



Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Tese de Doutorado

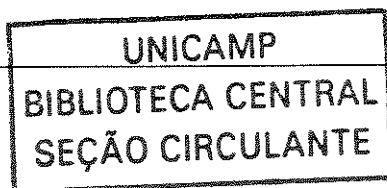
Novos Agentes Sillantes e Suas Aplicações na Modificação da
Sílica Gel Cromatográfica

Candidato: César Ricardo Silva

Co-Orientadora: Profa. Dra. Isabel C.S.F. Jardim

Orientador: Prof. Dr. Claudio Airoidi

Outubro/2002



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	Si38n
V	EX
TOMBO SCI	52198
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	128.11,00
DATA	13/02/03
Nº CPD	

BIBID. 283756

CM00180086-6

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

Si38n

Silva, César Ricardo

Novos agentes sililantes e suas aplicações na modificação da sílica gel cromatográfica / César Ricardo Silva. -- Campinas, SP: [s.n], 2002.

Orientador: Claudio Airoidi.

Co-Orientadora: Isabel C. S. F. Jardim.

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

1. Agentes sililantes. 2. Sílica. 3. Cromatografia
líquida. I. Airoidi, Claudio. II. Jardim, Isabel C.S.F.
III. Universidade Estadual de Campinas. IV. Título.

Agradecimentos

- Ao Prof. Claudio Airolti com que tive a valiosa oportunidade de aprender muito ao longo desses anos e por toda atenção dispensada na orientação desta tese.
- À Profa Isabel Cristina Sales Fontes Jardim pela oportunidade concedida e pela atenção dispensada na co-orientação desta tese.
- Aos amigos do Laboratório A1-100 pela amizade, pela convivência alegre e pelo companheirismo no ambiente de trabalho.
- Aos amigos do Labcrom pela amizade, pela cooperação e também pelo ambiente de trabalho agradável proporcionado.
- Ao Stefan Bachmann, ex-aluno do grupo do Prof Klaus Albert, pela doação de uma quantidade apreciável da sílica Prontosil.
- À Neusa, não só pela sua valiosa e indispensável ajuda prestada no Laboratório, mas principalmente pela amizade.
- Ao Prof. José de Alencar Simoni pela convivência alegre no laboratório e pelo estímulo na participação no programa de estágio a docência.
- Ao Prof. Barone pelas análises de absorção atômica.
- À Profa Carol Collins e ao Prof. Ken Collins pelas sugestões dadas.
- Aos funcionários do Instituto de Química da Unicamp, que direta ou indiretamente ajudaram no decorrer deste trabalho.
- À minha família e aos meus amigos e que colaboraram indiretamente com o apoio e amizade.
- À Fapesp por todo o suporte financeiro, inclusive na participação nos simpósios Kplc 2000 e Kplc 2002.
- Ao Assessor da Fapesp pelos comentários, pelas críticas e pelas sugestões dadas
- À Faep da Unicamp pela ajuda financeira concedida para a participação no simpósio Kplc 2001.

*À minha família e aos meus amigos,
Com grande estima, dedico esta tese*

Resumo

Título: Novos agentes sililantes e suas aplicações na modificação da sílica gel cromatográfica

Autor: César Ricardo Silva

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

Orientador: Prof. Dr. Claudio Airoidi

Palavras-chaves: agentes sililantes, sílica, cromatografia líquida, fase reversa, grupos polares inseridos.

Novos etoxissilanos, contendo grupos polares do tipo uréia ($-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{NH}-\text{R}'$) inseridos na cadeia N-alquila de diferentes grupos terminais R' variando de C_3 a C_{18} foram preparados de acordo com a rota de síntese desenvolvida neste projeto. A sílica cromatográfica foi quimicamente modificada com esses agentes sililantes, produzindo novas sílicas modificadas. Estes materiais híbridos foram caracterizados por análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho e ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^{29}Si e utilizados como fase estacionária, do tipo reversa, para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As avaliações cromatográficas mostraram que as fases estacionárias reversas quimicamente ligadas são promissoras na separação de compostos apolares, polares e especialmente os básicos devido à habilidade dos grupos uréia em minimizar as interações indesejáveis entre os grupos silanóis residuais e os analitos básicos durante a separação cromatográfica.

Abstract

Title: New silylant agents and their applications for the modification of chromatographic silica gel

Author: César Ricardo Silva

Co-Advisor: Profa. Dra Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

Advisor: Prof. Dr. Claudio Airoidi

Key words: silylant agents, silica, liquid chromatography, reversed phases, embedded polar groups.

New ethoxysilanes, containing polar urea groups embedded into the N-alkyl chain with different terminal groups R' varying from C₃ to C₁₈ were synthesized following the synthetic route developed in this project. Chromatographic silica was chemically modified with the urea-alkoxysilanes, yielding new modified silicas. The new hybrid materials were characterized by elemental analysis, infrared and solid-state ²⁹Si and ¹³C NMR spectroscopies and were used as reversed stationary phase for High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Chromatographic evaluations of the new chemically bonded phases have shown promising results for the separation of non polar, polar and specially basic compounds under reversed phase due to the ability of the embedded polar urea groups in minimizing the undesirable interactions between the residual silanol groups and the basic probes during the chromatographic separation.

1. Introdução

1.1 A sílica

A sílica é um sólido inorgânico formado por unidades tetraédricas SiO_4 , sendo também o material mais utilizado em cromatografia. Por isso o conhecimento de sua estrutura química é de grande relevância para a compreensão do seu comportamento e da sua reatividade em vários processos, principalmente na modificação química da sua superfície [1].

Os átomos de silício internos tendem a manter sua coordenação tetraédrica com o oxigênio formando a ligação siloxano (Si-O-Si). Os silícios mais externos completam seu número de coordenação através da ligação com grupos hidroxilas, formando os chamados grupos silanóis (Si-OH). Na superfície também podem existir grupos siloxanos expostos. 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. Já a ligação siloxano (Si-O-Si) é relativamente estável devido à retrodoação eletrônica do par de elétrons do oxigênio para o orbital d vazio do átomo de silício. Esta deslocalização eletrônica faz com que a basicidade de Lewis do átomo de oxigênio diminua consideravelmente. Assim, o átomo em ponte não interage com moléculas doadoras, contendo prótons, para formar as possíveis ligações de hidrogênio [2].

Os silanóis, do ponto de vista cromatográfico, são muito mais interessantes do que os grupos siloxanos devido à sua alta reatividade. Os silanóis podem se distribuir na superfície da sílica em três diferentes formas: livre ou isolado, geminal e vicinal ou ligado, como mostra o esquema da figura 1.

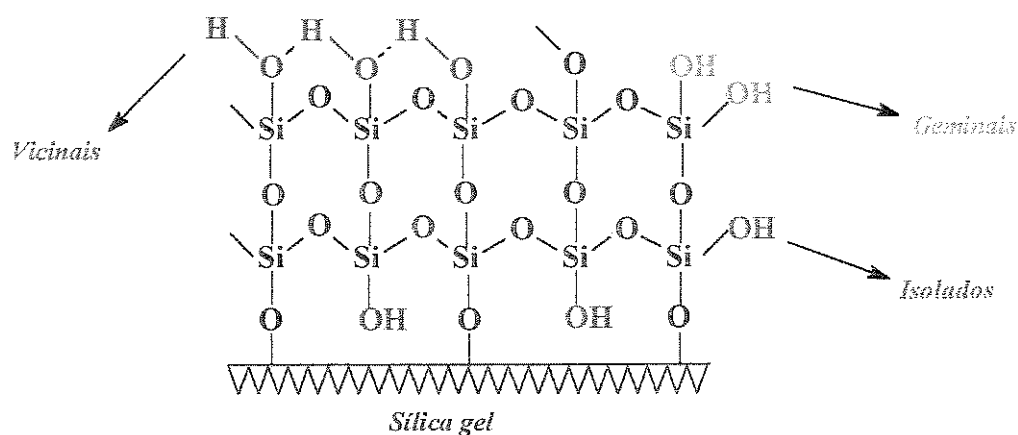


Figura 1: Representação dos diferentes tipos de silanóis encontrados na estrutura inorgânica da sílica.

Através de algumas técnicas como, por exemplo, a espectroscopia na região do infravermelho e mais recentemente a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{29}Si com as técnicas de polarização cruzada e rotação do ângulo mágico (CP/MAS) pode-se distinguir os diferentes tipos de grupos presentes na superfície da sílica. No infravermelho os grupos silanóis livres apresentam a banda de $\nu\text{-OH}$ em uma frequência maior que a banda de $\nu\text{-OH}$ para os grupos ligados, mas é impossível a diferenciação entre os grupos ligados e os geminais. Por outro lado, a técnica de RMN de ^{29}Si consegue diferenciar os grupos silanóis livres dos silanóis geminais, mas não é possível distinguir os vicinais (ligados) dos silanóis isolados (livres). Entretanto, a técnica de RMN de ^1H consegue fazer a diferenciação entre os grupos livres e os vicinais ligados [2].

Os grupos silanóis são ácidos e, dependendo do pH, a superfície da sílica pode estar carregada negativamente devido à dissociação desses grupos ácidos. Por exemplo, em pH 2 espera-se que a superfície da sílica seja neutra. Em pH acima de 8, a presença dos grupos silanóis dissociados permite que a superfície da sílica esteja carregada negativamente, possibilitando o seu uso em cromatografia de troca iônica. Esse comportamento nas fases quimicamente ligadas leva à assimetria de pico, característica para solutos básicos e ou ionizáveis [3].

Sabe-se que cada grupo deve apresentar uma acidez diferente devido ao ambiente químico distinto em que se encontra. Algumas evidências levam à conclusão de que os silanóis livres ou isolados são os mais ácidos e portanto deve apresentar o menor valor de pK_a . Além disso, se na estrutura inorgânica da sílica existirem outros metais com carga $3+$, a acidez desses grupos será potencialmente maior [3]. A substituição de um silício (Si^{4+}) por outro metal M^{3+} de raio iônico semelhante gera uma diferença de carga na superfície da sílica, fazendo com que ela seja compensada pela formação de fortes sítios ácidos de Brönsted. Dessa forma, para cada íon M^{3+} incorporado na matriz, deve existir um próton H^+ para manter a neutralidade de cargas na superfície do óxido. Geralmente, tal comportamento é observado com os íons alumínio e ferro no estado de oxidação $3+$.

A concentração dos grupos silanóis na superfície da sílica depende muito da forma de obtenção do óxido. Geralmente 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.

Os grupos silanóis da superfície da sílica podem ser facilmente removidos por aquecimento, onde ocorre a formação de uma nova ligação $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ e a liberação de moléculas de água. O aquecimento do material à 200°C retira as camadas de moléculas de água, obtendo uma superfície

anidra. O aumento contínuo da temperatura até 400°C resulta na reação de desidroxilação dos silanóis vicinais e, conseqüentemente, na superfície só são encontrados os silanóis livres. Se a temperatura não exceder 800 °C, o grupo siloxano formado reidroxila novamente, quando exposto à vapores de água. O aquecimento à 1200 °C promove uma desidroxilação total e irreversível da superfície do óxido e o caráter amorfo do material vai sendo lentamente perdido, com a formação da estrutura cristalina do quartzo. Neste tratamento, a superfície que inicialmente era hidrofílica, passa a ser totalmente hidrofóbica [2].

1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia é definida como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição dos mesmos entre duas fases. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra move-se através dela. Devido à diferença nos coeficientes de distribuição de cada um dos analitos nas respectivas fases, obtém-se velocidades diferentes, de tal modo que o composto menos retido na fase estacionária é eluído primeiramente [4].

Na cromatografia líquida a fase móvel é um líquido enquanto que a fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido sorvido ou imobilizado na superfície do sólido. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) abrange toda técnica de cromatografia líquida que requer pressões elevadas para forçar a passagem da fase móvel (FM) pelo leito cromatográfico da fase estacionária [3].

Na CLAE, a fase móvel é bombeada sob alta pressão a uma vazão controlada, sendo que, neste sistema, uma pequena quantidade de amostra é introduzida por meio de uma válvula de injeção. A amostra é então arrastada pela fase móvel, passando pela coluna, onde ocorre a separação cromatográfica. A coluna utilizada é recheada com fase estacionária, que é geralmente constituída de pequenas partículas, cujo tamanho pode variar de 3 a 10 µm. A fase móvel, arrastando os componentes da amostra, ao sair da coluna, chega ao detector onde um sinal, proporcional à concentração do analito, é enviado ao microcomputador [5].

A CLAE é considerada hoje como a técnica analítica mais empregada na indústria química. Na indústria farmacêutica, essa técnica de separação é extensivamente utilizada em muitas aplicações, desde a análise das matérias primas até o controle de qualidade dos medicamentos sintetizados. Em análises clínicas, a CLAE tem um papel fundamental nos estudos farmacocinéticos. Em laboratórios de análise ambiental, a CLAE é empregada na análise de pesticidas e outros contaminantes presentes no solo e na água. Aplicações da CLAE na indústria de alimentos incluem a determinação de resíduos de

pesticidas, nutrientes, como por exemplo, as vitaminas, e até mesmo a presença de aditivos. Estes são apenas alguns exemplos utilizados para demonstrar o vasto campo de aplicações desta técnica analítica que surgiu somente na década de setenta [3].

1.2.1 Mecanismos de separação em CLAE

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 um hidrocarboneto clorado, como por exemplo, o clorofôrmio. Em virtude da Cromatografia em Fase Reversa, hoje esta modalidade da cromatografia líquida é denominada como Cromatografia em Fase Normal (CLFN). O princípio da separação em CLFN se baseia na interação dos grupos funcionais dos respectivos analitos com os sítios polares de adsorção da sílica cromatográfica. A CLFN têm perdido sua importância e vem sendo substituída pela Cromatografia de Fase Reversa [3].

Na cromatografia 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 a 80 % das separações utilizam essa modalidade da cromatografia líquida. A sua popularidade se deve grandemente à versatilidade dessa modalidade onde 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. A maioria das fases estacionárias têm como suporte cromatográfico a sílica, mas fases poliméricas e outros substratos inorgânicos como, por exemplo, a zircônia, têm sido utilizados em alguns casos com sucesso no lugar da sílica [3].

Algumas aplicações, como na separação de proteínas, requerem uma superfície menos hidrofóbica que as fases estacionárias do tipo reversa para evitar alguns problemas como, por exemplo, a adsorção irreversível. As proteínas podem também ser desnaturadas na fase móvel hidroorgânica comumente empregadas na cromatografia de fase reversa. Se fases estacionárias menos hidrofóbicas são escolhidas, as proteínas podem ser eluídas utilizando uma fase móvel composta por uma solução tampão. Os analitos adsorvidos na fase estacionária podem ser eluídos através da alteração da concentração do tampão na fase móvel. Essa modalidade é considerada como uma extensão da cromatografia de fase reversa [3].

A cromatografia de troca iônica baseia-se na interação de analitos carregados positivamente ou negativamente, com os grupos funcionais de carga oposta do suporte cromatográfico. A fase estacionária pode ser a base de sílica ou uma resina polimérica, mas as resinas, apesar da menor

eficiência cromatográfica observada, ainda são preferidas em relação às fases a base de sílica devido à versatilidade em utilizar essas fases em uma ampla faixa de pH. A eluição é promovida pelo aumento da força iônica do tampão da fase móvel, intensificando a competição dos contra-íons, ou pela variação no pH, que podem acarretar na mudança da carga do analito ou do suporte cromatográfico. A aplicação desta modalidade de cromatografia inclui desde a especiação de cátions e ânions inorgânicos em amostras ambientais até os íons orgânicos. Neste campo inclui a análise dos biopolímeros, sendo aplicados também para as proteínas e os ácidos nucleicos [3].

1.2.2 Avaliação de colunas

Quando uma coluna é nova, seja ela adquirida comercialmente ou através de enchimento no próprio laboratório, devem ser feitos os cálculos dos parâmetros cromatográficos, a fim de avaliar o potencial desta coluna para futuras separações cromatográficas. Estes cálculos são realizados com os dados experimentais obtidos em um cromatograma típico, como mostra a figura 2 [5].

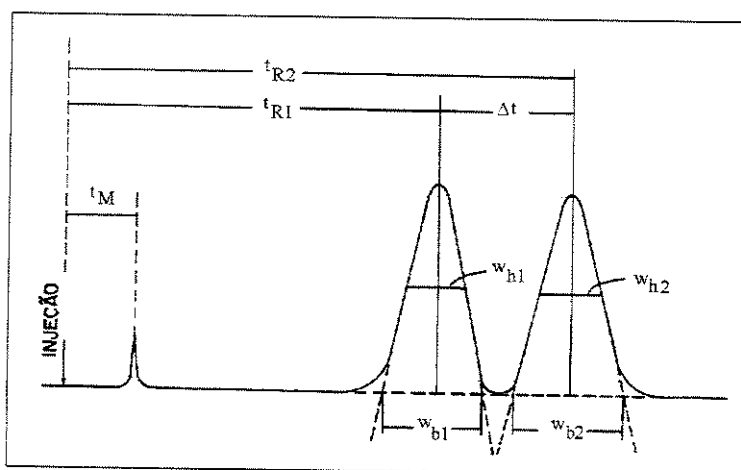


Figura 2: Cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes.

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, 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 [5]. O tempo de retenção ajustado, t'_R , é o tempo real que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária, calculado por:

$$t'_R = t_R - t_M$$

O fator de retenção k é determinado pela razão dos tempos em que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária ou percorrendo a coluna na fase móvel. Esse parâmetro normalizado

é bastante útil na comparação da retenção de um mesmo composto em diferentes colunas ou em diferentes composições da fase móvel [5].

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

A resolução **Rs** é uma medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a equação:

$$Rs = 1,777 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h2} + w_{h1}} \right)$$

em que t_{R2} e t_{R1} são os tempos de retenção dos dois analitos e w_{h1} e w_{h2} são as larguras dos picos a meia altura, medidas em unidade de tempo.

O fator de separação α entre dois picos adjacentes é calculado pela razão entre k_2 (do soluto mais retido) e k_1 (do soluto menos retido):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

A eficiência e número de pratos podem ser considerados como sinônimos. Da mesma forma que a resolução, **Rs**, o número de pratos é uma medida da qualidade da separação cromatográfica. Enquanto a resolução é baseada na largura e o tempo de retenção de dois picos adjacentes, o número de pratos leva em consideração um único pico. A nomenclatura reflete a origem do conceito da teoria de cromatografia gasosa em que a coluna poderia ser considerada como uma torre de destilação. Aplicando esse conceito, um certo comprimento da coluna deve ser ocupado por pratos. Este comprimento equivale à altura de vários pratos teóricos [3]. A eficiência, **N** é a medida do número de etapas de equilíbrio do analito entre a fase móvel e a fase estacionária, calculada por meio da equação:

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

A altura do prato, **H**, é a razão entre o comprimento da coluna (**L**) expressa em metros e o número de pratos (**N**), que pode ser calculado por $H = L/N$. Existe um outro parâmetro que é denominado de altura do prato reduzido, **h**. Esse parâmetro é um número adimensional calculado pelo quociente da altura do prato e o diâmetro médio das partículas que compõe a fase estacionária ($h = H / dp$). Esse parâmetro é útil para comparar colunas recheadas com partículas de tamanhos diferentes [3].

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

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

A figura 3 mostra o formato desta curva e as várias contribuições de cada um dos termos.

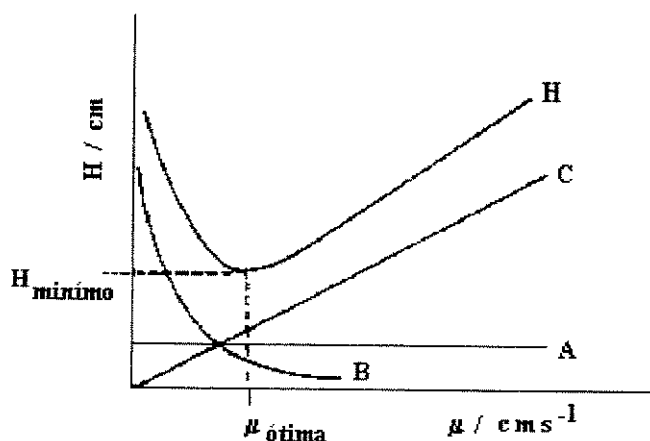


Figura 3: Curva de van Deemter mostrando as contribuições dos vários termos e a velocidade linear ótima.

O termo A , chamado de difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos devido aos caminhos múltiplos percorridos pelas moléculas do analito. O termo B é devido à difusão longitudinal ao longo da coluna e 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 fase móvel para a fase estacionária ou vice-versa [6]. A velocidade linear μ , expressa por cm s^{-1} , é definida pela razão do comprimento (L) da coluna e o t_M .

O fator de assimetria, A_s , é um parâmetro cromatográfico fundamental tanto para a avaliação das colunas preparadas no próprio laboratório, como para aquelas adquiridas comercialmente. 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 integração do pico, principalmente nas análises em que a relação sinal-ruído é muito baixa e quando os dois picos não estão bem resolvidos [3].

Existem várias causas que podem acarretar no alargamento. Colunas danificadas pelo seu uso contínuo, assim como as colunas preparadas em 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 [3]. O valor adimensional de As é medido à 10 % da altura do pico como mostra a figura 4.

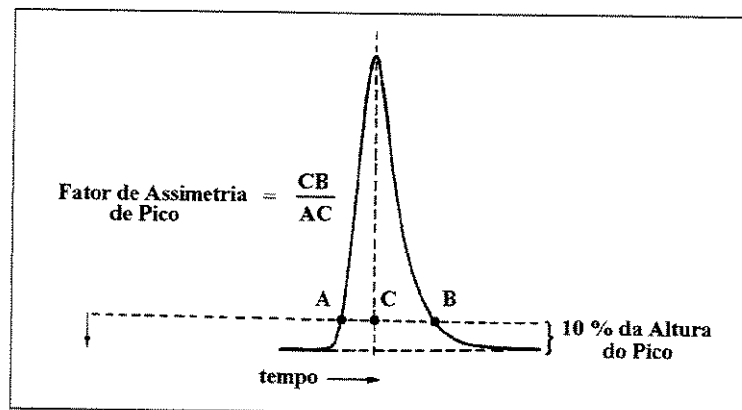


Figura 4: Cálculo do fator de assimetria de um pico à 10 % de sua altura.

Outro parâmetro cromatográfico que pode ser empregado é o fator de alargamento de pico, denominado Tf . Esse valor começou a ser utilizado por ter sido recomendado pela United States Pharmacopeia e alguns pesquisadores [3] acreditam ser uma medida mais precisa que o parâmetro As , que é tomado a 10% da altura do pico cromatográfico. Entretanto, teoricamente não existe nenhuma vantagem em medir o alargamento de pico com um método ou outro. O valor de Tf é calculado a partir das medidas dos seguimentos AC e CB da figura 4 a 5 % da altura do pico cromatográfico:

$$Tf = \frac{\overline{AC} + \overline{CB}}{2\overline{AC}}$$

Para ambos os parâmetros o valor ideal seria 1, indicando que o pico cromatográfico é totalmente simétrico [6].

1.3 O papel dos agentes sililantes na modificação da sílica

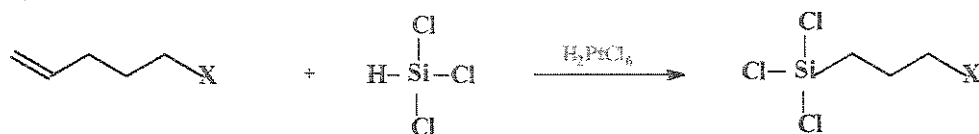
Um avanço marcante na Química para a obtenção de novos materiais foi o desenvolvimento dos silanos organofuncionais, denominados agentes sililantes. Estes reagentes apresentam uma propriedade notável em modificar superfícies inorgânicas ou sintetizar novos materiais híbridos inorgânico-orgânicos através do processo sol-gel, unindo, em um só material, propriedades completamente distintas entre si [7].

