolha do polímero apropriado, além da sua facilidade de preparação. A grande variedade de polímeros orgânicos disponíveis possibilita preparar FE com uma grande faixa de seletividade [18].

Dentre os polímeros já estudados, recobrimo suportes de sílica, estão o polietileno [19,20], o polibutadieno [21,22], o poliestireno [22], e alguns polissiloxanos [22,23]. A classe mais comum é a dos polissiloxanos, que apresentam ótima estabilidade térmica e termo-oxidativa, elasticidade a baixas temperaturas, temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) variada, resistência química e mecânica e cuja seletividade é função dos grupos substituintes existentes nas estruturas, como os poli(etilmetilsiloxanos), poli(metiloctilsiloxanos), poli(metiloctadecilsiloxanos) e

poli(metilfenilsiloxanos). Os poli(metilalquilsiloxanos) apresentam fórmula geral:

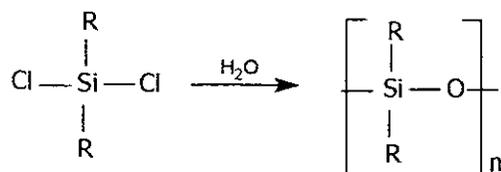


onde: R= octil, dodecil, hexadecil, octadecil, etc.

R<sub>1</sub>= metil

Enquanto a maioria dos polímeros que contém nas unidades das cadeias principais ligações carbono-carbono simples começa a degradar em temperaturas acima de 250 °C, polissiloxanos rigorosamente purificados são estáveis sob alto vácuo ou em atmosferas inertes, no mínimo a 350 – 400 °C. Esta diferença é diretamente atribuída à força de ligação do Si-O em relação à ligação C-C.

Os polissiloxanos, freqüentemente chamados de siliconas, são preparados pela hidrólise de haletos de alquil-silício ou aril-silício. A hidrólise dos haletos fornece compostos instáveis contendo silanóis que, através de condensação, levam a formação do esqueleto do siloxano. A hidrólise de dicloretos leva a polímeros lineares (Figura 3); já os tricloretos fornecem polímeros entrecruzados.



**Figura 3:** Preparação dos polissiloxanos.

Entretanto, como um método geral de preparo de polissiloxanos, a hidrólise de haletos de silício não é satisfatória, devido a tendência de formar siloxanos cíclicos (principalmente trímeros e tetrâmeros) sob as condições de hidrólise. Para obtenção de polímeros de alta massa molar, estes produtos cíclicos são purificados por destilação e polimerizados por reações de abertura de ciclo, catalisada em meio ácido. Na presença de ácido sulfúrico, há a abertura do ciclo e condensações resultando em polissiloxanos lineares. A adição de hexametildissiloxano durante a reação de polimerização resulta em grupos terminais trimetilsiloxil, pouco reativos [24].

Diferentes tipos de colunas recheadas com FE preparadas a partir da modificação dos suportes de sílica com polímeros podem ser encontrados. As técnicas para imobilização dos polímeros nos suportes podem ser classificadas de acordo com a maneira que o polímero é imobilizado ou de acordo com a rota de imobilização. Os polímeros imobilizados podem formar um filme fino sobre a superfície ou podem encher o volume de poro inteiro, podendo existir também a combinação destas duas formas. Esta classificação é bastante simplificada, porque é muito difícil preparar uma monocamada uniforme de polímero ou definir o tipo de imobilização, porque este inclui, na maioria dos casos, a combinação de vários procedimentos [15]. Em qualquer uma das formas, o polímero pode estar sorvido [25], imobilizado [26,27], quimicamente ligado [28-30], ou encapsulado [31] à sílica.

As FE encapsuladas são preparadas pela modificação do suporte com grupos funcionais antes de ligar a FE líquida. Esse processo ocorre em duas etapas. Na primeira etapa a sílica é pré-modificada com um reagente, como os grupos vinil. Numa segunda etapa é feita a encapsulação com um polímero ou monômero, ocorrendo a polimerização destes com os grupos do reagente que foram ancorados na sílica na primeira etapa.

As FE sorvidas consistem de um polímero que se encontra sorvido sobre a sílica devido à contribuição de um ou mais tipos de interações como dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre as cadeias do polímero e a sílica [32]. Dessa forma, o polímero pode recobrir toda a sílica e os solutos ficam mais protegidos de interações indesejáveis com a superfície da sílica. Essas FE sorvidas, preparadas com líquidos de alta massa molar, têm sido desenvolvidas em nosso laboratório com grande êxito [32] apresentando boas propriedades cromatográficas, similares às colunas comerciais. Além disso, o método de preparação destas fases é bastante simples quando comparado com as FE quimicamente ligadas.

Em estudos recentes em nosso laboratório, Bottoli [32] observou que a retenção de poli(metiloctilsiloxano), PMOS, nos poros da sílica aumentava com o tempo sem a aplicação de tratamento específico para promover a imobilização. Foi sugerido que, com o tempo, modificações ou rearranjos das cadeias do polímero nos poros da sílica acontecem, tornando a cadeia do polímero insolúvel frente a FM, isto é, imobilizada. Este processo foi denominado de auto-imobilização, já que não há necessidade de um agente externo indutor como calor, peróxidos ou radiação gama [32].

FE imobilizadas são obtidas através de reações entre as moléculas individuais da fase líquida sorvida, induzidas ou não por processos de entrecruzamento ou entre a fase líquida e o suporte [32]. Essas reações de entrecruzamento resultam em camadas estáveis, quando comparadas com as FE sorvidas, e são insolúveis nas fases móveis. Vários são os métodos utilizados para que essas reações

ocorram: tratamento térmico [32-34], irradiação por microondas [35], ou raios gama de cobalto-60 [4,36,37], ou ainda por agentes químicos como peróxidos, azocompostos e ozônio [38].

A radiação por microondas e a radiação gama já foram exploradas no laboratório no procedimento de recobrimento de suportes de sílica nua e sílica metalizada com óxidos de zircônio [39] ou titânio [40], com resultados bastante satisfatórios. O tratamento térmico é uma fonte de energia amplamente usada em diversos estudos e o aquecimento da amostra ocorre por condução de calor, isto é, inicialmente o recipiente contendo a amostra é aquecido e, em seguida, ocorre a transferência do calor para a amostra. O tratamento térmico têm sido utilizado para acelerar a imobilização do polímero nos suportes de sílica, auxiliando no processo de auto-imobilização. Como foi demonstrado recentemente [32], a auto-imobilização é um processo lento à temperatura ambiente, sendo necessário um considerável período de tempo, que varia dependendo da sílica utilizada, para que haja o rearranjo das moléculas de polímero em uma monocamada estável, de forma irreversível [33].

Bottoli *et al.* [34] estudaram a imobilização térmica de polialquilsiloxanos nos poros de sílica nua, sem a utilização de agentes reticulantes, como peróxidos. Para o polímero de cadeia mais curta (PMOS), a FE apresentou melhores parâmetros cromatográficos após a imobilização térmica na temperatura de 120 °C, enquanto que para o polímero de cadeia mais longa, PMODS – poli(metiloctadecilsiloxano) – a temperatura necessária ficou entre 80 a 100 °C [34]. Ambas apresentaram estabilidade alta em pH neutro e temperatura ambiente.

Tratamentos utilizando altas temperatura também foram estudados por Ohmacht *et al.* [41] na imobilização de poli(metiloctilsiloxano) (200-400 °C) na presença de peróxido. As melhores colunas continham fases preparadas a 400 °C e mostraram bons resultados a altos valores de pH.

### **1.3 Colunas cromatográficas**

Uma coluna para CLAE, que apresenta bom desempenho cromatográfico, deve ser estável, altamente eficiente e reprodutível. Para que isso aconteça, algumas propriedades devem ser observadas: [42]

- a) O recheio deve ser denso e ordenado de modo a proporcionar uma alta estabilidade;
- b) Os espaços intersticiais entre as partículas compactadas devem ter uma dimensão uniforme, de modo a resultar e um perfil homogêneo de fluxo;
- c) Devem ser rigorosamente evitados os locais de densidade de recheio desiguais, ao longo e através do eixo da coluna.

### 1.3.1 Enchimento de colunas para CLAE

Existe um grande número de variáveis envolvidas no processo de enchimento que tomam crítica essa etapa. Dois problemas principais devem ser evitados durante o enchimento de colunas: [43]

**a) Sedimentação das partículas:** pode ocorrer quando o solvente de suspensão tem densidade menor que a densidade das partículas, presença de água no solvente de suspensão e outros.

**b) Aglomeración das partículas:** quando se trabalha com partículas muito pequenas, aumenta-se a tendência em se acumular forças eletrostáticas na superfície, formando aglomerados, que impedem a livre sedimentação das partículas no leito da coluna. O atrito provocado pela alta velocidade de enchimento das colunas também pode gerar cargas na superfície. A utilização de misturas aquosas na suspensão de enchimento também pode gerar cargas negativas na superfície da sílica, favorecendo a formação de aglomerados.

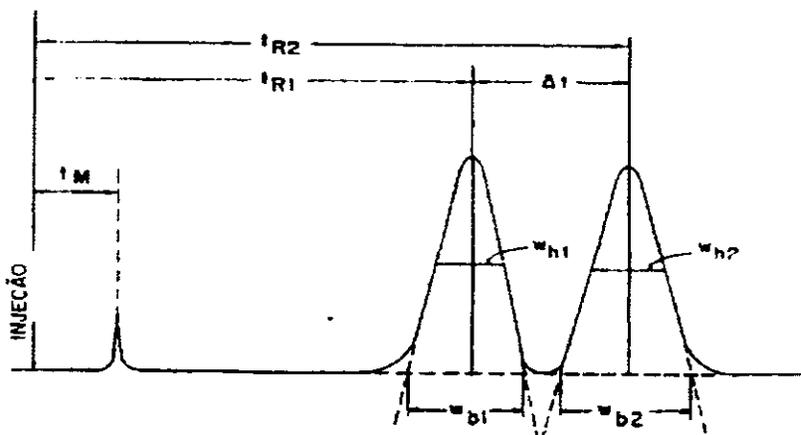
Os métodos para enchimento de colunas podem ser classificados, de uma maneira global, segundo a forma como se introduz a fase estacionária no tubo. O enchimento a seco é utilizado para se recheiar colunas com partículas de diâmetro maior que 20  $\mu\text{m}$ , enquanto que o enchimento por suspensão à alta pressão é preferido para partículas menores que 20  $\mu\text{m}$  [1].

Na técnica de enchimento por suspensão à alta pressão, prepara-se uma suspensão do material de enchimento em um solvente de suspensão. Dependendo do tipo de solvente empregado, esta suspensão pode ser classificada como suspensão com densidade balanceada (onde usa-se uma mistura de solventes cuja composição é ajustada para ter a mesma densidade das partículas das partículas a serem utilizadas no enchimento) [44,45] suspensão com solvente polar, [46], suspensão com solvente altamente viscoso [47] ou de baixa viscosidade [48], ou ainda suspensão utilizando soluções aquosas de surfactantes de baixa viscosidade [49]. A suspensão é colocada em um reservatório e, sob a ação de um solvente propulsor, preenche a coluna. O material de recheio é retido por um filtro na extremidade da coluna e compactado a alta pressão. A pressurização do solvente é feita por uma bomba pneumática movida à gás ( $\text{N}_2$ ), que opera a pressão constante.

### 1.3.2 Avaliação cromatográfica das colunas

Nos últimos anos, os avanços na tecnologia de preparação de FE têm disponibilizado comercialmente uma grande variedade de colunas para CLAE no modo fase reversa. Como as propriedades dessas FE podem variar bastante de uma para outra, vários métodos de avaliação cromatográfica para uso em rotina têm sido estudados e publicados. Os métodos químicos e físicos

comumente utilizados para dar informações a respeito das FE, como a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  ou a espectroscopia de absorção no infravermelho, necessitam do uso de instrumentação cara, podendo destruir as amostras e não necessariamente fornece todas as informações relacionadas à retenção, que inclui os efeitos de cobertura da superfície, silanóis residuais e sítios de troca iônica na superfície da sílica. Em contraste, os métodos de caracterização cromatográfica são mais expressivos e buscam medir e especificar discretas interações físico-químicas entre analitos bem caracterizados e as FE [50]. Dessa forma, a avaliação do desempenho de uma coluna pode ser feito através da determinação de parâmetros cromatográficos. Estes cálculos são realizados com os dados experimentais obtidos em um cromatograma típico, como mostra a Figura 4 [1].



**Figura 4:** Cromatograma com as medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos [1].

O tempo de retenção do analito,  $t_{R1}$ , é o tempo gasto desde o momento da injeção até a detecção do pico. O tempo de retenção de um composto não retido ou tempo de retenção da fase móvel,  $t_M$ , é o tempo gasto por ele para percorrer todo o sistema cromatográfico desde a injeção até a saída da coluna. Estes valores são obtidos diretamente do cromatograma quando se tem um integrador [1]. O tempo de retenção ajustado,  $t'_R$ , é o tempo real que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária, calculado por:

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

Outro parâmetro que também diz respeito à retenção de um soluto é o fator de retenção  $k$ , determinado pela razão dos tempos em que as moléculas do soluto ficam retidas na FE ou

percorrendo a coluna na fase móvel, de acordo com a expressão (2). Este parâmetro normalizado é bastante útil na comparação da retenção de um mesmo composto em diferentes colunas ou em diferentes composições da fase móvel [1].

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad (2)$$

Os valores ideais de  $k$  devem variar entre 0,5 a 10. Valores maiores que 10 significam uma forte interação do soluto com a fase estacionária e, conseqüentemente, um longo tempo de análise. Por outro lado, valores de  $k$  menores que 0,5 implicam em pouca interação do soluto com a fase estacionária, o que pode ser prejudicial à análise [5].

A resolução,  $R_s$ , é uma medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a expressão (3):

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

em que  $t_{R1}$  e  $t_{R2}$  são os tempos de retenção de dois analitos e  $w_{b1}$  e  $w_{b2}$  são as larguras dos picos na base, medidas em unidades de tempo. Já  $w_{h1}$  e  $w_{h2}$  se referem às larguras dos picos a meia-altura, também em unidades de tempo.

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

A eficiência e número de pratos podem ser considerados como sinônimos. Da mesma forma que a resolução,  $R_s$ , o número de pratos é uma medida da qualidade da separação cromatográfica. Enquanto a resolução é baseada na largura e no tempo de retenção de dois picos adjacentes, o número de pratos leva em consideração um único pico. A eficiência,  $N$ , representa a medida do número de etapas de equilíbrio do analito entre a fase estacionária e a fase móvel, calculado por meio da expressão (4):

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

Quanto maior o número de etapas de equilíbrio em uma coluna, melhor a separação por ela apresentada. Em um cromatograma, a eficiência é observada através do formato do pico, sendo que quanto mais estreito for o pico, maior é a eficiência da coluna na análise deste soluto.

Existem diversos fatores que podem alterar o valor do número de pratos obtidos por uma dada coluna, a saber: tamanho das partículas da fase estacionária, condições de enchimento da coluna, condições de análise, tamanho da amostra, tipo de soluto e, principalmente, comprimento da coluna. Para efeito de comparação entre colunas, a eficiência é expressa em termos de número de pratos por metro (N/m), calculado através da divisão do número de pratos da coluna pelo seu comprimento em metros.

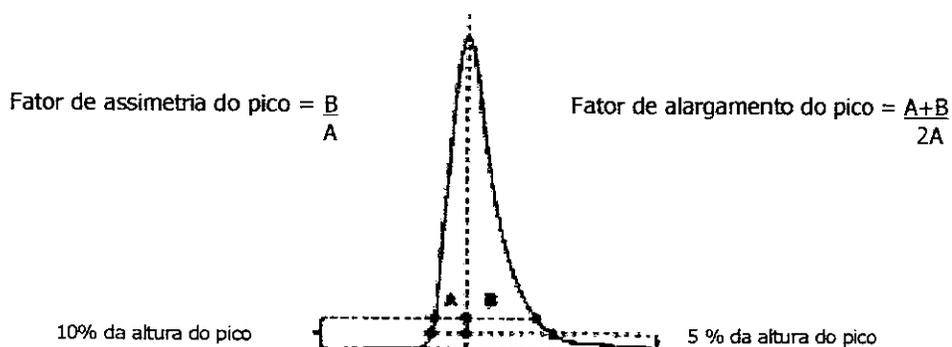
Porém, a expressão (4) só é válida para picos simétricos. Para picos assimétricos aumentam-se os erros no cálculo de N e a eficiência não pode ser expressa por este valor. É necessário então, calcular o fator de assimetria,  $A_s$ , a 10 % da altura do pico. Esse parâmetro é uma medida direta da assimetria do pico ou mais comumente denominado cauda no pico cromatográfico. Sabe-se que a assimetria distorce o pico cromatográfico, reduzindo o valor de eficiência e prejudicando a sua integração, principalmente nas análises em que a relação sinal-ruído é muito baixa e quando os dois picos não estão bem resolvidos [6].

Existem várias causas que podem acarretar no alargamento. Colunas danificadas pelo seu uso contínuo, assim como as colunas preparadas no laboratório, cujo enchimento não foi bem sucedido, podem apresentar caudas, principalmente para os compostos apolares em condições de fase reversa. Já a cauda para compostos básicos ou ionizáveis pode estar relacionada à presença dos silanóis residuais [6].

O fator de  $A_s$  deve ficar no intervalo de 0,9 a 1,2. Quanto mais simétrico o pico, melhor a separação dos componentes da mistura analisada. Acima de 1,6 as colunas devem ser descartadas [2].

Outro parâmetro cromatográfico que pode ser empregado é o fator de alargamento de pico, denominado  $T_f$ , do inglês *Tailing Factor*. Nesta abordagem a assimetria é medida a 5 % da altura do pico [51]. Esse valor começou a ser utilizado por ter sido recomendado pela United States Pharmacopeia e alguns pesquisadores [6] acreditam ser uma medida mais precisa que o parâmetro  $A_s$ . Entretanto, teoricamente não existe nenhuma vantagem em medir o alargamento de pico com um método ou outro. O valor ideal de  $T_f$  é 1,0, indicando que o pico cromatográfico é totalmente simétrico [2].

A Figura 5 mostra como é calculada a assimetria utilizando as duas maneiras:



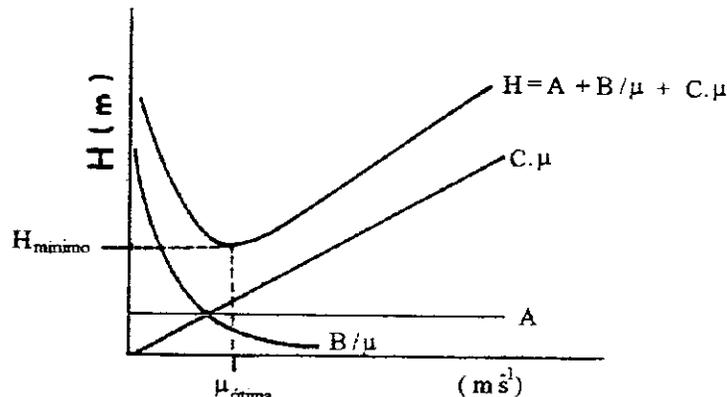
**Figura 5:** Medidas e cálculo do fator de assimetria e do fator de alargamento do pico.

A altura do prato,  $H$ , é a razão entre o comprimento da coluna ( $L$ ) expressa em metros e o número de pratos ( $N$ ), e pode ser calculada por  $H = L/N$ . Existe um outro parâmetro que é denominado de altura do prato reduzido,  $h$ . Este parâmetro é um número adimensional calculado pelo quociente da altura do prato e o diâmetro médio das partículas que compõe a FE ( $h = H/d_p$ ). Este parâmetro é útil para comparar colunas recheadas com partículas de tamanhos diferentes [6].

A eficiência de uma coluna depende da vazão que se utiliza e este comportamento pode ser verificado empregando a equação clássica de van Deemter, que matematicamente pode ser expressa como:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (5)$$

sendo que  $\mu = \frac{L}{t_M}$  é a velocidade linear da FM. A Figura 6 mostra o formato desta curva e as várias contribuições de cada um dos termos.



**Figura 6:** Curva da equação de van Deemter mostrando as contribuições dos vários termos e a velocidade linear ótima [1].

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

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

O termo **C** está relacionado com a velocidade de transferência de massa, ou seja, com a facilidade que as moléculas do soluto têm em serem transferidas da FM para a FE ou vice-versa [2]. Um fator que minimiza o termo C é a espessura do filme líquido que recobre as partículas do suporte. Quanto maior for esta espessura, maior será o termo C e menor a eficiência da coluna.

A curva da Figura 6 mostra que existe uma vazão (F) ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ( $\mu_{\text{ótima}}$ ), na qual  $H$  terá um valor mínimo e, conseqüentemente, a eficiência será máxima. Na prática, a definição da vazão ótima é obtida variando a velocidade do fluxo no sistema cromatográfico e medindo o  $N$  ou  $H$  em cada velocidade.

A completa avaliação de uma coluna cromatográfica passa pela análise de todos os parâmetros citados, com cuidado para que haja coerência entre os parâmetros calculados e o composto que está relacionado a estes dados. Deve-se ainda escolher compostos que caracterizem as propriedades de resolução, de retenção, de seletividade estérica, hidrofobicidade, de troca iônica e de interação silanofílica da coluna cromatográfica [52].

## 1.4 Estabilidade química das fases estacionárias

O uso de recheios estáveis permite que as características da coluna permaneçam inalteradas o maior tempo possível, reduzindo assim a frequência de substituição da mesma, mantendo a repetitividade nas análises. Com as fases reversas tradicionais, o primeiro sinal de degradação da coluna é o decréscimo no fator de retenção ( $k$ ) [53]. No entanto, em colunas mais estáveis, em soluções básicas,  $k$  permanece constante, ainda que estejam ocorrendo solubilizações da sílica. Neste caso, o tempo de vida das colunas também é limitado, pois, após um certo tempo, dependendo das condições de análise, a eficiência começa a ser prejudicada. Desta forma, a perda da eficiência é o melhor indicativo da deterioração da coluna, em testes realizados em meios básicos do que as medidas do  $k$  [54]. Assim, o tempo de vida de uma coluna é definido como o número de volumes de coluna da fase móvel passados através da coluna cromatográfica antes de iniciar um decréscimo significativo da eficiência.

A estabilidade das colunas convencionais baseadas em sílica depende do tipo e pureza do suporte de sílica e da natureza da fase ligada, além das condições de análise como: pH da fase móvel, temperatura, tipo e concentração do tampão e modificador orgânico utilizados na fase móvel.

Kirkland e colaboradores [55-59] definiram a influência destes fatores na dissolução da sílica em valores de pH intermediários e altos. Eles comprovaram que a solubilidade da sílica, geralmente, é maior quando são usadas fases móveis tamponadas em metanol, comparadas com as FM preparadas em acetonitrila. No entanto, isto não aconteceu para certos tipos de fases estacionárias, como as fases monoméricas estericamente protegidas, que mostraram solubilidades similares em ambos os solventes. A influência da natureza da fase ligada foi estudada comparando fases monoméricas de dimetil-C18 e de diisopropil-C18 [60]. Nesse estudo foi observado que as fases estericamente protegidas foram mais rapidamente degradadas em soluções básicas, contrariamente ao que acontece em pH ácido.

Sílicas xerogel (usualmente formadas pela precipitação de silicatos solúveis) e solgel (formadas pela hidrólise e policondensação de derivados de alcóxi siliconas, tal como ortosilicato de tetraetila) [2] foram comparadas, sendo que as do tipo xerogel dissolveram mais rapidamente devido a maior área superficial e volume de poros. Sílicas que contém elementos contaminantes de metais na sua estrutura (tipo A) mostraram menor solubilidade que as sílicas altamente purificadas (tipo B) [55].

Colunas baseadas em sílica apresentaram diferentes solubilidades, dependendo do tipo de ânion e cátion presente no tampão utilizado. No caso dos ânions, tampões de carbonato e fosfato degradaram estas colunas mais rapidamente que os tampões de borato e glicina. No caso dos cátions, a solubilidade da sílica foi diminuindo na seguinte direção:  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ . Alguns

resultados indicam que o uso de tampões com o cátion lítio pode reduzir a dissolução do suporte de sílica e, assim, melhorar a estabilidade da coluna em meios básicos [58]. Além disso, verifica-se que altas concentrações de tampão ( $> 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ ) e elevadas temperaturas ( $> 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ) influenciam fortemente na degradação da coluna.

Variados métodos têm sido empregados para testar a estabilidade de fases ligadas utilizando diversas condições de análise, não existindo um procedimento geral estabelecido [55-59,61,62]. A maioria destes procedimentos consomem grandes volumes de fase móvel e precisam de longos tempos de análise, devido à disponibilidade de fases estacionárias cada vez mais resistentes ao ataque de fases móveis alcalinas. Assim, foi desenvolvido um método usando condições mais drásticas de análise, [54] o qual permite estudar a estabilidade de colunas de fase reversa de forma mais rápida e com menos gasto de solvente. Este método consiste, principalmente, no uso de fase móvel contendo alta concentração de bicarbonato de sódio em temperatura de  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **1.5 Uso do planejamento fatorial na otimização de condições experimentais**

A Quimiometria, uma das subdivisões mais recentes da química, consiste, essencialmente, na aplicação de técnicas estatísticas a problemas químicos. O pesquisador recorre à estatística para planejar ou selecionar procedimentos experimentais de forma otimizada, além de fornecer o máximo de informação química com a análise de dados químicos. Além de minimizar os custos operacionais, um planejamento detalhado dará a ele a garantia de que seus resultados conterão informações relevantes para a solução do problema. Se o experimento tiver sido planejado corretamente essas informações poderão ser extraídas facilmente dos resultados observados, utilizando-se métodos adequados de análises [63].