Os silanos organofuncionais mais comumente empregados, podem ser representados por $(Y)_3\text{-Si-R-X}$, em que X representa o grupo funcional reativo da molécula orgânica, R o espaçamento de uma cadeia, normalmente três grupos (CH_2) entre o átomo de silício e o grupo X . O segundo centro reativo

deste reagente, Y, geralmente é o grupo cloro (Cl) ou um alcóxido (OR'), os quais são facilmente hidrolisados na presença de pequenas quantidades de água, e são responsáveis pela reatividade com diferentes óxidos inorgânicos, mais especificamente a sílica gel. Dependendo do número dos grupos reativos Y ligados diretamente ao átomo de silício, o agente sililante é classificado como mono, di ou trifuncional [7].

A preparação destes compostos se iniciou na década de quarenta, através da reação de hidrossililação, e hoje em dia podem ser facilmente sintetizados no próprio laboratório ou adquiridos comercialmente. A produção industrial destes compostos envolve um processo de duas etapas de acordo com o esquema representado na figura 5.

Etapa 1) Hidrossililação



Etapa 2) Esterificação

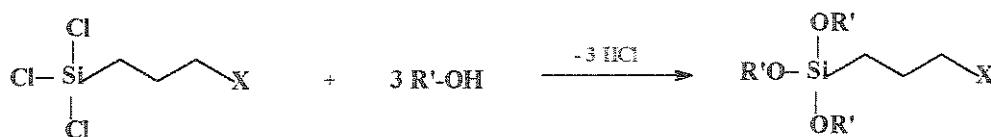


Figura 5: Reações envolvidas na preparação de um agente sililante trifuncional.

A hidrossililação consiste na formação de uma nova ligação Si-C através da adição do grupo Si-H do triclorossilano $\text{Cl}_3\text{-Si-H}$ à ligação $\text{C}=\text{C}$ de um alceno bifuncional na presença de platina como catalisador. Deve-se lembrar que a síntese de alguns silanos mais simples como, por exemplo, o octadeciltriclorossilano, envolve apenas a escolha do alceno contendo a cadeia orgânica alifática desejada, que pode variar de C_1 até C_{30} .

Se desejar sintetizar um agente sililante monofuncional, pode-se substituir o triclorossilano pelo precursor monofuncional, o clorodimetilsilano. De maneira análoga, a escolha do diclorodimetilsilano resulta na síntese de um silano difuncional.

A preparação dos alcoxissilanos envolve a reação dos grupos triclorossilil com álcoois para a formação dos grupos trialcoxissilil. Geralmente, metanol e etanol são usados nesta esterificação, de acordo com a reação mostrada na figura 5, e deve-se evitar a presença de água, que pode hidrolisar o produto final [7]. Dependendo da reatividade do grupo X do agente sililante, o qual pode ser um grupo

cloro, amino ou tiol [8], novos agentes sililantes podem ser sintetizados através da reação com outras moléculas orgânicas [9].

1.4 Modificação da sílica cromatográfica

Os silanóis presentes na superfície da sílica podem reagir com diferentes agentes para preparar as sílicas modificadas. Como essas sílicas modificadas podem ser utilizadas como fases estacionárias em cromatografia líquida, utiliza-se o termo fases quimicamente ligadas. O termo quimicamente ligado é devido à ligação química entre o suporte inorgânico e os grupos orgânicos, do respectivo agente sililante empregado.

A modificação da sílica ocorre através da reação dos grupos silanóis com grupos do tipo cloro ou etóxi presentes na molécula do agente sililante. A imobilização das cadeias orgânicas do agente sililante à superfície da sílica é estabelecida através da ligação $\equiv\text{Si-C}$, a qual é bastante estável hidroliticamente, devido às propriedades específicas do átomo de silício que possui baixa acidez de Lewis, formando uma ligação bastante apolar e inerte [3].

Os clorossilanos são mais reativos que os alcoxissilanos e, dessa forma, a preparação de fases quimicamente ligadas, na maioria dos casos, utiliza os clorossilanos juntamente com um catalisador, que pode ser uma base receptora de prótons. As aminas terciárias, assim como a piridina e lutidina, parecem desempenhar muito bem esta função, diminuindo o tempo de reação da sílica com o respectivo agente para se obter um alto grau de recobrimento da superfície [10]. Em alguns casos, já foram empregados alguns ácidos orgânicos que também parecem acelerar a reação dos silanóis com os grupos reativos do agente sililante [11].

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 $4 \mu\text{mol m}^{-2}$ devido ao impedimento estérico na reação com os agentes sililantes. Esse valor indica que apenas 50% dos silanóis disponíveis reagem, levando em conta que a concentração média dos silanóis é da ordem de $8 \mu\text{mol m}^{-2}$. Muito embora possa considerar que na superfície da sílica cromatográfica existem mais silanóis residuais que grupos orgânicos imobilizados. Apesar desses silanóis não estarem disponíveis para reagirem com as moléculas dos agentes sililantes, eles são suficientemente acessíveis para interagirem com os analitos durante a separação cromatográfica. Os mesmos contribuem com o aumento da retenção e alargamento de pico das amostras básicas [3].

Esses silanóis remanescentes da primeira modificação química podem ser desativados ou bloqueados com agentes sililantes menos volumosos e mais reativos, em uma segunda etapa de reação denominada de reação de capeamento. O trimetilclorossilano e o hexametildissilazano são os reagentes mais utilizados na reação de capeamento. Muitas vezes uma mistura desses dois reagentes também pode ser empregada. As sílicas modificadas, que são capeadas em uma segunda etapa de reação, apresentam uma atividade de silanóis residuais bem menor, quando comparadas com aquelas que não foram capeadas, entretanto, um bloqueio completo de todos os silanóis residuais é praticamente impossível. Dessa forma, a reação de capeamento melhora bastante a qualidade da fase estacionária, mas não resolve definitivamente o problema dos grupos silanóis residuais.

1.5 Fases monoméricas x poliméricas

Dependendo da escolha do agente sililante e das condições de reação, pode se obter sílicas modificadas com a mesma composição química, porém com propriedades completamente diferentes. Essas propriedades levam a um comportamento cromatográfico diferenciado, quando essas sílicas são utilizadas como fase estacionária, principalmente em termos de retenção e seletividade [12].

Quando se utiliza um silano monofuncional na modificação da sílica, existe apenas uma única forma de ligação entre a molécula do agente sililante e a superfície da sílica. Porém, esse comportamento não é observado em um sistema envolvendo a reação com um agente sililante difuncional, por exemplo. Quando o agente difuncional é empregado na modificação química, mais de um grupo silanol pode reagir com uma única molécula do agente sililante. Entretanto, como discutido anteriormente, nem todos os silanóis da superfície da sílica estão disponíveis para reagirem com os agentes sililantes. Aproximadamente, apenas uma metade dos agentes sililantes conseguem se ligar na sílica através de duas ligações siloxanos, enquanto que a outra metade se liga à superfície através de uma ligação siloxano. Tal situação permite que fiquem grupos reativos remanescentes na superfície da sílica, sendo que quando hidrolisados, podem contribuir para a formação de novos silanóis [3].

A situação torna-se um pouco mais crítica quando se utiliza um agente sililante trifuncional. A reação de uma molécula de agente sililante, simultaneamente, com três grupos silanóis parece ser impossível devido ao espaçamento dos grupos silanóis e ao tamanho da molécula do agente sililante. Conseqüentemente, nestas condições, um número bem maior de silanóis residuais é produzido, quando os grupos reativos ficam remanescentes na superfície da sílica. Parte desses grupos pode se condensar formando novas ligações do tipo siloxano, mas o resultado final é uma população de grupos silanóis maior que nas sílicas modificadas com agentes sililantes mono ou difuncionais [3].

As condições de reação podem ser ajustadas a fim de tirar vantagem desses novos grupos reativos remanescentes. Uma alternativa possível é a realização da modificação da sílica na presença de traços de umidade. As moléculas de água são capazes de hidrolisar os grupos reativos remanescentes na superfície, produzindo novos silanóis, que podem condensar formando novas ligações siloxanos entre as cadeias do agente sililante imobilizado e também com o silanóis do suporte cromatográfico. Como resultado, a superfície da sílica fica mais densamente recoberta, obtendo-se uma concentração de grupos orgânicos relativamente maior do que quando se emprega condições anidras. Um maior grau de recobrimento da superfície também pode ser verificado para as modificações químicas realizadas com agentes sililantes trifuncionais. Geralmente fases com um grau de recobrimento maior que $4 \mu\text{mol m}^{-2}$ são classificadas como fases poliméricas, entretanto essas fases podem ser avaliadas melhor através da análise cromatográfica empregando alguns hidrocarbonetos poliaromáticos [12].

A grande maioria das fases ligadas, como por exemplo as do tipo C_8 e C_{18} 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. 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 [3]. Mesmo os estudos de estabilidade demonstrando que as fases poliméricas podem ser mais estáveis em relação as fases monoméricas, as fases monoméricas parecem ser mais preferidas pelo fato do seu preparo ser mais fácil de ser reproduzido [3].

1.6 Alargamento de pico durante a separação cromatográfica

A separação de compostos apolares como, por exemplo, hidrocarbonetos poliaromáticos, por fase reversa não requer muitas preocupações por parte do analista em termos do alargamento de pico devido aos silanóis residuais, pois essas moléculas podem ser facilmente separadas empregando as colunas convencionais do tipo C_8 ou C_{18} .

A mesma facilidade não pode ser encontrada na separação cromatográfica de compostos polares, principalmente os fármacos, por CLAE quando se emprega a fase reversa. Geralmente esses compostos apresentam na sua estrutura diferentes grupos funcionais, com propriedades ácidas e básicas. Esses grupos são potencialmente ativos para interagirem com os silanóis residuais da superfície da sílica, causando o alargamento de pico indesejado, conforme é ilustrado na figura 6. Aliado a este fato, essas substâncias podem estar na sua forma neutra ou dissociada (carregada positivamente ou negativamente) dependendo do pH da fase móvel e do pK do respectivo fármaco,

dificultando ainda mais a separação [13]. Em pH menor que 3, as interações indesejáveis entre a fase C_8 ou C_{18} e a amitriptilina são minimizadas, porém em pH entre 6 e 8, essas interações são maximizadas, causando o alargamento, devido à ionização dos silanóis.

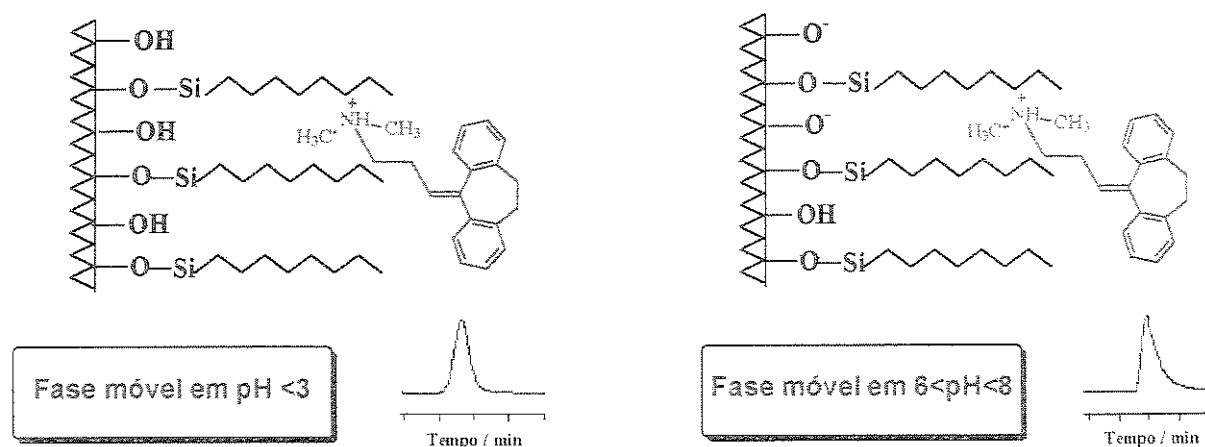


Figura 6: Alargamento de pico durante uma separação cromatográfica envolvendo a superfície de uma sílica modificada do tipo C_8 ou C_{18} e um fármaco básico, neste caso a amitriptilina.

As interações que contribuem para o alargamento de pico e baixa eficiência durante a separação cromatográfica podem ser dos tipos: ligações de hidrogênio ou interações iônicas. Em pH maior que 6, sabe-se que os grupos silanóis, cujo pK_a é aproximadamente 7, podem estar desprotonados na forma $\equiv Si-O^-$ e, assim, interagirem com os compostos básicos, os quais, dependendo também do seu valor de pK_a , podem estar carregados positivamente [13].

Na prática, quando compostos básicos têm que ser analisados por CLAE de fase reversa, utilizando colunas do tipo C_8 e C_{18} , o pH da fase móvel é ajustado a um valor na faixa de 3 a 5 para evitar a ionização dos grupos silanóis e manter os analitos básicos protonados, minimizando o alargamento de pico, como mostrado na figura 6.

Entretanto, esse procedimento, além de ser mais trabalhoso pois requer o ajuste do pH da fase móvel, diminui a vida útil da coluna cromatográfica devido à baixa estabilidade hidrolítica da sílica em fases móveis hidroorgânicas com pH menor que 2 e, dependendo do tipo do composto a ser analisado, o ajuste de pH não pode ser efetuado.

Para tentar solucionar esses problemas, algumas estratégias de síntese e preparação de novas fases estacionárias reversas foram desenvolvidas para minimizar as interações com os silanóis residuais.

1.7 Avanços tecnológicos no desenvolvimento de fases estacionárias a base de sílica

A sílica ainda é o material mais utilizado como suporte cromatográfico para as colunas de CLAE, devido à sua alta estabilidade mecânica e térmica, rigidez e a grande eficiência obtida nas separações cromatográficas. Apesar de existirem colunas recheadas com materiais poliméricos, a sílica é o suporte mais apropriado [14]. Inicialmente, a sílica utilizada apresentava formato irregular e foi substituída por partículas de morfologia esférica por volta de 1980. O próximo avanço foi o uso de partículas com diâmetros cada vez menores, sendo que aquelas de 10 μm foram preferencialmente trocadas pelas de 5 e 3,5 μm [14].

Também ocorreram mudanças significativas quanto à pureza das sílicas, principalmente no método de obtenção destes materiais porosos. A sílica, que antes era obtida a partir do silicato de sódio, agora passa ser obtida através do processo sol-gel, empregando o tetraetoxissilano como fonte de SiO_2 . Com a utilização de solventes e agentes surfactantes apropriados, consegue-se obter sílicas de diferentes tamanhos e porosidades. Hoje é possível adquirir sílicas altamente puras, livres de contaminantes como ferro e alumínio. A presença desses metais M^{3+} , como contaminantes na matriz de sílica, aumenta consideravelmente a acidez dos grupos silanóis (Si-OH), dificultando a análise de compostos básicos em condições de fase reversa. Essas melhorias no suporte cromatográfico permitiram significativos ganhos na eficiência, estabilidade e reprodutibilidade das colunas [14].

Alguns pesquisadores consideram que a modificação química da superfície da sílica parece não ter evoluído muito quando comparada com os métodos de obtenção da sílica, por ainda utilizar os mesmos organossilanos empregados há trinta anos. Entretanto, os pesquisadores engajados no desenvolvimento de novas colunas para CLAE conseguiram alguns melhoramentos para as fases quimicamente ligadas do tipo C_8 e C_{18} , através da reação de capeamento ou bloqueio dos grupos silanóis [15].

Além da busca de novos materiais para serem utilizados como suporte cromatográfico e novos procedimentos de síntese para bloquear os silanóis remanescentes, novas fases estacionárias vêm sendo sintetizadas, com o objetivo de obterem fases capazes de analisar diferentes compostos, incluindo os básicos, em uma ampla faixa de pH com considerável estabilidade química [16].

1.8 Novas fases estacionárias reversas à base de sílica

1.8.1 Fases reversas recobertas com polímero

A preparação de fases reversas 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]. No início, essas fases apresentavam baixa eficiência, sendo atribuída ao total preenchimento dos poros da sílica pelo filme polimérico e assim, afetando drasticamente a transferência de massa e, conseqüentemente, a eficiência durante a separação cromatográfica. Com a otimização do processo de sorção e imobilização dos polímeros, hoje já se sabe que essas fases apresentam características semelhantes às fases quimicamente ligadas do tipo C_8 e C_{18} , inclusive quanto a eficiência cromatográfica [18].

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. Os polímeros mais freqüentemente utilizados são: o poli(metiloctil)siloxano (PMOS) e o poli(metiloctadecil)siloxano (PMODS), mas existem trabalhos na literatura que já utilizaram o polibutadieno [19] e o poliestireno [20]. O método de preparação destes materiais é bastante simples e as fases preparadas com o PMOS e PMODS apresentam boa eficiência.

1.8.2 Fases reversas à base de sílica híbrida

Apesar da sílica ser o melhor suporte cromatográfico para o preparo das fases estacionárias, ela apresenta duas grandes limitações. A primeira limita-se a sua utilização em uma faixa de pH de 2 até 8, para não haver a degradação da fase estacionária e a segunda pela presença dos grupos silanóis residuais, os quais causam a assimetria de pico quando as amostras básicas são analisadas [21].

Sabe-se que em meio ácido, em pH menor que 2, as ligações $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ que formam o esqueleto da sílica e são responsáveis por manter os grupos orgânicos imobilizados na superfície da sílica, ficam mais susceptíveis à hidrólise. Dessa forma, os grupos orgânicos são mais facilmente lixiviados quando se emprega fases móveis com pH abaixo de 2. Em meio básico, com pH acima de 8, os grupos hidroxilas (OH) reagem facilmente com os silanóis residuais, promovendo a dissolução do suporte cromatográfico. Como conseqüência da dissolução da sílica, o leito cromatográfico dentro da coluna é alterado, resultando em baixas eficiências e o alargamento frontal de pico.

Para evitar esses problemas associados ao suporte de sílica, alternativamente podem ser empregados os suportes poliméricos no recheio das colunas cromatográficas para CLAE. Entretanto, os

polímeros não oferecem a mesma eficiência nas separações cromatográficas, apresentam uma menor resistência mecânica que a sílica e determinados suportes poliméricos são incompatíveis com alguns solventes, causando o intumescimento e até a dissolução. Essas desvantagens dos materiais poliméricos ainda são fatores decisivos para a escolha da sílica como suporte cromatográfico [21].

O material idealizado por qualquer cientista engajado em separações cromatográficas seria um suporte cromatográfico que combinasse as propriedades da sílica cromatográfica com a versatilidade dos materiais poliméricos a serem utilizados em uma ampla faixa de pH, com considerável estabilidade química e a completa ausência dos silanóis residuais [21].

Uma tentativa recente e bem sucedida de sintetizar esses novos materiais foi realizada pela Waters Corporation com a síntese da sílica híbrida através do processo sol-gel. Em um processo de síntese já patenteado em 2001 [22], os pesquisadores empregaram a mistura de 2:1 tetraetoxissilano (TEOS) e metiltrietoxissilano (MTEOS) para sintetizar partículas esféricas de sílica híbrida, com tamanho apropriado e porosidade controlada [21]. A estrutura química das partículas porosas da sílica híbrida, sintetizadas usando os dois organossilanos, está representada na figura 7.

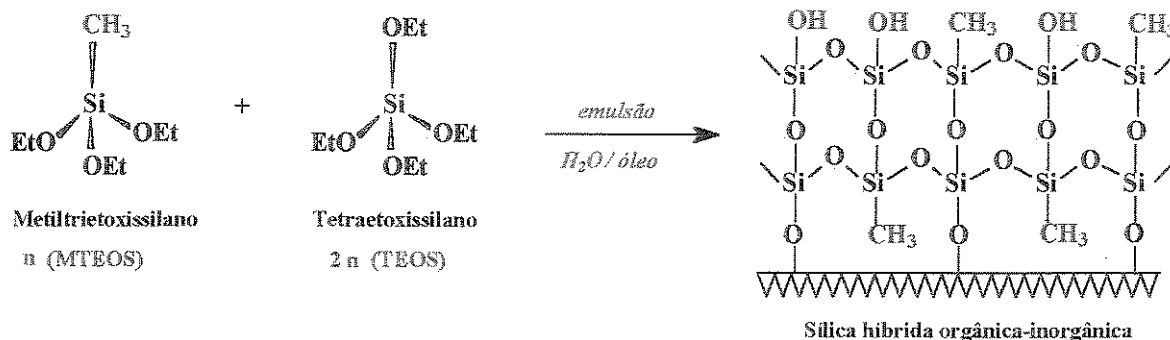


Figura 7: Representação da síntese e da estrutura das partículas de sílica híbrida de acordo com processo sol-gel desenvolvido pelos pesquisadores da Waters Corporation.

Detalhes do preparo da síntese dessas partículas porosas e esféricas obviamente foram omitidos e estão protegidos na patente [22]. Provavelmente durante o processo sol-gel, os grupos etóxi dos dois organossilanos são hidrolisados na presença de um catalisador. Em uma segunda etapa, utilizando um meio reacional apropriado os grupos silanóis, originados da hidrólise dos grupos etóxi, se condensam para formar as partículas esféricas de tamanho apropriado e porosidade controlada.

O novo material híbrido poroso difere da sílica cromatográfica convencional por apresentar grupos metilas incorporados na matriz inorgânica da sílica. Esses grupos estão presentes na estrutura do material híbrido devido à utilização do precursor metiltrietoxissilano. A presença destes grupos

hidrofóbicos confere a este material uma estabilidade química superior em relação ao suporte convencional, podendo ser utilizado em uma faixa de pH um pouco mais ampla que aquela que se emprega para a sílica pura, além de poder realizar separações em temperatura superior a ambiente. Outra possível vantagem é a baixa atividade dos grupos silanóis residuais nas fases a base de sílica híbrida. De fato, a sílica híbrida possui uma concentração de grupos silanóis menor que a sílica inorgânica devido à incorporação dos grupos metilas, mas continua sendo impossível obter um recobrimento total dos silanóis no processo de modificação química com outros agentes sililantes.

A Waters já comercializa colunas cromatográficas recheadas com essas partículas de sílica híbrida, que é modificada com agentes sililantes monofuncionais, contendo grupos polares do tipo carbamato inseridos e também com agentes sililantes trifuncionais. As estruturas dos materiais disponíveis comercialmente são mostradas na figura 8.