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que se procura. A primeira etapa, no planejamento de um experimento, é determinar quais são os fatores e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. Os fatores, isto é, as variáveis controladas pelo experimentador, tanto podem ser qualitativos (como tipo de catalisador), como quantitativos (temperatura) [63].

Em seguida, é preciso definir claramente o objetivo que se pretende alcançar com os experimentos, porque isto determinará que tipo de planejamento experimental deve ser utilizado.

Um tipo de planejamento experimental muito empregado é o planejamento fatorial. Para executar um planejamento fatorial precisa-se, em primeiro lugar, especificar os níveis em que cada

fator será estudado, isto é, os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos. Um planejamento fatorial completo requer a execução de experimentos para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Cada um desses experimentos em que o sistema é submetido a um conjunto de níveis definido é um ensaio experimental.

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação. Isto implica na realização de ensaios em pelo menos dois níveis desse fator. Um planejamento fatorial em que todas as variáveis são estudadas em apenas dois níveis é, portanto, o mais simples de todos eles. Para  $k$  fatores, isto é,  $k$  variáveis controladas pelo experimentador, um planejamento completo de dois níveis irá requerer a realização de  $2^k$  ensaios diferentes, sendo por isso chamado de planejamento fatorial  $2^k$ . No caso do planejamento fatorial  $2^3$  serão necessários 8 ensaios [64].

No planejamento fatorial de dois níveis costuma-se identificar os níveis superior e inferior com os sinais (+) e (-), respectivamente. A Tabela 1 mostra um exemplo de como são colocados os coeficientes de contraste para um fatorial  $2^3$ , a partir da matriz de planejamento, onde os sinais se alternam, sempre começando com o nível (-) na primeira coluna [64]. As demais colunas são obtidas sempre duplicando os sinais da coluna anterior. Dessa forma, a segunda coluna é obtida duplicando os sinais que aparecem na primeira coluna, a terceira coluna é obtida duplicando os sinais da segunda e assim por diante.

Os sinais para calcular as interações de dois fatores **12**, **13** e **23** e de três fatores **123** são obtidos multiplicando os sinais das correspondentes colunas, pertencentes aos fatores principais. Com todos esses sinais são calculados os efeitos, incluindo a coluna de sinais positivos para o cálculo da média. Através do planejamento experimental não existem informações ociosas, pois tanto os efeitos principais quanto os de interação são calculados utilizando-se todas as respostas obtidas experimentalmente.

**Tabela 1:** Coeficientes de contraste para um fatorial  $2^3$ .

Ensaio	1	2	3	Respostas
1	-	-	-	$Y_1$
2	+	-	-	$Y_2$
3	-	+	-	$Y_3$
4	+	+	-	$Y_4$
5	-	-	+	$Y_5$
6	+	-	+	$Y_6$
7	-	+	+	$Y_7$
8	+	+	+	$Y_8$

Fazendo todos os ensaios em duplicata é obter uma estimativa do erro experimental associado à determinação de uma resposta individual e, portanto, decidir, de acordo com a extensão do erro, se existem ou não efeitos estatisticamente significativos dos fatores sobre a resposta. Quando o efeito de uma variável depende do nível de outra, diz-se que as duas variáveis interagem e pode-se calcular esse efeito de interação entre elas.

Para obter as estimativas do erro experimental calcula-se a **estimativa da variância para cada observação individual ( $s^2$ )**, dada por:[48]

$$V(x) = s^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{N-1} \quad (6)$$

onde  $y_i$  = medida (ou resposta),  $\bar{y}$  = média das respostas, N = número de respostas

Seguidamente pode-se calcular a **estimativa conjunta da variância ( $s_p^2$ )**, tomando-se a média ponderada de todas as estimativas:

$$s_p^2 = \frac{U_1 s_1^2 + U_2 s_2^2 + \dots + U_n s_n^2}{U_1 + U_2 + \dots + U_n} \quad (7)$$

onde  $U_i = N_i - 1$  = número de graus de liberdade de  $s_i^2$ ;  $s_i^2$  = estimativa da variância do i-ésimo ensaio.

A raiz quadrada de  $s_p^2$  fornece o **erro experimental**, também conhecido com **erro padrão (S)**:

$$S = (s_p^2)^{1/2} \quad (8)$$

Para verificar se os efeitos calculados são significativamente diferentes de zero, pode-se empregar o teste  $t$  de Student, utilizando seus valores tabelados no nível de 95 % de confiança e 8 graus de liberdade [64]. Para isto, é necessário calcular primeiramente a **variância de um efeito ( $V_{(efeito)}$ )**, através da equação 9:

$$V(\text{efeito}) = V(\bar{y}_{.}) + V(\bar{y}_{.}) = \frac{s^2}{N} + \frac{s^2}{N} \quad (9)$$

Através da raiz quadrada da variância de um efeito, obtemos o **erro padrão de um efeito** ( $S_{(\text{efeito})}$ ) (equação 10):

$$s(\text{efeito}) = [V(\text{efeito})]^{1/2} \quad (10)$$

Os efeitos cujas estimativas forem superiores em valor absoluto ao produto do erro padrão de um efeito pelo ponto de distribuição de Student, ( $S_{(\text{efeito})} \times t_v$ ) serão estatisticamente significativos. Deve-se ter em conta que o valor de  $v$  corresponde à somatória do número de graus de liberdade para cada ensaio ( $\sum v_i$ ). No caso de um planejamento fatorial  $2^3$ ,  $v$  equivale a 8.

Quando o número de fatores aumenta, crescem as chances de que um ou mais fatores não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, ou por meio de efeitos de interação. Por outro lado, em muitas situações, o pesquisador não conhece todos os fatores que afetam significativamente a resposta. Nesse caso, é conveniente incluir no estudo o maior número possível de fatores. Isso é possível usando-se planejamentos fatoriais fracionários ao invés de fatoriais completos [64]. Os planejamentos fatoriais fracionários são extremamente econômicos e podem ser usados para estudar dezenas de fatores de uma só vez.

## 2. Objetivos

Preparar fases estacionárias para CLAE - FR a partir da sorção e / ou imobilização do polímero poli(metiloctilsiloxano) PMOS por tratamento térmico, visando a obtenção de um material que resulte em uma coluna com boa eficiência cromatográfica e estabilidade química.

Para alcançar o objetivo proposto, o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- (a) preparar as fases estacionárias sorvidas  $\text{SiO}_2$ (PMOS);
- (b) promover a imobilização térmica do polissiloxano no suporte em diferentes condições;
- (c) caracterizar as fases estacionárias preparadas por meio de testes químicos, físicos e cromatográficos;
- (d) testar a estabilidade química das FE através da passagem de FM básica.

## 3. Parte Experimental

### 3.1 Condições Gerais

#### 3.1.1 Reagentes e Solventes

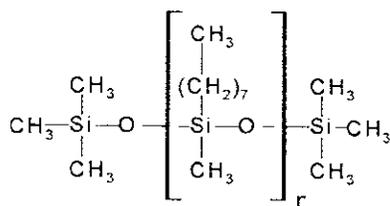
- \* Acenafteno, 99%, Aldrich
- \* Acetona p.a., Merck
- \* Ácido Nítrico p.a, Nuclear
- \* Água deionizada, sistema Milli-Q, Millipore
- \* Benzeno p. a., Synth
- \* Benzonitrila p. a., Riedel-de Haën
- \* Clorofórmio para cromatografia, Mallinckrodt ChromAR HPLC
- \* Fenol, 99%, Aldrich
- \* Hexano, Mallinckrodt ChromAR HPLC
- \* Metanol, Mallinckrodt ChromAR HPLC
- \* Naftaleno, p.a. Carlo Erba
- \* N,N-Dimetilanilina, 98%, Fluka
- \* Pentano, Merck
- \* Tolueno, planta piloto, IQ/Unicamp
- \* Uracil, 98%, Aldrich

#### 3.1.2 Gases

- \* Nitrogênio, White Martins

### 3.1.3 Fase estacionária líquida

A fase estacionária utilizada nesse estudo foi o poli(metiloctilsiloxano)(PMOS), da United Chemical Technologies, que é um líquido apolar de massa molar média 16000 Da, (Figura 7).



**Figura 7:** Estrutura do poli(metiloctilsiloxano) (PMOS).

### 3.1.4 Suporte cromatográfico

Foram utilizados dois suportes:

- sílica Kromasil: forma esférica, tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , fabricante Akzo Nobel
- sílica Rainin: forma esférica, tamanho de partícula 5  $\mu\text{m}$ , fabricante Rainin Instrument Co. Inc.

### 3.1.5 Equipamentos

- \* Agitador magnético, Corning modelo PC-351
- \* Agitador Roto Torque, Cole-Parmer Instruments Company, Model nº 7637-01
- \* Analisador elementar, Perkin Elmer, modelo 2400 Series II
- \* Analisador termogravimétrico, TA Instruments, modelo A-2050, sensibilidade de 0,0001 g
- \* Balança analítica, Fischer Scientific, modelo A-250
- \* Banho de Ultra-som, Thornton, modelo T14
- \* Bomba a vácuo, Marconi
- \* Bomba de enchimento de colunas, marca Haskel, com faixa de pressão disponível entre 0-50000 psi, modelo nº 51769

- \* Cromatógrafo a líquido utilizado para avaliar o desempenho das colunas, constituído por bomba de alta pressão, do tipo pistão cabeça dupla, Waters modelo 510, detector UV/Visível, de comprimento de onda variável entre 190 a 600 nm, com cela de caminho ótico de 10 mm, Waters, modelo 486, injetor do tipo Rheodyne 7725i, microcomputador tipo Pentium, 90 MHz, com sistema de aquisição e tratamento de dados Chrom Perfect e Report Write Plus, Justice Innovations
- \* Cromatógrafo a líquido utilizado para a realização dos testes de estabilidade constituído de um sistema de degaseificação em linha, com bomba de vácuo, Alltech; bomba de alta pressão, do tipo pistão cabeça dupla, Shimadzu, modelo LC-10AD; detector espectrofotométrico de absorção de UV/Vis, com comprimento de onda variável, Shimadzu, modelo SPD-10; auto-injetor, amostrador programado de 5  $\mu$ L, Shimadzu, modelo SIL-10 A; sistema de aquisição de dados, constituído de um microcomputador do tipo Pentium III, 700 Mhz, com software de sistema de tratamento de dados cromatográficos Shimadzu Class Vip; forno para coluna Shimadzu, modelo CTO-10AS, controlador de sistema Shimadzu, modelo SCL-10A
- \* Espectrofotômetro de infravermelho Perkin Elmer, modelo FT-IR 1600
- \* Espectrômetro de RMN Bruker, ASX 300
- \* Estufa a vácuo, Yamato modelo ADP 21
- \* Forno controlador de temperatura e processo, tipo tubular, EDG 10 P-S, EDG Equipamentos e Controles, dotado com sistema construído no laboratório para controlar a atmosfera nos tubos
- \* Porosímetro, Micromeritics, modelo ASAP 2010
- \* Sistema de extração em fluxo contínuo, constituído de bomba de alta pressão, Waters, modelo 510, acoplada a um forno de coluna, Eldex, modelo CH-150
- \* Sistema purificador de água, Millipore, modelo Milli Q-Plus

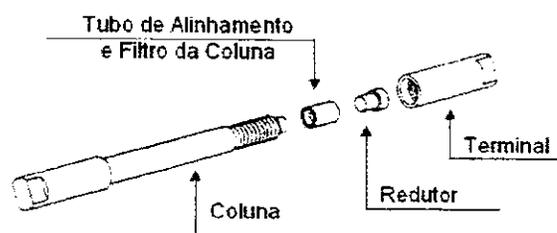
### **3.1.6 Tubos para colunas cromatográficas**

Foram usados tubos de aço inoxidável 316 L, sem costura, de formato cilíndrico, com comprimento de 60 mm e 3,9 mm de diâmetro interno. A superfície interna do tubo foi polida segundo por um método segundo um procedimento desenvolvido no LabCrom [65]. O procedimento

consiste na passagem, através do interior do tubo de aço, de uma haste de metal giratória envolvida em palha de aço e pasta de polimento, fixada em uma furadeira de bancada.

Após o polimento, os tubos foram lavados com ácido nítrico 50 %, água e etanol. Este processo foi feito até se obter uma superfície interna altamente polida e livre de imperfeições.

O acabamento e confecção dos terminais da coluna (Figura 8) foram realizados na oficina mecânica do Instituto de Química da Unicamp.



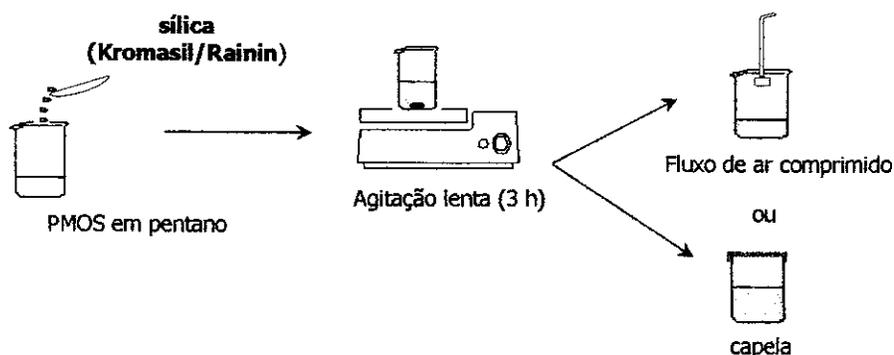
**Figura 8:** Esquema da coluna cromatográfica e conexões.

## **3.2 Preparo das fases estacionárias**

### **3.2.1 Fases estacionárias sorvidas**

As FE sorvidas foram preparadas pelo método de evaporação do solvente [66] que consiste no contato de massas apropriadas de PMOS, dissolvido em solvente adequado, e de sílica, com agitação lenta por 3 horas. A % de carga de polímero e a sílica utilizada variaram, de acordo com cada estudo realizado.

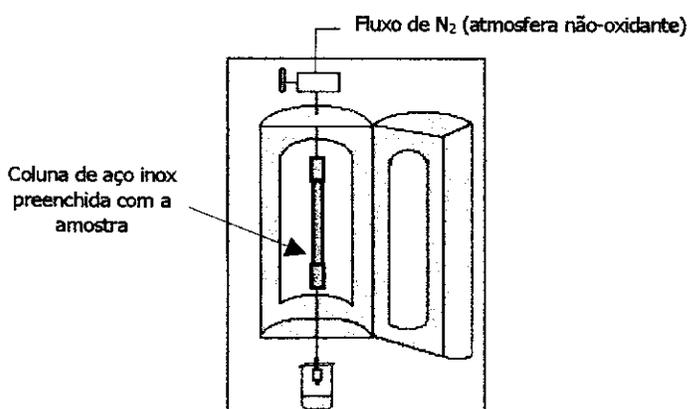
Antes do contato com o PMOS, a sílica foi ativada através do aquecimento a 150 °C por 24 horas para eliminar a água fisicamente adsorvida. O solvente de preparação utilizado foi o pentano, muito volátil e no qual o PMOS é solúvel, resultando em uma evaporação rápida. Após a agitação da suspensão sílica/PMOS em pentano, o solvente foi rapidamente evaporado com a ajuda de um pequeno fluxo de ar comprimido ou deixado na capela para evaporação lenta do solvente, dependendo do procedimento realizado, como indica a Figura 9.



**Figura 9:** Esquema do preparo das fases estacionárias sorvidas.

### 3.2.2 Condições de imobilização térmica das fases estacionárias

A imobilização térmica do PMOS foi promovida sob diferentes condições, variando-se a temperatura e o tempo de aquecimento. Para isso, foi utilizado um forno controlador de temperatura, Figura 10, como fonte geradora de calor, contendo uma coluna de aço inox preenchida com a amostra. Tal coluna foi acoplada diretamente a um tubo pelo qual passava um fluxo de nitrogênio, fazendo com que todo o processo de tratamento térmico da fase ocorresse em atmosfera não-oxidante.

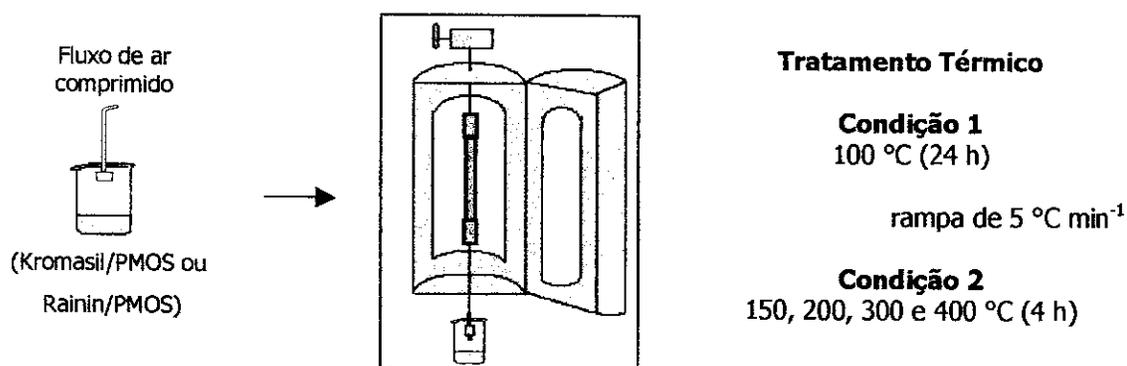


**Figura 10:** Esquema do forno controlador de temperatura utilizado para o tratamento térmico.

### 3.2.2.1 Imobilização térmica a altas temperaturas usando rampas de aquecimento

A imobilização das FE foi feita utilizando rampas de aquecimento, envolvendo dois passos, submetendo a FE a diferentes temperaturas e tempos de aquecimentos consecutivos. Dessa forma, logo após a evaporação do solvente, um lote grande de FE sorvida (Kromasil/PMOS ou Rainin/PMOS) foi dividido em porções e cada porção foi submetida, primeiramente, a um tratamento térmico de 100 °C (Temperatura 1) por 24 h. Este primeiro passo, chamado de "imobilização por adsorção", é necessário para que ocorra a adsorção e rearranjo das moléculas de polímero na superfície e poros da sílica. A temperatura foi escolhida dentro da faixa (80 – 120 °C) onde são obtidas espessuras do polímero do tipo monocamada nos poros da sílica [32].

Logo em seguida, as diversas amostras foram aquecidas por um período fixo de tempo (4 h), variando-se as temperaturas entre 150, 200, 300 e 400 °C (Temperatura 2) em cada uma, Figura 11. Neste segundo passo, chamado de "imobilização da fase ligada", pode ocorrer a quebra de várias ligações, com possível formação de ligações fortes na superfície do suporte. Além disso, já foi demonstrado que o aquecimento em temperaturas maiores (150 - 300 °C) produz espessuras do polímero do tipo bicamada [4,32].



**Figura 11:** Esquema do procedimento de preparo das fases estacionárias utilizando altas temperaturas e rampas de aquecimento.

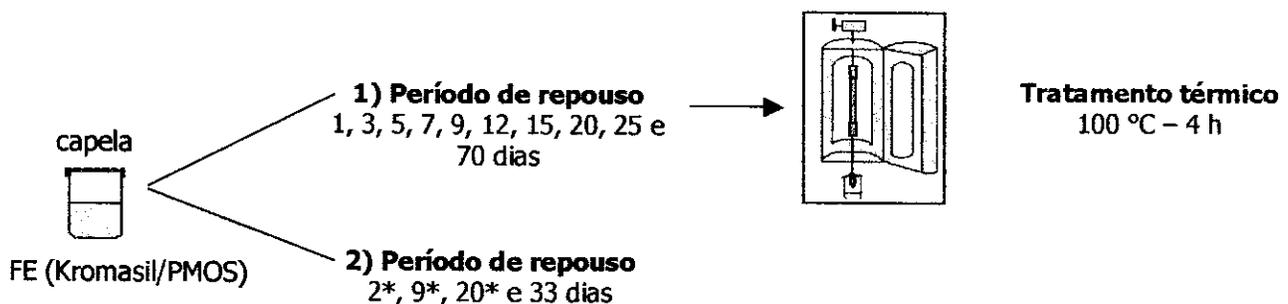
O mesmo procedimento foi realizado com as sílicas Kromasil e Rainin com o objetivo de analisar a influência das características do suporte no desempenho cromatográfico das FE preparadas. As FE preparadas com a sílica Kromasil tinham  $\bar{m}_{\text{PMOS}} = 0,80$  g PMOS / g sílica ( $\bar{m}_{\text{PMOS}}$  = massa específica), equivalente a uma porcentagem de carga de 44 %, suficiente para encher todos os poros da sílica. Já as preparadas com a sílica Rainin tinham

$\bar{m}_{\text{PMOS}} = 0,51 \text{ g PMOS / g sílica}$ , equivalente a uma carga de 44 %, 10 % a mais que o suficiente para encher todos os poros da sílica.

Por fim, todas as fases foram extraídas para retirar o excesso de polímero (PMOS não-imobilizado) presente e, em seguida, estas FE foram usadas no enchimento de colunas.

### 3.2.2.2 Estudo da influência do tempo de sorção do polímero na sílica antes da imobilização térmica

Neste caso, outro lote de FE sorvida (Kromasil/PMOS) ( $\bar{m}_{\text{PMOS}} = 0,80 \text{ g PMOS / g sílica}$ ) foi dividido em porções que foram mantidas à temperatura ambiente por 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 20, 25 e 70 dias (auto-imobilização). Em seguida, tais porções foram submetidas ao tratamento térmico por 4 h à 100 °C, para verificar se o tratamento térmico modifica a camada auto-imobilizada. Novamente, após cada procedimento de imobilização, o excesso de PMOS (não imobilizado) foi extraído das FE e, em seguida, estas fases foram usadas no enchimento de colunas. Para que fosse possível analisar apenas a influência da auto-imobilização, extraíram-se e analisaram-se fases mantidas à temperatura ambiente por diferentes dias sem nenhum posterior tipo de imobilização térmica (Figura 12).



**Figura 12:** Esquema do procedimento de preparo das fases estacionárias não imobilizadas e imobilizadas termicamente após diferentes períodos de repouso.

\*: Dados retirados de um trabalho feito em conjunto, publicado no artigo da referência [18].

### 3.2.2.3 Estudo das condições de preparo das FE utilizando planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$

O planejamento fatorial fracionário foi escolhido pois através dele é possível estudar um maior número de fatores de forma mais rápida e econômica. Além disso, nesse tipo de planejamento fatorial, a informação desejada pode ser obtida a partir de um número de ensaios bem menor, correspondente a uma fração do número de ensaios de um fatorial completo.

Os fatores escolhidos para estudo na preparação de FE (Rainin/PMOS) e seus níveis se apresentam na Tabela 2.

**Tabela 2:** Parâmetros estudados (fatores) e seus níveis no experimento.

Fator		Nível	
		(-)	(+)
1	% carga de PMOS	34	44
2	Temperatura de aquecimento (° C)	120	140
3	Tempo de aquecimento (h)	8	16
4	Tempo de repouso (dias) (auto imobilização)	4	8

As porcentagens de carga escolhidas correspondem a uma  $\bar{m}_{\text{PMOS}} = 0,49$  g PMOS / g sílica (34 %), suficiente para encher todos os poros da sílica utilizada e, a um excesso de 10 % dessa quantidade (44 %). As temperaturas e os tempos de aquecimento escolhidos foram baseados em trabalhos anteriores, utilizando FE preparadas a partir da sílica Kromasil e o PMOS [67]. Já os tempos de repouso selecionados, 4 e 8 dias, foram escolhidos com base em trabalhos anteriores [18] que realizaram estudos cinéticos de adsorção do PMOS sobre a sílica Davisil e Rainin. Os resultados sugerem que nesse intervalo já é possível observar a formação de uma monocamada auto-imobilizada de PMOS sobre a sílica.

Neste caso, como temos 4 fatores, seriam necessários  $2^4 = 16$  ensaios, sem repetição, para realizar um planejamento fatorial completo do tipo  $2^4$ . Já com o planejamento fatorial fracionário escolhido, foram necessários apenas 8 ensaios, com repetição, realizados segundo a tabela de coeficientes de contraste descrita na Tabela 3. Tal planejamento nada mais é que uma fração meia de um fatorial completo do tipo  $2^4$ . Costuma-se representá-lo com a notação  $2^{4-1}$ , que é a metade de  $2^4$ :

$$\frac{2^4}{2} = 2^{-1} 2^4 = 2^{4-1} = 8 \text{ ensaios}$$

**Tabela 3:** Tabela de coeficientes de contraste para o planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$

Ensaio	I	1	2	3	4 <sup>a</sup>
1	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	+
3	+	-	+	-	+
4	+	+	+	-	-
5	+	-	-	+	+
6	+	+	-	+	-
7	+	-	+	+	-
8	+	+	+	+	+

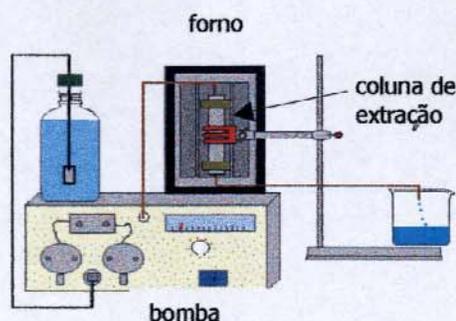
<sup>a</sup>Os sinais para o fator 4 foram obtidos através da relação geradora  $4 = 123$

Após o preparo, todas as FE foram extraídas utilizando o solvente hexano para retirar o excesso de PMOS (não imobilizado).

### 3.2.3 Extração do excesso de polímero nas FE após imobilização térmica

Todas as fases foram extraídas para retirar o excesso de polímero presente, utilizando-se tubos de aço inox, dentro de um forno de coluna (50 °C), acoplado a uma bomba cromatográfica. O solvente de extração (hexano) foi bombeado através do material contido no tubo por 3 horas a 0,5 mL min<sup>-1</sup> e, o eluato foi coletado num béquer [64] (Figura 13). A extração foi realizada sempre no dia seguinte aos tratamentos térmicos. Após a extração, a FE foi transferida para um béquer e deixada na capela para evaporação do solvente. Em seguida, estas fases foram usadas no enchimento de colunas.

A quantidade de polímero extraído da sílica foi calculada a partir dos resultados da análise elementar de carbono (% C) do material contido no tubo antes e após a extração.



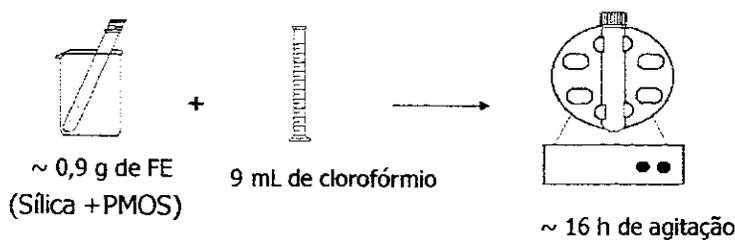
**Figura 13:** Sistema de extração do excesso de polímero contido nas fases estacionárias (tubo de extração, 80 x 6 mm d.i.).

### 3.3 Enchimento das colunas com fase estacionária

#### 3.3.1 Preparo da suspensão

As concentrações ideais de suspensão ainda são polêmicas e variam entre 1 e 30 % massa/volume (m/v). Muitos pesquisadores preferem suspensões diluídas, entre 1 e 10 % (m/v), para evitar o risco da formação de aglomerados das partículas. Baseado em trabalhos anteriores [4], escolheu-se a concentração de 10 % (m/v) das fases estacionárias para o preparo das suspensões no solvente clorofórmio.

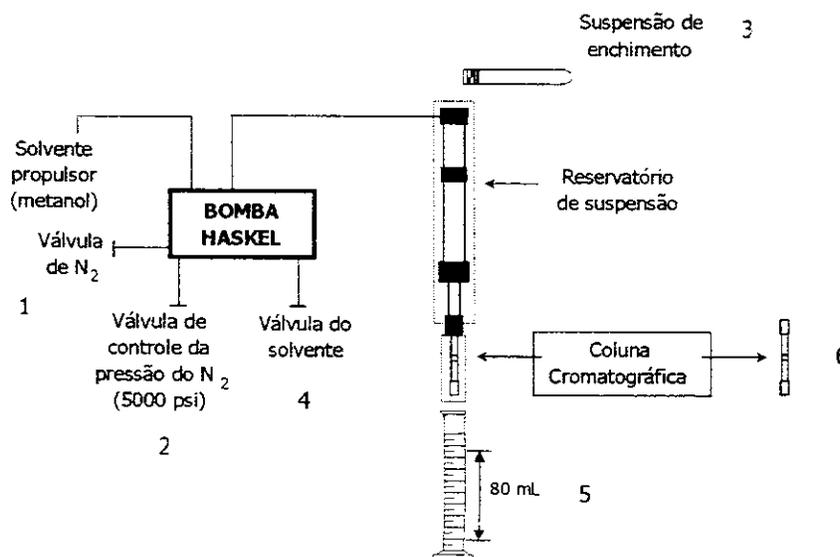
A massa de fase estacionária necessária para fazer o enchimento é proporcional ao volume da coluna, que é calculado através da equação do volume de um cilindro. Considerando a densidade da sílica, o valor de volume pode ser convertido para massa de fase estacionária, acrescentando 20 % deste valor para garantir um excesso de fase estacionária no enchimento da coluna. Dessa maneira, para as colunas de 60 mm de comprimento utilizadas, foram pesados aproximadamente 0,9 g de FE, que foram suspensas em 9 cm<sup>3</sup> do solvente clorofórmio em um tubo de ensaio com tampa. As suspensões foram agitadas mecanicamente em um agitador roto-torque por um período mínimo de 16 horas, antes de serem colocadas no reservatório do sistema de enchimento. Foram feitas várias suspensões, utilizando-se cada uma das amostras de FE submetidas à imobilização por tratamento térmico (Figura 14).



**Figura 14:** Esquema do preparo da suspensão de fase estacionária.

### 3.3.2 Procedimento de recheio das colunas com a fase estacionária

As colunas cromatográficas foram recheadas utilizando o método de suspensão à alta pressão, representado na Figura 15, que consiste de coluna, reservatório de suspensão de 32 mL, bomba de enchimento Haskel e cilindro de nitrogênio.



**Figura 15:** Sistema de enchimento de colunas [35].

Antes de iniciar o procedimento de enchimento, todo o sistema é passado por uma vistoria, para se certificar que não há vazamentos na linha e nem a presença de resíduos no interior do

reservatório de suspensão e conexões. Vazamentos podem gerar variação da pressão, causando um enchimento não homogêneo da coluna que, podem resultar na perda de sua eficiência.

O procedimento de enchimento consiste em preencher o reservatório de solvente com o solvente propulsor, metanol previamente filtrado, e ajustar a bomba em uma pressão fixa de 5000 psi (34,5 MPa) (1 e 2). Depois, conecta-se a coluna cromatográfica ao reservatório de suspensão, transfere-se a suspensão (3) para o reservatório e completa-o com clorofórmio. A válvula do solvente propulsor é aberta e a pressão exercida pelo gás nitrogênio força a passagem do solvente de suspensão ( $\text{HCCl}_3$ ) e depois do solvente propulsor ( $\text{MeOH}$ ) pela fase estacionária (4), que fica retida graças à presença de um filtro ao final da coluna (6). A pressão constante durante o enchimento irá resultar em um leito bem compactado e homogêneo, ideal para as separações cromatográficas. O sistema é mantido sob pressão até se coletar 80 mL de solvente (5). Terminado o enchimento, o sistema é despressurizado e a coluna é desconectada do reservatório após 15 minutos. O excesso de FE que sobra no topo da coluna é removido e são colocadas as conexões da coluna (filtro, redutor e porca terminal).

### **3.4 Fase móvel**

As fases móveis usadas em CLAE devem apresentar as seguintes características: ser de alto grau de pureza ou de fácil purificação, dissolver a amostra sem decompor os seus componentes, não decompor ou dissolver a fase estacionária, ter baixa viscosidade, ser compatível com o tipo de detector utilizado e ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra [1]. Outros requisitos secundários também devem ser considerados como ser o menos tóxica possível, além de ser comercialmente disponível a um preço acessível.

Para avaliar as colunas recheadas com as FE preparadas, utilizou-se como fase móvel (para fase reversa) uma mistura de metanol:água na proporção de 70:30 (v/v). A mistura foi feita juntando volumes medidos independentemente em provetas apropriadas. Esta mistura foi utilizada porque a fase estacionária é apolar, portanto a fase móvel deve ser mais polar para permitir a eluição diferencial dos componentes da amostra analisada.

Todos os solventes foram filtrados em uma membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Antes de ser colocada no reservatório do cromatógrafo, a FM foi degaseificada num banho ultrassônico por alguns minutos para eliminar bolhas de ar que podem prejudicar o processo cromatográfico.

### 3.5 Condicionamento das colunas

Após o enchimento da coluna, é necessário fazer seu condicionamento com a fase móvel para eliminar todos os vestígios de solventes usados no enchimento e para a fase estacionária ficar em equilíbrio com a fase móvel.

O condicionamento da coluna foi feito sem acoplá-la ao detector para evitar que partículas que porventura pudessem sair da coluna obstruíssem a tubulação de entrada ou saída do detector ou, principalmente, a cela de detecção. O condicionamento foi realizado por um período de 2 horas a uma vazão de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$  com FM metanol:água 70:30 (v/v).

### 3.6 Avaliação cromatográfica das colunas

#### 3.6.1 Misturas teste

A avaliação cromatográfica foi feita em vazão de fase móvel de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$  para a sílica Kromasil e  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$  para a sílica Rainin. Duas misturas teste foram utilizadas para a avaliação das colunas: a mistura teste 1, contendo os compostos uracil, acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno (compostos neutros de diferentes polaridades) e a mistura teste 2, que além de conter compostos neutros, contém também compostos ácidos e básicos (uracil, fenol, N-N-dimetilanilina, naftaleno, acenafteno) [69].

As duas misturas foram dissolvidas em metanol:água 70:30 (v/v) e armazenadas na geladeira.

O uracil foi adicionado nas misturas-teste para se obter o valor do  $t_m$ , tempo necessário para a passagem da fase móvel através da coluna, valor útil nos cálculos do parâmetro cromatográfico  $k$ .

#### 3.6.2 Cálculo dos parâmetros cromatográficos

Todas as análises foram realizadas utilizando o detector UV/Visível no comprimento de onda de 254 nm. O volume de amostra injetada foi sempre de  $5 \mu\text{L}$  e as injeções foram feitas em duplicata ou triplicata. A avaliação do desempenho da coluna foi feita através da determinação dos parâmetros cromatográficos fator de retenção ( $k$ ), eficiência (expressa em números de pratos por metro,  $N/m$ ), fator de assimetria a 10 % ( $As_{10}$ ) (principalmente do composto N,N-dimetilanilina, que expressa a atividade silanofílica) e resolução (expressa a separação entre os compostos da mistura,  $R_s$ ), obtidos diretamente do sistema de aquisição de dados do programa Chrom Perfect.

### **3.7 Estudo da estabilidade química das fases estacionárias**

Com o objetivo de verificar a estabilidade química das FE preparadas, algumas colunas foram submetidas diretamente às condições mais drásticas de análise [54], utilizando uma FM MeOH: tampão carbonato 0,1 mol L<sup>-1</sup> 50:50 (v/v), pH 8,4, em temperatura de 60 °C, uma vez que os testes convencionais são muito demorados e consomem muito solvente. A análise foi feita injetando-se a mistura teste 1 a cada determinado volume da FM tamponada passada, analisando-se sempre os parâmetros cromatográficos de N/m, A<sub>S10</sub> e k do composto mais retido, o naftaleno.

Como já foi dito, o tempo de vida de uma coluna é definido como o número de volumes de coluna da FM passados através da coluna cromatográfica antes de ser observado um decréscimo significativo da eficiência. O volume da coluna, V<sub>c</sub>, é calculado segundo a equação 11:

$$V_c = \pi \cdot r^2 \cdot L \quad (11)$$

onde r = raio da coluna (mm) e L = comprimento da coluna (mm).

Dessa forma, podemos construir gráficos de N/m, A<sub>S10</sub> e k *versus* V<sub>c</sub> para analisar o comportamento desses parâmetros cromatográficos de acordo com a quantidade de FM passada através da coluna, expressa em volumes de coluna.

### **3.8 Caracterização física e química do PMOS, da sílica e das fases estacionárias**

#### **3.8.1 Testes Físicos**

##### **3.8.1.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho**

A espectroscopia na região do infravermelho foi aplicada ao polímero, à sílica e às fases estacionárias, com o objetivo de avaliar qualitativamente a presença de grupos funcionais característicos.

Os espectros foram obtidos no intervalo espectral de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>. As amostras sólidas foram preparadas utilizando pastilhas de brometo de potássio (KBr), enquanto a amostra de PMOS foi preparada sob a forma de um filme em cela de cloreto de sódio (NaCl).

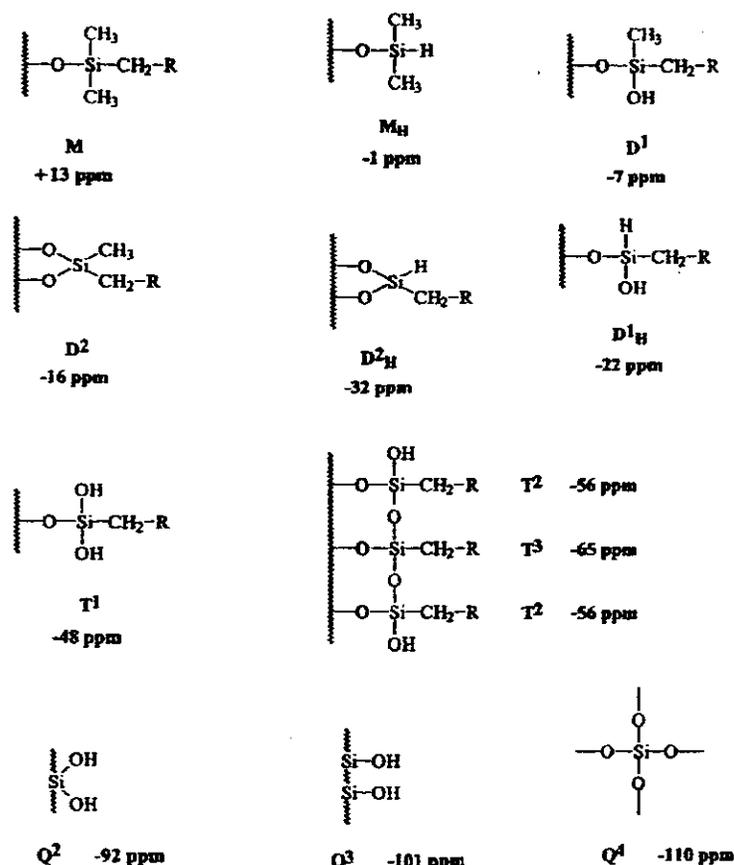
### 3.8.1.2 Medida de área superficial, volume e tamanho de poros

A porosidade baseia-se nas medidas de sorção de nitrogênio nos sólidos porosos, a qual é quantificada através das isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio a 77 K. Previamente, as amostras são desgaseificadas a 100 °C por 24 h, sob vácuo de aproximadamente 15 mPa ( $10^{-4}$  torr). A área de superfície específica foi obtida a partir das isotermas de acordo com o método BET a partir dos dados de adsorção na faixa de pressão relativa de 0,06 a 0,25. O volume de poro total foi avaliado pela conversão do volume de nitrogênio adsorvido na pressão relativa de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O tamanho médio dos poros foi determinado a partir do volume total de poro e área de superfície  $S_{\text{BET}}$  ( $4 V_p/S_{\text{BET}}$ ) obtida no analisador Micromeritics ASAP 2010.

### 3.8.1.3 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de $^{29}\text{Si}$ (RMN $^{29}\text{Si}$ )

A técnica de RMN fundamenta-se na absorção seletiva de ondas de rádio por amostras colocadas num campo magnético. Para obter-se um espectro de RMN de uma amostra, esta é colocada no campo magnético no espectrômetro, e um campo de radiofrequência é aplicado, passando-se uma corrente por uma bobina que envolve a amostra. O campo magnético ( $B_0$ ) é aumentado aos poucos e a excitação ou a "oscilação" dos núcleos de uma orientação para a outra é detectada como uma voltagem induzida, resultando na absorção de energia no campo de radiofrequência. Um espectro de RMN é um gráfico de voltagem induzida contra a varredura do campo magnético. A área sob um "pico" depende do número total de núcleos que estão "oscilando".

A funcionalidade de silanos e ligações químicas, encontradas nas fases estacionárias, pode ser facilmente determinada por essa técnica. A determinação de sinais dos fragmentos silil pode ser brevemente resumida: um maior nível de entrecruzamento das espécies de silício e/ou de oxigênios vizinhos levam a um deslocamento para campos altos no espectro de RMN. Espécies monofuncionais (M) aparecem na região de 13 a -1 ppm, espécies difuncionais ( $D^n$ ) de -7 a -22 ppm, espécies trifuncionais ( $T^n$ ) de -46 a -70 ppm e sinais da sílica nua de -91 ppm a -110 ppm. A Figura 16 mostra a nomenclatura e os deslocamentos químicos das espécies silil.



**Figura 16:** Nomenclatura e deslocamentos químicos das espécies silil [32].

Neste trabalho, a técnica de RMN no estado sólido foi utilizada na caracterização das fases estacionárias baseadas em sílica/polissiloxano, tornando-se uma ferramenta útil na obtenção de informações sobre a estrutura química dos grupos silil fixados na superfície da sílica, contribuindo, assim, para o estudo do efeito do tratamento térmico, através da análise dos espectros obtidos para as camadas sorvidas e auto-imobilizadas. Os espectros foram obtidos no espectrômetro Bruker AC/300Mhz, utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação do ângulo mágico (CP/MAS). Foi utilizado um tempo de contato de 5 ms e um intervalo de pulso de 1,5 s, numa frequência de 59,6 MHz [32].

### 3.8.1.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi utilizada para determinar a estabilidade térmica do polímero, do suporte de sílica e de algumas fases estacionárias após os procedimentos de imobilização e extração. As medidas foram feitas em amostras de aproximadamente 10 mg numa razão de aquecimento de

10 °C min<sup>-1</sup> no intervalo de 25 a 1000 °C. As análises foram realizadas sob nitrogênio ou argônio (atmosfera inerte) e outras sob ar (atmosfera oxidante), para efeito de comparação. Os termogramas foram obtidos em % de perda de massa pela curva derivada do tempo.

### 3.8.2 Testes Químicos

#### 3.8.2.1 Análise elementar

Na análise elementar de carbono, hidrogênio e nitrogênio é utilizado o método de combustão para converter os elementos da amostra em gases simples como CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e N<sub>2</sub>. A amostra é primeiramente oxidada em uma atmosfera de oxigênio puro usando reagentes como o tungstato de prata e o vanadato de prata. Os gases resultantes são homogeneizados e controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume e, então, despressurizados através de uma coluna, separados, detectados em função de suas condutividades térmicas e convertidos em porcentagem de C, H e N na amostra [70].

A análise elementar foi aplicada em algumas fases estacionárias antes e após a extração. A partir dos resultados de porcentagem de carbono obtidos foram calculadas as quantidades adsorvidas e/ou extraídas de polímero, após a imobilização térmica e/ou extração aplicadas.

Foram utilizadas as seguintes equações, sabendo-se que 62 % da massa de PMOS é referente a carbono e, utilizando o termo massa específica ( $\bar{m}_{\text{PMOS}}$ ), isto é, massa de polímero por grama de sílica:

$$\bar{m}_{\text{PMOS}} = \frac{m_{\text{PMOS}}}{m_{\text{Si}}} = \frac{\%C}{62 - \%C} \quad (12)$$

$$\% \text{PMOS}_{\text{retido}} = \frac{\bar{m}_{\text{PMOS}_{\text{retido}}}}{\bar{m}_{\text{PMOS}_{\text{inicial}}}} \times 100 \quad (13)$$

Os valores de  $\bar{m}_{\text{PMOS}_{\text{retido}}}$  e  $\bar{m}_{\text{PMOS}_{\text{inicial}}}$  foram obtidos da equação 12, após as medidas de % C para o material residual da extração e para o material não extraído, respectivamente.

E, finalmente, a % extraída foi calculada:

$$\% \text{PMOS}_{\text{extraída}} = 100 - \% \text{PMOS}_{\text{retido}} \quad (14)$$

Através dos resultados obtidos de massa específica, pôde-se calcular também a espessura da camada de polímero depositado nos poros da sílica ( $\tau$ ), conforme a equação 15.

$$\tau = \left( \frac{\sqrt{d^2 - Fd^2} - d}{2} \right) \quad (15)$$

onde **F** é a fração auto-imobilizada ou imobilizada termicamente [32] e **d** é a medida do diâmetro médio de poro da sílica. Para este cálculo, assume-se que os poros da sílica têm um diâmetro uniforme e que o polímero imobilizado é caracterizado por uma camada de espessura constante nas paredes dos poros da sílica.

A fração F é obtida a partir da equação 16:

$$F = \frac{\bar{m}_{\text{PMOSretido}}}{\bar{m}_{\text{PMOSporos cheios}}} \quad (16)$$

A massa específica de PMOS necessária para encher os poros da sílica,  $\bar{m}_{\text{PMOSporos cheios}}$ , é obtida a partir do volume de poro específico da sílica ( $vp = 0,54 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  para a Rainin e  $vp = 0,88 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$  para a Kromasil), e da densidade do PMOS,  $\rho = 0,91 \text{ g mL}^{-1}$ , segundo a equação 17:

$$\bar{m}_{\text{PMOSretido}} = vp_{\text{sílica}} (\text{mL / g}) \times \rho_{\text{polímero}} (\text{g / mL}) \quad (17)$$

Dessa forma, temos para a Rainin  $\bar{m}_{\text{PMOSporos cheios}} \approx 0,49 \text{ g PMOS / g sílica}$  e para a Kromasil um valor igual a  $0,80 \text{ g PMOS / g sílica}$ .

Cálculos da espessura da camada de polímero vêm sendo feitos para muitas FE desenvolvidas no laboratório, a partir dos polímeros polissiloxanos C-8 [60,66,71], C-18 [66] e polibutadienos [72] imobilizados sobre a sílica por tratamento térmico ou por radiação gama. Esses estudos consideram

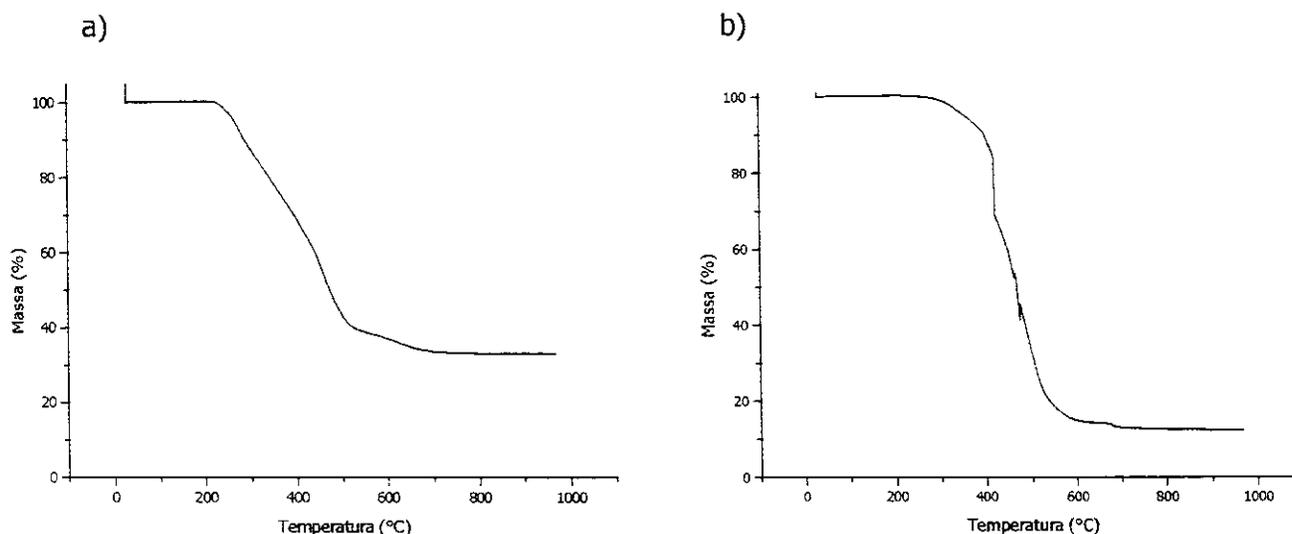
que são formadas estruturas de monocamadas de  $\sim 1,1$  nm e bicamadas de 2,2 nm. Consideram ainda que a camada formada cobre toda a superfície do poro e a cadeia do polímero fica estendida diretamente para o espaço vazio do poro.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Caracterização do polímero PMOS

#### 4.1.1 Análise termogravimétrica (TGA)

A termogravimetria é uma técnica na qual a mudança de massa de uma substância é registrada como função da temperatura ou do tempo. No gráfico, chamado de termograma, as porções horizontais (platôs) indicam as regiões em que não ocorrem mudanças de massas, enquanto as porções verticais das curvas indicam perdas de massas. Os termogramas a e b da Figura 17 mostram a diferença do perfil de degradação do polímero PMOS obtidas em atmosfera oxidante e inerte, respectivamente. A desigualdade acontece devido aos variados mecanismos de reações que ocorrem nos dois ambientes, produzindo diferentes compostos voláteis.

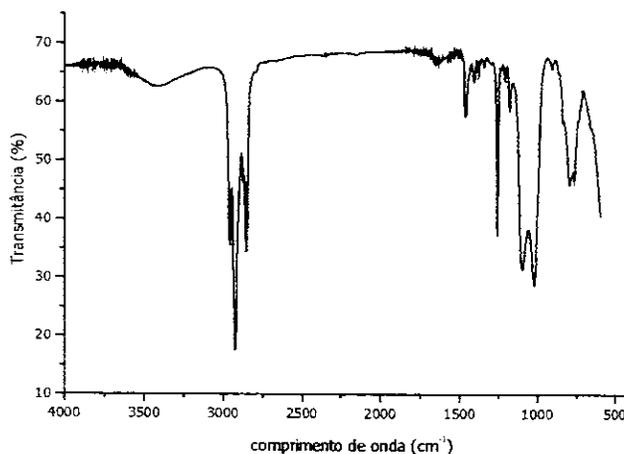


**Figura 17:** Termogramas obtidos para o polímero PMOS em: (a)atmosfera oxidante e (b)atmosfera inerte. (Os termogramas com as suas derivadas estão em anexo)

Podemos dizer que não houve mudança de massa significativa até próximo a temperatura de 315 °C, em atmosfera oxidante (Figura 17 a), e 410 °C, em atmosfera inerte (Figura 17 b), indicando que o polímero PMOS é estável até estas temperaturas, sendo que a estabilidade é um pouco maior em atmosfera inerte. A partir dessas temperaturas começa a ocorrer uma perda de massa acentuada, que termina em 530 °C no termograma (Figura 17 a), e 460 °C no termograma (Figura 17 b).

### 4.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

O espectro de infravermelho da fase estacionária líquida, poli(metiloctilsiloxano), Figura 18, apresentou como bandas principais um triplete em 2958,0; 2923,5; e 2855  $\text{cm}^{-1}$ , característica dos grupos metila, uma banda fraca em 1460  $\text{cm}^{-1}$  da deformação de C-H, uma banda forte em 1258  $\text{cm}^{-1}$ , referente à ligação  $\equiv\text{Si-O-}$  e uma banda forte em 1099 e 1021,5  $\text{cm}^{-1}$  dos grupos siloxanos [73,74].