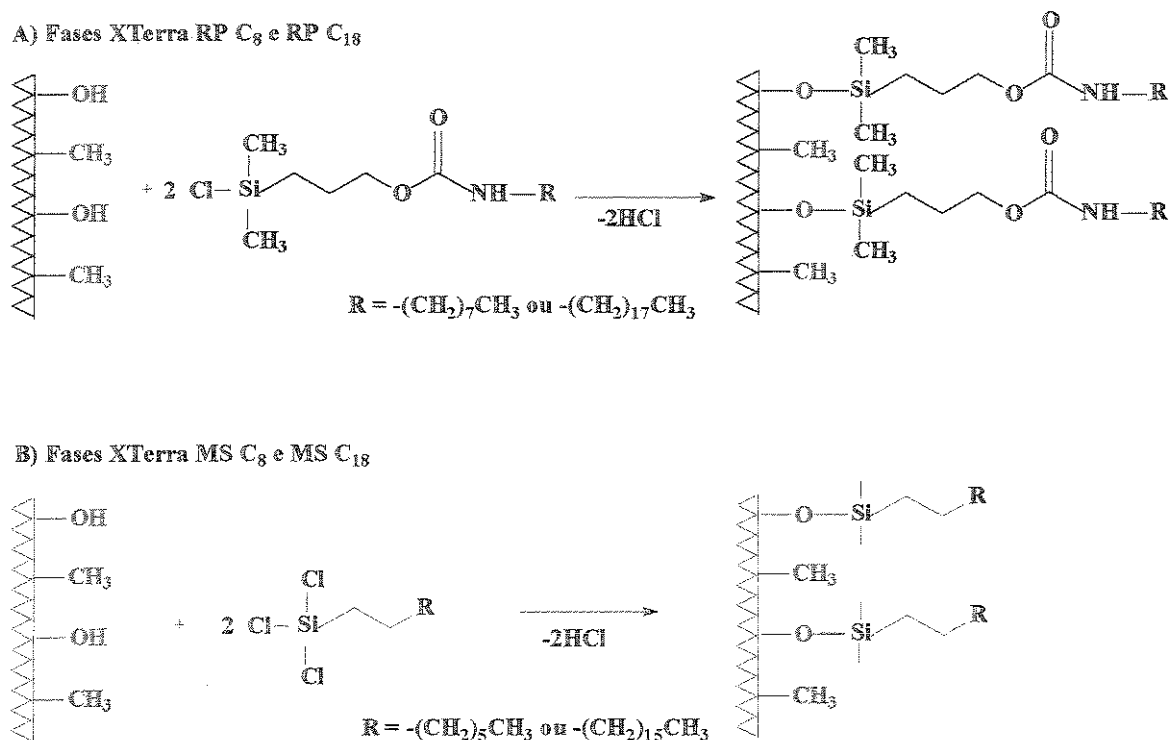


Figura 8: Preparação das fases estacionárias a base de sílica híbrida, que são comercializadas pela Waters Corporation.

Neue e colaboradores [21] demonstraram que as fases XTerra a base de sílica híbrida podem ser empregadas em separações cromatográficas utilizando fases móveis com pH na faixa de 1,2 até 11,5 sem haver perda de eficiência da coluna. Outra vantagem relatada foi a realização de separações em

temperaturas acima de 60 °C. Essas condições experimentais não são viáveis para as fases quimicamente ligadas a base de sílica pura devido à sua rápida degradação em temperaturas elevadas.

Novas partículas híbridas estão sendo sintetizadas, substituindo o MTEOS por outros organossilanos bidentados do tipo $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{-Si-(CH}_2)_3\text{-Si-(CH}_3\text{O})_3$, com o propósito de serem mais estáveis que os materiais híbridos sintetizados inicialmente. Mais recentemente, os trialcossilanos contendo grupos funcionais do tipo amina, o [(3-amino)propil] trimetoxissilano, $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{-Si-(CH}_2)_3\text{-NH}_2$, e o viniltrimetoxissilano, tendo como grupo funcional na sua estrutura o grupo vinila $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{-Si-CH}_2\text{=CH}_2$, também estão sendo empregados na síntese sol-gel em substituição ao MTEOS. O objetivo de sintetizar essas novas sílicas híbridas é obter novas fases estacionárias através da reação destes grupos funcionais penderes com outras moléculas orgânicas [23].

1.8.3 Fases estericamente protegidas

A escolha de agentes sililantes monofuncionais, contendo grupos isopropila ou isobutila, ligados diretamente ao átomo de silício, permite a síntese das fases denominadas de estericamente protegidas. Essas fases foram inicialmente relatadas na literatura em 1989 com a finalidade de obter fases mais estáveis que as fases convencionais do tipo C_8 e C_{18} [24]. Essas fases estericamente protegidas foram desenvolvidas por Kirkland e Glajch, cuja invenção está protegida por patente desde 1987 [25]. Hoje em dia, a Agilent Technologies comercializa essas fases estacionárias denominadas Zorbax StableBond. Existem fases do tipo C_8 , C_{18} e CN (cianopropil) com os grupos volumosos ligados diretamente ao átomo de silício, como mostra o exemplo ilustrado na figura 9.

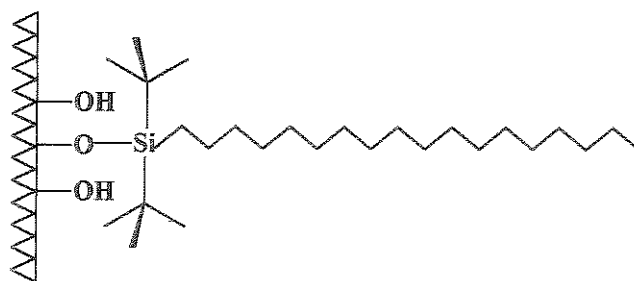


Figura 9: Estrutura da fase Zorbax SB-C18 da Agilent, com grupos isobutila ligados diretamente ao átomo de silício e uma cadeia n-alquila do tipo C_{18} .

A tecnologia de inserir esses grupos hidrofóbicos e volumosos, próximos à superfície da sílica, permite que a superfície da sílica fique mais protegida principalmente em fase móvel em pH abaixo de 3, evitando a quebra das ligações do tipo siloxano que são responsáveis por manter os grupos orgânicos imobilizados na superfície da sílica [24].

O fabricante recomenda a utilização dessas fases em separações cromatográficas que requerem a utilização de uma fase móvel agressiva, como por exemplo àquelas que contêm ácido trifluoracético. Porém, a utilização com fases móveis em pH acima de 7 não é recomendada.

A propriedade dos grupos volumosos em bloquear os silanóis residuais parece ter sido erroneamente atribuída. Alguns resultados com o uso destas fases estacionárias na separação de compostos básicos em pH 7 mostraram uma atividade considerável de grupos silanóis residuais devido ao baixo recobrimento da superfície [26]. A presença destes grupos volumosos deve dificultar a reação dos grupos reativos do silano com os silanóis da superfície da sílica.

Outra publicação mostrou que uma destas fases (a Zorbax-SB CN) é menos estável em fases móveis em pH acima de 7 em comparação com as fases monofuncionais, preparadas com os monoclорodimetilsilanos e também em relação às fases poliméricas preparadas com agentes sililantes trifuncionais como, por exemplo, o octadeciltriclorossilano ou o octadecil-trimetoxissilano [27]. O motivo da baixa estabilidade está relacionado com o menor grau de recobrimento da superfície da sílica, quando se utiliza os silanos monofuncionais com os grupos isopropila ou isobutila.

1.8.4 Fases reversas bidentadas

Uma nova classe de fases reversas, denominadas bidentadas, foram recentemente preparadas por Kirkland et al. [28]. Essas fases são sintetizadas a partir da modificação da sílica cromatográfica com agentes sililantes bidentados formados por dois átomos de silício. O processo de síntese destes agentes sililantes é propriedade de duas patentes [29], [30], agora pertencentes à Agilent. Essa empresa comercializa colunas recheadas com essa fase bidentada com o nome de Zorbax Extend-C18. A estrutura desta fase estacionária é mostrada na figura 10.

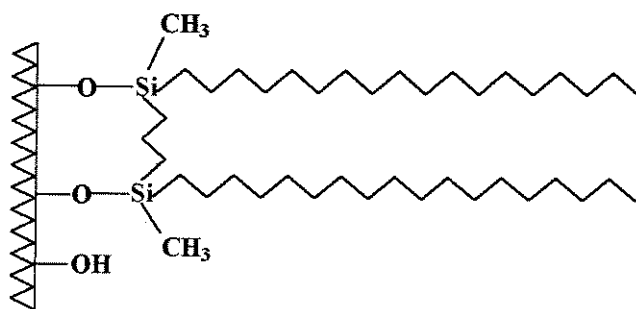


Figura 10: Estrutura química da fase bidentada Zorbax Extend-C18 da Agilent.

Essas fases são denominadas bidentadas por apresentarem um grupo propila ligado a dois átomos de silício do agente sililante. A principal vantagem em relação as fases reversas

monofuncionais é uma estabilidade relativamente maior em fases móveis agressivas em pH acima de 7. O fabricante recomenda a utilização desta fase em separações com fase móvel em pH até 11.

Provavelmente o grau de recobrimento da superfície da sílica com esse agente sililante bidentado é relativamente menor quando comparado com aquele obtido para as sílicas modificadas com os agentes sililantes monofuncionais. Como consequência, a população dos grupos silanóis remanescentes é maior, tanto que o fabricante admite realizar o bloqueio dos silanóis em uma segunda etapa de reação. Porém, com as fases bidentadas reversas é possível realizar separações cromatográficas empregando fases móveis com pH alto. Se o pH da fase móvel é maior que o valor de pK_a dos analitos básicos, as moléculas estarão na forma não-protonada e o silanóis residuais na forma $Si-O^-$. Nesta situação, a atividade dos silanóis residuais é mínima, evitando o alargamento de pico [28].

1.8.5 Fases Monolíticas

O conceito de fases monolíticas a base de sílica foi recentemente introduzido em CLAE. Essas colunas monolíticas diferem das colunas convencionais por não serem recheadas com partículas porosas de sílica. Essas fases foram desenvolvidas por pesquisadores da Universidade de Kyoto [31] em colaboração com a Merck KGaA da Alemanha [32]. Essas colunas, que podem ser do tipo C_8 ou C_{18} , estão disponíveis comercialmente desde 2000 com o nome de Chromolith Columns. O recheio das colunas monolíticas também é um material poroso, mas apresenta poros com diferentes tamanhos. Nas colunas convencionais, o material particulado apresenta mesoporos com tamanho de 6 até 30 nm, enquanto que na fase monolítica o suporte cromatográfico apresenta uma estrutura tridimensional com mesoporos de 13 nm e macroporos de 2 μm de diâmetro. A figura 11 mostra imagem do material obtida por microscopia eletrônica de varredura, em que é possível visualizar os macroporos.



Figura 11: Microscopia Eletrônica mostrando a estrutura porosa da sílica monolítica.

Esses monólitos são produzidos através de um processo sol-gel, empregando o TEOS como fonte de sílica e agentes surfactantes apropriados que permitem a obtenção dos mesoporos e

macroporos na matriz de sílica. O interessante é que o material é fabricado dentro da coluna cromatográfica. Provavelmente, em alguma etapa de processo a mistura é bombeada para dentro da coluna e em etapas subsequentes de geificação e de calcinação, ocorre a formação da sílica monolítica, cuja estrutura está na figura 11. Provavelmente a etapa de modificação química destas fases com os agentes sililantes do tipo C_{18} também deve ser feita com o material contido na coluna.

A principal vantagem destas novas fases em relação as fases particuladas é a possibilidade de realizarem separações rápidas por poderem ser feitas em altas vazões de fase móvel. Isso só é possível graças aos macroporos que contribuem para uma rápida transferência de massa, sem ocasionar perdas de eficiência, nem o aumento da pressão dentro da coluna [33].

A estabilidade, assim como a atividade dos grupos silanóis residuais, ainda não foram investigadas ou relatadas na literatura pelo fato dessas fases monolíticas terem sido lançadas no mercado recentemente.

1.8.6 Fases reversas contendo grupos polares embutidos

Novas fases estacionárias do tipo reversa para CLAE têm surgido desde o nascimento desta técnica analítica há quase quarenta anos atrás. A busca de novos materiais para serem utilizados como suporte cromatográfico tem como principal objetivo obter novas fases estacionárias capazes de analisar compostos básicos sem o alargamento de pico, comumente observado em condições de fase reversa. Dentre essas novas fases estacionárias, tem crescido o número de fases reversas que possuem grupos polares inseridos na cadeia N-alkila.

Geralmente esses grupos polares encontram-se embutidos na cadeia N-alkila da sílica modificada, após o terceiro grupo metileno ligado ao átomo de silício do organossilano imobilizado. Na grande maioria os grupos polares são formados por átomos capazes de estabelecer ligações de hidrogênio com outras espécies sendo que os átomos de nitrogênio e oxigênio desempenham muito bem esta função. As fases reversas, contendo grupos polares do tipo amida ($-NH-C(O)-R'$), foram inicialmente sintetizadas na década de 90 através de um processo de modificação química em duas etapas como mostra o esquema da figura 12.

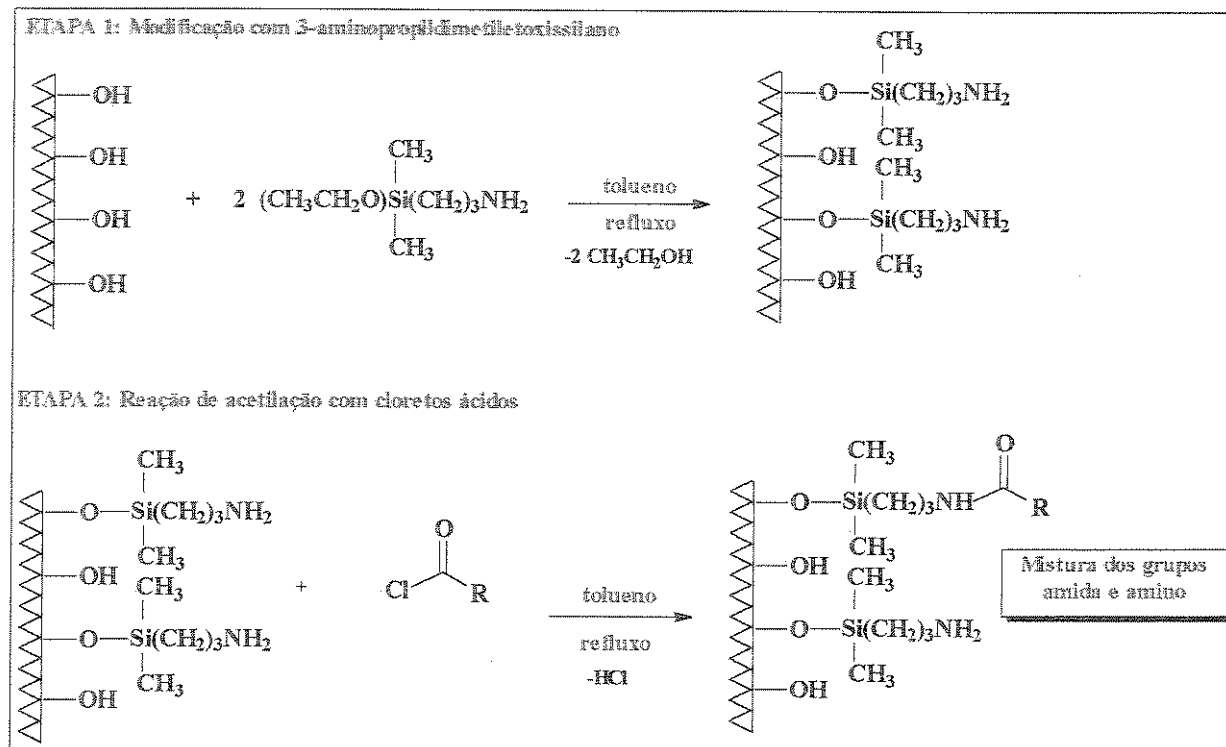


Figura 12: Esquema da preparação das fases reversas contendo grupos polares do tipo amida, em que o grupo **R** pode representar um grupo alquila ou arila, dependendo da escolha do respectivo cloreto ácido.

Inicialmente, a sílica é modificada quimicamente com o aminoorganossilano monofuncional. Em uma segunda etapa da modificação, os grupos aminopropila, ligados à superfície da sílica, são acetilados através da reação com cloretos ácidos para formar o grupo funcional do tipo amida, inserido na cadeia N-alquila do ligante, como mostra a figura 12.

O primeiro trabalho envolvendo a preparação deste novo tipo de sílica modificada foi o de Nomura et al. [34] em 1987, onde foram utilizados os cloretos de benzila e proprionila como reagentes para a segunda etapa de acetilação. Em um estudo sistemático, foi explorada a reatividade dos grupos aminopropila com esses reagentes em função do tamanho do poro da sílica, utilizada na primeira etapa da modificação química. Entretanto, a utilização dessas sílicas modificadas como fase estacionária para cromatografia líquida não foi explorada.

Apenas em 1990 Ascah e Feibush [35], que na época eram pesquisadores da Supelco, publicaram a separação de compostos básicos, incluindo a piridina e piridinas substituídas, utilizando uma nova fase estacionária que possuía grupos polares perto da superfície da sílica. Neste trabalho o tipo do grupo polar não foi revelado, porém os resultados obtidos sugeriram que esses grupos polares minimizavam as interações indesejáveis com os silanóis residuais, permitindo a separação desses

compostos básicos em pH em torno de 7,0, sem a adição de outras substâncias na fase móvel, para suprir essas interações com os silanóis.

Esta fase apresentava fracas interações dos grupos silanóis residuais com os analitos básicos, o que permitiu que essa nova subclasse de fases do tipo reversa continuasse sendo desenvolvida. No mesmo ano a Supelco publicou o pedido de propriedade de patente dessas novas fases reversas preparadas através do processo de duas etapas que se mostraram superiores às fases C₈ e C₁₈ por apresentarem boa eficiência e baixo alargamento de pico para compostos básicos [36].

Em 1991, Buszewski et al. [37] publicaram a síntese de novas fases estacionárias preparadas a partir da reação das sílicas do tipo aminopropila monofuncional e trifuncional com o cloreto derivado do ácido esteárico, utilizando o mesmo processo esquematizado na figura 12. O reagente para a acetilação foi preparado a partir da reação do respectivo ácido graxo com cloreto de tionila (SOCl₂). As fases foram devidamente caracterizadas por ressonância magnética nuclear tanto de ²⁹Si como de ¹³C.

Em um outro trabalho mais recente, Schmid et al. [38] conseguiram caracterizar essas novas fases reversas utilizando a ressonância magnética nuclear, sendo possível obter mais informações que comprovaram a formação do grupo polar (-NH-C(O)-R'), principalmente através do sinal em 160 ppm no espectro de RMN de ¹³C, referente à carbonila da função amida. Estudos envolvendo a seletividade das novas fases do tipo amida [39] foram obtidos por Buszewski e Janoriec [40] através da síntese de diferentes fases reversas do tipo amida com grupos terminais n-alquila, R', variando de C₅ a C₁₈ [41].

Em um trabalho de 1996 [42], os pesquisadores da Supelco, Ascah et al., apresentaram uma versão “melhorada” das fases do tipo amida disponíveis comercialmente, denominadas Supercosil ABZPlus. Neste trabalho foi dada grande ênfase na caracterização da referida fase estacionária por espectroscopia fotoeletrônica de Raios-X (XPS) e a caracterização cromatográfica. Eles ressaltaram as vantagens destas fases do tipo amida em separar compostos polares e ionizáveis em comparação à fase sintetizada anteriormente [35] e às sílicas convencionais do tipo C₈ e C₁₈. Muito embora sabe-se que este procedimento em duas etapas é ineficiente, pois na segunda etapa da reação, como mostrado na figura 12, é difícil obter um rendimento de 100 % na reação de acetilação, ficando grupos aminopropila sem reagir com o cloreto ácido. Como consequência, obtém-se uma fase mista, com grupos aminopropila remanescentes, os quais podem estar presentes entre os grupos do tipo amida.

A presença destes grupos remanescentes na superfície da sílica modificada às vezes pode ser benéfica para algumas separações, pois o grupo -NH₂ também tem a propriedade de reduzir os efeitos

indesejáveis dos silanóis residuais presentes na superfície da sílica. Mas, na maioria dos casos, esses grupos remanescentes do tipo amina podem causar fortes interações. Conseqüentemente o alargamento ou até mesmo a adsorção irreversível pode ocorrer durante a separação cromatográfica, principalmente em meio ácido, onde o grupo -NH_2 pode estar protonado, propiciando interações através da troca iônica com os compostos ácidos, os quais podem estar parcialmente dissociados, dependendo do seu pK_a e do pH da fase móvel.

Alternativamente, os pesquisadores da Waters Corporation publicaram em 1995 a síntese de uma nova fase reversa, baseada na modificação da superfície da sílica em uma única etapa, diferente da metodologia empregada na síntese das fases reversas contendo grupos polares do tipo amida [43]. Inicialmente foi preparado o clorossilano, já contendo o grupo funcional embutido, sendo neste caso tipo carbamato (-O-C(O)-NH-R') com características semelhantes aos do tipo amida. A rota de síntese, baseada em uma série de reações, é mostrada na figura 13 e foi patenteada em 1994 [44]. A Waters comercializa essas fases estacionárias denominadas SymmetryShield.

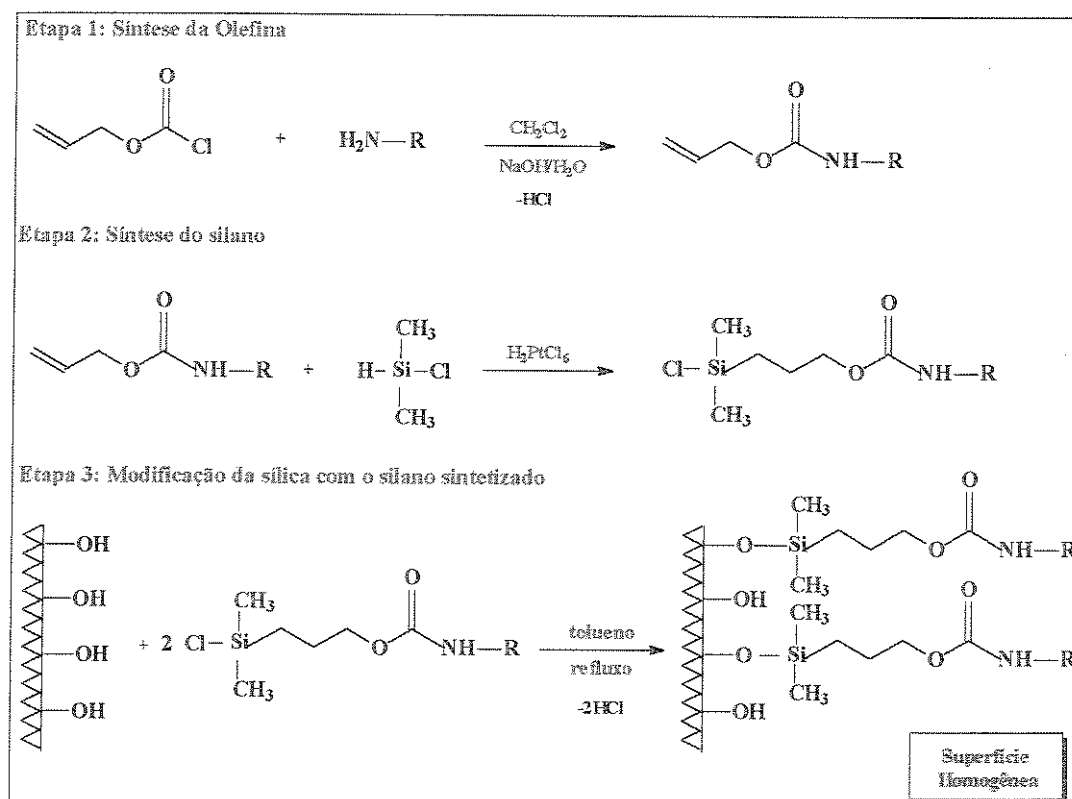


Figura 13: Método de preparação das fases estacionárias do tipo reversa, contendo grupos polares do tipo carbamato, desenvolvida pelos pesquisadores da Waters Corporation.

O grupo R depende da escolha prévia da amina na etapa de síntese da olefina. Na primeira etapa é sintetizada uma olefina bifuncional, o cloroformato de alila, que reage com uma amina alifática

fosfato de pH 7 foi $20,0 \text{ mmol dm}^{-3}$. O tampão foi preparado dissolvendo-se 1,68 g de K_2HPO_4 juntamente com 1,33 g de KH_2PO_4 em um balão volumétrico 1 dm^3 . O pH da solução tampão foi ajustado a 7,00 antes da adição do metanol com o auxílio do peagâmetro.