**Figura 18:** Espectro obtido na região do infravermelho para o polímero PMOS.

## 4.2 Caracterização das sílicas

### 4.2.1 Medida da área superficial, volume específico e diâmetro médio de poros, diâmetro médio das partículas

As propriedades físicas das sílicas usadas, ou seja, as medidas de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros, podem ser vistos na Tabela 4. Todas essas variáveis podem influenciar as propriedades das FE e conseqüentemente a separação cromatográfica.

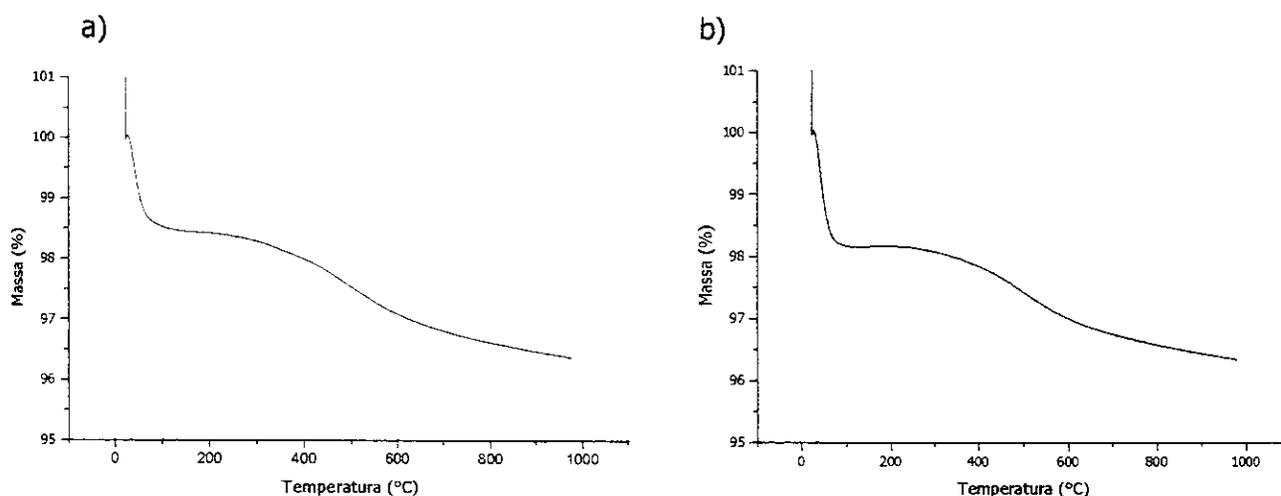
**Tabela 4:** Medida de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros, diâmetro médio das partículas das sílicas Rainin e Kromasil utilizadas.

	Área superficial ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )	Volume específico de poros ( $\text{mL g}^{-1}$ )	Diâmetro médio de poros (nm)	Diâmetro médio das partículas ( $\mu\text{m}$ )
Rainin	188	0,55	11,4	5
Kromasil	320	0,88	11,1	5

Segundo Engelhardt e Muller [75], o diâmetro médio das partículas de sílica e sua distribuição são dois fatores que afetam a eficiência da coluna cromatográfica, ou seja, quanto menor o diâmetro médio das partículas e quanto mais estreita for a distribuição de tamanho, maior é a eficiência da coluna. Neste trabalho, as duas sílicas apresentaram diâmetros de partículas similares, de 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)

Os termogramas da porcentagem de massa em função da temperatura para as sílicas estão apresentados na Figura 19.

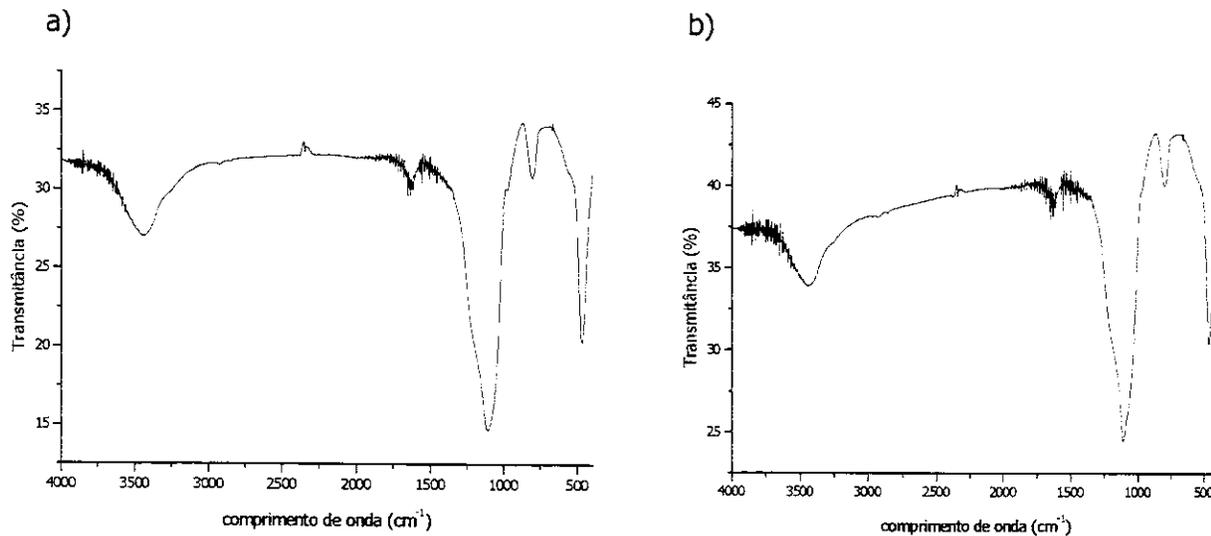


**Figura 19:** Termogramas obtidos em atmosfera oxidante para as sílicas (a)Kromasil nua e (b)Rainin nua.

Observou-se que as sílicas apresentaram comportamentos semelhantes, sendo que suas curvas indicam somente a perda de água adsorvida na faixa de temperatura estudada.

### 4.2.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros das sílicas Kromasil e Rainin (Figura 20) são muito similares, apresentando uma banda em  $3433\text{ cm}^{-1}$ , que pode ser proveniente tanto das vibrações dos grupos hidroxilas ligados por ligações hidrogênio à água fisicamente adsorvida como de grupos hidroxilas geminais, [42] uma banda fraca em  $1630\text{ cm}^{-1}$  referente a deformação vibracional de moléculas de água, [76] uma banda forte em  $1105\text{ cm}^{-1}$  proveniente do estiramento das ligações siloxano ( $\nu$  Si-O-Si), [73,74] um ombro em  $975\text{ cm}^{-1}$  dos grupos silanóis livres. A outra banda em  $1115\text{ cm}^{-1}$  é atribuída aos grupos siloxanos, além do sinal na região de  $975\text{ cm}^{-1}$ , característico dos silanóis livres [73] e uma banda fraca em  $803\text{ cm}^{-1}$ , característica dos grupos silanóis [73].



**Figura 20:** Espectros na região do infravermelho para a (a) sílica Kromasil nua e (b) sílica Rainin nua.

### 4.3 Condições de imobilização térmica das fases estacionárias

#### 4.3.1 Imobilização térmica a altas temperaturas usando rampas de aquecimento

##### 4.3.1.1 Fases estacionárias Kromasil/PMOS

Inicialmente, os experimentos foram feitos com a sílica Kromasil como suporte. Após a preparação da FE sorvida, começaram-se os estudos de imobilização aquecendo as FE à uma temperatura comum ( $T_1$ ) para, logo em seguida, submetê-las à temperaturas mais altas ( $T_2$ ), entre 150 e 400 °C, através de uma rampa de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup>. Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 5.

**Tabela 5:** % C, massa específica e  $\tau$  das fases estacionárias preparadas a partir da sílica Kromasil, submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições.

Tratamento Térmico		% C		$\bar{m}_{\text{PMOS}}^a$ (g/g)	$\bar{m}_{\text{PMOSretido}}^b$ (g/g)	$\tau^c$ (nm)
Condição 1 $T_1$ (°C) – $t_1$ (h)	Condição 2 $T_2$ (°C) – $t_2$ (h)	antes da extração	após a extração			
Temperatura ambiente <sup>d</sup>		27,6	9,7	0,803	0,185	0,68
100°C – 24 h	-	27,3	7,9	0,786	0,145	0,53
100°C – 24 h	150°C – 4 h	27,5	13,2	0,795	0,271	1,04
100°C – 24 h	200°C – 4 h	27,3	16,2	0,788	0,353	1,40
100°C – 24 h	300°C – 4 h	27,3	19,4	0,788	0,455	1,91
100°C – 24 h	400°C – 4 h	18,0	17,1	0,401	0,380	1,53
-	400°C – 4 h	15,1	10,8	0,336	0,210	0,78

Obs: A condição 2 foi realizada imediatamente após o término da condição 1

<sup>a</sup>Após a imobilização e antes da extração

<sup>b</sup>Após a extração

<sup>c</sup>Calculado a partir da % C após a extração

<sup>d</sup>Amostra extraída após 30 dias de preparo da FE

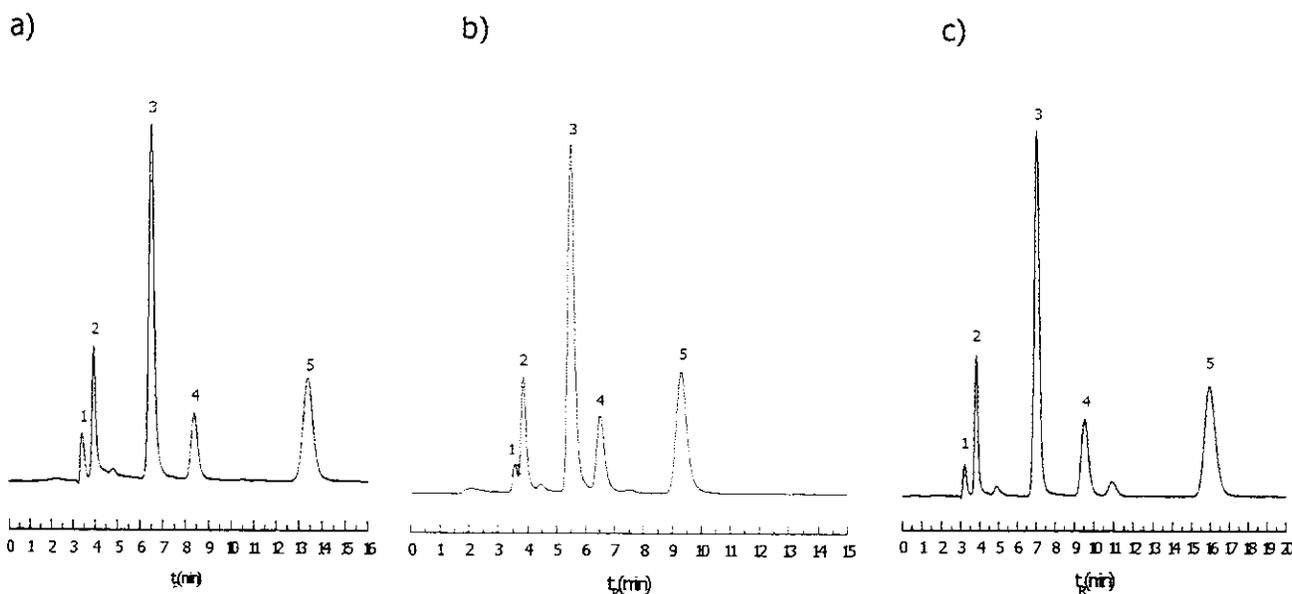
Os resultados da Tabela 5 mostraram que o aquecimento em altas temperaturas (150 – 300 °C) acelerou o processo de imobilização, obtendo-se maiores quantidades de PMOS retido por grama de sílica ( $\bar{m}_{\text{PMOSretido}}$ ) em comparação com a amostra que não sofreu nenhum tratamento térmico (temperatura ambiente). A grande vantagem é que com o tratamento térmico não é preciso deixar a FE em repouso por longos períodos para obter uma camada significativa de polímero sobre o suporte de sílica, otimizando assim o seu tempo de preparo. Em temperaturas mais

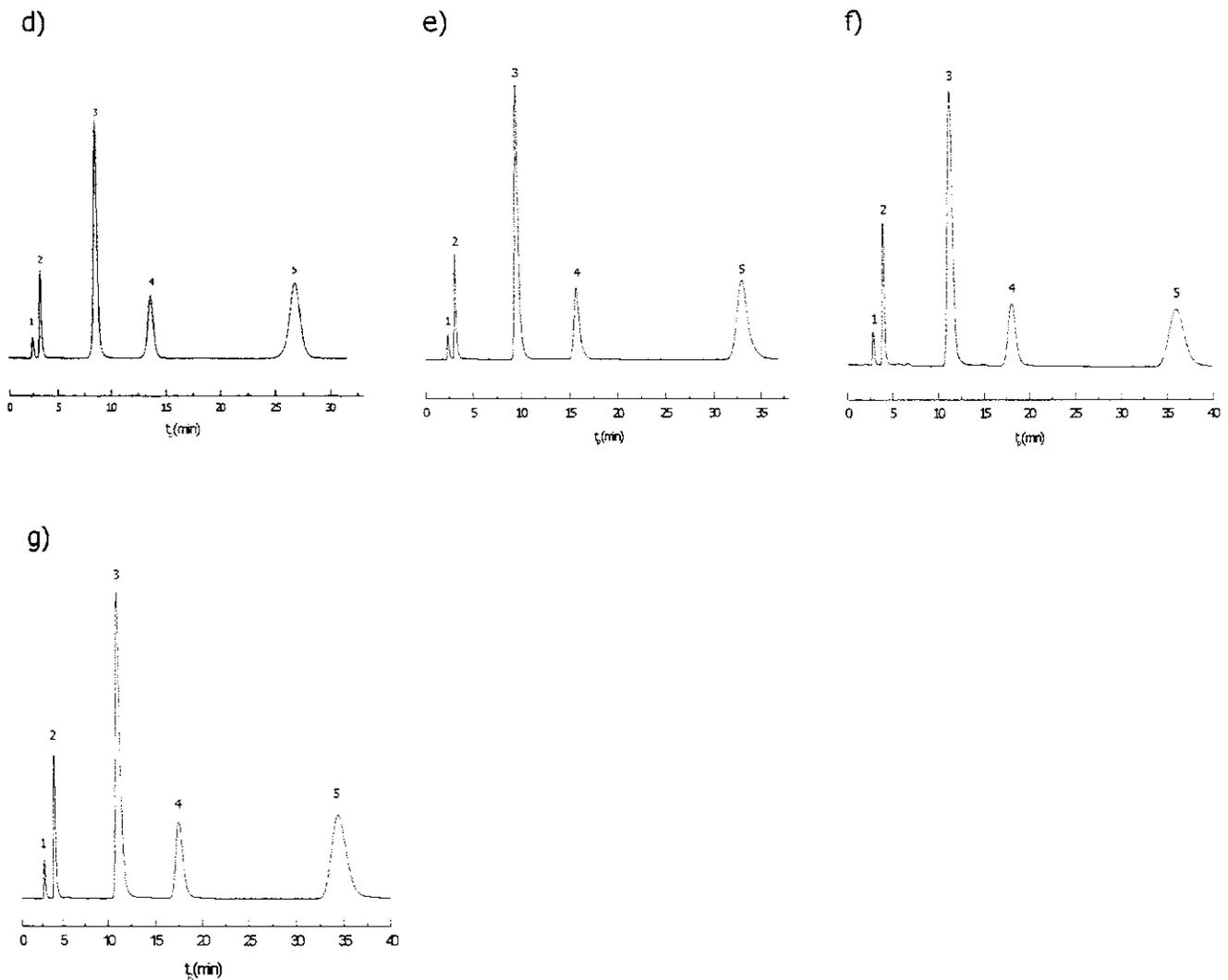
altas ocorre a quebra de várias ligações do polissiloxano [77], com possíveis reações entre as cadeias do polímero e/ou entre o polímero e a superfície do suporte, resultando em uma maior cobertura do polímero na superfície e poros da sílica.

Já para as amostras aquecidas à 400 °C, com ou sem prévio aquecimento a 100 °C, pôde-se observar que houve perda de polímero da fase estacionária durante a imobilização. Isso pode ser constatado pelos valores encontrados de massa específica, obtida para a amostra não extraída, após o tratamento térmico, que ficaram bem abaixo da massa específica inicialmente preparada de 0,80 g de PMOS / g sílica. Essa perda de massa do polímero não é observada quando a amostra é aquecida entre 150 e 300 °C e é maior para a amostra que não sofreu o tratamento térmico à 100 °C. Podemos relacionar esse resultado com o fato de que o polímero PMOS sofre uma acentuada perda de massa quando aquecido acima de 300 °C, em atmosfera inerte, como foi observado no termograma da Figura 17b.

#### 4.3.1.1.1 Avaliação cromatográfica

Os cromatogramas obtidos para as FE podem ser vistos na Figura 21. Os parâmetros cromatográficos calculados para estas fases se apresentam na Tabela 6.





**Figura 21:** Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com FE (Kromasil/PMOS) e submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, com posterior extração: (a) temperatura ambiente (30 dias de repouso), (b) 100°C-24h, (c) 100°C-24h/150°C-4h, (d) 100°C-24h/200°C-4h, (e) 100°C-24h/300°C-4h, (f) 100°C-4h/400°C-4h, (g) 400°C-4h. Mistura teste 2: uracil (1), fenol (2), N,N-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafteño (5). Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.

**Tabela 6:** Parâmetros cromatográficos das FE preparadas com sílica Kromasil submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, utilizando a mistura teste 2. Valores referentes a média dos valores de 3 injeções da melhor coluna obtida.

Tratamento Térmico		k <sup>a</sup>	N/m <sup>a</sup>	As <sub>10</sub> <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	N/m <sup>c</sup>	As <sub>10</sub> <sup>c</sup>
Condição 1 T <sub>1</sub> (°C) – t <sub>1</sub> (h)	Condição 2 T <sub>2</sub> (°C) – t <sub>2</sub> (h)						
Temperatura ambiente <sup>d</sup>		3,0	71600	1,1	7,6	59400	1,5
100°C - 24 h	-	1,6	49300	1,4	4,8	44000	1,7
100°C - 24 h	150°C – 4h	4,0	57900	1,2	7,4	54300	1,4
100°C - 24 h	200°C – 4h	9,9	59800	0,9	9,7	52500	1,3
100°C - 24 h	300°C – 4h	13,0	65700	1,5	11,2	62100	1,9
100°C - 24 h	400°C – 4h	12,7	32800	1,3	7,6	32000	1,4
-	400°C – 4h	11,2	35800	1,3	7,7	41700	1,4

Obs: A condição 2 foi realizada imediatamente após o término da condição 1.

<sup>a</sup>Calculado para o pico do acenafteno

<sup>b</sup>Calculado para o par naftaleno-acenafteno

<sup>c</sup>Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina

<sup>d</sup>Amostra extraída após 30 dias de preparo da FE.

A análise dos parâmetros cromatográficos mostrou que houve uma melhora na separação dos componentes da amostra, além do aumento da eficiência (N/m) para as fases aquecidas entre 150 e 300 °C, principalmente para a fase aquecida a 300 °C.

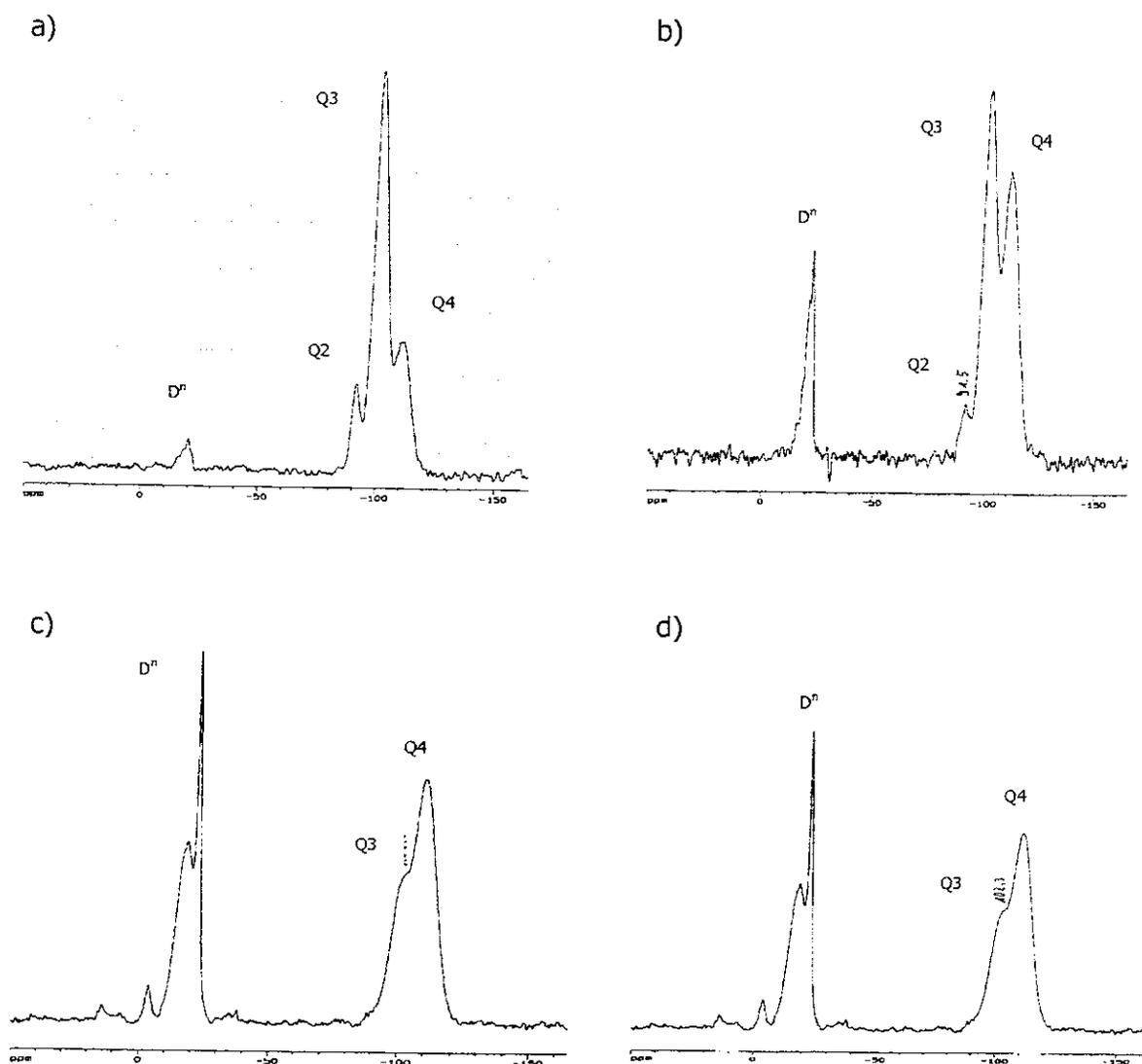
Observa-se também que a medida em que se aumentou a temperatura de tratamento térmico, aumentou-se também o fator de retenção do acenafteno na coluna, indicando maior interação do soluto com a fase estacionária e, conseqüentemente, maior quantidade de polímero adsorvido nos poros, como já havia sido observado pela análise elementar das fases estacionárias após a extração. Isso pode ser observado quando comparamos os valores de k obtidos para as amostras aquecidas entre 150 e 300 °C com a amostra que não sofreu nenhum tratamento térmico (k = 3,0). Os ótimos valores de assimetria obtidos, principalmente para o composto básico N,N-dimetilanilina, mostram que houve uma cobertura dos grupos silanóis pelo polímero, reduzindo as interações silanofílicas entre o composto básico e a superfície do suporte, produzindo picos mais simétricos.

A FE que não sofreu nenhum tratamento térmico obteve a maior eficiência (71600 N/m) e valores de resolução e assimetria comparáveis às outras FE, imobilizadas termicamente. Porém, tal resultado só foi obtido após 30 dias de repouso da fase, período no qual ocorreu o rearranjo das cadeias de polímero nos poros da sílica.

A perda de polímero observada nas FE aquecidas à 400 °C e a forma da distribuição do polímero alcançada durante a imobilização provocou queda no desempenho cromatográfico, com baixos valores de eficiência.

#### 4.3.1.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN $^{29}\text{Si}$ )

Um melhor entendimento do efeito do aquecimento às altas temperaturas pode ser feito através dos espectros de RMN  $^{29}\text{Si}$  mostrados na Figura 22.



**Figura 22:** Espectros de RMN de  $^{29}\text{Si}$  com CP/MAS das FE tratadas termicamente a (a)100°C-24h, (b)100°C-24h/200°C-4h, (c)100°C-24h/400°C-4h e (d)400°C-4h.

O pico Q4 a  $-110$  ppm é atribuído aos grupos siloxano ( $\text{Si}^*(\text{OSi}\equiv)_4$ ) do suporte de sílica e pode ser observado em todos os espectros. O sinal a  $-21,9$  ppm é atribuído ao líquido PMOS puro ( $\text{D}^{2r}$ ). Os sinais a  $-20,6$  ppm ( $\text{D}^{2a}$ ),  $-18$  ppm ( $\text{D}^{2a'}$ ) e  $-15,5$  ppm ( $\text{D}^{2a''}$ ) indicam a formação de novas espécies de silício e podem ser atribuídos a uma combinação de diferentes grupos adsorvidos e ligados quimicamente [78]. Com o RMN podemos distinguir entre silanóis geminais e os isolados, mas não é possível diferenciar entre os isolados e os vicinais.