As misturas testes SRM 869a [61] e SRM 1647c [62], compostas por vários hidrocarbonetos poliaromáticos, estão disponíveis comercialmente no “Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia” (NIST, EUA) e foram empregadas para avaliar somente a coluna recheada com a sílica C_{18} uréia.

Os parâmetros cromatográficos como número de pratos, N , fator de retenção, k , e fator de assimetria a 10% da altura do pico, A_s , e de alargamento do pico a 5 %, T_f , foram calculados conforme recomendado na literatura [6].

3.5.6 Separação cromatográfica de uma mistura de herbicidas na coluna C_{18} uréia

A separação dos herbicidas cianazina, simazina, atrazina, ametrin, diuron e linuron foi realizada no cromatógrafo da Waters, empregando uma coluna de $150 \times 3,9 \text{ mm}$ de diâmetro interno, recheada com a fase C_{18} uréia. A fase móvel empregada foi $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 50:50, v/v na vazão ótima de $0,8 \text{ ml min}^{-1}$. O volume de injeção foi de $5 \text{ }\mu\text{l}$ e as separações foram realizadas no comprimento de onda de 230 nm .

Esta mesma mistura também foi separada em uma coluna comercial da Waters, NovaPak C_{18} ($150 \times 3,9 \text{ mm d.i.}$) recheada com a sílica modificada do tipo C_{18} , tamanho de partículas de $5 \text{ }\mu\text{m}$ e tamanho de poros de 6 nm . As condições empregadas foram as mesmas descritas acima para comparar cromatograficamente a coluna comercial e a coluna fabricada em nosso laboratório.

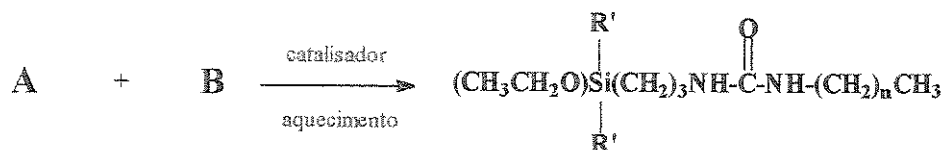
3.5.7 Teste de estabilidade

Para simular o uso rotineiro das colunas em um laboratório de análise e verificar a estabilidade química das novas sílicas, a fase móvel foi constantemente bombeada na coluna de menor comprimento à vazão ótima. A coluna recheada com a fase estacionária foi periodicamente avaliada através da separação de uma mistura teste e do cálculo dos parâmetros cromatográficos: fator de retenção (k), eficiência expressa por N/m e o alargamento de pico (T_f). A mistura teste foi a mesma utilizada nas avaliações iniciais com as colunas de 150 mm de comprimento e $3,9 \text{ mm}$ de diâmetro interno. A mistura era composta por uracil, naftaleno, ftalatos de dibutila e dipropila, propranolol e amitriptilina. A composição da fase móvel foi metanol:tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a pH 7,0, na proporção de 65:35 v/v.

4. Resultados e Discussão

4.1 Preparação dos Novos Agentes Sililantes

A preparação dos novos agentes sililantes C₃ a C₁₈ uréia seguiu o mesmo procedimento experimental, cujo processo já se encontra patenteado [54]. A partir da reação dos precursores A e B, sob determinadas condições, um novo agente sililante foi formado, contendo um grupo polar derivado da uréia (-NH-C(O)-NH-) como mostra a figura 18.



R' = -CH(CH₃)₂ e n=17 para o silano [(3-octadeciluréia)propil]diisopropiletoxissilano

R' = -OCH₂CH₃ para os etoxissilanos trifuncionais com n variando de 2 até 17

R' = -CH₃ e n=17 para o [(3-octadeciluréia)propil]dimetiletoxissilano

Figura 18: Preparação dos novos agentes sililantes contendo grupos derivados da uréia.

Da mesma forma, os agentes sililantes monofuncionais, C₁₈ dimetil uréia e C₁₈ diisopropil uréia, foram sintetizados seguindo um procedimento similar àquele utilizado para a síntese dos agentes sililantes trifuncionais. A rota de síntese é bastante versátil, pois permite a síntese de novos agentes sililantes com grupos funcionais do tipo uréia e comprimento da cadeia orgânica variável, dependendo da prévia escolha dos precursores A e B.

4.2 Caracterização dos Novos Agentes Sililantes

4.2.1 Análise dos espectros na região do IV

Nos espectros IV dos agentes sililantes sintetizados, mostrados na figura 19, são observadas bandas em 3340 cm⁻¹ referente ao estiramento da ligação N-H, na região de 2970 à 2880 cm⁻¹, três bandas atribuídas ao estiramento da ligação C-H nos grupos CH₂ e CH₃, em 1630 cm⁻¹ atribuída ao estiramento da ligação C=O. Esta banda, em uma frequência relativamente menor que o estiramento C=O de aldeídos e cetonas, é característica do mesmo estiramento nos compostos do tipo uréia, onde a presença dos dois átomos de nitrogênio faz com que haja uma maior deslocalização eletrônica e essa banda seja detectada em uma frequência menor [63]. A outra banda de forte intensidade em 1590 cm⁻¹ deve-se principalmente à deformação angular da ligação N-H. Um pequeno ombro em 3160 cm⁻¹ refere-se ao sobretom (primeiro harmônico) desta referida banda em 1590 cm⁻¹.

podendo ser a octadecilamina, por exemplo, para formar outra olefina, contendo um grupo funcional do tipo carbamato. Em seguida, esse intermediário sofre uma reação de hidrossililação com o reagente clorodimetilsilano na presença do catalisador, que é um ácido derivado da platina (H_2PtCl_6). A modificação da superfície da sílica é feita através da reação do grupo cloro do agente sililante com os silanóis da sílica, produzindo uma superfície quimicamente homogênea [45].

Os materiais preparados seguindo esta rota de síntese são considerados como a segunda geração das fases estacionárias reversas, contendo grupos polares embutidos na cadeia n-alquila. A modificação da superfície da sílica com o organossilano já contendo o grupo funcional é bastante vantajosa quando comparada com o método primeiramente desenvolvido, pois produz uma superfície com um único grupo funcional, ao contrário do observado quando se utiliza o método em duas etapas, em que a modificação da sílica ocorre antes da reação química com os grupos funcionais do organossilano [46].

Além da técnica de preparar fases estacionárias reversas, contendo grupos polares embutidos, pode-se também empregar as fases estericamente protegidas [47]. Estas são assim denominadas por apresentarem grupos volumosos isopropila ou isobutila ligados diretamente ao átomo de silício, como mostra o exemplo da figura 14.

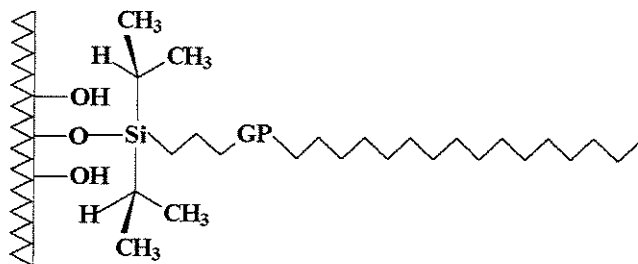


Figura 14: Representação esquemática de uma fase estacionária combinando duas tecnologias distintas: a utilização dos grupos isopropila ligados diretamente ao átomo de silício, juntamente com grupos polares (GP) na cadeia n-alquila.

A rota de síntese destas fases estericamente protegidas, contendo grupos polares do tipo amida, não foi revelada, mas acredita-se que seja por um processo de duas etapas similar ao mostrado na figura 14. Entretanto, algumas publicações mostraram que estas fases são menos estáveis em fases móveis com pH acima de 7 em comparação com as fases monofuncionais, preparadas com os monoclorossilanos e também em relação às fases poliméricas preparadas com agentes sililantes trifuncionais como por exemplo, o octadeciltriclorossilano ou octadeciltrimetoxissilano [48].

O motivo da baixa estabilidade está relacionado com o menor grau de recobrimento da superfície da sílica, quando se utiliza os silanos monofuncionais com os grupos isopropila ou isobutila. A presença destes grupos volumosos deve dificultar a reação dos grupos reativos do silano com os silanóis da superfície da sílica.

Essas fases estacionárias reversas, que combinam em um único material duas propriedades distintas, já se encontram disponíveis comercialmente. Um exemplo é a coluna ZORBAX Bonus-RP da Agilent Technologies, recheada com uma fase do tipo reversa com grupos polares do tipo amida e uma cadeia n-alquila de 14 átomos de carbono, além de grupos isopropila ligados diretamente ao átomo de silício [47]. Entretanto, essas fases são preparadas em um processo de duas etapas, enquanto que o processo de uma única etapa é mais vantajoso, pois está baseado no uso do silano previamente sintetizado e caracterizado.

Seguindo essas novas tendências, neste trabalho de tese foram preparadas fases estacionárias reversas, contendo grupos polares do tipo uréia inseridos na cadeia n-alquila do agente sililante [49]. Os resultados obtidos foram satisfatórios, indicando que os grupos do tipo uréia também desempenham muito bem a função de minimizar as interações indesejadas com os silanóis residuais na análise de compostos básicos [50]-[52].

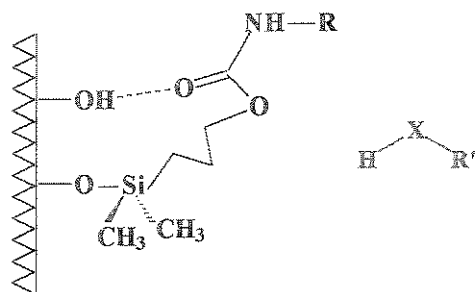
Ainda não se sabe exatamente como essas fases, contendo os grupos polares inseridos, conseguem minimizar as interações dos grupos silanóis com os compostos básicos. Os grupos polares, que podem ser do tipo amida, carbamato ou uréia, podem interagir com os grupos silanóis da sílica através da ligação de hidrogênio, como mostrado na figura 15 A. Dessa forma estes silanóis estão menos disponíveis para interagirem com os compostos básicos durante a separação cromatográfica, diminuindo o alargamento de pico e conseqüentemente a assimetria [46].

Outro mecanismo proposto seria que os grupos polares, inseridos na cadeia carbônica, podem interagir também com moléculas de água da fase móvel, como mostra a figura 15 B, formando uma suposta camada ou barreira de moléculas de água. A formação desta camada diminuiria a hidrofobicidade da fase estacionária ao redor da superfície. Como conseqüência, o acesso dos compostos básicos aos grupos silanóis fica dificultado, deixando esses grupos inacessíveis para a interação [46].

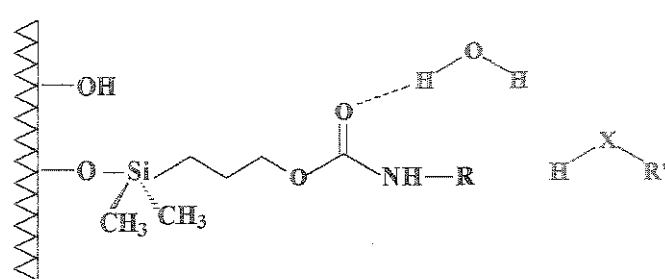
Outra possibilidade seria aquela em que o analito pode interagir preferencialmente com o grupo polar da fase estacionária ao invés de interagir com os silanóis residuais, evitando as interações indesejáveis, como mostra a figura 15 C [46].

As possíveis interações entre os grupos polares de cadeias adjacentes também são esperadas através das ligações de hidrogênio, como está esquematizado na figura 15 D. Essas interações também podem bloquear o acesso aos silanóis residuais, diminuindo o número de interações indesejadas com os analitos durante a separação cromatográfica.

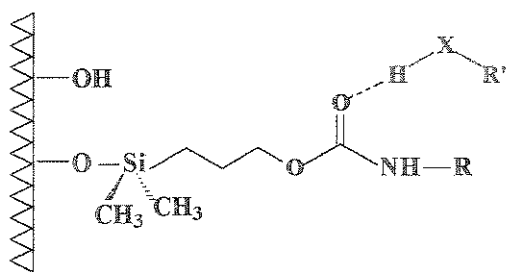
(A) Interações com os silanóis residuais



(B) Interações com moléculas de água



(C) Interações com os solutos polares



(D) Interações entre os grupos polares

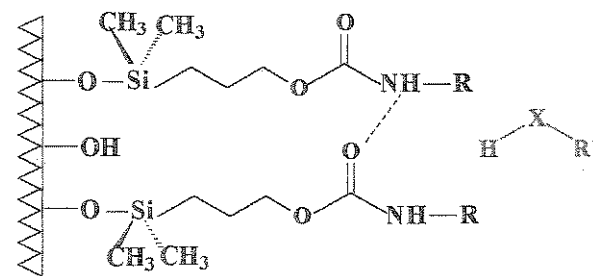


Figura 15: Prováveis interações durante a separação cromatográfica utilizando uma fase com o grupo polar do tipo carbamato. (A) o grupo polar compete com o analito para interagir com o silanol residual, (B) o grupo polar aumenta a concentração de água na camada de hidratação, (C) a molécula do analito pode interagir com o grupo polar e (D) as interações entre os grupos polares de cadeias adjacentes.

Esses mecanismos foram propostos para explicar porque essas fases têm a propriedade de minimizar as interações indesejáveis entre os grupos silanóis e os analitos básicos. Algumas evidências mostraram que a superfície da sílica tem uma maior concentração de água devido às suas ligações de hidrogênio com os respectivos grupos polares, ficando próximas à superfície do suporte cromatográfico.

Espera-se a formação de uma barreira “virtual” de moléculas de água, a qual impede de uma certa maneira, a interação dos analitos básicos com os silanóis residuais. Outra evidência prática é que com essas fases polares é possível realizar algumas separações cromatográficas utilizando, por exemplo, uma fase móvel com 100% de água. Nas fases clássicas isto não é possível devido ao colapso que ocorre com as cadeias hidrofóbicas imobilizadas na superfície da sílica, alterando consideravelmente a retenção dos analitos [53], como mostram os diagramas da figura 16.

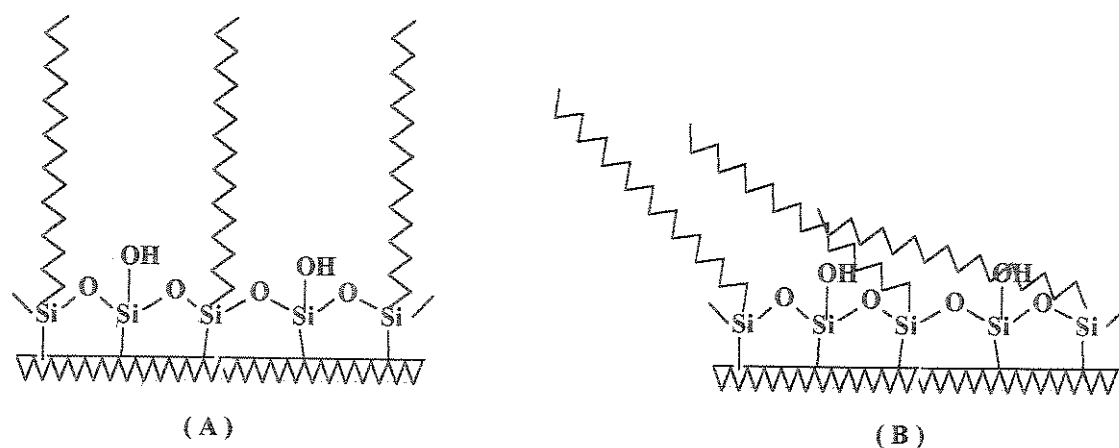


Figura 16: Diagramas das possíveis conformações das cadeias orgânicas hidrofóbicas do tipo C₁₈ imobilizadas na superfície da sílica: (A) estendida quando solvatada por uma fase móvel adequada e (B) o colapso das cadeias orgânicas na presença de uma fase móvel composta por quase 100% de água.

Por outro lado, a presença dessa barreira de moléculas de água parece contribuir para uma maior dissolução do suporte de sílica, quando comparada com as fases clássicas C₈ e C₁₈. Em um único estudo realizado para avaliar a estabilidade química de diferentes fases estacionárias, verificou-se que uma fase reversa do tipo amida da Supelco (ABzPlus) mostrou menor estabilidade que as fases C₈ e C₁₈ nas condições experimentais empregadas no teste. Os autores sugeriram que a menor estabilidade poderia estar relacionada com a maior hidratação da superfície da sílica, deixando-a mais susceptível à hidrólise [48].

1.9 O enchimento de colunas para CLAE

O procedimento mais adequado para rechear colunas com sílica de tamanho de partícula menor que 20 μm é o da suspensão sob alta pressão pois, quanto maior a área superficial da sílica, maior é a probabilidade de formação de cargas eletrostáticas, impossibilitando o enchimento a seco, devido à formação dos aglomerados. No procedimento de enchimento existem inúmeras variáveis que devem ser otimizadas com o intuito de se obter colunas reprodutíveis e com boa eficiência.

O enchimento de colunas foi considerado mais como uma arte do que ciência e que as experiências nos procedimentos dificilmente poderiam ser trocadas entre pesquisadores [55]. Além disso, cada laboratório possui um sistema de enchimento diferente e mesmo usando como recheio fases estacionárias derivadas da sílica, elas podem diferir quanto ao fabricante, forma, tamanho de partículas e funcionalidade [56]. Resumidamente, pode-se afirmar que no procedimento de enchimento de colunas, utilizando o método da suspensão sob alta pressão, além das citadas acima, existem pelo menos cinco variáveis diferentes.

A primeira variável seria a direção do enchimento, que pode ser ascendente ou descendente. Alguns trabalhos no passado recomendavam que para partículas menores que 10 μm era mais interessante utilizar o enchimento na direção ascendente, evitando assim que os aglomerados entrassem no leito da coluna, ficando no reservatório de suspensão e dessa forma seria obtida uma coluna com um leito mais homogêneo. Entretanto, mais recentemente, recomenda-se que se o enchimento na direção descendente for rápido, este deve ser preferido, pois é mais reprodutível quando comparado ao método anterior [57].

A segunda variável está relacionada ao tipo de solvente utilizado na preparação da suspensão de sílica. O solvente apropriado para suspensão deve evitar a formação de aglomerados de partículas e para isso as interações sílica-solvente devem ser maiores que as interações entre as partículas de sílica. Portanto, é muito importante estudar quimicamente a superfície da sílica a ser utilizada como fase estacionária [58].

Outro aspecto importante diz respeito à densidade e à viscosidade do solvente a ser escolhido. Sabe-se que quanto mais denso e viscoso for o solvente, mais lento será o enchimento da coluna, entretanto, a velocidade de sedimentação das partículas de sílica na suspensão é bastante lenta, conferindo uma grande estabilidade à suspensão, podendo ser neste sentido, uma boa alternativa. Na prática, o que se procura fazer é encontrar um solvente que apresente baixa viscosidade e densidade relativamente próxima à da sílica a ser utilizada como recheio da coluna. Pode-se escolher solventes de baixa densidade, desde que a suspensão seja suficientemente estável durante o procedimento de enchimento [59].

Outra variável que deve ser otimizada é a pressão utilizada durante o enchimento. O ideal é que as partículas de sílica entrem na coluna cromatográfica com uma alta velocidade a fim de vencer as forças de atrito entre as partículas e a parede da coluna. Por esta razão, cuidados experimentais devem ser tomados durante o polimento da parede interna das colunas confeccionadas de maneira artesanal.

Deste modo, sabe-se que quanto menor a partícula, maior a pressão a ser utilizada no enchimento e que as partículas esféricas necessitam de uma pressão menor no enchimento, quando comparadas com as partículas irregulares, empregando o mesmo solvente de suspensão. Outro cuidado que deve ser tomado é não utilizar uma pressão muito alta que pode danificar as partículas e, conseqüentemente, diminuir a eficiência da coluna.

A quarta variável seria o tipo de solvente utilizado como propulsor durante o procedimento de enchimento. A função do solvente propulsor é promover a consolidação do leito da coluna recém formado, deixando-o mais denso e isto pode ser feito em vazões altas, passando solventes com características coagulantes pelo leito da coluna. Na maioria dos procedimentos, o solvente de suspensão difere do solvente propulsor.

A última variável está relacionada com a forma de agitação da suspensão que pode ser mecânica, ou com o auxílio do ultrassom, ou a combinação de ambos. Na realidade o que se deseja é obter um alto grau de dispersão das partículas de sílica na suspensão e no caso do ultrassom, cuidados devem ser tomados para não danificar as partículas da sílica. Além disso, pode-se usar diferentes concentrações da suspensão, mas os valores utilizados são geralmente de 10, 20 e 30 % em relação massa de sílica e o volume de solvente.

Infelizmente, muitos dos avanços no procedimento de enchimento de colunas não são publicados, pois na maioria das vezes são propriedades dos fabricantes de coluna e obviamente não existe nenhum interesse em divulgar as técnicas utilizadas no enchimento das mesmas para CLAE [56].

2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi a preparação de novas fases estacionárias, contendo grupos polares do tipo uréia inseridos na cadeia orgânica. Para isso foram necessárias algumas etapas que constituíram em:

Preparar novos agentes sililantes do tipo alcoxissilano, contendo grupos polares do tipo uréia (-NH-C(O)-NH-R') inseridos na cadeia n-alquila, com diferentes grupos terminais R' do tipo alquila, variando de C_3 a C_{18} , a partir da rota de síntese a ser desenvolvida. Dependendo da escolha do precursor, também poderão ser sintetizados alcoxissilanos monofuncionais com grupos metila ou isopropila ligados diretamente ao átomo de silício.

Modificar a superfície da sílica cromatográfica com esses novos agentes sililantes. Caracterizar as sílicas modificadas através das técnicas de análise elementar, espectroscopia na região do infravermelho, e ressonância magnética nuclear de ^{13}C e ^{29}Si aplicada a sólidos. Após a perfeita caracterização, empregar os novos materiais sintetizados como fase estacionária no recheio de colunas para CLAE.

Avaliar cromatograficamente as colunas recheadas com as sílicas modificadas desenvolvidas no nosso laboratório e verificar a aplicabilidade das mesmas na separação de algumas misturas complexas.

3. Procedimento Experimental

3.1 Preparação dos novos agentes sililantes com grupos derivados da uréia

A preparação dos novos agentes sililantes seguiu o mesmo procedimento experimental que está protegido por patente [54]. Foram sintetizados sete novos alcoxissilanos: [(3-propiluréia)propil], [(3-pentiluréia)propil], [(3-heptiluréia)propil], [(3-dodeciluréia)propil], [(3-octadeciluréia)propil] trietoxissilanos, [(3-octadeciluréia)propil]dimetiletetoxissilano e [(3-octadeciluréia)propil]diisopropil etoxissilano.

Resumidamente, uma quantidade do reagente **A** foi dissolvida em 70 cm³ de tolueno seco em um balão de fundo redondo. A mistura foi mantida sob agitação em atmosfera seca de nitrogênio. No funil de adição, conectado ao balão, foram adicionados 30 cm³ de tolueno seco, juntamente com uma quantidade equimolar do precursor **B** e o catalisador para promover a reação. Sob atmosfera anidra de nitrogênio, esta mistura foi adicionada lentamente, gota a gota, à solução do reagente. A mistura resultante foi mantida sob agitação e aquecimento durante 3 h. Após este tempo, o produto final foi isolado através da remoção do solvente. O produto foi recristalizado, formando um sólido de coloração branca. Em todos os casos a presença de umidade pode ocasionar hidrólise, portanto, todo manuseio foi feito em condições anidras.

3.2 Caracterizações dos Etoxissilanos

3.2.1 Análise Elementar

Os alcoxissilanos foram caracterizados por análise elementar sendo as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio determinadas no analisador 2400 da Perkin Elmer.

3.2.2 Espectroscopia na Região do IV

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram obtidos no espectrofotômetro Bomem MB-Series da Hartmann e Braun, no intervalo de 4000 a 450 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. As amostras dos organossilanos sintetizados foram dispersas entre as janelas de KBr.

3.2.3 Ressonância Magnética Nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foi realizada no espectrômetro INOVA da Varian. As amostras dos agentes sililantes foram dissolvidas em tetracloreto de carbono. As frequências utilizadas foram de 500 e 125 MHz para os núcleos de ¹H e ¹³C respectivamente. Um

capilar contendo água deuterada a 99,8 % foi utilizado como referência para os espectros de RMN de ^1H e o próprio solvente, CCl_4 , para os espectros de ^{13}C .

3.2.4 Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram obtidos no espectrômetro AutoSpec da Micromass, utilizando uma energia de ionização de 75 eV e temperatura da sonda acima da temperatura de fusão das respectivas amostras.

3.2.5 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O ponto de fusão de cada silano foi determinado através da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC). Uma amostra do respectivo organossilano foi aquecida até 423 K a uma taxa de 2 K por minuto no instrumento DSC 2910 da Dupont.

3.3 Modificação química da superfície da sílica com os agentes sililantes

No processo de modificação química, foram utilizadas duas sílicas cromatográficas diferentes. A LiChrosorb Si100 (Merck), de diâmetro de partículas de 5 μm e forma irregular, tamanho de poros de 12 nm, foi empregada na reação com os agentes sililantes trifuncionais C_3 a C_{12} uréia. Em uma segunda etapa, foi utilizada uma sílica com características superiores àquela inicialmente empregada. A Prontosil (Bischoff) de tamanho de partículas de 3 μm e forma esférica com tamanho de poros de 21 nm, foi empregada no processo de modificação com os silanos C_{18} uréia, C_{18} dimetil e C_{18} diisopropil uréia.

Primeiramente a sílica foi lavada com água desionizada e seca sob vácuo à temperatura de 100 $^\circ\text{C}$ por 8 h. Em cada caso, uma amostra de aproximadamente 10,0 g de sílica foi suspensa em 150 cm^3 de tolueno, já contendo 0,055 mol do respectivo trialcoxissilano. A suspensão foi agitada mecanicamente e mantida em refluxo em atmosfera inerte de nitrogênio por 86 h. As sílicas modificadas foram lavadas com tolueno, metanol e água para promover a hidrólise dos grupos etóxi, que por ventura ficaram remanescentes na superfície da sílica. Em seguida, as sílicas foram novamente secas sob vácuo a 60 $^\circ\text{C}$ por 8 h.

As sílicas modificadas sofreram uma nova reação com clorotrimetilsilano a fim de bloquear os grupos silanóis remanescentes, originados da primeira etapa de modificação da superfície. Resumidamente, em cada caso, a reação foi realizada refluxando aproximadamente 10,0 g da sílica modificada com um grande excesso de clorotrimetilsilano (30,0 cm^3 , 0,28 mol) em 100 cm^3 de tolueno

com 4,0 cm³ de piridina. Após a mistura ter sido agitada a 100 °C por 48 h, as sílicas foram filtradas e lavadas com tolueno, metanol e água. As fases resultantes, C₃, C₅, C₇, C₁₂ e C₁₈ uréia foram secas sob vácuo à temperatura ambiente.

Para as sílicas C₁₈ dimetil e C₁₈ diisopropil uréia, o procedimento adotado foi semelhante, com uma pequena alteração que consistiu na adição de um catalisador básico ao meio reacional. Em cada caso, 5,0 g da sílica Prontosil foi suspensa em 100 cm³ de tolueno, já contendo 0,023 mol do etoxissilano monofuncional sintetizado. Uma quantidade equimolar de trietilamina bidestilada (3,20 cm³, 0,023 mol) foi adicionada à suspensão, a qual foi agitada mecanicamente e mantida em refluxo sob atmosfera inerte de nitrogênio por 120 h.

As sílicas modificadas foram lavadas com tolueno, metanol e água e novamente secas sob vácuo a 70 °C por 8 h. As sílicas modificadas, C₁₈ dimetil uréia e C₁₈ diisopropil uréia, sofreram uma nova reação de capeamento com uma mistura de dois agentes sililantes, o trimetilclorossilano (TMCS) e o hexametildissilazano (HMDS), a fim de bloquear os grupos silanóis remanescentes após a primeira reação de modificação da superfície. Resumidamente, a reação foi realizada refluxando aproximadamente 4,5 g de cada uma das sílicas modificadas com uma mistura equimolar de trimetilclorossilano (15,0 cm³, 0,16 mol) e hexametildissilazano (35,0 cm³, 0,16 mol) em 100 cm³ de tolueno. Após a mistura ter sido agitada a 100 °C por 48 h, o material foi filtrado e lavado com tolueno, metanol e água. As fases, foram secas sob vácuo à temperatura ambiente.

3.4 Caracterizações das sílicas modificadas

3.4.1 Análise Elementar

Os percentuais de C, H e N de pelo menos duas amostras das sílicas modificadas, antes e após a reação de capeamento, foram determinados no analisador Perkin Elmer 2400.

3.4.2 Espectroscopia na região do IV

Os espectros FTIR na região de 4000 a 450 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹, foram obtidos no espectrofotômetro Bomem MB Series da Hartmann e Braun, utilizando a técnica de reflectância difusa.

3.4.3 Ressonância Magnética Nuclear aplicada a sólidos

Os espectros de RMN no estado sólido de ¹³C e ²⁹Si para as sílicas modificadas antes e após a reação de capeamento, foram obtidos no espectrômetro INOVA, da Varian, utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação do ângulo mágico (CP/MAS). Para o núcleo de ²⁹Si foi utilizado um

tempo de contato de 5 ms e um intervalo de pulso de 2 s. Para o núcleo de ^{13}C , foi utilizado um tempo de contato de 3 ms e um intervalo de pulso de 2 s. As análises foram realizadas com as amostras das respectivas sílicas, acondicionadas em rotores de carbetto de silício de 4 mm, utilizando as frequências de 100 e 125 MHz para os núcleos de ^{29}Si e ^{13}C respectivamente. Para se obter os espectros, o número de acumulações foi aproximadamente de 5000 e 10000 para os espectros de silício e carbono, respectivamente.

3.4.5 Isotermas de Adsorção de Nitrogênio

A área superficial, o volume e o tamanho dos poros das sílicas foram calculados através da isoterma de adsorção de nitrogênio a 77K, obtida no analisador ASAP 2010 da Micrometrics.

3.5 Testes Cromatográficos

3.5.1 Colunas para CLAE

As colunas para CLAE devem ser resistentes para suportar as altas pressões empregadas e ser inerte frente aos diversos tipos de fase móvel. Por isso, o material mais utilizado é o aço inoxidável 316 L. O corpo da coluna consiste de um tubo de formato cilíndrico de comprimento de 150 ou 50 mm e 3,9 mm de diâmetro interno. Além do corpo de aço inoxidável, a coluna é composta por outros acessórios que ficam conectados internamente e externamente nas extremidades: anel de aço inoxidável, filtro sinterizado poroso de 0,5 μm , redutor de fluxo de aço inoxidável, tampa para coluna, terminal e tubo de alinhamento de aço inoxidável. Tanto as colunas como os acessórios foram confeccionadas na oficina mecânica do IQ-UNICAMP.

3.5.2 Procedimento de polimento das colunas

A superfície interna da coluna deve estar muito bem polida para não oferecer qualquer tipo de resistência ao escoamento do líquido e assim conseguir a máxima eficiência possível. Para isso as colunas foram polidas de acordo com método desenvolvido no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida [60]. Neste procedimento, a coluna é polida de acordo com esquema apresentado na figura 17.

A superfície interna da coluna de aço inoxidável é polida através da rotação a uma velocidade constante de 1000 rpm, de uma haste metálica, acoplada a uma furadeira de bancada. Nesta haste, fios de palha de aço são enrolados, juntamente com uma pasta, contendo partículas abrasivas de carbetto de silício, para dar o acabamento final no polimento.

Durante o polimento, com a haste em movimentação dentro da coluna, é necessário fazer leves movimentos manuais para cima e para baixo para que o polimento da parede fique o mais homogêneo possível. Para segurar a coluna, utiliza-se uma garra metálica longa, porque durante o polimento, a coluna aquece com o atrito entre a haste e a superfície interna da mesma.

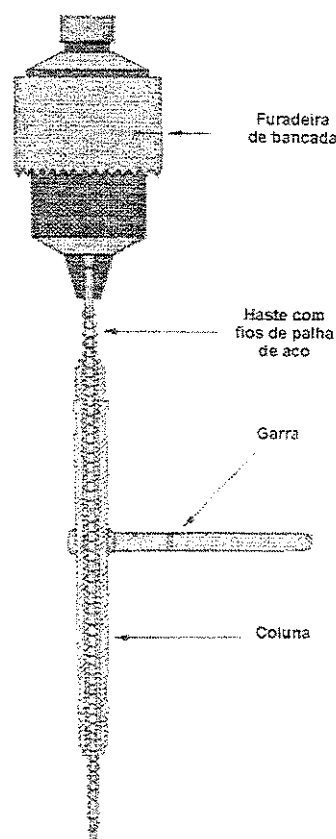


Figura 17: Configuração do sistema utilizado no polimento das colunas para CLAE.

Após o polimento, a coluna é lavada com hexano e colocada no ultrassom para remover a pasta de polimento. Em seguida a coluna é lavada com solução de HNO_3 1:1 v/v para remover qualquer tipo de impureza, que por ventura tenha ficado aderida à superfície interna e abundantemente com porções de água desionizada e metanol.

3.5.3 Procedimento de enchimento das colunas para CLAE com as sílicas modificadas

Dentre os vários métodos propostos foi escolhido um procedimento que recomendava o uso de uma suspensão de sílica na proporção massa/volume de 10 %. Após um teste com vários solventes, o clorofórmio foi selecionado como solvente para a suspensão.

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

silica, 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 colunas de 150 mm de comprimento, deveriam ser pesados aproximadamente 2,20 g de sílica e suspensos em 22 cm³ de clorofórmio em um tubo de vidro. Para as colunas 50 mm de comprimento, foram utilizados 0,73 g com 7,3 cm³ do solvente. As suspensões foram agitadas mecanicamente por 12 h no roto-torque e por mais 5 min no aparelho de ultrassom, antes de serem colocadas no reservatório do sistema de enchimento.

O método de enchimento baseia-se na passagem do solvente propulsor, a alta pressão, com o auxílio de uma bomba de enchimento, fazendo com que a suspensão se desloque do reservatório da suspensão até a coluna que está conectada a esse reservatório e assim ocorra a formação do leito cromatográfico. A suspensão deve ser colocada no reservatório rapidamente para evitar a sedimentação das partículas e adicionar clorofórmio até preencher todo o volume do reservatório, o qual deve ser fechado imediatamente, evitando a introdução de bolhas de ar dentro do sistema. Imediatamente, o sistema é pressurizado, fazendo com que a suspensão preencha a coluna na direção descendente por ação do solvente propulsor, que neste caso foi o metanol de grau cromatográfico, a uma pressão de 41,4 MPa.

Na extremidade oposta da coluna de aço inoxidável devem ser colocados previamente: o filtro, o anel de alinhamento, o redutor e por último o terminal. Fazendo o solvente percorrer todo o sistema, a sílica fica retida dentro da coluna através do filtro de 0,5 µm, e foi formando o leito da coluna. A pressurização do solvente foi feita como auxílio de uma bomba pneumática (Haskel Pressure Pump), sendo que o gás utilizado foi o nitrogênio. Após a passagem de 80 cm³ de solvente pela coluna que acabou de ser recheada, desliga-se a bomba e fecha-se a válvula de pressão. A coluna deve ficar conectada por mais alguns minutos ao sistema de enchimento a fim de equilibrar a pressão interna com a pressão ambiente.

Ao final deste procedimento, a coluna foi desconectada do sistema cuidadosamente a fim de não quebrar o leito de sílica formado nas paredes internas da coluna de aço inoxidável. O excesso de sílica foi cuidadosamente removido da extremidade da coluna e foi colocado o tubo de alinhamento, o filtro e finalmente o redutor de vazão seguido do terminal de latão. Ambos os lados da coluna foram fechados com tampas de "PEEK" para impedir a evaporação do solvente dentro da coluna e evitar possíveis rachaduras no leito da nova coluna. Após enchimento, a coluna foi acondicionada com a fase móvel a

fim de retirar o metanol utilizado durante o processo de enchimento e para que houvesse o equilíbrio perfeito entre a fase móvel a fase estacionária.

3.5.4 Avaliação cromatográfica das colunas recheadas

As separações cromatográficas foram realizadas utilizando o cromatógrafo a líquido modular, constituído de uma bomba de alta pressão, modelo 510 da Waters, detector espectrofotométrico de absorção no UV/VIS, de comprimento de onda variável, modelo 486, da Waters e injetor da Rheodyne modelo 7725 com alça de amostragem de 5 μl . Os dados das análises cromatográficas eram processados, utilizando um microcomputador que interfaciava ao cromatógrafo com auxílio do software ChromPerfect da Justice Innovations.

As separações das misturas testes SRM 869a, SRM 1647c assim como dos isômeros da Vitamina E foram realizadas utilizando a bomba de alta pressão Lichrograph L-6200A e um detector Lichrograph L-4200, ambos da Merck.

Todas as detecções foram feitas na região do ultravioleta, em comprimento de onda 254 nm, em que todos os componentes aromáticos absorvem. Todos os solventes utilizados, metanol, clorofórmio e acetonitrila eram de grau cromatográfico e foram filtrados e desgaseificados antes de serem utilizados no sistema de CLAE. As separações sempre foram realizadas à temperatura ambiente.

3.5.5 Escolha das misturas testes para a avaliação cromatográfica

Para determinar a eficiência de qualquer coluna, algumas avaliações cromatográficas devem ser feitas usando misturas testes, contendo diferentes tipos de moléculas orgânicas. Dependendo do tipo de coluna, utilizam-se misturas testes específicas. A escolha das misturas testes baseia-se nas misturas propostas por fabricantes de colunas cromatográficas e nos trabalhos da literatura. A primeira mistura teste utilizada foi uma mistura de uracil (necessário para determinar o tempo de retenção do composto não retido, t_M), acetofenona, benzeno, tolueno e naftaleno.

A segunda mistura teste foi escolhida para avaliar a capacidade dos grupos uréia em reduzir o alargamento de pico para as amostras básicas e continha uma mistura de uracil (12 mg dm^{-3}), naftaleno e acenafteno (hidrocarbonetos poliaromáticos bastante apolares) nas concentrações de 70 e 200 mg dm^{-3} respectivamente, butilparabeno (26 mg dm^{-3}) e ftalato de dibutila (420 mg dm^{-3}) como moléculas “sonda” polares e o solutos básicos: propranolol e amitriptilina nas concentrações de 400 e 110 mg dm^{-3} respectivamente [13]. As separações foram realizadas utilizando uma fase móvel composta por metanol: tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ de pH 7 na proporção de 65:35 v/v. A concentração total do tampão

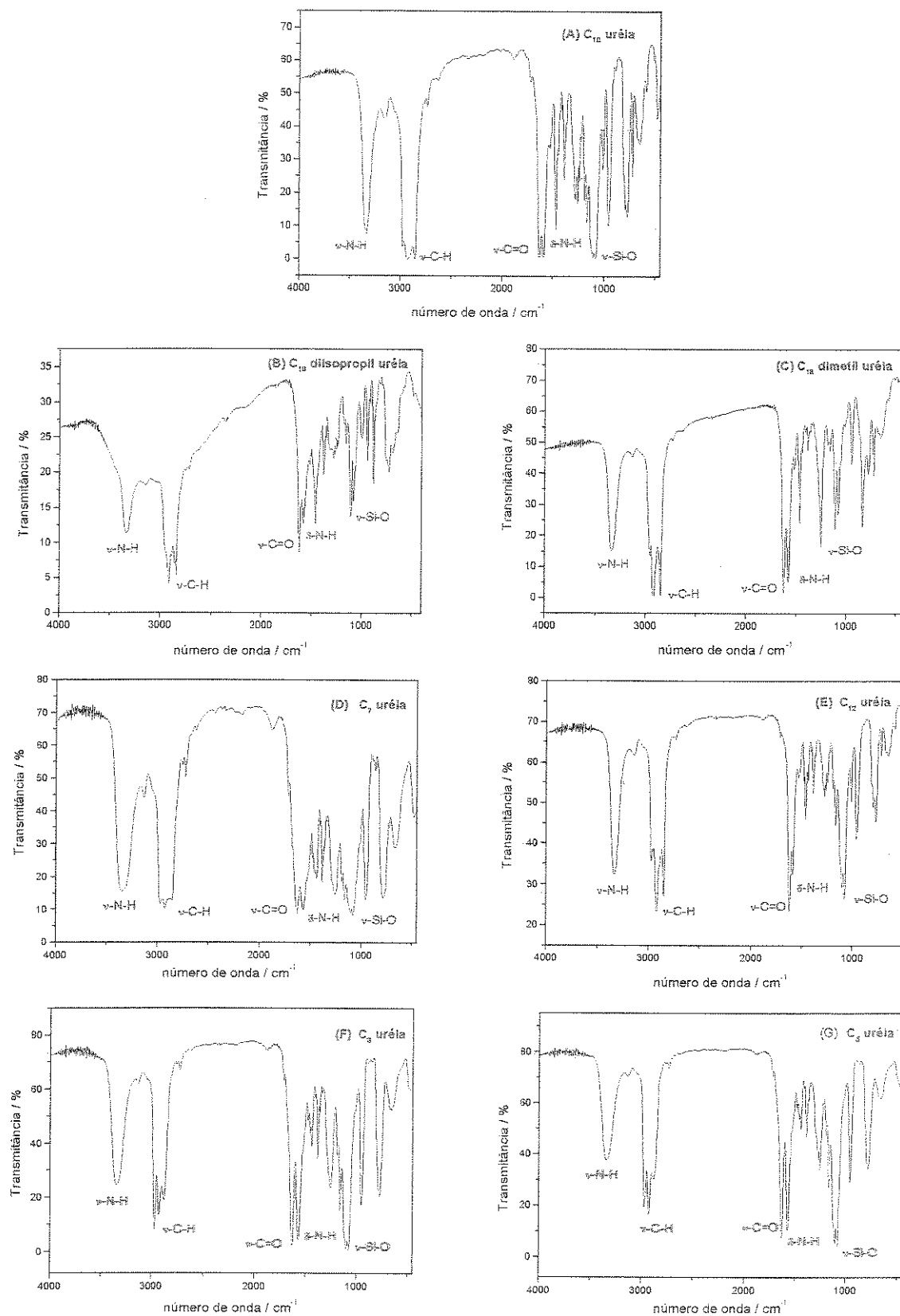


Figura 19: Espectros na região do IV para os silanos sintetizados.

As duas bandas em 1100 e 1080 cm^{-1} se devem ao estiramento da ligação Si-O do respectivo alcoxissilano. Nos espectros de todos os agentes sililantes da figura 19, nenhuma banda foi detectada na região de 3500 cm^{-1} referente ao estiramento da ligação O-H dos grupos silanóis (Si-OH), indicando que os grupos etóxi não foram hidrolisados durante o procedimento de síntese. As bandas principalmente em 3330, 1630 e 1590 cm^{-1} indicam que os alcoxissilanos foram obtidos com sucesso.

4.2.2 Análise dos espectros de RMN de ^1H

Nos espectros de RMN de ^1H dos alcoxissilanos sintetizados, mostrados nas figuras 20-26, foram observados alguns sinais que são comuns a todos os agentes sililantes: um sinal na região de $\delta = 6,5$ ppm atribuído aos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio do grupo uréia. Em $\delta = 0,6$ ppm é observado um tripleto atribuído aos hidrogênios ligados ao carbono da ligação $\equiv\text{Si-C}$. Os picos em $\delta = 1,3$ e 3,8 ppm são atribuídos aos hidrogênios 1 e 2 do grupo etóxi do alcoxissilano sintetizado [63].

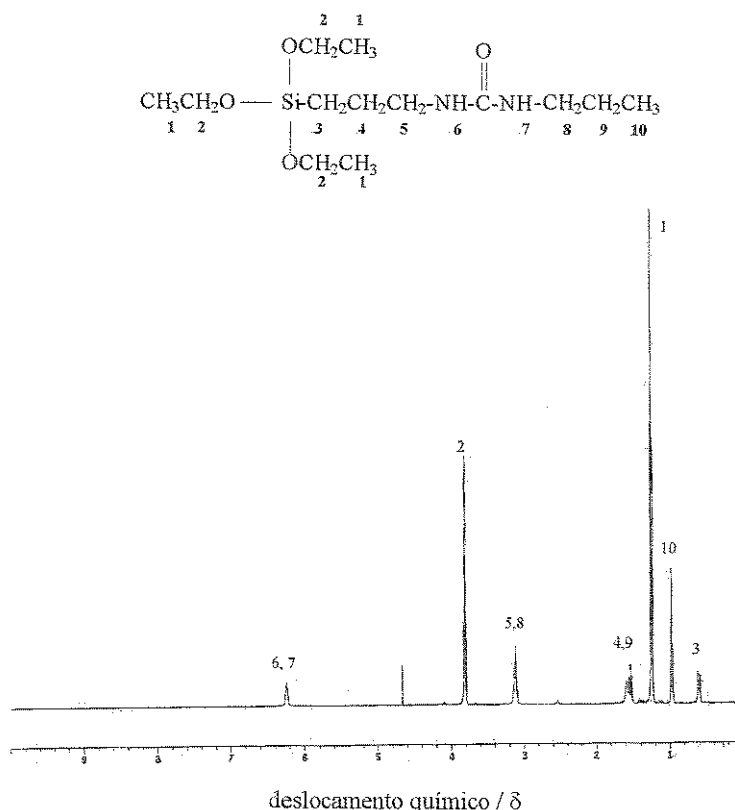


Figura 20: Espectro de RMN de ^1H do [(3-propiluréia)propil]trietoxissilano.

A presença destes sinais é uma indicação de que os produtos foram obtidos com sucesso, sem que ocorresse a hidrólise dos grupos etóxi, conforme foi verificado também pelo espectro na região do infravermelho. Os outros sinais, com exceção do sinal em $\delta = 4,6$ ppm da água deuterada utilizada como referência, devem-se a aos hidrogênios da cadeia n-alquila do agente sililante, os quais foram

atribuídos conforme mostra a estrutura do exemplo da figura 20 e podem variar de intensidade de acordo com o tamanho da cadeia carbônica do respectivo silano.

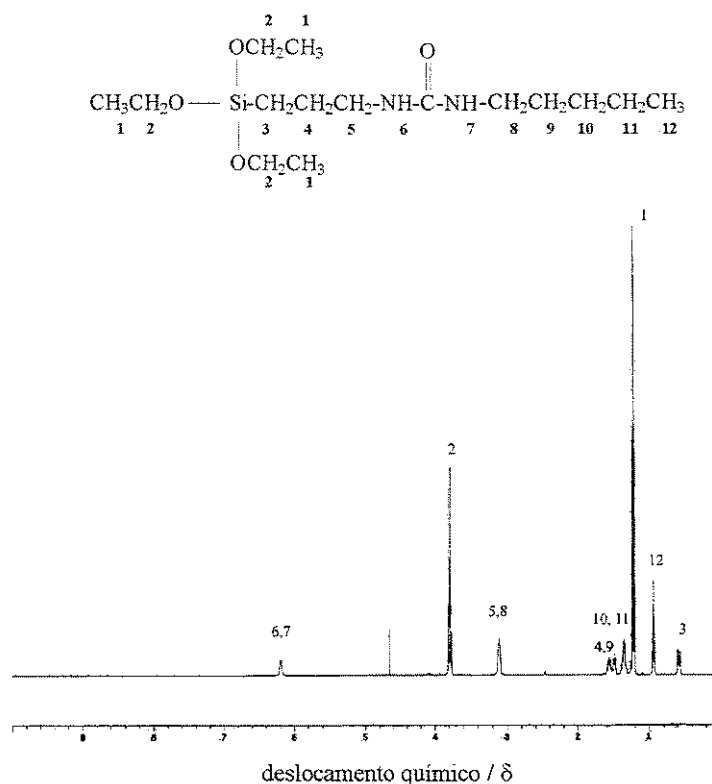


Figura 21: Espectro de RMN de ^1H do [(3-pentiluréia)propil]trietoxissilano.