Observa-se que a intensidade do sinal em Q3 ( $-101$  ppm), atribuído ao silanol livre  $(\text{OH})\text{Si}^*(\text{OSi}\equiv)_3$ , diminuiu com o aumento da temperatura, ocorrendo o mesmo com a intensidade do sinal em Q2 ( $-92$  ppm) - atribuído ao átomo de silício que se encontra ligado a dois grupos  $-\text{OH}$ ,  $\text{Si}^*(\text{OH})_2(\text{OSi}\equiv)$ , silanol geminal - presente nas FE aquecidas a  $100$  e  $200$  °C, mostrando que a ligação do polímero com a sílica ocorre com estes grupos da sílica. Este último sinal não é observado após tratamento térmico a  $400$  °C (espectros c e d).

Os espectros mostram também um aumento da intensidade do sinal na faixa de  $-22$  a  $-18$  ppm, principalmente para os espectros (Figura 22c) e (Figura 22d) onde podemos observar com maior nitidez o sinal em  $-18$  ppm, atribuído ao PMOS imobilizado. Isto mostra que, apesar do aquecimento a  $400$  °C provocar a perda de polímero da fase, fato esse constatado pelos baixos valores encontrados de  $\bar{m}_{\text{PMOS}}$ , obtida para a amostra não extraída, após tratamento térmico, em comparação com a  $\bar{m}_{\text{PMOS}}$  inicialmente usada no preparo das fases, que foi de  $0,80$  g PMOS / g sílica, o polímero restante permaneceu fortemente imobilizado nos poros da sílica.

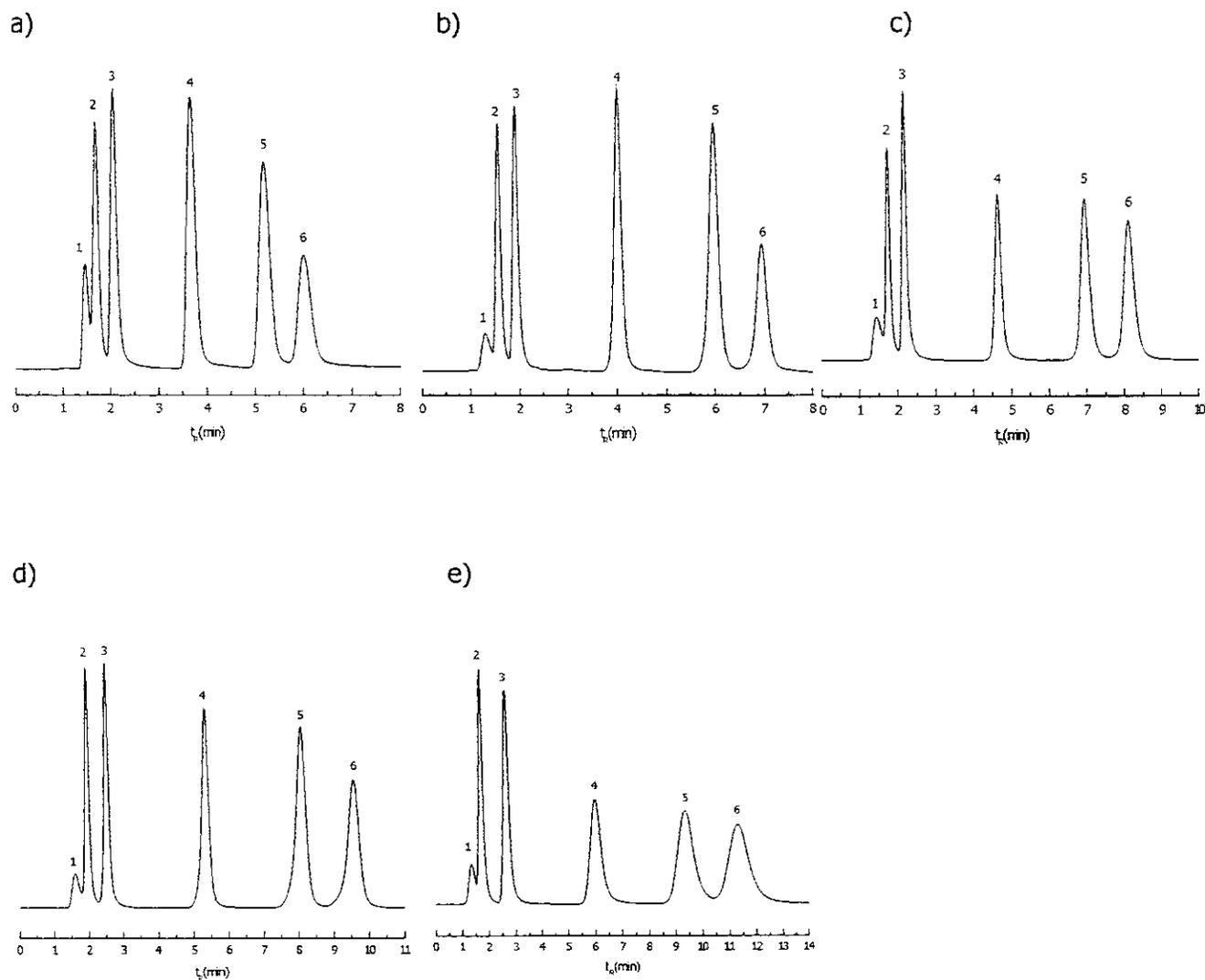
Os espectros obtidos para as amostras aquecidas à  $400$  °C, com e sem prévio aquecimento por  $4$  h à  $100$  °C (condição 1) foram muito similares. Apesar disso, os valores de % C obtidos antes e após a extração são diferentes em cada caso (Tabela 5). Isso mostra o aquecimento prévio a uma temperatura mais baixa pode influenciar no processo de fixação do polímero na sílica.

De modo geral, os espectros de RMN mostraram que a imobilização térmica pode auxiliar na retenção do PMOS nos poros e superfície da sílica.

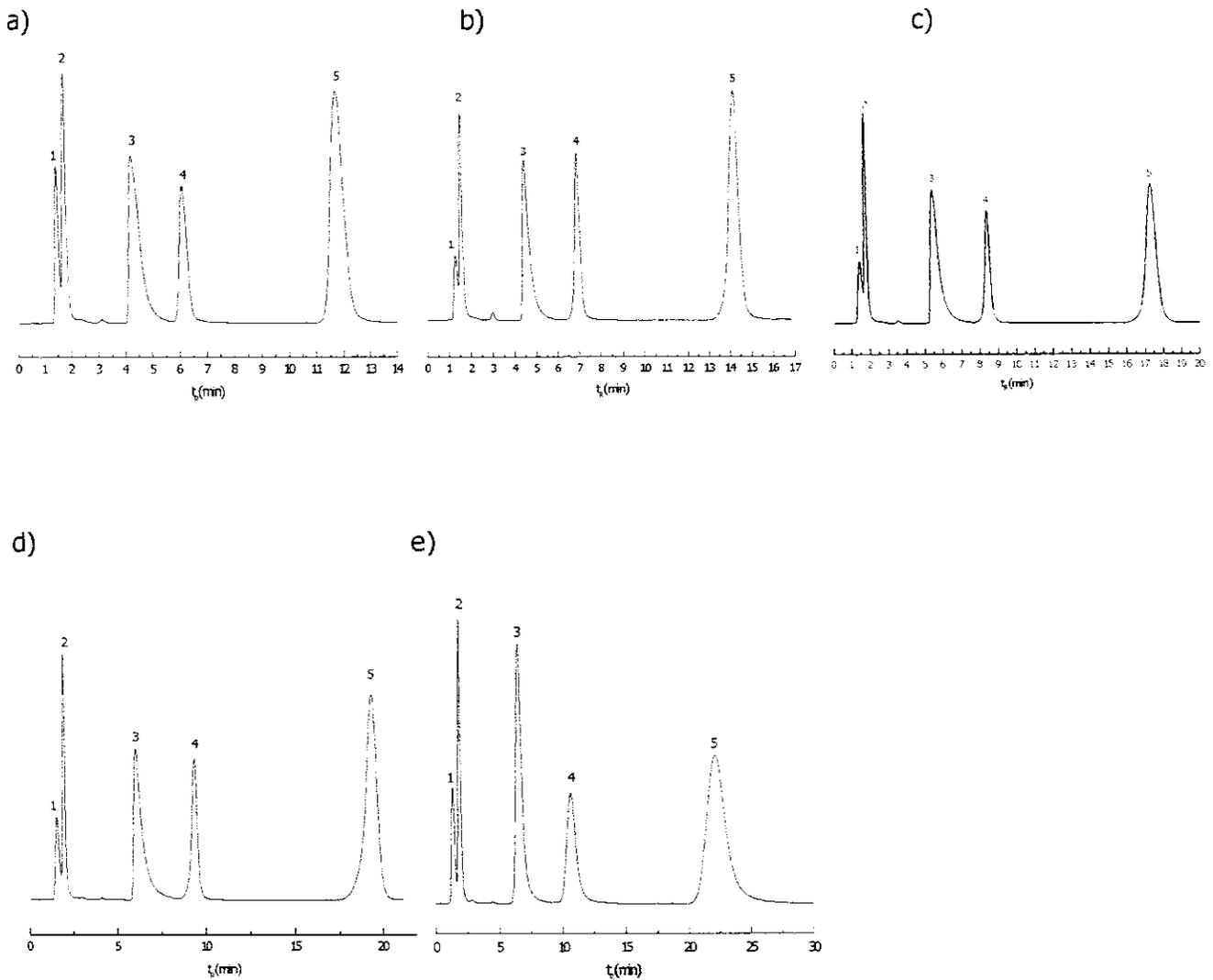
#### **4.3.1.2 Fases estacionárias (Rainin/PMOS)**

##### **4.3.1.2.1 Avaliação cromatográfica**

Os experimentos também foram realizados com a sílica Rainin. Os cromatogramas obtidos com as misturas teste 1 e 2 se encontram nas Figuras 23 e 24. Já os parâmetros cromatográficos estão apresentados na Tabela 7.



**Figura 23:** Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com FE (Rainin/PMOS) e submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, com posterior extração: (a) temperatura ambiente (30 dias de repouso), (b) 100°C-24h/150°C-4h, (c) 100°C-4h/200°C-4h, (d) 100°C-4h/300°C-4h, (e) 100°C-4h/400°C. Mistura teste 1: uracil (1), acetona (2), benzonitrila (3), benzeno (4), tolueno (5), naftaleno (6). Condições cromatográficas: FM: metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,3 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.



**Figura 24:** Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com FE (Rainin/PMOS) e submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, com posterior extração: (a) temperatura ambiente (30 dias de repouso), (b) 100°C-24h/150°C-4h, (c) 100°C-4h/200°C-4h, (d) 100°C-4h/300°C-4h, (e) 100°C-4h/400°C. Mistura teste 2: uracil (1), fenol (2), *N,N*-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafteno (5). Condições cromatográficas: FM: metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,3 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.

**Tabela 7:** Parâmetros cromatográficos das FE preparadas com a sílica Rainin submetidas ao tratamento térmico sob diferentes condições, utilizando as misturas teste 1 e 2.

Tratamento Térmico		Mistura teste 1				Mistura teste 2		
Condição 1	Condição 2	k <sup>a</sup>	N/m <sup>a</sup>	As <sub>10</sub> <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	k <sup>c</sup>	N/m <sup>c</sup>	As <sub>10</sub> <sup>d</sup>
T <sub>1</sub> (°C) – t <sub>1</sub> (h)	T <sub>2</sub> (°C) – t <sub>2</sub> (h)							
Temperatura ambiente <sup>e</sup>		3,2	37900	1,5	1,8	7,0	45100	4,4
100°C – 24 h	150°C – 4h	4,4	73100	1,0	2,5	9,9	81800	3,5
100°C – 24 h	200°C – 4h	4,6	66300	1,3	2,5	10,7	73300	4,4
100°C – 24 h	300°C – 4h	5,3	71600	0,8	2,8	11,1	72800	4,5
100°C – 24 h	400°C – 4h	7,4	17200	1,4	1,6	15,4	16400	1,9

<sup>a</sup> Calculado para o pico do naftaleno

<sup>b</sup> Calculado para o par tolueno – naftaleno

<sup>c</sup> Calculado para o pico do acenafteno

<sup>d</sup> Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina

<sup>e</sup> FE extraída 30 dias após o seu preparo

Observa-se melhores resultados para os parâmetros cromatográficos para as FE aquecidas entre 150 e 300 °C, em relação à FE que não foi imobilizada termicamente (temperatura ambiente). No entanto, o aquecimento a 400 °C fez com que ocorresse uma queda no desempenho da coluna cromatográfica. Novamente devemos levar em consideração que, em temperaturas acima de 300 °C começa a ocorrer a degradação do polímero (Figura 17b).

Já para o composto básico N,N-dimetilanilina estas FE não foram adequadas, apresentando baixa eficiência, cauda nos picos e altas assimetrias, maior do que o recomendado [79] (> 1,6). Estudos de imobilização feitos com tratamento térmico em atmosfera ambiente, utilizando sílicas com características diferentes, foram realizados anteriormente no LabCrom. Os resultados mostraram que o tipo de sílica influencia bastante no comportamento cromatográfico de solutos básicos. Sílicas nuas do tipo Kromasil (5 µm) e Davisil (10 µm), sorvidas com PMOS e posteriormente imobilizadas a 100 °C, por exemplo, apresentaram propriedades adequadas na separação de solutos básicos, com picos simétricos [33]. Porém, a sílica Rainin (5 µm) mostrou um comportamento similar ao encontrado com os resultados deste experimento. Como explicação, foi sugerida a existência de uma grande quantidade de silanóis livres na superfície da sílica Rainin, mesmo após a imobilização térmica, ou um alto teor de metais em sua estrutura, que aumentam a acidez da superfície, causando forte interação com compostos básicos, resultando em cauda nos picos e uma conseqüente alta assimetria.

A FE que não sofreu nenhum tratamento térmico obteve eficiência (45100 N/m) e valores de resolução inferiores às fases tratadas termicamente. É interessante observar que, neste caso, o período de repouso ao qual a amostra foi submetida (30 dias) não foi suficiente para que ocorresse

uma auto-imobilização satisfatória. Devemos relacionar esse resultado com as características da sílica utilizada.

Os suportes de sílica são classificados como sendo do tipo A ou B, dependendo da sua pureza. Suportes de sílica altamente puros, com caráter menos ácidos, são classificados como do Tipo B. Quando se compara a influência do tipo de suporte utilizado no preparo de FE reversa, na separação de compostos básicos, verifica-se que o suporte de sílica do Tipo B resulta em cromatogramas com picos mais simétricos, com menos cauda, devido a uma menor interação com os grupos silanóis do que o suporte do Tipo A [80]. A sílica Rainin, mesmo contendo grande quantidade de impurezas metálicas, é classificada pelos fabricantes como sendo do Tipo B; mas, o seu comportamento cromatográfico frente a compostos básicos indica que provavelmente seja do Tipo A.

Segundo Nawrocki [81] traços de impurezas metálicas na matriz da sílica são uma fonte de sítios de adsorção adicional da sílica e, embora eles não possam interagir diretamente com os analitos, eles aumentam a acidez dos silanóis. Os sítios de adsorção criados são de natureza ácida e adsorvem os compostos básicos. A determinação do conteúdo de metais nas sílicas Kromasil e Rainin [72] obtida através da análise por espectroscopia de absorção atômica por chama, indicam que a sílica Rainin apresenta quantidades significativas de alguns metais não encontrados na sílica Kromasil (Tabela 8).

**Tabela 8:** Caracterização química das sílicas Rainin e Kromasil, em  $\mu\text{g/g}$  [72].

Sílica	Al	Fe	Na	Ti	Ca	Mg
Rainin	144	94	144	35	20	5
Kromasil	12	12	20	2	< 5	16

### 4.3.2 Estudo da influência do tempo de sorção do polímero na sílica antes da imobilização térmica

Os resultados obtidos no estudo da quantidade retida de polímero das FE (Kromasil/PMOS) auto-imobilizadas com ou sem posterior tratamento térmico, podem ser vistos na Tabela 9.

**Tabela 9:** % C, massa específica,  $\bar{m}_{PMOS}$ , e espessura da camada,  $\tau$ , da FE Kromasil/PMOS auto-imobilizadas, com ou sem posterior tratamento térmico a 100 °C por 4h.

Condições	Tempo de repouso (dias)	% C antes da extração	% C após extração	$\bar{m}_{PMOS}^a$ (g/g)	$\bar{m}_{PMOSretido}^b$ (g/g)	$\tau^c$ (nm)
Auto-imobilização a temperatura ambiente*	2	-	2,4	-	0,105	0,14
	9	-	5,5	-	0,098	0,35
	20	-	5,8	-	0,103	0,37
	33	27,5	6,5	0,795	0,117	0,38
Auto-imobilização a temperatura ambiente + tratamento térmico (100 °C –4 h)	1	27,6	2,9	0,803	0,050	0,16
	3	27,2	3,5	0,780	0,059	0,19
	5	26,8	3,6	0,759	0,061	0,19
	7	26,9	3,4	0,768	0,058	0,19
	9	27,0	4,4	0,770	0,075	0,24
	12	26,8	5,1	0,762	0,090	0,29
	15	27,6	5,3	0,802	0,093	0,30
	20	27,2	9,5	0,783	0,181	0,60
	25	27,0	10,8	0,769	0,211	0,70
70	27,4	11,7	0,789	0,233	0,79	

<sup>a</sup>Após a imobilização e antes da extração

<sup>b</sup>Após a extração

<sup>c</sup>Calculado a partir da % C após a extração

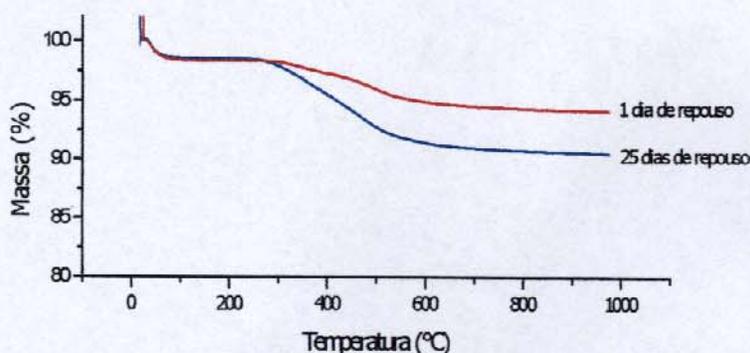
Pela Tabela 9, observa-se que a quantidade de PMOS retido nos poros da sílica aumentou com o tempo de repouso das fases, sugerindo que polímero pode modificar a sua distribuição na superfície, mesmo sem nenhum tratamento específico. Isso pode ser confirmado pelos valores de espessura da camada de polímero ( $\tau$ ), que aumentaram consideravelmente com o tempo para as FE com e sem tratamento térmico.

A comparação entre os valores de % C obtidas após a extração para as fases auto-imobilizadas e tratadas termicamente com as fases apenas auto-imobilizadas mostra que não houve um aumento significativo da % C devido ao tratamento térmico para as FE mantidas sob repouso por menos tempo.

#### 4.3.2.1 Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas das duas fases estacionárias (Figura 25), coletadas após o enchimento, mostram uma maior perda de massa próximo a 290 °C, que deve estar relacionado com a quebra das ligações Si-O e conseqüente formação de polissiloxanos cíclicos voláteis de baixa massa molar, ou então, a quebra da ligação entre as cadeias alifáticas dos polímeros e a formação de produtos gasosos voláteis [82,83].

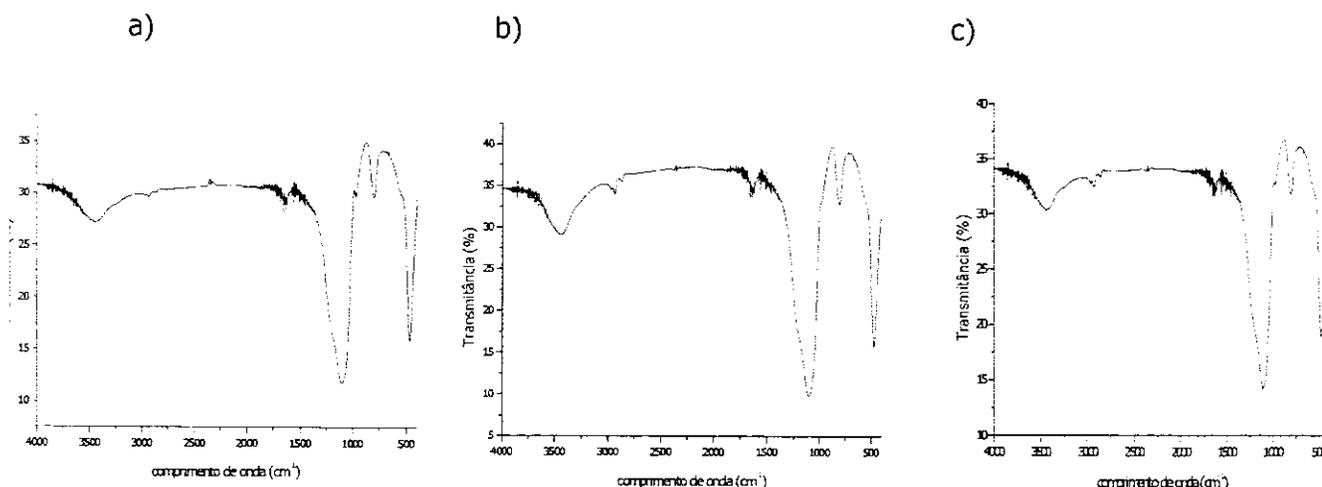
A % de perda de massa observada para as fases estacionárias na faixa de temperatura estudada foi proporcional à quantidade de polímero retido na sílica. Assim, a fase mantida em repouso por apenas 1 dia mostrou a menor perda de massa (6,0 %), devido à menor quantidade de PMOS auto-imobilizado comparado com a fase que ficou em repouso por 25 dias (9,7 %).



**Figura 25:** Termogramas obtidos em atmosfera inerte das FE (Kromasil/PMOS) após diferentes períodos de repouso anteriores ao tratamento térmico à 100 °C por 4h.

#### 4.3.2.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros obtidos na região do infravermelho de algumas fases estacionárias analisadas pode ser vistos na Figura 26.

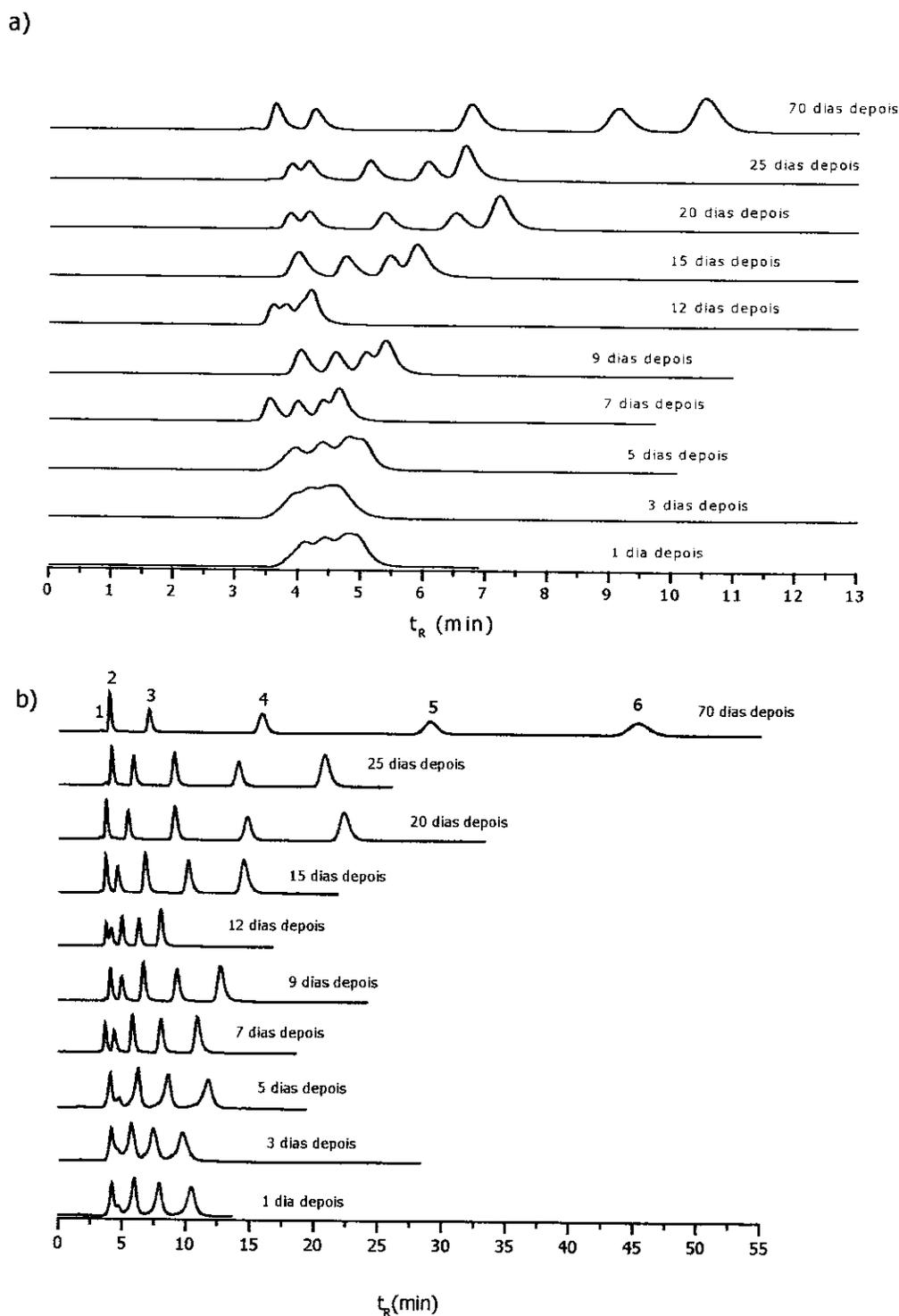


**Figura 26:** Espectros de IV da (a)FE auto-imobilizada por 1 dia com posterior tratamento térmico à 100 °C por 4h, (b)FE auto-imobilizada por 25 dias, com posterior tratamento térmico, (c)FE auto-imobilizada por 33 dias, sem posterior tratamento térmico.

Basicamente, os espectros das FE preparadas apresentaram uma banda na região de  $3450\text{ cm}^{-1}$ , característica do suporte, uma banda forte em  $1100\text{ cm}^{-1}$  dos grupos siloxanos, constituintes do suporte e fase estacionária líquida, e um ombro em  $975\text{ cm}^{-1}$  dos grupos silanóis livres do suporte. Os espectros das FE auto-imobilizada por 25 dias com posterior tratamento térmico (Figura 26b) e auto-imobilizada por 33 dias (Figura 26c) apresentam um triplete na região de  $2900\text{ cm}^{-1}$ , característica dos grupos metilas do poli(metiloctilsiloxano). O espectro da FE auto-imobilizada por apenas um dia (Figura 26a), contém um ombro mais intenso em  $975\text{ cm}^{-1}$ , em comparação com os outros dois espectros (Figuras b e c). Neste caso, o curto tempo de imobilização (1 dia) não foi suficiente para o polímero cobrir e se fixar sobre os silanóis da sílica, o que pode ser confirmado pela pequena quantidade de carbono encontrada nesta fase, calculada pela análise elementar (Tabela 9).

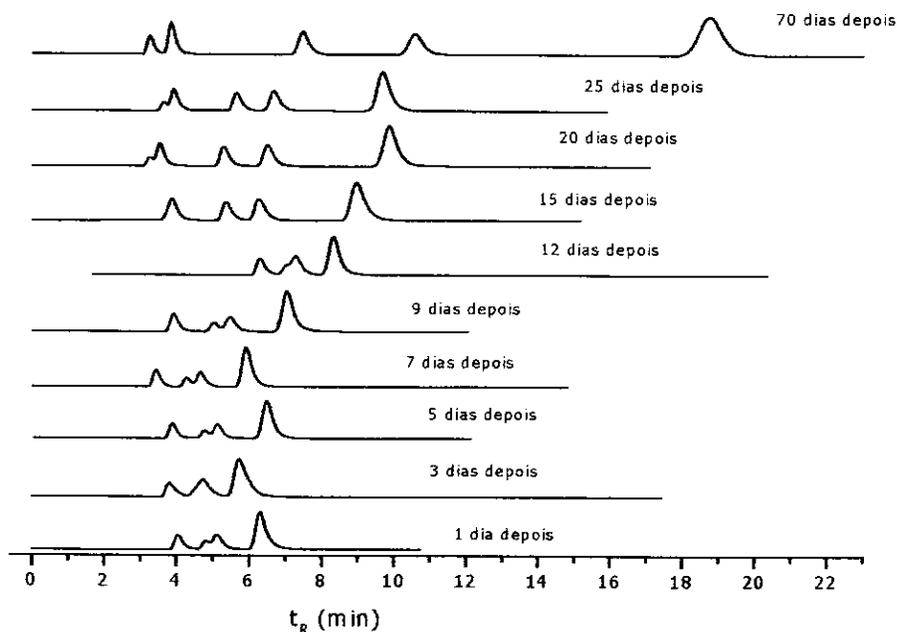
#### 4.3.2.3 Avaliação cromatográfica

As FE foram analisadas cromatograficamente utilizando as misturas teste 1 e 2. As análises foram feitas com fase móvel metanol:água nas proporções 70:30 e 50:50 (v/v), mas os melhores resultados cromatográficos foram obtidos diminuindo a força cromatográfica da FM com o aumento da quantidade de água, ou seja, com a fase móvel metanol:água 50:50 (v/v). Nas Figuras 27 e 28 estão os cromatogramas das FE e nas Tabelas 10 e 11, seus parâmetros cromatográficos.

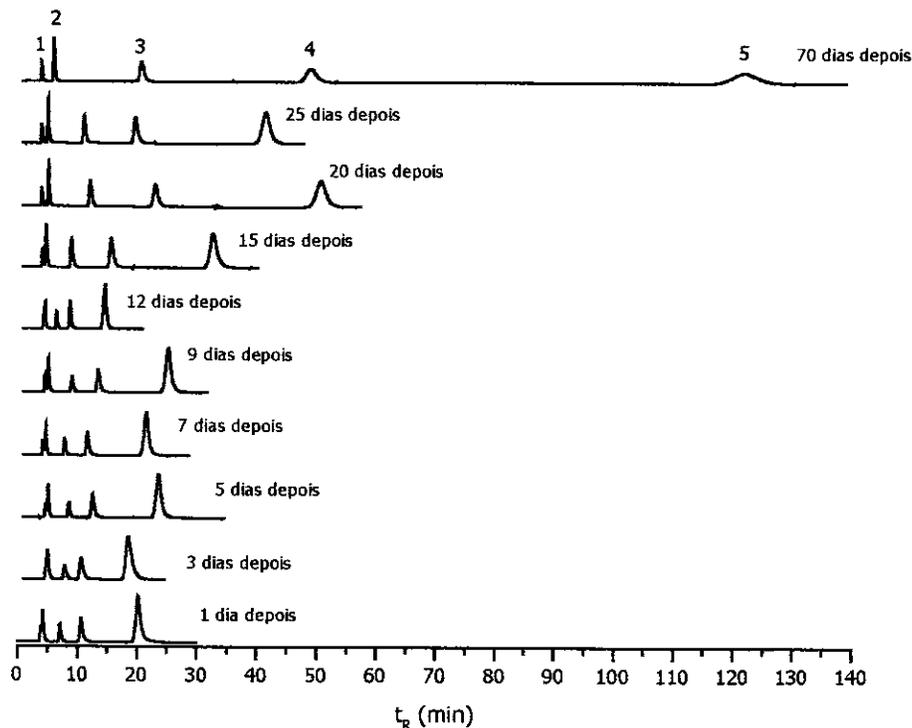


**Figura 27:** Cromatogramas da mistura teste 1 para as FE Kromasil/PMOS em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica a 100 °C por 4h, analisadas com (a) FM metanol:água 70:30 (v/v) e (b) FM metanol:água 50:50 (v/v). Mistura teste 1: uracil (1), acetona (2), benzonitrila (3), benzeno (4), tolueno (5), naftaleno (6). Condições cromatográficas: vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.

a)



b)



**Figura 28:** Cromatogramas da FE Kromasil/PMOS em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica à 100 °C por 4h, analisadas com (a) FM metanol: água 70:30 (v/v) e (b) FM metanol:água 50:50 (v/v). Mistura teste 2: uracil (1), fenol (2), N,N-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafteño (5). Condições cromatográficas: vazão: 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.

**Tabela 10:** Parâmetros cromatográficos obtidos para as FE em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica a 100 °C por 4h, utilizando as misturas teste 1 e 2 e fase móvel metanol:água 50:50 (v/v). Valores referentes a média dos valores de 3 injeções da melhor coluna obtida.

Condições	Tempo de repouso (dias)	Mistura teste 1				Mistura teste 2	
		k <sup>a,e</sup>	N/m <sup>a</sup>	As <sub>10</sub> <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	N/m <sup>c</sup>	As <sub>10</sub> <sup>d</sup>
Auto-imobilização a temperatura ambiente*	2	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	-	40600	- <sup>f</sup>
	9	1,1	49800	1,6	-	52900	1,8
	20	2,8	41900	1,4	-	38700	1,5
	33	5,2	55400	1,3	5,6	58400	1,5
Auto-imobilização a temperatura ambiente + tratamento térmico (100 °C –4 h)	1	5,5	22800	0,8	2,6	54500	1,9
	3	5,1	13500	0,8	2,0	26400	2,3
	5	6,6	22900	0,7	2,8	54200	1,6
	7	6,4	49400	1,7	1,7	58000	1,9
	9	2,4	51000	1,7	4,0	58300	1,9
	12	1,3	49200	1,5	3,2	59600	1,9
	15	3,3	51600	1,9	4,8	62700	2,0
	20	5,9	64900	1,5	6,3	71900	1,6
	25	4,7	66900	1,5	6,1	73300	1,8
70	12,9	56500	1,3	6,5	60500	1,5	

<sup>a</sup>Calculado para o pico do naftaleno

<sup>b</sup>Calculado para o par tolueno-naftaleno

<sup>c</sup>Calculado para o pico do acenafeno

<sup>d</sup>Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina

<sup>e</sup>Tempo morto da coluna ( $t_M$ ) foi medido com o composto uracil.

<sup>f</sup>Não foi feito o cálculo dos parâmetros devido à falta de resolução dos picos

Os resultados mostraram que o tempo de repouso das fases afetou significativamente todos os parâmetros cromatográficos das colunas, principalmente para as fases estacionárias posteriormente aquecidas. Conforme o período entre a preparação da fase e a imobilização foi aumentando, N/m, k e Rs, principalmente dos compostos hidrofóbicos, aumentaram significativamente, confirmando que a quantidade de polímero alcançada durante a auto-imobilização resulta em uma camada orgânica mais completa, aumentando as etapas de equilíbrio na transferência de massa entre o soluto e a FE. Por outro lado, a fase auto-imobilizada por apenas 2 dias apresentou baixa resolução, relacionada à pequena quantidade de PMOS retida na superfície da sílica, como confirmado pela % C, não sendo capaz de reter os solutos da mistura. No entanto, quando esta fase foi sujeita ao tratamento térmico, foi possível obter uma boa resolução e calcular seus parâmetros cromatográficos, como resultado da redistribuição induzida termicamente do polímero na superfície da sílica [84].

**Tabela 11:** Parâmetros cromatográficos obtidos para as FE em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica a 100 °C por 4h, utilizando as misturas teste 1 e 2 e fase móvel metanol:água 70:30 (v/v). Valores referentes a média dos valores de 3 injeções da melhor coluna obtida.

Condições	Tempo de repouso (dias)	Mistura teste 1				Mistura teste 2	
		k <sup>a,c</sup>	N/m <sup>a</sup>	As <sub>10</sub> <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	N/m <sup>c</sup>	As <sub>10</sub> <sup>d</sup>
Auto-imobilização a temperatura ambiente*	2	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	-	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>
	9	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	-	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>
	20	0,5	40600	1,2	-	41960	1,3
	33						
Auto-imobilização a temperatura ambiente + tratamento térmico (100 °C –4 h)	1	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	37800	0,7
	3	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	19000	- <sup>f</sup>
	5	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	38300	0,8
	7	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	36600	1,1
	9	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	41400	1,2
	12	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	41200	- <sup>f</sup>
	15	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	- <sup>f</sup>	42300	2,1
	20	1,0	44300	1,5	1,3	54600	2,0
	25	0,8	46200	1,5	1,2	57300	2,0
70	2,3	52400	1,6	2,0	61900	1,7	

<sup>a</sup>Calculado para o pico do naftaleno

<sup>b</sup>Calculado para o par tolueno-naftaleno

<sup>c</sup>Calculado para o pico do acenafteno

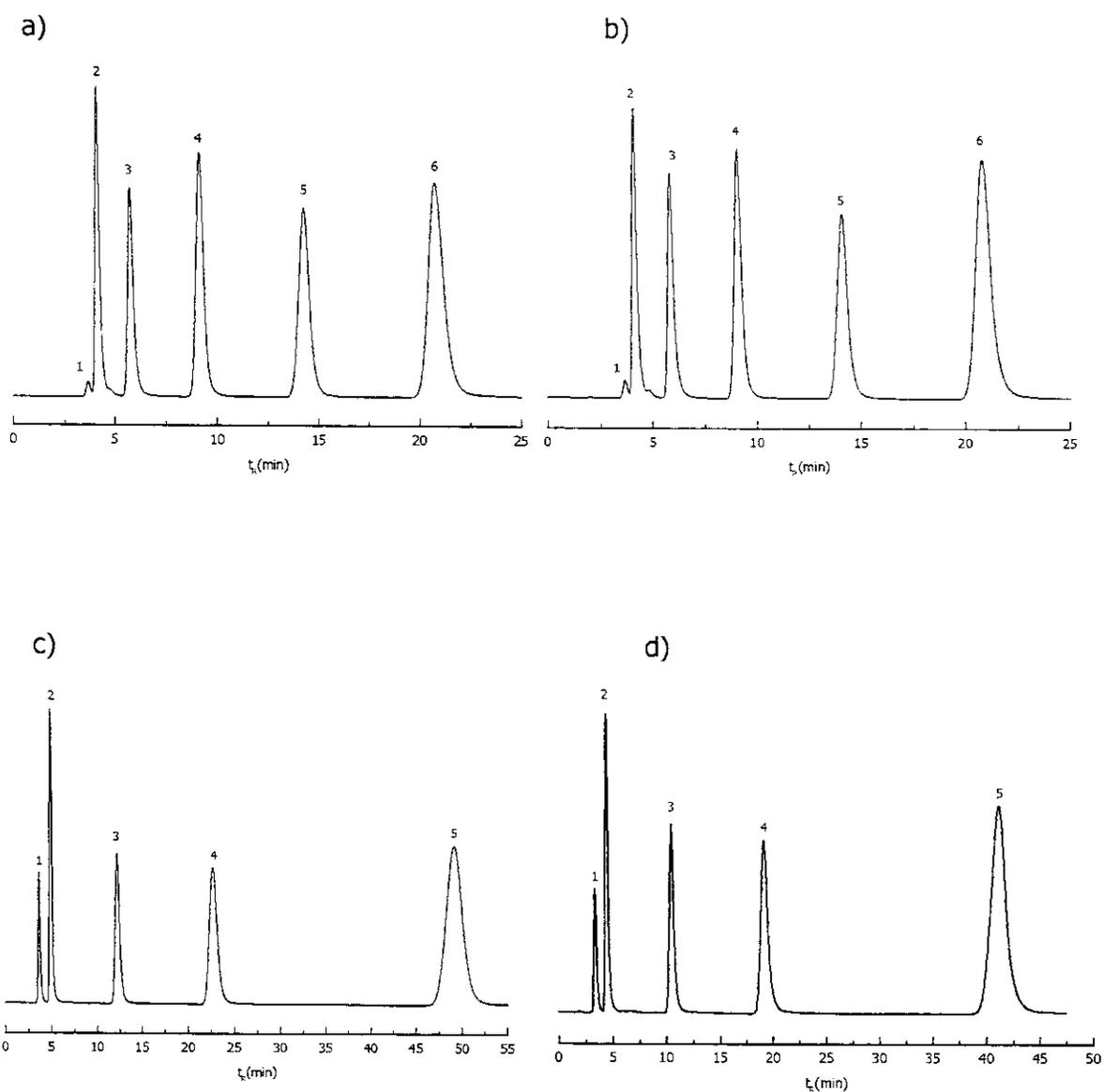
<sup>d</sup>Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina

<sup>e</sup>Tempo morto da coluna (t<sub>M</sub>) foi medido com o composto uracil.

<sup>f</sup>Não foi feito o cálculo dos parâmetros devido à falta de resolução dos picos

Dessa forma, pode-se sugerir que, quando a redistribuição do polímero não é completa, como no caso de fases recém-preparadas, o tratamento térmico pode auxiliar no rearranjo do polímero, resultando no aumento da resolução dos compostos da mistura analisada.

A influência do tratamento térmico após certo período de auto-imobilização do polímero também pode ser avaliada se compararmos uma fase extraída após 33 dias de repouso com uma fase imobilizada termicamente à 100 °C por 4h e extraída após 25 dias de repouso (Figura 29 e Tabela 12).



**Figura 29:** Cromatogramas obtido para as colunas recheadas com (a,c) FE extraída após 33 dias de auto-imobilização e (b,d) FE imobilizada termicamente à 100 °C por 4h e extraída após 25 dias de auto-imobilização. Mistura teste 1 (a,b): uracil (1), acetona (2), benzonitrila (3), benzeno (4), tolueno (5), naftaleno (6). Mistura teste 2 (c,d): uracil (1), fenol (2), N,N-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafteno (5). Condições cromatográficas: FM MeOH:H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra: 5 µL, detecção: UV a 254 nm.

**Tabela 12:** Parâmetros cromatográficos obtidos para as FE em função do tempo de repouso antes da imobilização térmica a 100 °C por 24h, utilizando as misturas teste 1 e 2 e fase móvel metanol:água 50:50 (v/v).

Condições	Tempo de repouso (dias)	Mistura teste 1				Mistura teste 2	
		$k^{a,e}$	N/m <sup>a</sup>	As <sub>10</sub> <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	N/m <sup>c</sup>	As <sub>10</sub> <sup>d</sup>
<b>Auto-imobilização a temperatura ambiente*</b>	33	5,2	55400	1,3	5,6	58400	1,5
<b>Auto-imobilização a temperatura ambiente + tratamento térmico (100 °C –4 h)</b>	25	4,7	66900	1,5	6,1	73300	1,8

<sup>a</sup>Calculado para o pico do naftaleno

<sup>b</sup>Calculado para o par tolueno-naftaleno

<sup>c</sup>Calculado para o pico do acenafteno

<sup>d</sup>Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina

<sup>e</sup>Tempo morto da coluna ( $t_M$ ) foi medido com o composto uracil.

Apesar da melhora no valor de eficiência, após 25 dias de repouso, o tratamento térmico a 100 °C por 4 h não melhorou muito as características cromatográficas da FE, em relação àquela que permaneceu somente em repouso a temperatura ambiente por 33 dias. Os cromatogramas obtidos são bastante similares para as duas misturas utilizadas, evidenciando que o tratamento térmico acelera a distribuição e o rearranjo do polímero na sílica quando é aplicado após um curto período de auto-imobilização da fase [84]. No entanto, se o processo de auto-imobilização alcança uma monocamada uniforme de PMOS, o tratamento térmico não afeta essa configuração e os parâmetros cromatográficos são muito parecidos, com ou sem tratamento térmico. Também, é importante acrescentar que o período ideal de auto-imobilização para atingir a monocamada não pode ser generalizado para todas as fases estacionárias baseadas em polímero e sílica, pois este período depende das características de cada sílica. No caso da sílica Kromasil, observa-se que a monocamada com aproximadamente 1,1 nm é obtida apenas após 100 dias de auto-imobilização [18].

### 4.3.3 Estudo das condições de preparo das fases estacionárias utilizando planejamento fatorial fracionário $2^{4-1}$

Os resultados obtidos de % C no estudo da influência conjunta do processo de adsorção do polímero na sílica Rainin e do tratamento térmico podem ser vistos na Tabela 13.

**Tabela 13:** % C e massa específica das fases estacionárias submetidas às diferentes condições do planejamento fatorial utilizado.

Ensaio <sup>a</sup>	% C		$\bar{m}_{\text{PMOS}}^b$ (g/g)	$\bar{m}_{\text{PMOSretido}}^c$ (g/g)	% PMOS adsorvida	$\tau^d$ (nm)
	antes da extração	após a extração				
1	21,6	5,0	0,534	0,089	16,6	0,32
2	26,9	12,5	0,766	0,252	32,8	0,98
3	20,8	13,3	0,505	0,274	54,2	1,08
4	25,9	14,6	0,718	0,309	43,0	1,23
5	21,1	11,9	0,541	0,237	43,9	0,92
6	27,0	14,1	0,773	0,294	38,0	1,17
7	21,3	12,3	0,523	0,247	47,3	0,96
8	26,5	13,0	0,748	0,264	35,3	1,03

<sup>a</sup> Planejamento fatorial fracionário  $2^{4-1}$ , Tabela 2

<sup>b</sup> Após a imobilização e antes da extração

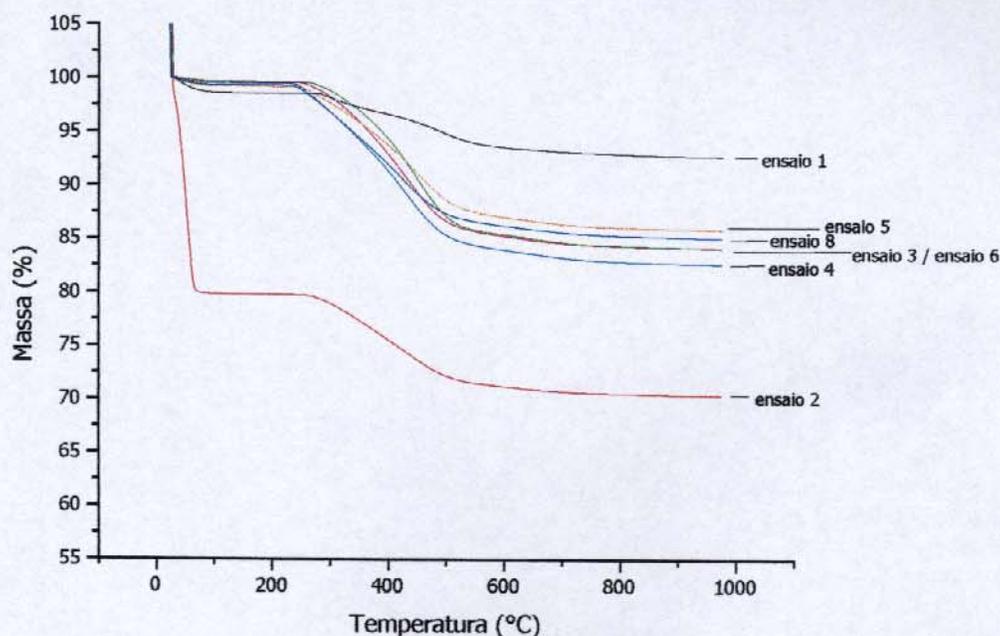
<sup>c</sup> Após a extração

<sup>d</sup> Calculado a partir da % C após a extração

Através dos valores de  $\bar{m}_{\text{PMOSretido}}$  pode-se observar que, em geral, houve um maior recobrimento da superfície da sílica para as FE preparadas com uma % de carga de polímero maior (44 %) (ensaios 2, 4, 6 e 8). As diversas combinações de temperatura e tempo de aquecimento escolhidas parecem não influenciar muito na quantidade de polímero presente na sílica, já que os intervalos analisados estão dentro de uma faixa que produz espessuras do polímero do tipo monocamada, com exceção do ensaio 1. Pode-se dizer também que os tempos de repouso escolhidos, 4 e 8 dias, não influenciaram de forma significativa na quantidade final de polímero não extraível da sílica, já que os maiores valores de  $\bar{m}_{\text{PMOSretido}}$  foram obtidos para os ensaios 4 (0,3088 g PMOS / g sílica) e 6 (0,2936 g PMOS / g sílica) mantendo as FE em repouso por menos tempo (4 dias).

### 4.3.3.1 Análise termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas para as fases estacionárias de cada ensaio realizado estão representadas na Figura 30. A partir destas curvas, foram retirados os dados de porcentagem de perda de massa e a faixa de temperatura na qual houve a perda, cujos valores encontram-se na Tabela 14.



**Figura 30:** Termogramas obtidos em atmosfera inerte das FE (Rainin/PMOS) dos ensaios realizados segundo o planejamento fatorial fracionário  $2^{4+1}$  realizado. Análises realizadas com as FE após a extração.

**Tabela 14:** Perda de massa obtida das curvas cumulativas de TGA para as fases estacionárias (Rainin/PMOS) preparadas segundo os ensaios do planejamento fatorial fracionário  $2^{4+1}$ .