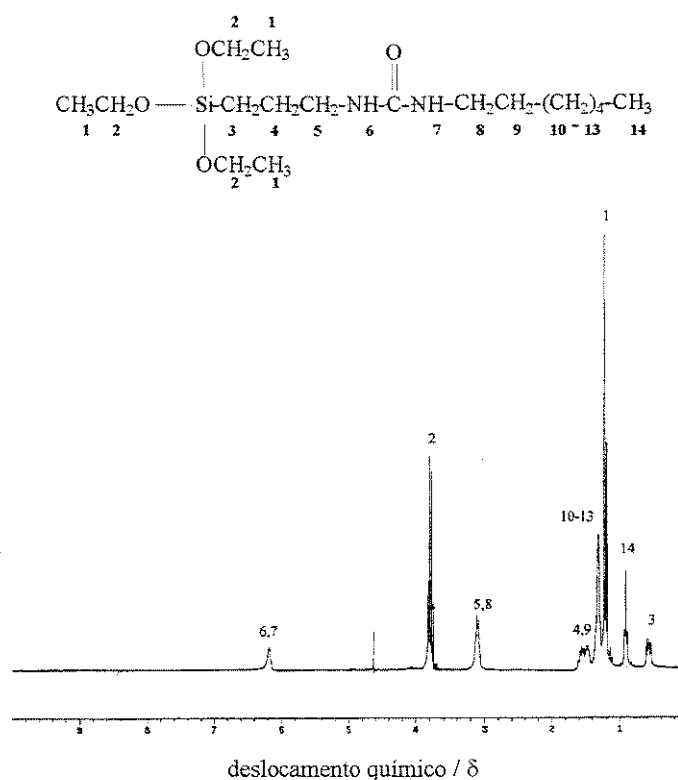


Figura 22: Espectro de RMN de ^1H do [(3-heptiluréia)propil]trietoxissilano.

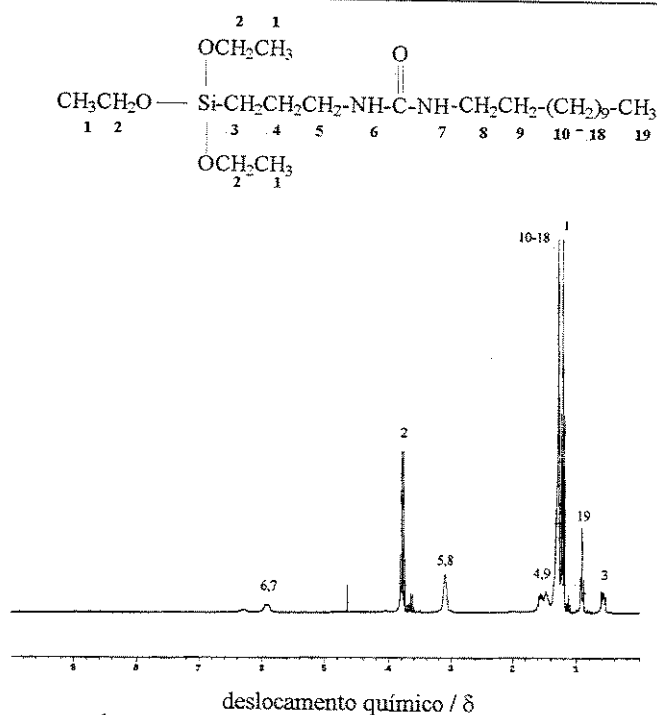


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H do [(3-dodeciluréia)propil]triétoxissilano.

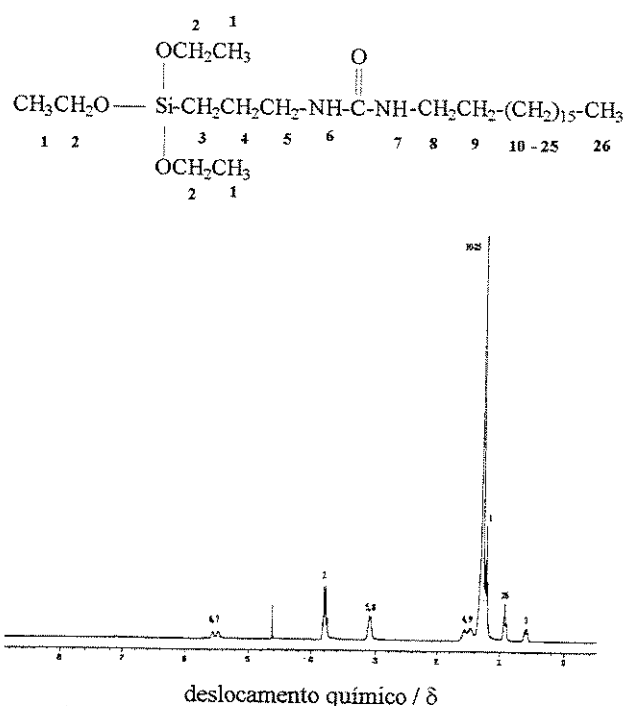


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H do [(3-octadeciluréia)propil]triétoxissilano.

Um novo sinal foi observado em $\delta = 0,1$ ppm no espectro de RMN de H^1 do silano C_{18} dimetil uréia da figura 25 referente aos hidrogênios **3** e **4** do grupo metila o qual está diretamente ligado ao átomo de silício, conforme mostra a estrutura. Como a solubilidade deste composto era relativamente baixa em CCl_4 , decidiu-se então utilizar o clorofórmio deuterado como solvente.

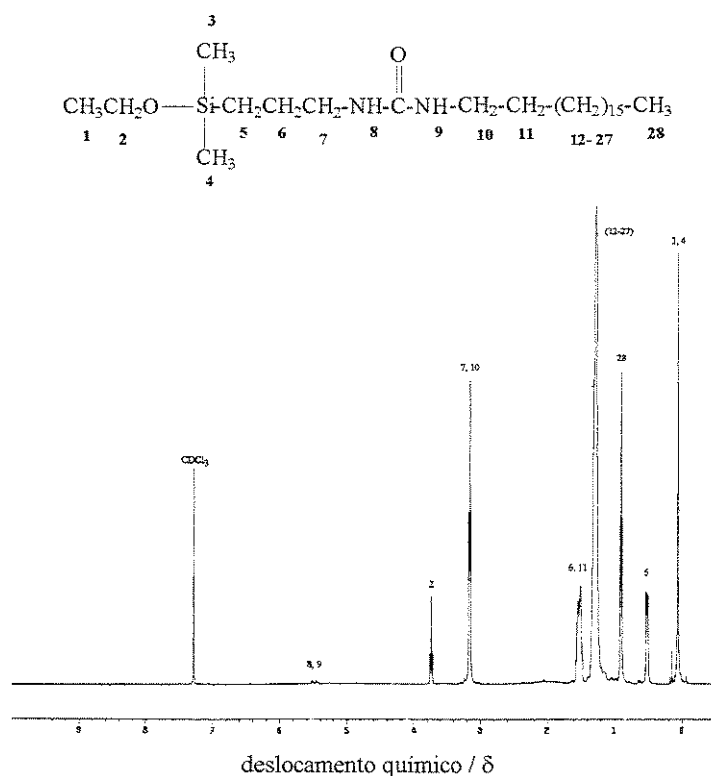


Figura 25: Espectro de RMN de ¹H do [(3-octadeciluréia)propil]dimetiletoxissilano.

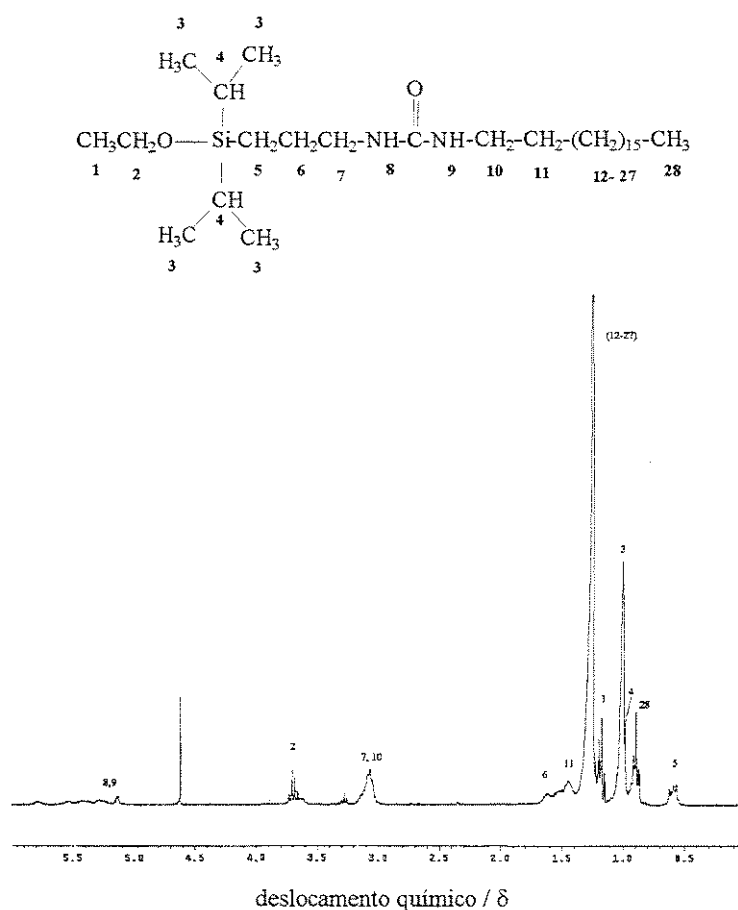


Figura 26: Espectro de RMN de ¹H do [(3-octadeciluréia)propil]diisopropiletoxissilano.

Na figura 26, é mostrado o espectro do silano C₁₈ diisopropil uréia, na qual verifica-se que os sinais referentes aos hidrogênios **3** e **4** do grupo isopropila foram observados na região de $\delta = 1,0$ ppm. Os hidrogênios **7** e **10** foram observados em $\delta = 3,2$ ppm. Em $\delta = 1,3$ ppm, foi observado um sinal de forte intensidade referente aos hidrogênios **12-27**, pertencentes à cadeia n-alquila do agente sililante.

4.2.3 Análise dos espectros de RMN de ¹³C

Nos espectros de RMN de ¹³C dos agentes sililantes sintetizados, mostrados nas figuras 27 a 33, foram observados alguns sinais comuns a todos os espectros. O sinal em $\delta = 98$ ppm se deve a presença do CCl₄, que foi utilizado como solvente. Em torno de $\delta = 160$ ppm, o pico foi atribuído ao carbono do grupo carbonila da ligação uréia, numerado de acordo com a estrutura fornecida em cada espectro do agente sililante [63]. Outros dois sinais, comuns nos espectros, em $\delta = 19$ e 58 ppm foram atribuídos aos carbonos, pertencentes aos grupos etóxi dos respectivos agentes sililantes. O carbono se encontra em um campo mais baixo por estar diretamente ligado ao átomo de oxigênio, formando assim o grupo alcóxi. Em $\delta = 8$ ppm, o pico foi atribuído ao carbono vizinho ao átomo de silício, o qual se encontra em um campo mais alto pelo fato deste átomo de carbono estar ligado diretamente ao silício, que é menos eletronegativo que o carbono [63]. Os outros sinais são característicos da cadeia alifática de cada trialcoxissilano sintetizado.

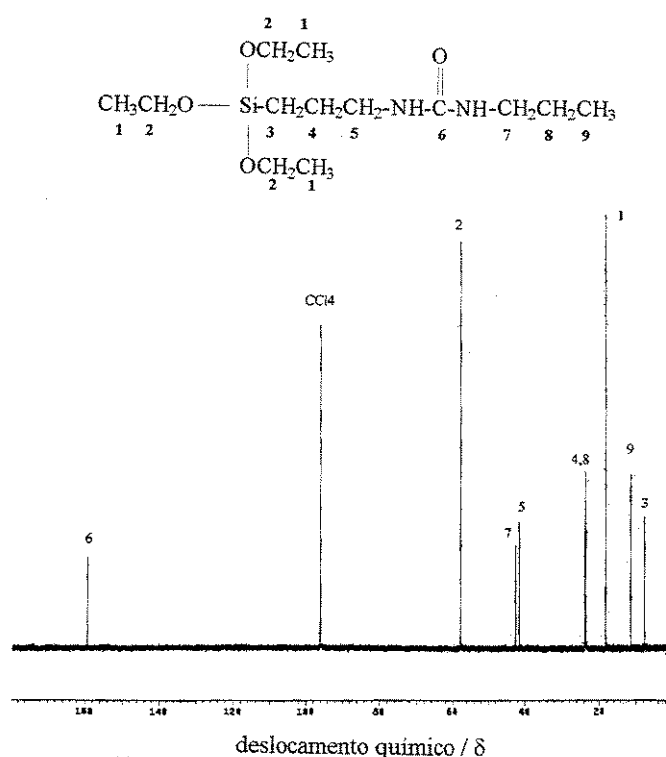


Figura 27: Espectro de RNM de ¹³C do[(3-propiluréia)propil]trietoxissilano.

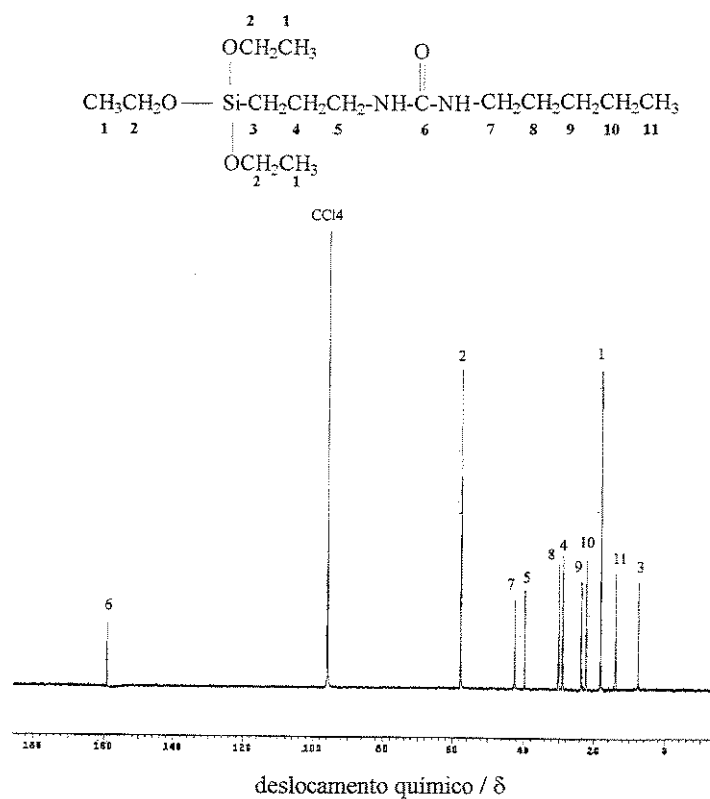


Figura 28: Espectro de RNM de ^{13}C do[(3-pentiluréia)propil]triethoxissilano.

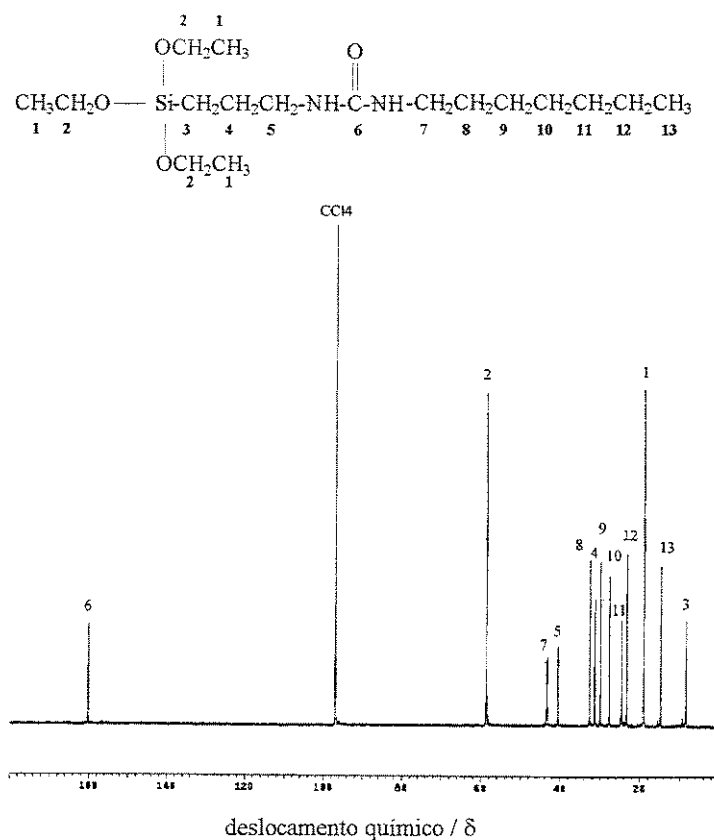


Figura 29: Espectro de RNM de ^{13}C do[(3-heptiluréia)propil]triethoxissilano.

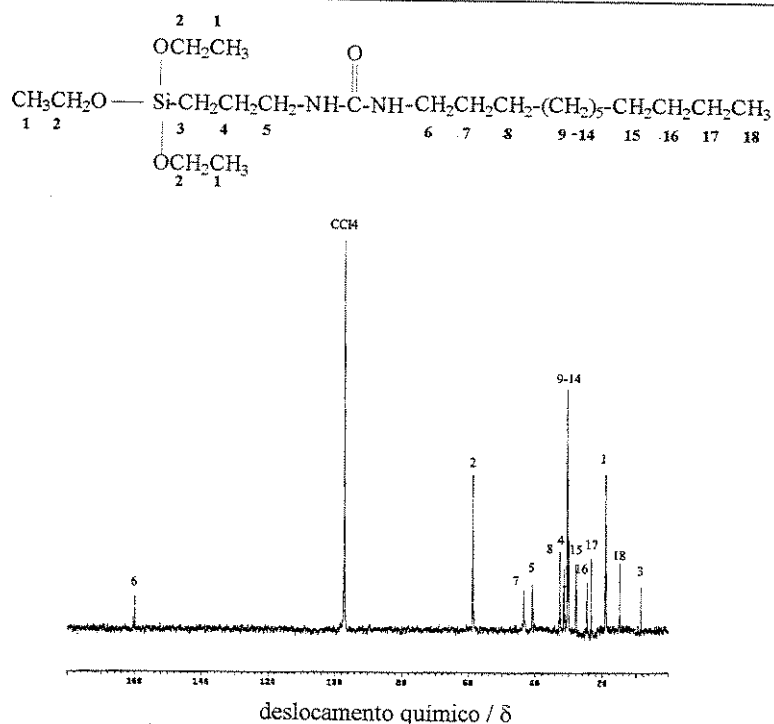


Figura 30: Espectro de RNM de ^{13}C do[(3-dodeciluréia)propil]triétoxissilano.

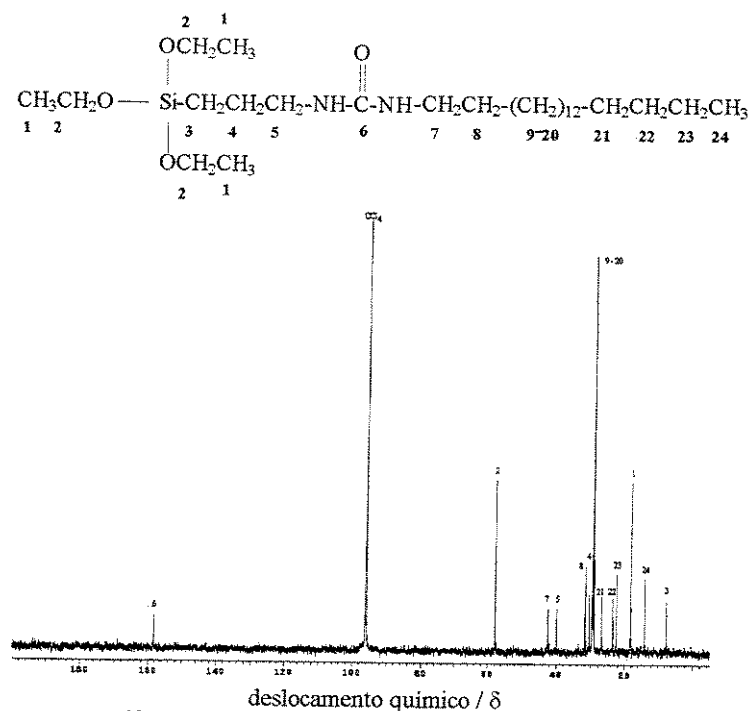


Figura 31: Espectro de RNM de ^{13}C do[(3-octadeciluréia)propil]triétoxissilano.

No espectro de RMN de ^{13}C do silano C_{18} dimetil uréia, os grupos metilas ligados no átomo de silício foram observados na região de 0 ppm. O sinal de forte intensidade em 77 ppm refere-se ao CDCl_3 , que foi utilizado como solvente. Em $\delta = 30$ ppm o sinal se refere aos carbonos 11 a 22 da cadeia n-álquila do respectivo alcóxissilano monofuncional.