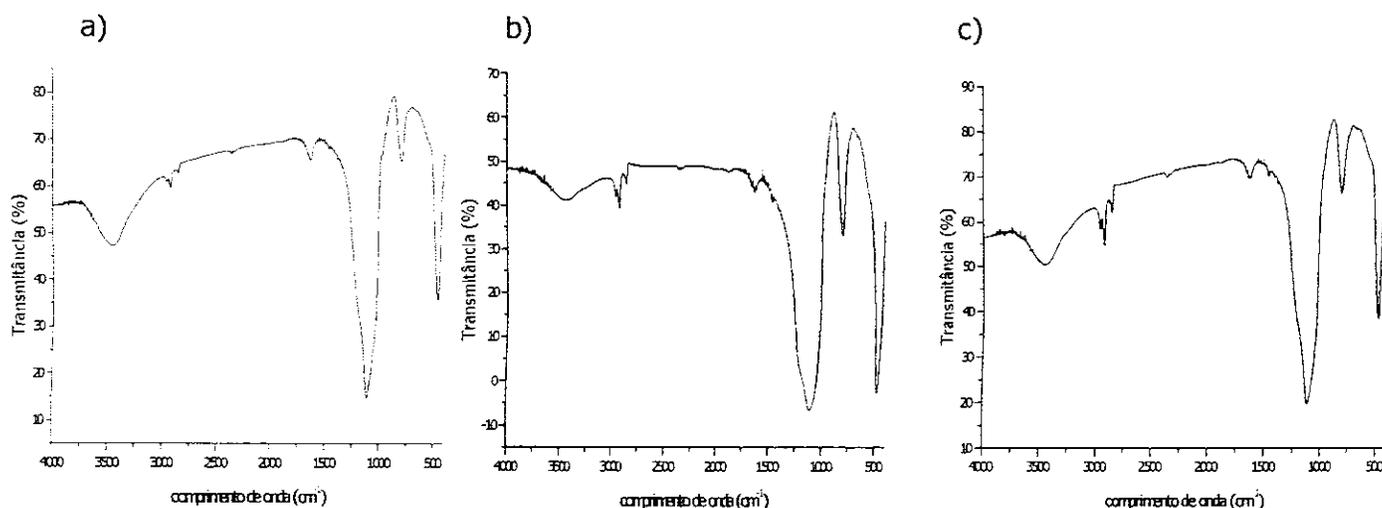
Ensaio	% perda de massa
1	7,2
2	29,3
3	15,8
4	17,4
5	14,1
6	15,9
8	14,9

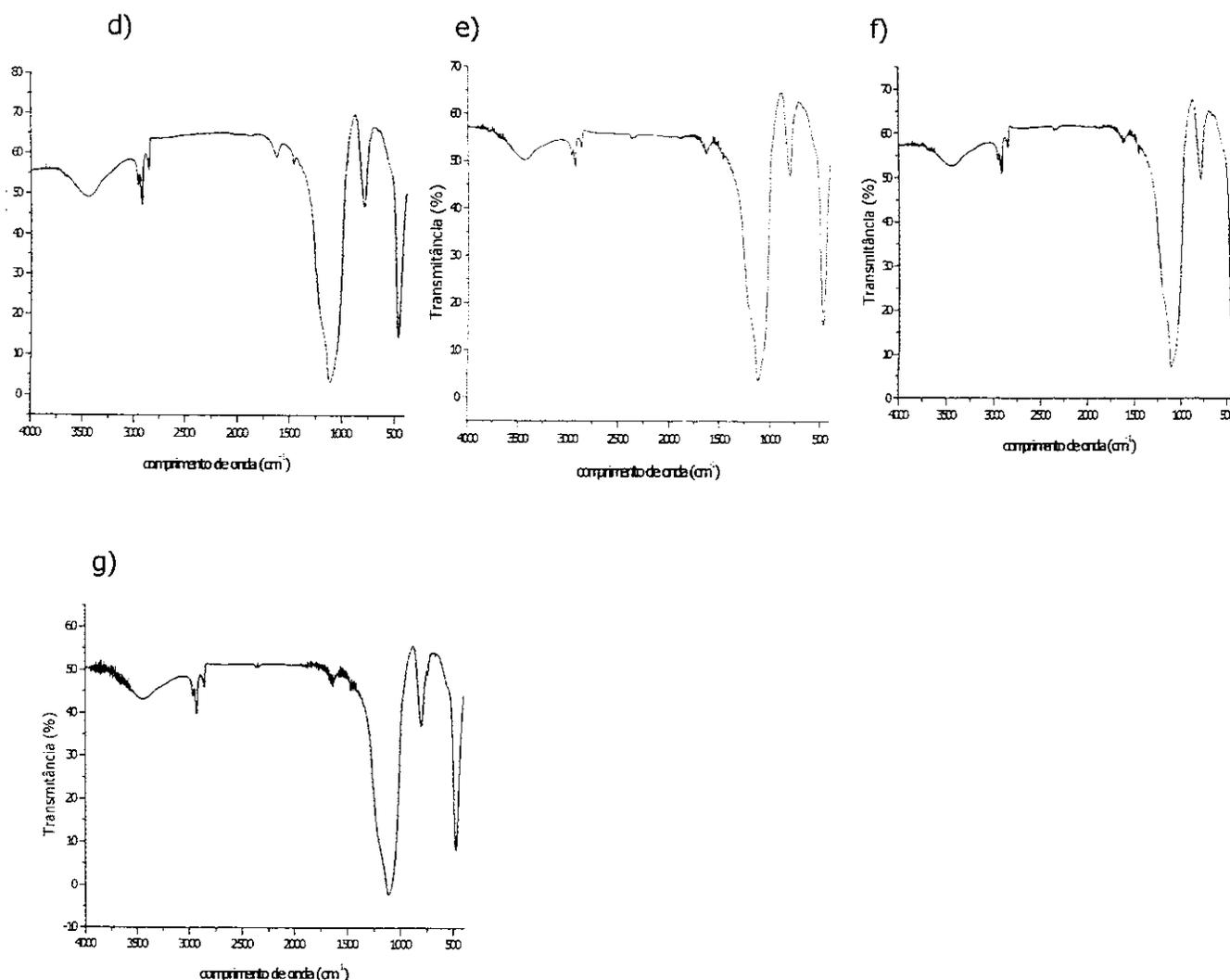
Apesar das curvas termogravimétricas apresentarem comportamentos similares, os dados da Tabela 14 mostram que houve uma maior % de perda de massa para as fases estacionárias dos ensaios 2 e 4, devido à maior quantidade de polímero adsorvido presente. Estes resultados estão de acordo com os maiores valores de  $\bar{M}_{PMOSretido}$  para estes ensaios, determinados pela análise elementar, apresentados na Tabela 13.

As curvas dos ensaios 2, 3, 4, 5, 6 e 8 mostraram uma grande perda de massa por volta de 300 °C, sendo que os compostos voláteis já foram removidos durante a imobilização pelo tratamento térmico.

#### 4.3.3.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Os espectros obtidos na região do infravermelho das FE dos ensaios 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 se encontram na Figura 31.



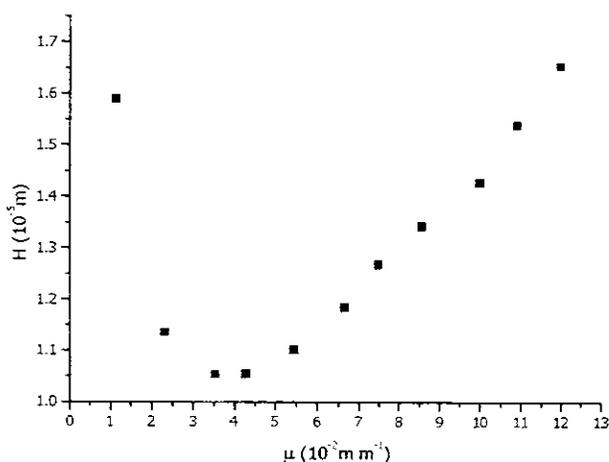


**Figura 31:** Espectros obtidos na região do infravermelho para o (a)ensaio 1, (b)ensaio 2, (c)ensaio 3, (d)ensaio 4, (e) ensaio 5, (f)ensaio 6 e (g)ensaio 8.

Os espectros dos ensaios pares (b, d, f e g), referentes às fases estacionárias preparadas com uma porcentagem de carga de polímero maior sobre o suporte de sílica não apresentaram um ombro em  $975\text{ cm}^{-1}$ , referentes aos grupos silanóis livres do suporte, em comparação com os outros espectros. Isto indica que deve ter ocorrido uma saturação dos poros do suporte e deposição sobre ele de uma camada de poli(metiloctilsiloxano) diminuindo assim, quantidades de grupos silanóis expostos, que atuam como sítios ativos polares, o que é indesejável em fases reversas. Verificou-se também nessas fases estacionárias uma diminuição da intensidade da banda em  $3450\text{ cm}^{-1}$ , mostrando uma redução na quantidade de grupos OH.

#### 4.3.3.3 Definição da vazão de trabalho

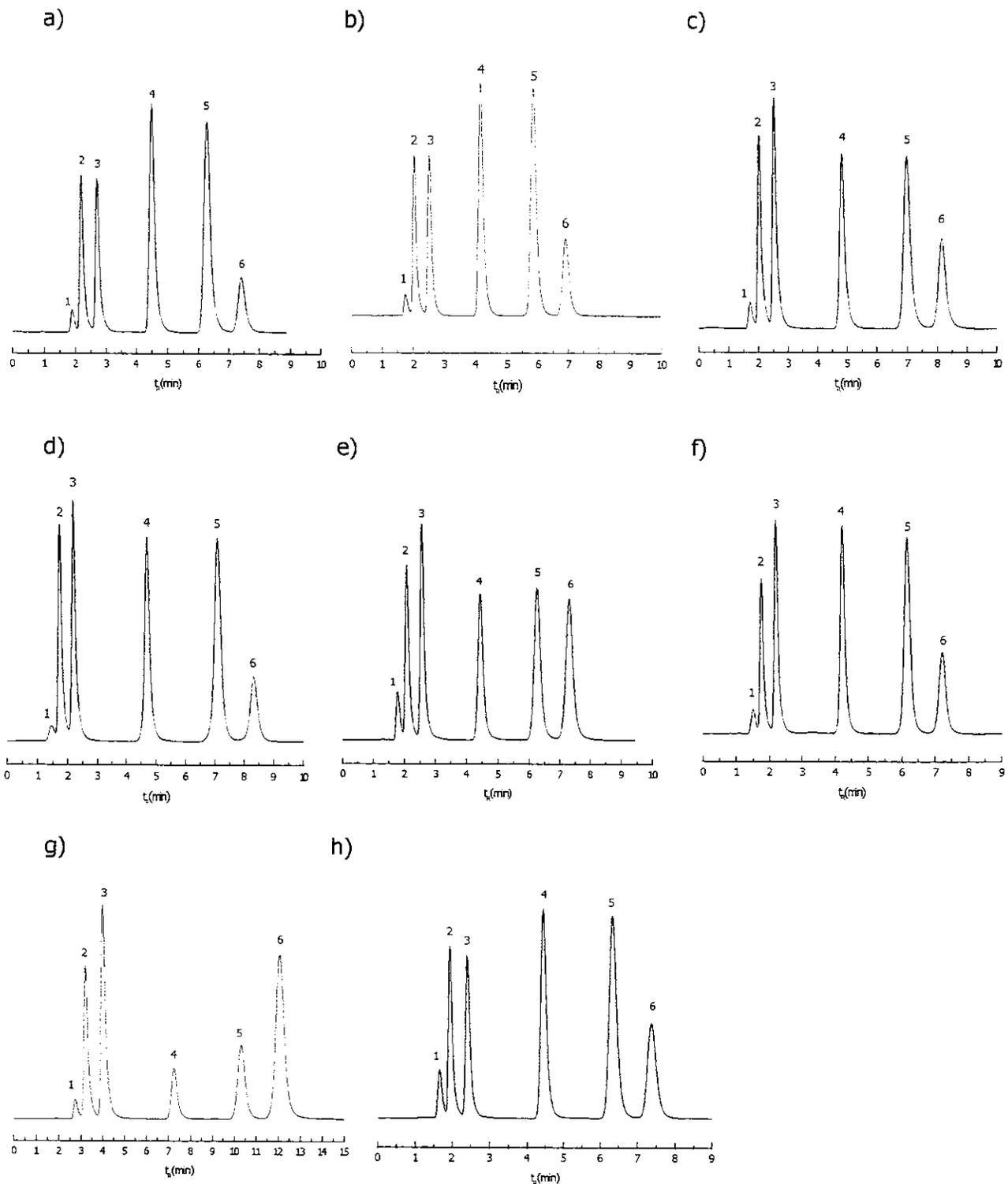
Através da curva de van Deemter, Figura 32, foi possível determinar a vazão ótima no estudo das FE preparadas segundo o planejamento fatorial. A curva foi construída através dos valores obtidos para a FE do ensaio 7, o primeiro realizado, encontrando-se o valor de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ , vazão (F) ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ( $\mu_{\text{ótima}}$ ), na qual H terá um valor mínimo e, conseqüentemente, a eficiência é máxima.



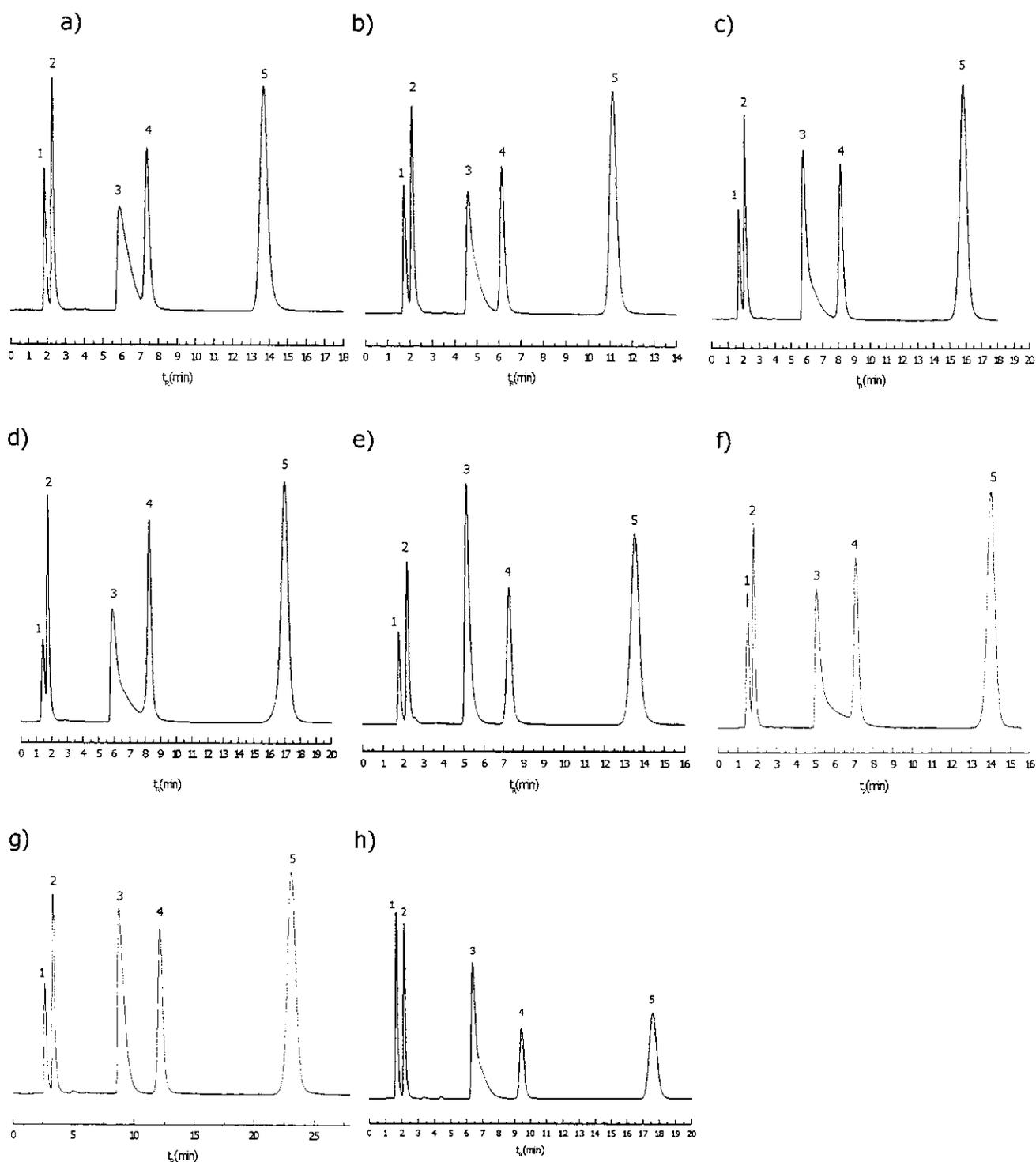
**Figura 32:** Curva de van Deemter

#### 4.3.3.4 Avaliação cromatográfica

Nas Figuras 33 e 34 podemos observar os cromatogramas para as FE de todos os ensaios, analisadas com as misturas teste 1 e 2, respectivamente. Os resultados cromatográficos estão apresentados na Tabela 15. Todas as FE foram analisadas com a vazão de  $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ , determinada através da curva de van Deemter para a FE do ensaio 7 e com FM metanol:água 70:30 (v/v).



**Figura 33:** Cromatogramas obtidos com a mistura 1 para as colunas recheadas com as FE (Rainin/PMOS) preparadas de acordo com o planejamento fatorial: a)ensaio 1, b)ensaio 2, c)ensaio 3, d)ensaio 4, e)ensaio 5, f)ensaio 6, g)ensaio 7 e h)ensaio 8. Mistura teste 1: uracil (1), acetona (2), benzonitrila (3), benzeno (4), tolueno (5), naftaleno (6). Condições cromatográficas: vazão: 0,3 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra: 5 µL, FM metanol:água 70:30 (v/v), detecção: UV a 254 nm.



**Figura 34:** Cromatogramas obtidos com a mistura 2 para as colunas recheadas com as FE (Rainin/PMOS) preparadas de acordo com o planejamento fatorial: a)ensaio 1, b)ensaio 2, c)ensaio 3, d)ensaio 4, e)ensaio 5, d)ensaio 6, e)ensaio 7 e f) ensaio 8. Mistura teste 2: uracil (1), fenol (2), N,N-dimetilanilina (3), naftaleno (4), acenafeno (5). Condições cromatográficas: vazão: 0,3 mL min<sup>-1</sup>, volume de amostra: 5  $\mu$ L, FM metanol:água 70:30 (v/v) detecção: UV a 254 nm.

**Tabela 15:** Parâmetros cromatográficos obtidos para as FE, utilizando as misturas teste 1 e 2, em função dos níveis dos fatores escolhidos. Valores referentes a média dos valores de 3 injeções da melhor coluna obtida.

Ensaio	Mistura teste 1				Mistura teste 2		
	k <sup>a,e</sup>	N/m <sup>a</sup>	As <sub>10</sub> <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	k <sup>c</sup>	N/m <sup>c</sup>	As <sub>10</sub> <sup>d</sup>
1	2,9	71800	1,6	2,7	6,3	81200	5,4
2	2,7	81300	1,5	2,6	5,4	93800	5,9
3	3,8	82300	1,5	2,7	8,4	95600	6,8
4	4,7	85800	1,1	2,8	10,6	97300	8,2
5	3,1	74500	1,2	2,6	6,6	78000	2,7
6	3,8	89600	1,3	2,9	8,3	97200	8,5
7	3,4	79600	1,2	2,6	7,5	83600	3,3
8	3,4	77600	1,3	2,5	7,7	84900	3,9

<sup>a</sup>Calculado para o pico do naftaleno

<sup>b</sup>Calculado para o par tolueno-naftaleno

<sup>c</sup>Calculado para o pico do acenafteno

<sup>d</sup>Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina

<sup>e</sup>Tempo morto da coluna (t<sub>M</sub>) foi medido com o composto uracil

Foram observados ótimos valores de eficiência e assimetria para os compostos hidrofóbicos naftaleno e acenafteno nos ensaios pares, mostrando que a maior quantidade de polímero presente nestas fases melhora o processo de interação entre os compostos e fase estacionária. O fator de retenção (k) não variou muito, sendo ligeiramente maior para os ensaios 4, 6 e 8, onde a quantidade de polímero adsorvido foi um pouco maior (Tabela 13). Este aumento refletiu na melhor resolução entre o tolueno e o naftaleno, compostos hidrofóbicos de grande afinidade com a camada polimérica. Este resultado indica que o tratamento térmico usado pode auxiliar no rearranjo do polímero, aumentando a interação do soluto com a fase estacionária. Isso pode ser confirmado pelos altos valores de fator de retenção (k) dos compostos hidrofóbicos da mistura analisada.

Já o composto básico N,N-dimetilanilina apresentou cauda nos picos e altas assimetrias. Isso mostra que o método de imobilização utilizado na fase não foi suficiente para impedir a interação do composto básico, presente na mistura, com os silanóis ativados da sílica Rainin, como já foi demonstrado anteriormente.

#### 4.3.3.5 Cálculo dos Efeitos

A influência dos fatores % carga de polímero, tempo de repouso, tempo e temperatura de imobilização no preparo da FE Rainin/PMOS foi analisada através do cálculo dos contrastes para os parâmetros cromatográficos de eficiência do naftaleno, acenafteno e N,N-dimetilanilina, além da assimetria da N,N-dimetilanilina. de acordo com o planejamento fatorial fracionário 2<sup>4+1</sup>.

É importante ressaltar que as repetições dos experimentos realizados neste trabalho não são repetições autênticas, isto é, não são realizações, pela segunda vez, de todas as etapas do procedimento de preparo das FE. Preparou-se apenas um lote de FE para cada ensaio que resultou em duas colunas.

Na Tabela 16 estão mostrados os valores de eficiência do naftaleno, assim como as suas médias e as variâncias calculadas. Já a Tabela 17 apresenta a análise dos dados da Tabela 16, e inclui a eficiência média global (I), que também é uma combinação linear de todas as observações.

**Tabela 16:** Valores de eficiência do composto naftaleno presente na mistura teste 1, média das eficiências e desvio padrão para cada ensaio.

Ensaio	I	1	2	3	4	N/mm <sup>2</sup> *		$\bar{X}_i^b$	$S_i^{2c}$
1	+	-	-	-	-	73,700	70,000	71,800	6,856
2	+	+	-	-	+	81,500	81,100	81,300	0,062
3	+	-	+	-	+	82,000	82,600	82,300	0,205
4	+	+	+	-	-	87,200	84,300	85,800	4,044
5	+	-	-	+	+	74,900	74,000	74,500	0,384
6	+	+	-	+	-	90,300	89,000	89,600	0,862
7	+	-	+	+	-	80,000	79,300	79,600	0,248
8	+	+	+	+	+	79,000	76,200	77,600	4,188

<sup>a</sup>Média dos valores das três injeções em cada uma das duas colunas analisadas para cada ensaio.

<sup>b</sup>Média das eficiências

<sup>c</sup>Desvio padrão

Estimativa conjunta da variância	$16,849 / 8 = 2,106$
Variância de um efeito	$2,106 / 4 = 0,527$
Erro padrão de um efeito	$(0,527)^{1/2} = 0,7$
Erro padrão da média $\diamond$	$0,7 / 2 = 0,4$
$\diamond s(\text{média}) = s(\text{efeito})^{1/2}$	

\* As duas colunas de cada ensaio foram recheadas sempre no mesmo dia. Apesar disso, através dos valores obtidos, podemos observar que o procedimento de enchimento de colunas é um fator que causa muita variação nos resultados.

**Tabela 17:** Tabela de contrastes calculada para a eficiência do composto naftaleno presente na mistura teste 1.

Média (I)	80,3 ± 0,4
<b>Efeitos principais</b>	
$t_1$	6,5 ± 0,7
$t_2$	2,0 ± 0,7
$t_3$	0,1 ± 0,7
$t_4$	-2,8 ± 0,7
<b>Interações de dois fatores</b>	
$t_{12}$	-5,8 ± 0,7
$t_{13}$	0,04 ± 0,7
$t_{23} = t_{14}$	-5,5 ± 0,7

No nível de 95 % de confiança, somente são considerados estatisticamente significativos, segundo o teste  $t$  de Student, [64] os contrastes cujos valores são maiores que 1,674 ( $t_{\alpha} \times S_{\text{efeito}} = 2,306 \times 0,726 = 1,674$ ) pois somente assim o intervalo de confiança não incluirá o valor zero. Dessa forma, podemos dizer que o contraste mais significativo é aquele relacionado à % de carga de polímero utilizada na preparação das FE ( $t_1$ ), além das interações  $t_{12}$  e  $t_{23}$ . O contraste 1 é significativo, e como ele é positivo (6,5), são obtidos melhores resultados de eficiência para o pico do naftaleno quando ele é mantido no nível mais alto (44 %), independente da temperatura e tempo de aquecimento utilizado durante a imobilização. Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos de % C e espessura da camada de polímero ( $\tau$ ) (Tabela 13), que é maior para os ensaios pares, melhorando a separação dos compostos analisados.

Os níveis estudados dos fatores 2 e 3, temperatura e tempo de aquecimento, respectivamente, parecem não influenciar muito nos resultados, pois, como já foi dito, eles estão dentro de uma faixa que produz espessuras do polímero do tipo monocamada. Já o valor negativo para o contraste  $t_4$  (-2,8) indica uma tendência de se utilizar menos tempo de repouso, ou seja, 4 dias, para se obter melhores resultados.

A mesma tendência foi observada na análise dos contrastes para as respostas de eficiência do acenafteno, outro composto bastante retido pela FE (Tabelas 18 e 19). O teste t ( $t_8 \times S_{\text{efeito}} = 2,306 \times 3,262 = 7,522$ ) indicou a quantidade de polímero utilizada no preparo da FE ( $t_1$ ) como sendo o contraste mais significativo, influenciando de forma positiva a resposta. A análise cromatográfica das fases confirmou tal resultado, já que as maiores eficiências foram obtidas com as fases preparadas com excesso de polímero nos poros da sílica (44 %), ou seja, para os ensaios pares.

**Tabela 18:** Valores de eficiência do composto acenafteno presente na mistura teste 2, média das eficiências e desvio padrão para cada ensaio.

Ensaio	I	1	2	3	4	N/mm <sup>2</sup>		$\bar{X}_i^b$	$S_i^{2c}$
1	+	-	-	-	-	82,200	80,200	81,200	1,986
2	+	+	-	-	+	94,700	92,800	93,800	1,944
3	+	-	+	-	+	95,600	95,700	95,600	0,005
4	+	+	+	-	-	98,400	96,200	97,300	2,402
5	+	-	-	+	+	78,900	78,200	78,500	0,277
6	+	+	-	+	-	97,500	96,900	97,200	0,191
7	+	-	+	+	-	85,200	82,800	84,000	2,854
8	+	+	+	+	+	106,300	80,600	93,500	330,862

<sup>a</sup>Média dos valores das três injeções em cada uma das duas colunas analisadas para cada ensaio.

<sup>b</sup>Média das eficiências

<sup>c</sup>Desvio padrão

Estimativa conjunta da variância	$340,521 / 8 = 42,565$
Variância de um efeito	$42,565 / 4 = 10,641$
Erro padrão de um efeito	$(10,641)^{1/2} = 3,3$
Erro padrão da média $\diamond$	$3,3 / 2 = 1,6$

$$\diamond s(\text{média}) = s(\text{efeito}) / 2$$

**Tabela 19:** Tabela de contrastes calculada para a eficiência do acenafteno presente na mistura teste 2.

Média (I)	90,1 ± 1,6
<b>Efeitos principais</b>	
$t_1$	10,6 ± 3,3
$t_2$	4,9 ± 3,3
$t_3$	-3,7 ± 3,3
$t_4$	0,4 ± 3,3
<b>Interações de dois fatores</b>	
$t_{12}$	-5,0 ± 3,3
$t_{13}$	3,5 ± 3,3
$t_{23} = t_{14}$	-4,0 ± 3,3

No caso do composto N,N-dimetilanilina todos os contrastes principais (Tabela 12) parecem influenciar significativamente na eficiência, principalmente o  $t_3$ , já que  $t_3 \times S_{(efeito)} = 2,306 \times 2,575 = 5,938$ . No entanto, não podemos afirmar sobre a influência exata dos fatores estudados, já que os resultados estão sendo influenciados pela qualidade da sílica utilizada e não somente pelo procedimento de preparo. Os valores baixos de eficiência obtidos (Tabela 20) podem ser atribuídos à quantidade de impurezas metálicas presentes na sílica, suficiente para causar forte interação com compostos básicos como a N,N-dimetilanilina, dificultando sua separação, como já foi comentado.

**Tabela 20:** Valores de eficiência do composto N,N-dimetilanilina presente na mistura teste 2, média das eficiências e desvio padrão para cada ensaio.

Ensaio	I	1	2	3	4	N/mm <sup>a</sup>		$\bar{x}_i^b$	$s_i^{2c}$
1	+	-	-	-	-	7,500	7,300	7,400	0,027
2	+	+	-	-	+	18,700	20,000	19,400	0,945
3	+	-	+	-	+	26,900	32,200	39,600	13,950
4	+	+	+	-	-	13,800	12,900	13,300	0,416
5	+	-	-	+	+	43,800	45,000	44,500	0,779
6	+	+	-	+	-	27,000	25,000	26,000	2,030
7	+	-	+	+	-	52,800	33,200	43,000	193,769
8	+	+	+	+	+	41,200	41,900	41,500	0,202

<sup>a</sup>Média dos valores das três injeções em cada uma das duas colunas analisadas para cada ensaio.

<sup>b</sup>Média das eficiências

<sup>c</sup>Desvio padrão

Estimativa conjunta da variância	$212,118 / 8 = 26,515$
Variância de um efeito	$26,515 / 4 = 6,629$
Erro padrão de um efeito	$(6,629)^{1/2} = 2,6$
Erro padrão da média $\diamond$	$2,6 / 2 = 1,3$

$\diamond s(\text{média}) = s(\text{efeito}) / 2$

**Tabela 21:** Tabela de contrastes calculada para a eficiência do composto N,N-dimetilanilina presente na mistura teste 2.

<b>Média (I)</b>	$28,1 \pm 1,3$
<b>Efeitos principais:</b>	
$t_1$	$-6,0 \pm 2,6$
$t_2$	$7,5 \pm 2,6$
$t_3$	$21,4 \pm 2,6$
$t_4$	$11,3 \pm 2,6$
<b>Interações de dois fatores:</b>	
$t_{12}$	$-2,8 \pm 2,6$
$t_{13}$	$-3,9 \pm 2,6$
$t_{23} = t_{14}$	$-0,5 \pm 2,6$

A análise da assimetria da N,N-dimetilanilina confirmou as observações feitas para a sua eficiência. Novamente, o teste  $t$  de Student,  $t_8 \times S_{(\text{efeito})} = 2,306 \times 0,232 = 0,535$ , indicou todos os contrastes como significativos, não sendo possível concluir sobre a influência real dos fatores estudados na preparação da fase estacionária Rainin/PMOS.

**Tabela 22:** Valores de assimetria do composto N,N-dimetilanilina presente na mistura teste 2, média das assimetrias e desvio padrão para cada ensaio.

Ensaio	I	1	2	3	4	N/mm <sup>a</sup>		$\bar{x}_i$ <sup>b</sup>	$s_i$ <sup>2c</sup>
1	+	-	-	-	-	5,4	5,4	5,4	0
2	+	+	-	-	+	5,9	5,8	5,9	0,005
3	+	-	+	-	+	6,8	6,8	6,8	0
4	+	+	+	-	-	7,8	8,7	8,3	0,405
5	+	-	-	+	+	2,6	2,7	2,7	0,005
6	+	+	-	+	-	7,8	9,2	8,5	0,98
7	+	-	+	+	-	3,2	2,4	2,8	0,32
8	+	+	+	+	+	6,1	6,0	6,1	0,005

<sup>a</sup>Média dos valores das injeções de cada uma das duas colunas analisadas para cada ensaio.

<sup>b</sup>Média das assimetrias

<sup>c</sup>Desvio padrão

Estimativa conjunta da variância	$1,72 / 8 = 0,215$
Variância de um efeito	$0,215 / 4 = 0,0538$
Erro padrão de um efeito	$(0,0538)^{1/2} = 0,2$
Erro padrão da média $\diamond$	$0,2 / 2 = 0,1$

$$\diamond s(\text{média}) = s(\text{efeito}) / 2$$

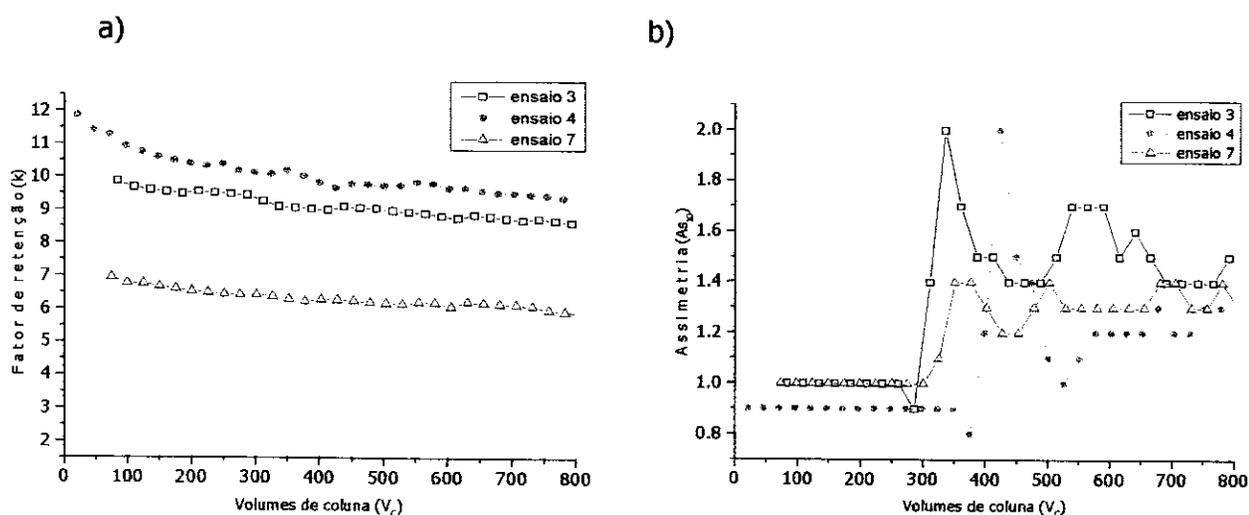
**Tabela 23:** Contrastes calculados para a assimetria da N,N-dimetilanilina presente na mistura teste 2.

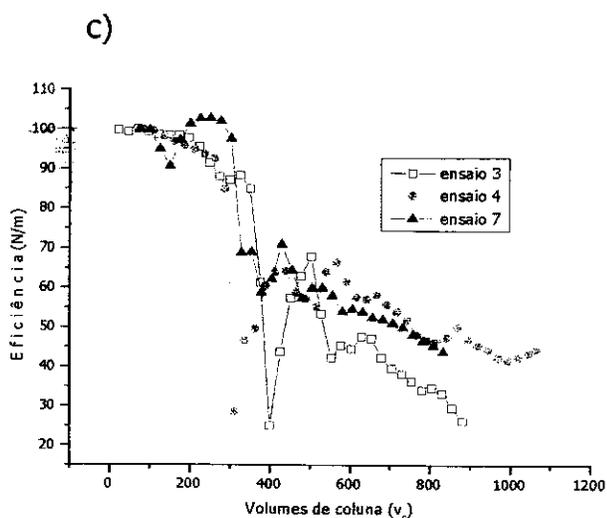
Média (I)	$5,8 \pm 0,1$
<b>Efeitos principais</b>	
$t_1$	$2,8 \pm 0,2$
$t_2$	$0,4 \pm 0,2$
$t_3$	$-1,6 \pm 0,2$
$t_4$	$-0,9 \pm 0,2$
<b>Interações de dois fatores:</b>	
$t_{12}$	$-0,4 \pm 0,2$
$t_{13}$	$1,8 \pm 0,2$
$t_{23}$	$-1,5 \pm 0,2$

#### 4.4 Estudo da estabilidade química das fases estacionárias

As FE dos ensaios 3, 4 e 7 foram escolhidas devido a sua disponibilidade no momento, e testadas em relação à sua estabilidade em condições drásticas de análise. Assim, é possível obter rapidamente informações a respeito da estabilidade relativa das fases e posteriormente testar a fase de interesse em condições de rotina.

Na Figura 35 observa-se que as fases dos ensaios 3, 4 e 7 apresentaram quedas similares em eficiência após a passagem de ~ 250 volumes de coluna. A queda abrupta na eficiência indica que ocorreram mudanças no leito cromatográfico devido à dissolução da sílica. Os valores do fator de retenção diminuíram ligeiramente com o aumento da quantidade de fase móvel básica percorrida através da coluna, sugerindo possíveis perdas de fase líquida, provavelmente sorvida, com a dissolução da sílica. A fase do ensaio 4, com maior quantidade inicial de polímero, foi um pouco mais estável, apresentando variações menores quanto aos valores de assimetria e fator de retenção.





**Figura 35:** Avaliação da estabilidade das FE dos ensaios 3, 4 e 7 do planejamento fatorial realizado, em função do (a) fator de retenção, (b) assimetria e (c) eficiência do composto naftaleno em fase móvel metanol: tampão carbonato (50:50 v/v), pH 8,4, a 60 °C.

Podemos dizer que, apesar das diferenças nos procedimentos de imobilização realizados e das características cromatográficas observadas, a estabilidade química das FE analisadas foi bastante similar.

## 5. Conclusões

O aquecimento das fases estacionárias (Kromasil/PMOS e Rainin/PMOS) entre 150 e 300 °C pode ser um método eficiente de acelerar a imobilização do polímero no suporte de sílica, já que induz à quebra de várias ligações, com formação de ligações fortes na superfície do suporte e/ou entrecruzamento entre as cadeias. Estas fases estacionárias apresentaram bom desempenho cromatográfico. As FE preparadas com as duas diferentes sílicas utilizadas neste trabalho apresentaram baixos valores de eficiências quando aquecidas à 400 °C. Porém, as FE preparadas com sílica Rainin apresentaram valores de k maiores, se comparados às outras FE preparadas com a Kromasil, mostrando a diferença de comportamento entre as duas sílicas em relação à retenção dos compostos analisados.

A caracterização das fases com a espectroscopia de RMN de  $^{29}\text{Si}$  mostrou novos sinais em deslocamentos químicos diferentes do sinal do PMOS puro, indicando a formação de espécies de silício com grupos ligados quimicamente, que foram atribuídos ao PMOS auto-imobilizado e imobilizado termicamente.

O tratamento térmico em fases estacionárias recém-preparadas obtém a mesma espessura da camada produzida pela auto-imobilização, mas de uma forma mais rápida, resultando em fases estacionárias com melhor desempenho cromatográfico. Porém, se a fase é mantida a temperatura ambiente tempo suficiente para alcançar uma configuração estável, o tratamento térmico não influencia muito nos resultados cromatográficos.

Com o planejamento fatorial utilizado foi possível analisar a influência de alguns fatores importantes no preparo de fases estacionárias (Rainin/PMOS) de forma mais rápida e econômica. Os cálculos mostraram que melhores resultados são obtidos quando as fases são preparadas com excesso de polímero.

Os métodos de imobilização utilizados na fase estacionária (Rainin/PMOS) não foram eficientes para impedir a interação do composto básico (N,N-dimetilanilina) com os silanóis da sílica, resultando em altas assimetrias de pico e baixas eficiências, não sendo adequadas para a separação deste tipo de composto. Em contraste, as fases estacionárias preparadas com a sílica Kromasil, que contém menos impurezas, mostram bons valores de assimetrias com este composto básico.

Os resultados obtidos para as colunas preparadas foram muito satisfatórios, indicando que as fases estacionárias preparadas utilizando tratamento térmico como método de imobilização

apresentam grandes potencialidades para utilização em CLAE, com boas eficiências cromatográficas, e devem ser exploradas na análise de amostras reais.

## 6. Referências bibliográficas

- [1] Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S., coordenadores, "Introdução a Métodos Cromatográficos", 4ª edição, Editora da Unicamp, Campinas, 1990.
- [2] Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Glajch, J.L., "Practical HPLC Method Development", 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley and Sons, New York, 1997.
- [3] Majors, R.E.; *LC-GC*, 10 (1992) 229.
- [4] Anazawa, T.A., Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1996.
- [5] Poole, C.F.; Poole, S.K. "Chromatography Today", Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1991.
- [6] Neue, U.D. "HPLC Columns: Theory, Technology and Practice". John Wiley & Sons-VCH, New York, 1997.
- [7] Murphy, R.E.; Schure, M.R.; Foley, J.P., *J. Chromatogr. A*, 824 (1998) 181.
- [8] Berthod, A; *J. Chromatogr.* 549 (1991) 1.
- [9] Schomburg, G.; Deege, A.; Köhler, J.; Bien-Vogelsang, U. *J. Chromatogr.* 282 (1983) 27.
- [10] Tonhi, E.; Collins, K.E.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C.H., *Quim. Nova*, 25 (2002) 616.
- [11] Nawrocki, J., *J. Chromatogr. A*, 779 (1997) 29.
- [12] Zhuravlev, L. T. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 173 (2000) 01.
- [13] Sander, L.C.; Wise, S. A ., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 18 (1987) 299.
- [14] Cox, G.B., *J. Chromatogr. A* . 656 (1993) 353.
- [15] Petro, M.; Berek, D.; *Chromatographia*, 37 (1993) 549.
- [16] Kinkel, J.N.; Unger, K.K., *J. Chromatogr. A* 316 (1984) 193.
- [17] Schomburg, G.; Köhler, J.; Figge, H.; Deege, A.; Bien-Vogelsang, U., *Chromatographia* 18 (1984) 265.
- [18] Bottoli, C.B.G.; Vigna, C.R.M.; Fisher, G.; Albert, K.; Collins, K.E.; Collins, C.H. *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 217.
- [19] Forgács, E.; Cserhádi, T., *J. Chromatogr. A*, 797 (1998) 33.
- [20] Nasai, A.; Haber, P.; Kaliszan, R.; Forgács, E.; Cserhádi, T.; Abraham, M.H., *Chromatographia*, 43 (1996) 484.
- [21] Hanson, M.; Eray, B.; Unger, K.; Neimark, A.V.; Schmid, J.; Albert, K.; Bayer, E., *Chromatographia*, 35 (1993) 403.
- [22] Hanson, M.; Kurganov, A.; Unger, K K.; Davankov, V. A., *J. Chromatogr. A*, 656 (1993) 369.
- [23] Schomburg, G., *Trends Anal. Chem.*, 10 (1991) 163.

- [24] Stevens, M. P. "Polymer Chemistry: an introduction", 3<sup>a</sup> edição, Oxford University Press, 1999.
- [25] Melo, L.F.C., Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1998.
- [26] Schomburg, G.; Deege, A.; Köhler, J.; Bien-Vogelsang, U., *J. Chromatogr.* 282 (1993) 27.
- [27] Figge, H.; Deege, A.; Köhler, J.; Schomburg, G., *J. Chromatogr.* 351 (1986) 393.
- [28] Stefa, C.; Rudaz, S.; Veuthey, J.L.; Tchaplá, A., *Chromatographia* 53 (2001) S113.
- [29] Majors, R., *LC-GC* 18 (2000) 1214.
- [30] Henry, R. A., *Am. Lab.* 34 12 (2002) 25.
- [31] Sudo, Y.; Wada, T.; *J. Chromatogr.*, 813 (1998) 239.
- [32] Bottoli, C.B.G. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2002.
- [33] Collins, K.E.; Sá, A.L.A.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H., *J. Chromatogr. A*, 53 (2001) 661.
- [34] Bottoli, C.B.G.; Chaudhry, Z.F.; Fonseca, D.A.; Collins, K.E.; Collins, C.H., *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 21.
- [35] Morais, L. S. R., Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 2003.
- [36] Anazawa, T.A., Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1992.
- [37] Lopes, N. P.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F., *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 77.
- [38] Reeder, D. H.; Li, J.; Carr, P. W.; Flickinger, M. C.; McCormick, A. V., *J. Chromatogr. A* 760 (1997) 71.
- [39] Melo, L.F.C.; Jardim, I.C.S.F. *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 423.
- [40] Silva, R.B.; Collins, C.H.. *J. Chromatogr. A* 845 (1999) 417.
- [41] Ohmacht, R.; Kele, M.; Matus, Z., *Chromatographia* 28 (1989) 19.
- [42] Unger, K. K., "Porous Sílica, Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography", 3<sup>a</sup> edição, Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, 1986.
- [43] Verzele, M.; Dewaele, C., *LC-GC*, 4 (1986) 614.
- [44] Cassidy, R.; Le Gay, D.; Frei, R. W., *Anal. Chem.* 46 (1974) 340.
- [45] Kirkland, J. *Chromatographia* 10 (1975) 661.
- [46] Kirkland, J., *J. Chromatogr. Sci* 10 (1972) 593.
- [47] Asshauer, J.; Halasz, I., *J. Chromatogr. Sci.* 12 (1974) 139.
- [48] Verzele, M.; *J. Chromatogr.* 295 (1984) 81.
- [49] Zimina, T. M.; Smith, R. M.; Myers, P.; King, B.W., *Chromatographia* 40 (1995) 662.
- [50] Euerby, M. R.; Peterson, P., *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 13.
- [51] Poole, C.F.; Schuette, S. A., "Contemporary Practice of Chromatography", Elsevier Science Publishing Company Inc., New York, 1984.
- [52] Hespanhol, M. C., Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1996.

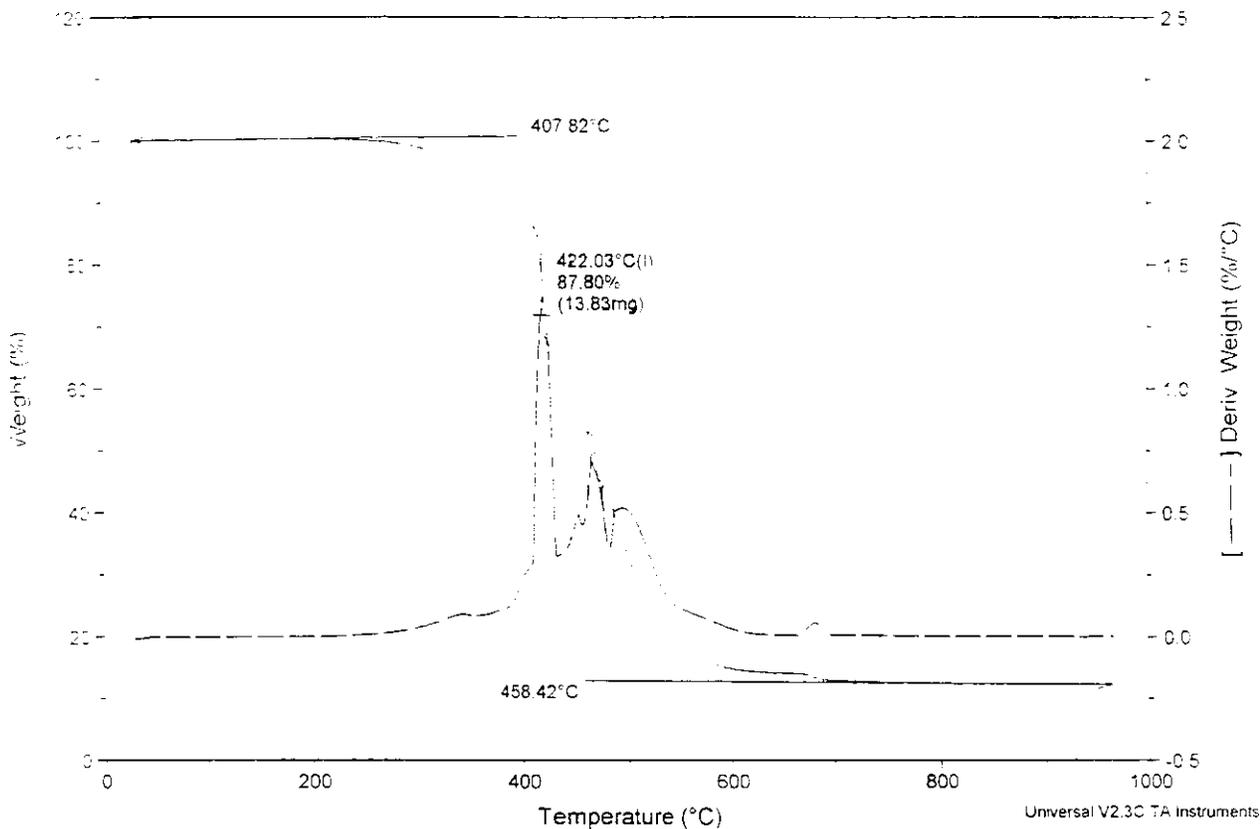
- [53] Engelhardt, H.; Löw, H.; Eberhardt, W.; Maub, M., *Chromatographia*, 27 (1989) 535.
- [54] Fonseca, D.A., Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2001.
- [55] Kirkland, J.J.; van Straten, M.A.; Claessens, H.A., *J. Chromatogr. A* . 691 (1995) 3.
- [56] Claessens, H.A.; Van Straten, M.A .; Kirkland, J.J., *J. Chromatogr. A* ., 728 (1996) 259.
- [57] Kirkland, J.J.; Henderson, J.W.; Destefano, J.J.; Van Straten, M.A.; Claessens, H.A., *J. Chromatogr. A*, 762 (1997) 97.
- [58] Kirkland, J.J., The Use of Porous Silica-Based Column Packing in HPLC Method Development, LC-GC Special Issue on Current Issues in HPLC Technology, May 1997, S46.
- [59] Kirkland, J.J.; Henderson, J.M., *J. Chromatogr. Sci.*, 32 (1994) 473.
- [60] Hetem, M. J.J.; de Haan, J.W.; Claessens, H.A.; van de Vem, L. J. M.; Cramers, C.A., *Anal. Chem.*, 62 (1990) 473.
- [61] Li L.; Carr, P.W.; Evans, J.F., *J. Chromatogr. A*, 868 (2000) 153.
- [62] Verstraeten, W.; de Zeeuw, J.; Cromben, J.; Vonk, N., *Am. Lab.*, 32 (2000) 20.
- [63] Box, G.E.P.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S., "Statistics for Experimenters. An Introduction To Design, data Analysis and Buildings", New York, 1978.
- [64] Neto, B.B.; Scarmino, I.S.; Bruns, R.E., "Como fazer Experimentos" Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, Editora da Unicamp, Campinas, 2001.
- [65] Collins, K.E.; Franchon, A.C.; Jardim, I.C.S.F.; Radovanovic, E.; Gonçalves, M.C., *LC-GC*, 18 (2000) 106.
- [66] Anazawa, T.A.; Carraro, F.; Collins, K.E.; Jardim, I.C.S.F. *J. Chromatogr. A* 697 (1995) 159.
- [67] Tonhi, E.; Bachmann, S.; Albert, K.; Jardim, I.C.S.F.; Collins, K.E.; Collins, C.H. *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 97.
- [68] Cabrera, K.; Arras, R.; R.; Lubda, D.; Krebs, K. F.; Wieland, G. F., *Am. Lab.*, 29 (1997) 44.
- [69] Chaudhry, Z.F.; Collins, C.H., 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, MG, 2001, QA-104.
- [70] Perkin Elmer. User's Manual Elemental Analysis. Perkin Elmer, Norwalk, 1996.
- [71] Vansant, E. F.; Van Der Voort, P.; Vrancken, K. C., "Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface", Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [72] Lopes, N.P., Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.
- [73] Petrarch System Silanes & Silicones, Catálogo, 1989.
- [74] Silverstein, R.M.; Bassler, G.C.; Morrill, T.C., "Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos", 3ª edição, Editora Guanabara Dois S. A., Rio de Janeiro, 1979.
- [75] Engelhardt, H.; Muller, H., *J. Chromatogr.*, 218 (1981) 395.

- [76] Wood, D.L.; Rabinovich, E.M., *Applied Spectroscopy* 43 (1989) 263.
- [77] Zhao, J.; Carr, P. W. A., *Anal. Chem.* 72 (2000) 302.
- [78] Albert, K.; Brindle, R.; Schmid, J.; Buszewski, B.; E., *Chromatographia* 38 (1994) 283.
- [79] Snyder, L.R.; Kirkland, J.J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography", 2ª edição, John Wiley & Sons, New York, 1979.
- [80] Kirkland, J. J.; Boyes, B. E.; DeStefano, J.J., *American Laboratory* 26 (1994) 36.
- [81] Nawrocki, J., *Chromatographia*, 31 (1991) 177.
- [82] Mao, Y.; Fung, B.M., *J.Chromatogr A* 9 (1997) 790.
- [83] Hetem, M.J.J.; De Haan, J.W.; Claessens, H.A .; Cramers, C. A .*J. Chromatogr* 53 (1991) 540.
- [84] Collins, K.E.; Granja, M.L.M.M.; Pereira Filho, R.G.; Anazawa, T.A; Jardim, I.C.S.F., *Chromatographia*, 45 (1997) 99.

Sample: PMOS puro  
Size: 15.7550 mg  
Method: 10 g/min  
Comment: TGA

### TGA

File: C:\AcamiliaPMOS puro.001  
Operator: Fabiana  
Run Date: 14-Aug-03 13:40



Sample: PMOS puro oxi  
Size: 9.7299 mg  
Method: 10 g/min  
Comment: TGA

### TGA

File: C:\AcamiliaPMOS puro oxi.001  
Operator: Fabiana  
Run Date: 19-Aug-03 13:38