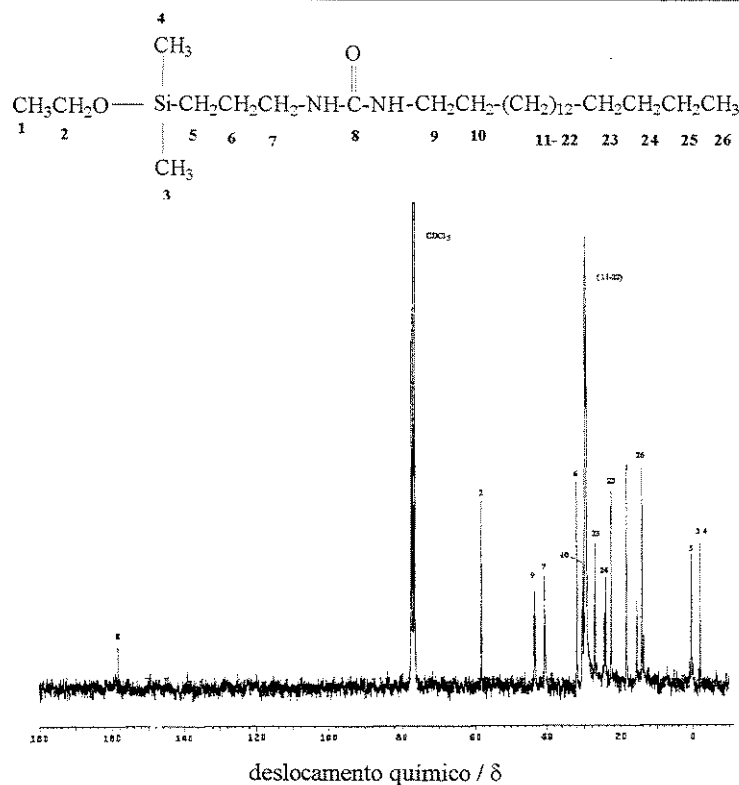


Figura 32: Espectro de RNM de ^{13}C do[(3-octadeciluréia)propil]dimetiletoxissilano

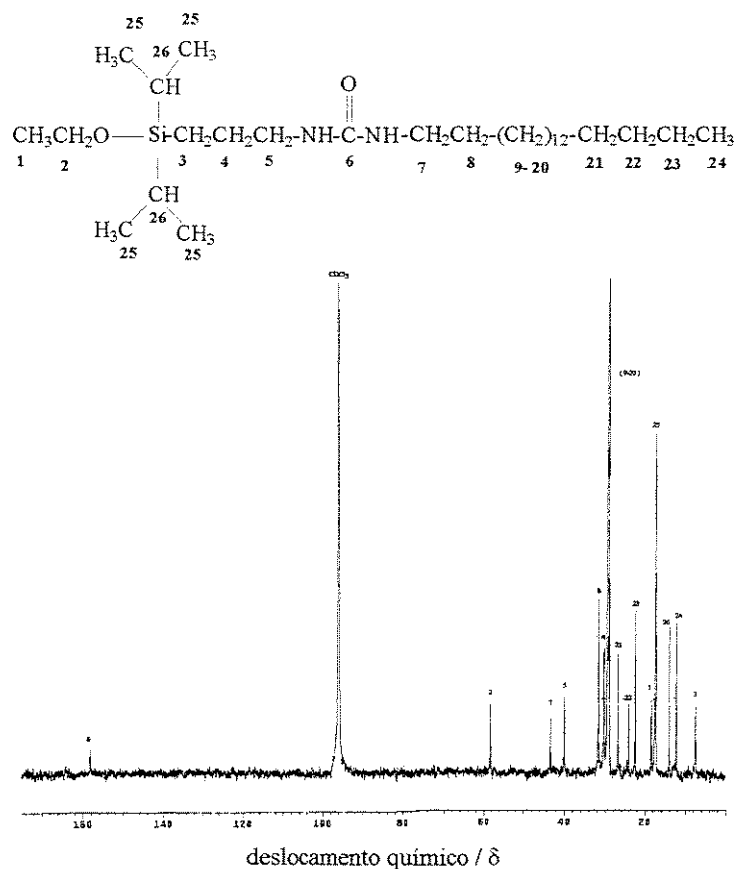


Figura 33: Espectro de RNM de ^{13}C do [(3-octadeciluréia)propil]diisopropiletoxissilano.

Diferentemente dos demais, no espectro de RMN de ^{13}C para o silano [(3-octadeciluréia)propil] diisopropiletoxissilano, os carbonos 25 e 26 do grupo isopropila foram observados em $\delta = 18$ e 5 ppm, respectivamente, além dos sinais dos grupos etóxi e da carbonila da ligação uréia. O sinal de intensidade forte em $\delta = 30$ ppm refere-se aos carbonos 9-20 da cadeia n-alquila do agente sililante.

4.2.4 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas também foi utilizada para caracterizar os alcoxissilanos. Vapores da respectiva molécula orgânica são introduzidos na câmara de ionização do espectrômetro e o feixe de elétrons converte algumas dessas moléculas em íons de carga positiva. A simples remoção de um elétron da molécula resulta em um íon cuja massa é a mesma da molécula introduzida [63].

Este íon molecular é simbolizado por M^+ . O valor de m/z no qual o íon molecular aparece no espectro de massas, assumindo que este íon foi produzido pela perda de um elétron, corresponde ao valor da respectiva massa molar da molécula original. Dessa maneira, com os espectros de massas é possível comprovar a massa molar proposta para cada novo agente sililante produzido. As figuras 34 a 40 apresentam os espectros de massas obtidos.

Outros íons também são formados, conforme pode ser observado no espectro. Muitos destes íons podem sofrer novas reações ou rearranjos que dificultam a identificação estrutural de cada íon molecular formado. Nos espectros dos silanos C_3 a C_{12} uréia observa-se o pico base em $m/z=163$, que possivelmente é atribuído ao fragmento $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_3\text{Si}^+$. Assim foram determinadas as massas molares para os respectivos etoxissilanos, cujos resultados estão na tabela 1.

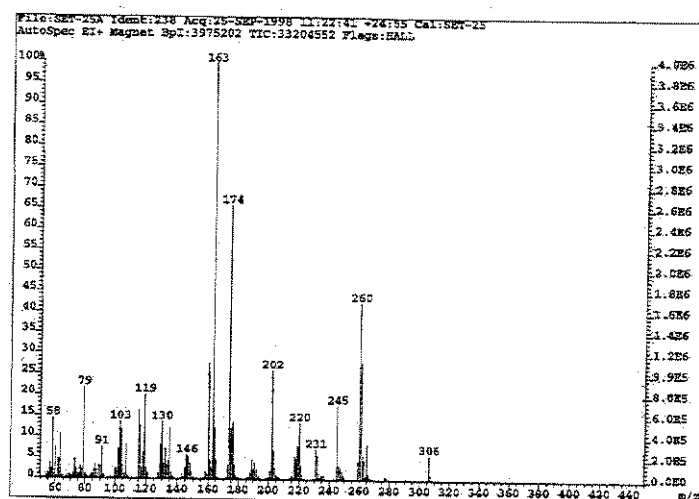


Figura 34: Espectro de massas do [(3-propiluréia)propil]triethoxissilano.

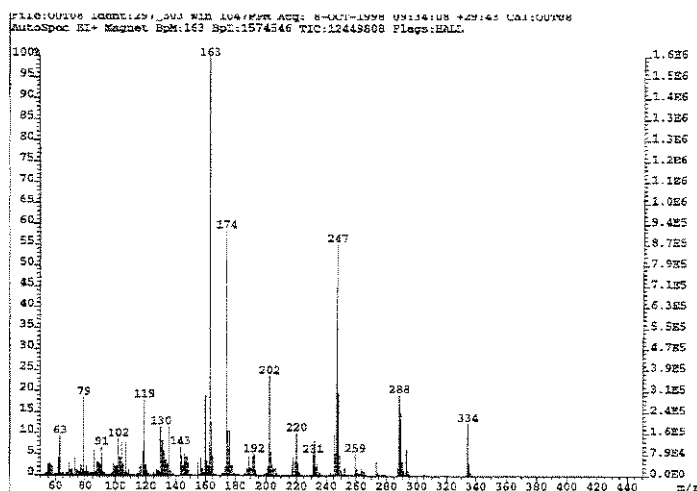


Figura 35: Espectro de massas do [(3-pentiluréia)propil]trietoxissilano.

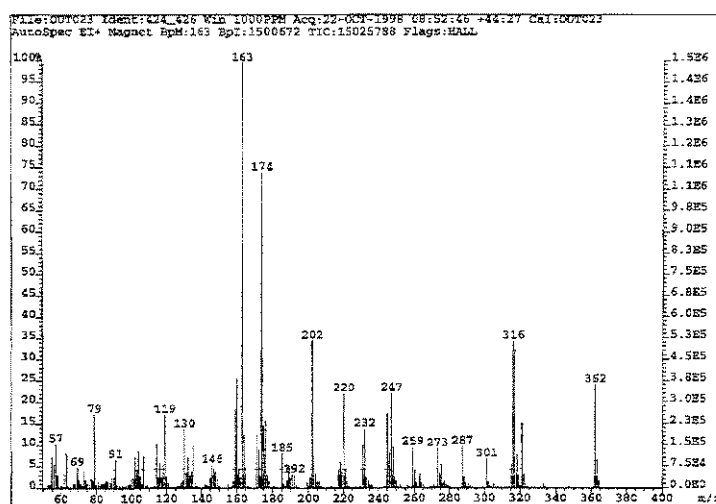


Figura 36: Espectro de massas do [(3-heptiluréia)propil]trietoxissilano.

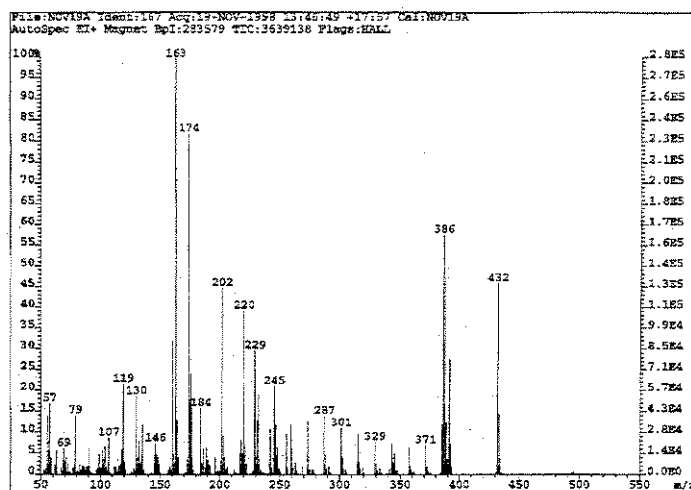


Figura 37: Espectro de massas do [(3-dodeciluréia)propil]trietoxissilano

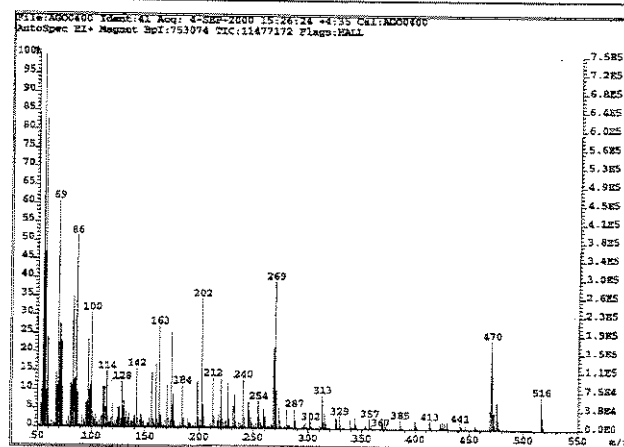


Figura 38: Espectro de massas do [(3-octadeciluréia)propil]trietoxissilano.

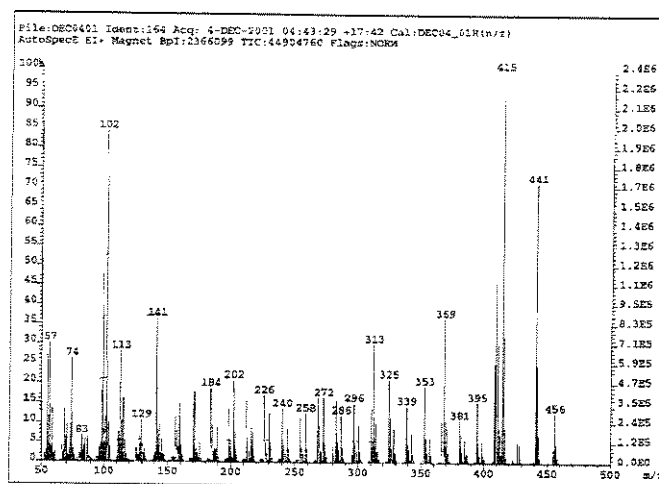


Figura 39: Espectro de massas do [(3-octadeciluréia)propil]dimetiletoxissilano.

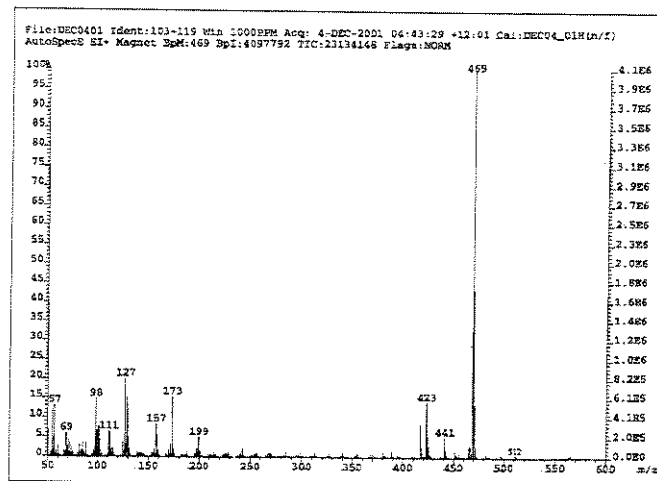


Figura 40: Espectro de massas do [(3-octadeciluréia)propil]diisopropiletoxissilano.

O espectro de massas para o silano C₁₈ diisopropil uréia, apresentado na figura 40, difere bastante dos outros espectros de massas dos agentes sililantes trifuncionais, inclusive também ao do

silano monofuncional C_{18} dimetil uréia. Essa diferença se deve basicamente à presença do grupo isopropila na estrutura do silano C_{18} diisopropil uréia, a qual permite que o mecanismo de fragmentação seja diferente daquele observado para os outros silanos.

O grupo isopropila, que apresenta carbonos secundários, faz com que sejam produzidos íons extremamente estáveis, dificultando a detecção do íon molecular. O pico molecular, de baixíssima intensidade, foi detectado em aproximadamente $m/z = 513$, enquanto que o pico base foi observado em $m/z = 469$.

4.2.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial foi utilizada na determinação do ponto de fusão dos respectivos alcoxissilanos. Os silanos C_3 , C_5 e C_7 uréia são líquidos viscosos, enquanto os demais alcoxissilanos são sólidos à temperatura ambiente. As curvas de DSC dos compostos sólidos referentes à primeira corrida, estão apresentadas na figura 41. Nas curvas de DSC, o pico endotérmico refere-se à fusão do respectivo sólido. O ponto de fusão de cada composto sintetizado encontra-se na tabela 1.

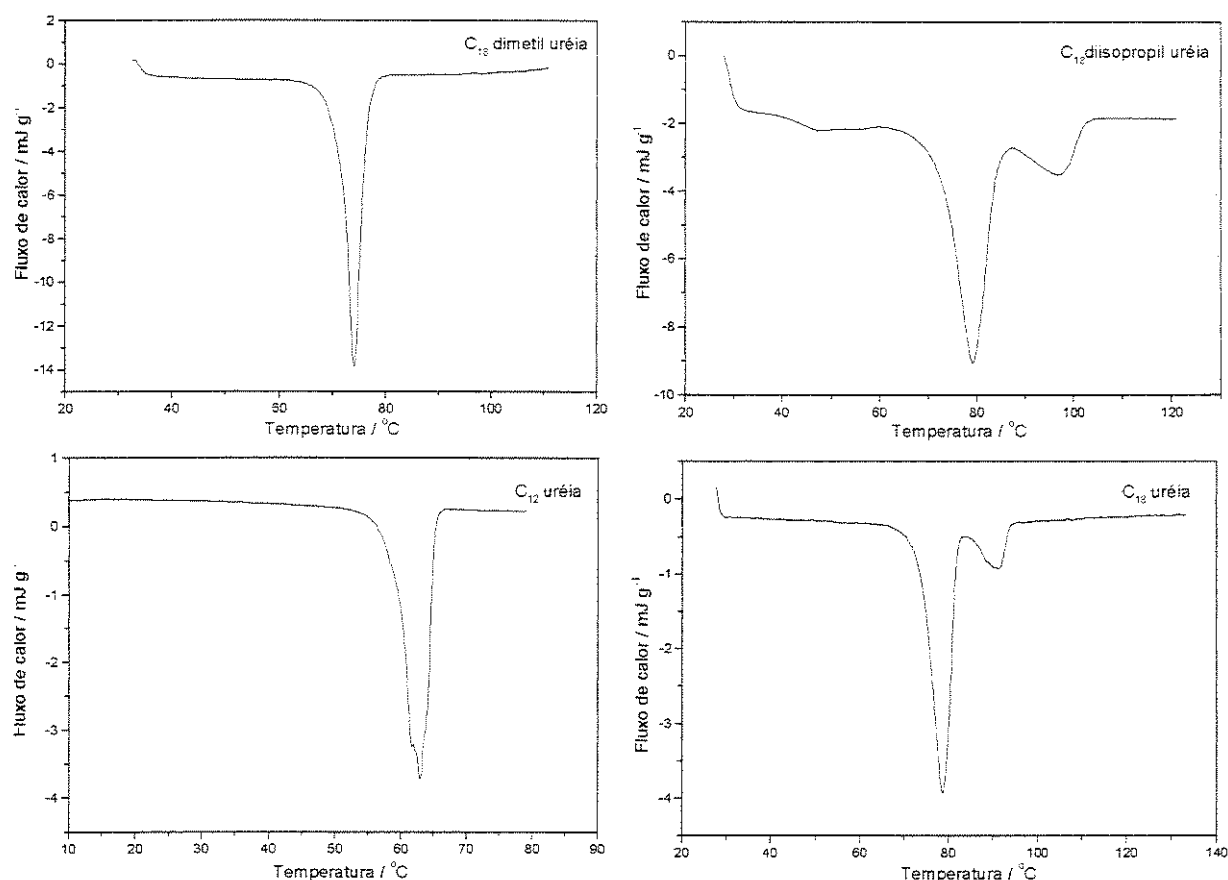


Figura 41: Curvas de DSC referentes a primeira corrida para os alcoxissilanos sintetizados.

Um pequeno pico endotérmico em 92 °C também foi detectado nas curvas de DSC da figura 41, indicando a presença de alguma impureza nas respectivas amostras dos silanos C₁₈ uréia e C₁₈ diisopropil uréia. Entretanto, as outras análises não indicaram a presença de impurezas no composto sintetizado, e portanto o pequeno ombro em 92 °C na curva de DSC da figura 41 poderia ser atribuído a uma porção da amostra do alcoxissilano que sofre uma hidrólise parcial durante o processo de pesagem da respectiva amostra ou uma evaporação do solvente remanescente do processo de síntese. Comparando-se o valor de 79 °C para os silanos com 18 carbonos, com os valores obtidos para outros agentes sililantes sintetizados anteriormente, verifica-se que este é maior que os outros, indicando que a temperatura de fusão para esta classe homóloga de uréia-alcoxissilanos aumenta proporcionalmente à medida que a cadeia orgânica N-alquila cresce.

4.2.6 Análise Elementar

Na análise elementar, foram determinadas as porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos silanos sintetizados. Os resultados obtidos estão concordantes com as porcentagens calculadas, levando em consideração a estrutura de cada um dos silanos, como mostra a tabela 1. Os valores de M^+ , obtidos através dos espectros de massas, também coincidem com os valores esperados de massa molar. Concluindo, os novos agentes sililantes foram obtidos com sucesso seguindo o procedimento experimental previamente desenvolvido.

Tabela 1: Percentuais de C, H e N obtidos experimentalmente (exp) e os calculados (calc) para os alcoxissilanos, os valores de massa molar (M^+) e a temperatura de fusão (T) determinada por DSC.

<i>silano</i>	<i>fórmula</i>	$C_{calc}/\%$	$C_{exp}/\%$	$H_{calc}/\%$	$H_{exp}/\%$	$N_{calc}/\%$	$N_{exp}/\%$	MM_{calc}	$M^+ m/z$	$T/^\circ C$
C ₃ uréia	C ₁₃ H ₃₀ N ₂ O ₄ Si	50,9	50,2	9,80	10,0	9,15	8,93	306	306	30
C ₅ uréia	C ₁₅ H ₃₄ N ₂ O ₄ Si	53,9	52,8	10,2	10,4	8,38	8,23	334	334	21
C ₇ uréia	C ₁₇ H ₃₈ N ₂ O ₄ Si	56,4	54,7	10,5	9,90	7,70	7,72	362	362	33
C ₁₂ uréia	C ₂₂ H ₄₈ N ₂ O ₄ Si	61,1	60,2	11,1	11,3	6,48	6,72	432	432	63
C ₁₈ uréia	C ₂₈ H ₆₀ N ₂ O ₄ Si	65,1	65,9	11,6	11,4	5,41	5,43	516	516	79
C ₁₈ dimu	C ₂₆ H ₅₆ N ₂ O ₂ Si	68,4	68,8	12,3	12,5	6,15	6,20	456	456	74
C ₁₈ dipu	C ₃₀ H ₆₄ N ₂ O ₂ Si	70,3	72,6	12,5	12,8	5,47	5,47	512	512	79

4.3 Modificação da sílica gel cromatográfica com os novos agentes sililantes

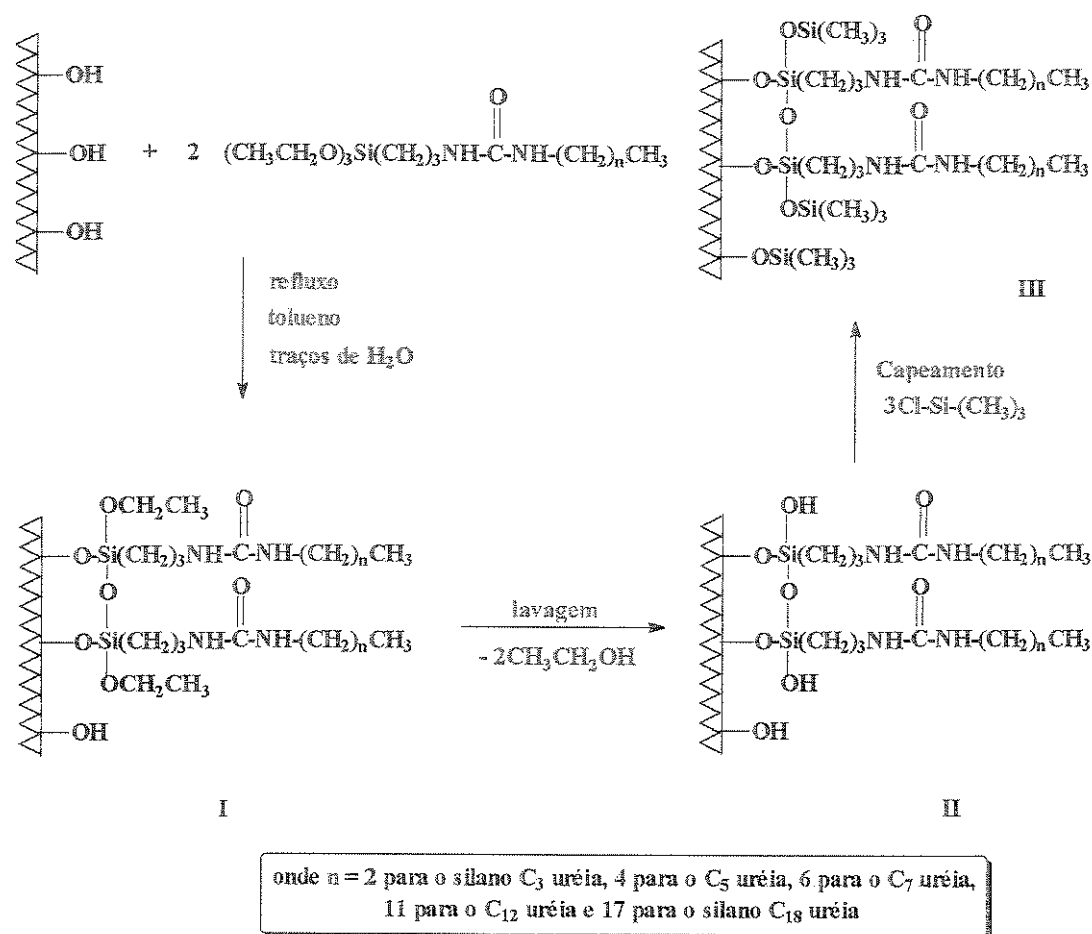


Figura 42: Esquema das reações para a modificação química da sílica cromatográfica com os agentes sililantes trifuncionais.

A modificação química da sílica cromatográfica foi realizada utilizando o método convencional, que se baseia na reação da sílica gel com o trialcóxissilano, sob refluxo com um solvente apolar, por exemplo, o tolueno. A rota da modificação química está na figura 42.

Inicialmente, na primeira etapa da modificação, os grupos etóxi do alcóxissilano reagem com os silanóis da superfície da sílica produzindo a sílica modificada em (I). Por se tratar de um agente sililante trifuncional, sabe-se que na superfície do material podem ficar grupos etóxi, que podem reagir com a água, formando mais silanóis (II). Estes grupos silanóis devem ser desativados ou bloqueados através da reação com trimetilclorossilano em uma segunda etapa. Além desses silanóis, existem os silanóis remanescentes na superfície da sílica que não sofreram reação com o agente sililante C₁₈ uréia e devem ser também desativados nesta segunda etapa, resultando na sílica representada em (III).

Na modificação química da sílica esférica Prontosil (de tamanho de partícula de 3 μm) com os alcoxissilanos monofuncionais, decidiu-se utilizar um catalisador com o objetivo de aumentar a reatividade do grupo etóxi e assim obter um maior grau de recobrimento da superfície da sílica. Para isso foi utilizada uma quantidade equimolar de trietilamina, em relação ao alcoxissilano [11].

Independente do tipo do agente sililante (sendo um alcoxissilano ou clorossilano) utilizado para modificar a superfície da sílica, é recomendável o uso de um catalisador. Quando se utiliza os clorossilanos, o mecanismo de ação é bastante óbvio, pois o catalisador básico reage com o subproduto da reação, que neste caso é o HCl, deslocando a reação para a formação dos produtos e evitando que a sílica fosse atacada pelo ácido. Ou ainda, o catalisador básico, o qual é um bom nucleófilo, interage com o átomo de silício, formando um intermediário pentacoordenado. A formação desse intermediário, enfraquece a ligação Si-Cl, facilitando a reação com os grupos $\equiv\text{Si-OH}$ [10].

Nas reações envolvendo os alcoxissilanos, como eles são bem menos reativos que os clorossilanos frente à reação com os grupos silanóis da superfície da sílica, o mecanismo de ação ainda não está bem elucidado. Pelo fato de se obter um alto grau de recobrimento da superfície da sílica quando a mesma reage com [(3-amino)propil]triétoxissilano, acredita-se que a reação é autocatalizada pela presença dos grupos $-\text{NH}_2$, possivelmente devido à interação destes grupos com os silanóis da sílica ($\equiv\text{Si-OH}$) por ligação de hidrogênio, deixando os silanóis mais reativos frente aos grupos etóxi do respectivo etoxissilano [64].

A utilização de um catalisador, como um ácido orgânico, também é recomendada, uma vez que a reação de modificação da superfície da sílica nada mais é do que uma reação de formação de um anidrido a partir de um ácido (os grupos silanóis da sílica) e um éster (neste caso os grupos etóxi do alcoxissilano). Algumas modificações químicas da sílica envolvendo o uso de alcoxissilanos e o ácido p-toluenosulfônico, mostraram que o grau de recobrimento da superfície é bem maior quando comparado com o procedimento convencional nas mesmas condições, sem o uso do ácido como catalisador [11].

O procedimento utilizado na modificação da sílica cromatográfica com os etoxissilanos monofuncionais C_{18} dimetiluréia e C_{18} diisopropiluréia encontra-se esquematizado na figura 43.

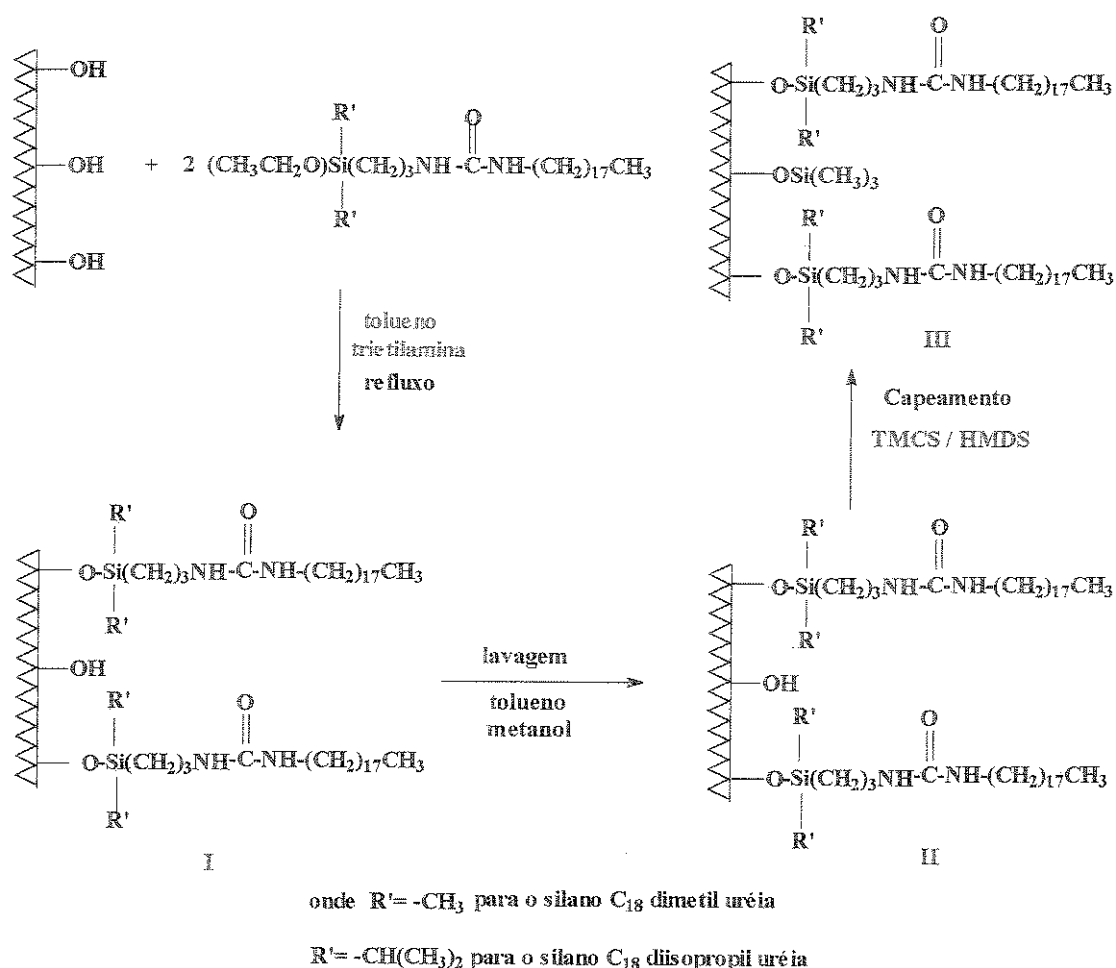


Figura 43: Esquema das reações para a modificação química da sílica Prontosil com os agentes monofuncionais.

Inicialmente, na primeira etapa da modificação química, o grupo etóxi do alcoxissilano monofuncional reage com os silanóis da superfície da sílica, produzindo a sílica modificada em (I). A sílica é lavada com tolueno e metanol a fim de remover o excesso de alcoxissilano, que por ventura poderia estar adsorvido na sílica. Esta remoção é necessária para realizar a reação de desativação dos silanóis (II). Os grupos silanóis remanescentes sofrem uma reação de desativação com uma mistura de dois agentes sililantes: o trimetilclorossilano (TMCS) e hexametildissilazano (HMDS), resultando na sílica representada em (III). Nessas preparações foi aplicado um novo procedimento para a reação de capeamento, que empregou dois reagentes. Quando o TMCS reage, o HCl é produzido, enquanto que o HMDS produz vapores de NH_3 . Nestas condições de reação, os dois reagentes formam o NH_4Cl , que se condensa nas paredes do balão de reação, aumentando a eficiência do processo de capeamento.

4.3.1 Espectroscopia na região do IV

As sílicas obtidas em cada uma das etapas da modificação química mostradas nos esquemas das figuras 42 e 43 para os alcoxisilanos trifuncionais e monofuncionais respectivamente, foram caracterizados pela espectroscopia na região do IV. Nas figuras 44 e 45, são mostrados os espectros para a sílica original (Lichrosorb e Prontosil) e para as sílicas modificadas com os respectivos silanos trifuncionais e monofuncionais.

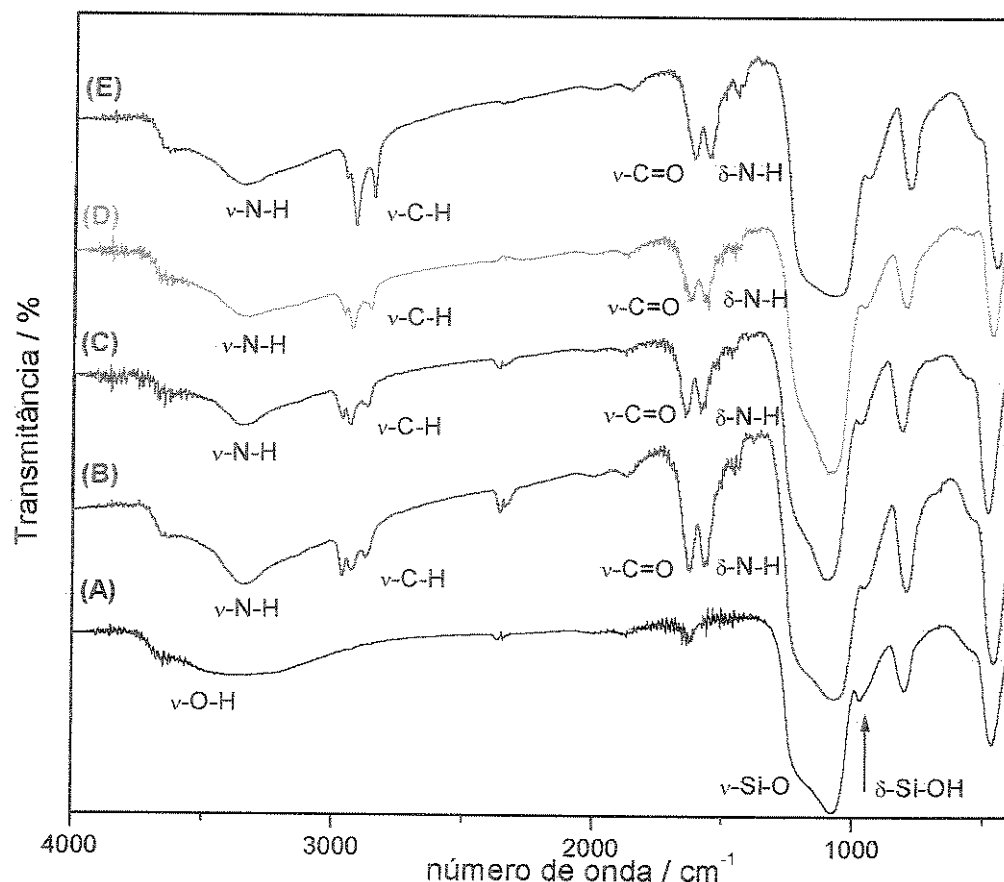


Figura 44: Espectros na região do IV para a sílica original (A) Lichrosorb e as sílicas modificadas (B) C₃ uréia, (C) C₅ uréia, (D) C₇ uréia e (E) C₁₂ uréia.

Nos espectros de todas as sílicas modificadas são observadas novas bandas na região de 3340, 2960 a 2850, em 1630 e em 1570 cm^{-1} . Essas bandas também foram observadas e já atribuídas no espectro IV dos novos agentes sililantes sintetizados. Portanto, o aparecimento dessas novas bandas nos espectros das sílicas modificadas devem-se à presença dos respectivos agentes sililantes imobilizados na superfície da sílica.

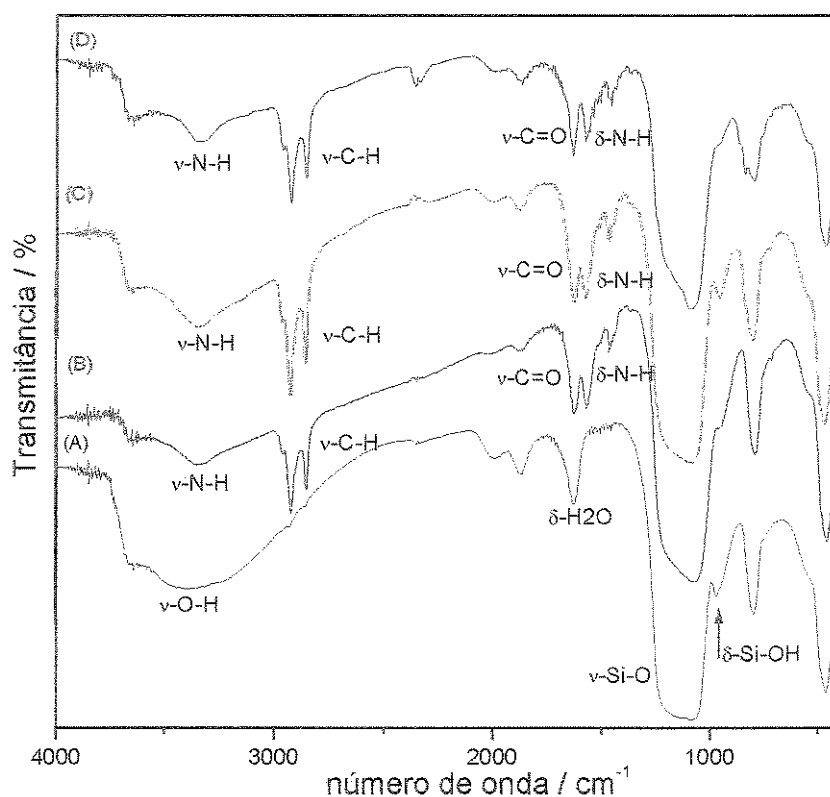


Figura 45: Espectros na região do IV para sílica Prontosil (A) e as sílicas modificadas C_{18} uréia (B) C_{18} dimetil uréia (C) e C_{18} diisopropil uréia (D).

Na segunda etapa da modificação química, as sílicas, após as etapas de lavagem e secagem, reagiram com TMCS ou com a mistura de TMSC/HMDS em excesso para promover o bloqueio dos grupos silanóis residuais. Na figura 46 são mostrados os espectros de um dos materiais antes e após a reação de capeamento.

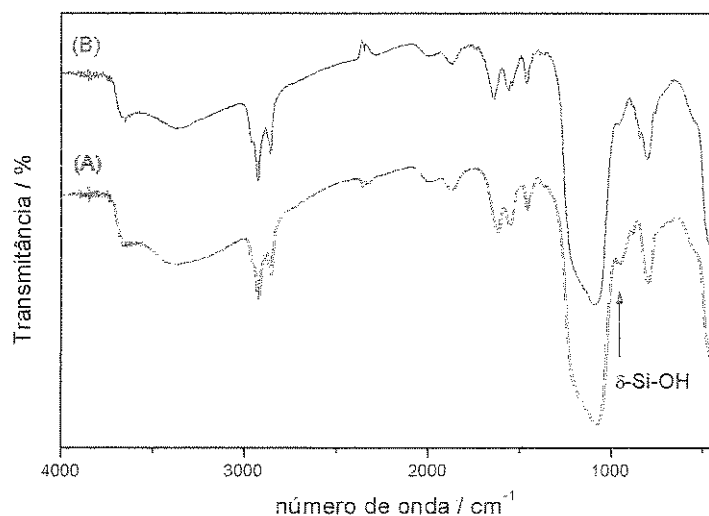


Figura 46: Espectros IV para a sílica C_{18} diisopropil uréia, (A) antes e (B) após o capeamento.

Como pode ser observado no exemplo da figura 46, após a reação de capeamento das sílicas modificadas, não ocorreu nenhuma mudança na estrutura química da molécula orgânica imobilizada, a qual pudesse ser detectada no espectro IV, a não ser a diminuição da banda da deformação da ligação Si-OH em 960 cm^{-1} , evidenciando o sucesso da reação de capeamento. As bandas características da função uréia em 1630 cm^{-1} $\nu(\text{C=O})$ e 1570 cm^{-1} $\delta(\text{N-H})$ continuam presentes nos espectros, mesmo após reação de capeamento.

4.3.2 Análise Elementar

Através do percentual de carbono, foi possível calcular o grau de recobrimento, χ , das superfícies utilizando a expressão recomendada pela literatura [65]:

$$\chi = \frac{P_c}{1200n_c - P_c(MM - n_x)} \frac{1}{S_{BET}}$$

sendo P_c a porcentagem de carbono na sílica modificada, n_c o número de átomos de carbono da molécula orgânica imobilizada, MM é a massa molar do silano imobilizado, n_x o número de grupos reativos do alcoxissilano de partida, que pode ser 1 para os silanos monofuncionais ou 3 para os trifuncionais. S_{BET} é a área superficial das sílicas originais, $189\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ para a Prontosil, ou $223\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$ para a Lichrosorb, calculadas a partir da isoterma de adsorção de nitrogênio. O grau de recobrimento das superfícies, assim como as porcentagens de C, H e N estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Percentual de C, H e N obtido através da análise elementar para as sílicas modificadas e o grau de recobrimento da superfície (χ).

sílica	C / %	H / %	N / %	$\chi / \mu\text{mol m}^{-2}$
C ₃ uréia	8,41	1,65	2,52	4,04 *
C ₅ uréia	9,22	1,79	2,20	3,77 *
C ₇ uréia	8,93	1,80	1,84	3,04 *
C ₁₂ uréia	12,4	2,31	3,04	3,22 *
C ₁₈ uréia	13,1	2,43	2,70	3,22 *
C ₁₈ dimu	14,4	2,63	1,75	3,33
C ₁₈ dipu	10,2	1,66	1,48	1,87

* O asterisco indica que foi levado em conta que havia pelo menos um grupo etóxi remanescente para cada molécula do alcoxissilano imobilizado no cálculo de MM. Tal consideração pode ser feita devido à presença de sinais em 20 e 60 ppm no espectro de RMN de ^{13}C para essas sílicas modificadas, o qual será discutido a seguir.

Analisando os valores de χ , verifica-se um baixo grau de recobrimento da superfície da sílica modificada com o silano C_{18} diisopropil uréia. A presença dos grupos isopropila faz com que a reação dos grupos etóxi com os silanóis da sílica seja dificultada por impedimento estérico. Já para a sílica C_{18} dimetil uréia, foi obtido um grau de recobrimento de $3,33 \mu\text{mol m}^{-2}$, um valor próximo ao valor encontrado para as demais sílicas, modificadas com os silanos trifuncionais [65].

Após a reação de capeamento, as sílicas modificadas foram novamente submetidas à análise elementar, onde foram observados aumentos de 0,30 até 0,83 % no percentual de carbono nas sílicas. O aumento no percentual de carbono foi maior, conforme era esperado, para a sílica C_{18} diisopropil uréia, que apresentou um menor grau de recobrimento da superfície, portanto um maior número de silanóis.

4.3.3 Análise dos espectros de RMN de ^{13}C

A espectroscopia de RMN de ^{13}C no estado sólido é uma poderosa técnica para investigar as estruturas químicas que foram covalentemente ligadas em cada etapa da modificação química da superfície da sílica [66]. A figura 47 mostra os espectros de RMN de ^{13}C das sílicas C_3 , C_5 , C_7 e C_{12} uréia antes da reação de capeamento. A atribuição de cada pico observado foi baseada nas atribuições feitas nos espectros de RMN de ^{13}C dos agentes sililantes em CCl_4 e estão mostradas nas estruturas inseridas na figura 47.

Nenhuma mudança química na estrutura química do ligante orgânico foi observada após as etapas de modificação química. Em aproximadamente 18 e 58 ppm são observados dois sinais devido aos carbonos 1 e 2, respectivamente, remanescentes dos grupos etóxi do agente sililante trifuncional. Por esta razão é que essas sílicas modificadas foram lavadas várias vezes com água destilada para promover a hidrólise dos grupos etóxi antes da reação de capeamento.

Esses sinais também foram observados no espectro de RMN de ^{13}C da figura 48 para a sílica C_{18} uréia antes da reação de capeamento. Depois da reação de capeamento, um novo sinal foi observado em 1 ppm devido à presença do grupo $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, produto da reação dos silanóis residuais com TMCS, conforme foi mostrado no esquema da figura 43.

62

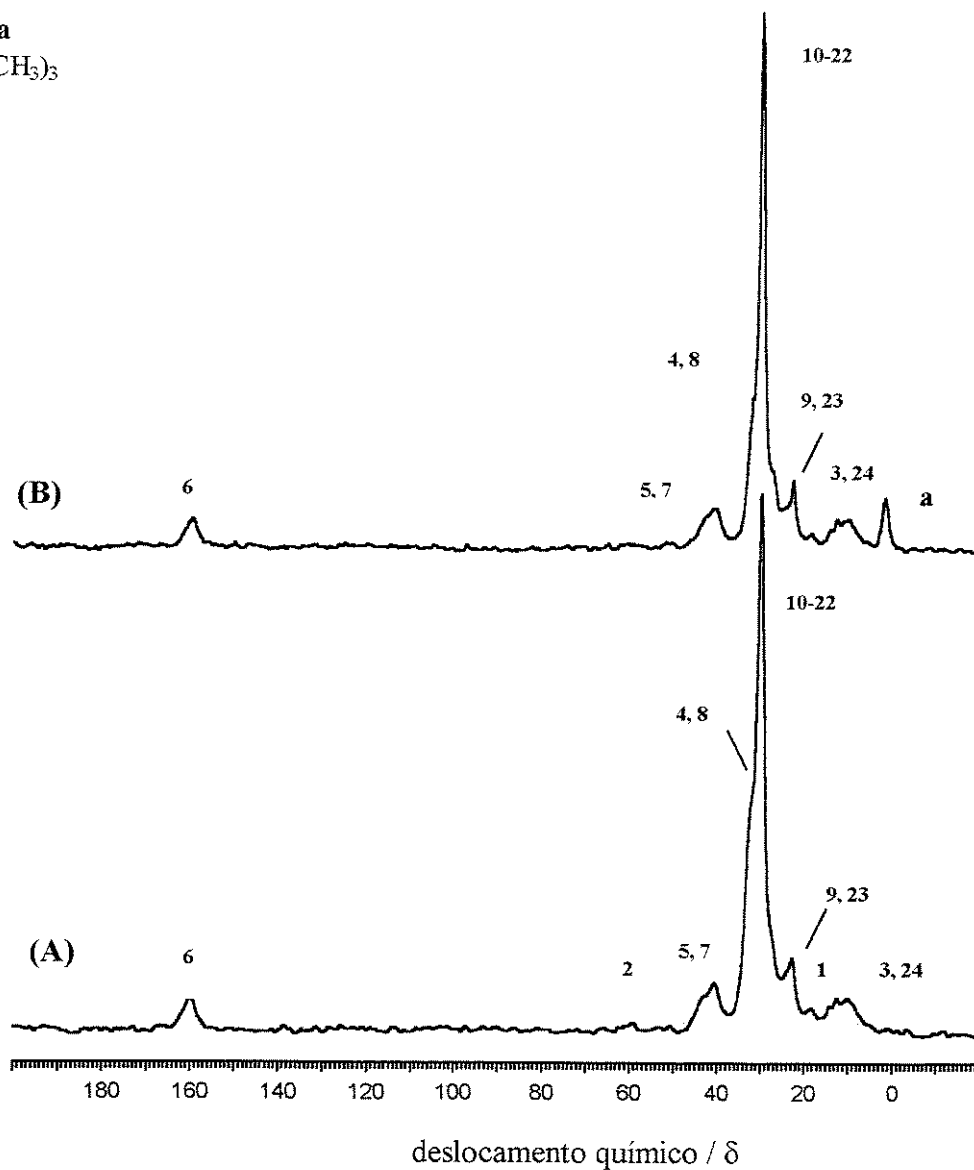
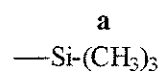


Figura 48: Espectros CP/MAS de RMN de ^{13}C para a sílica C_{18} uréia antes (A) e após (B) a reação de capeamento com TMCS.

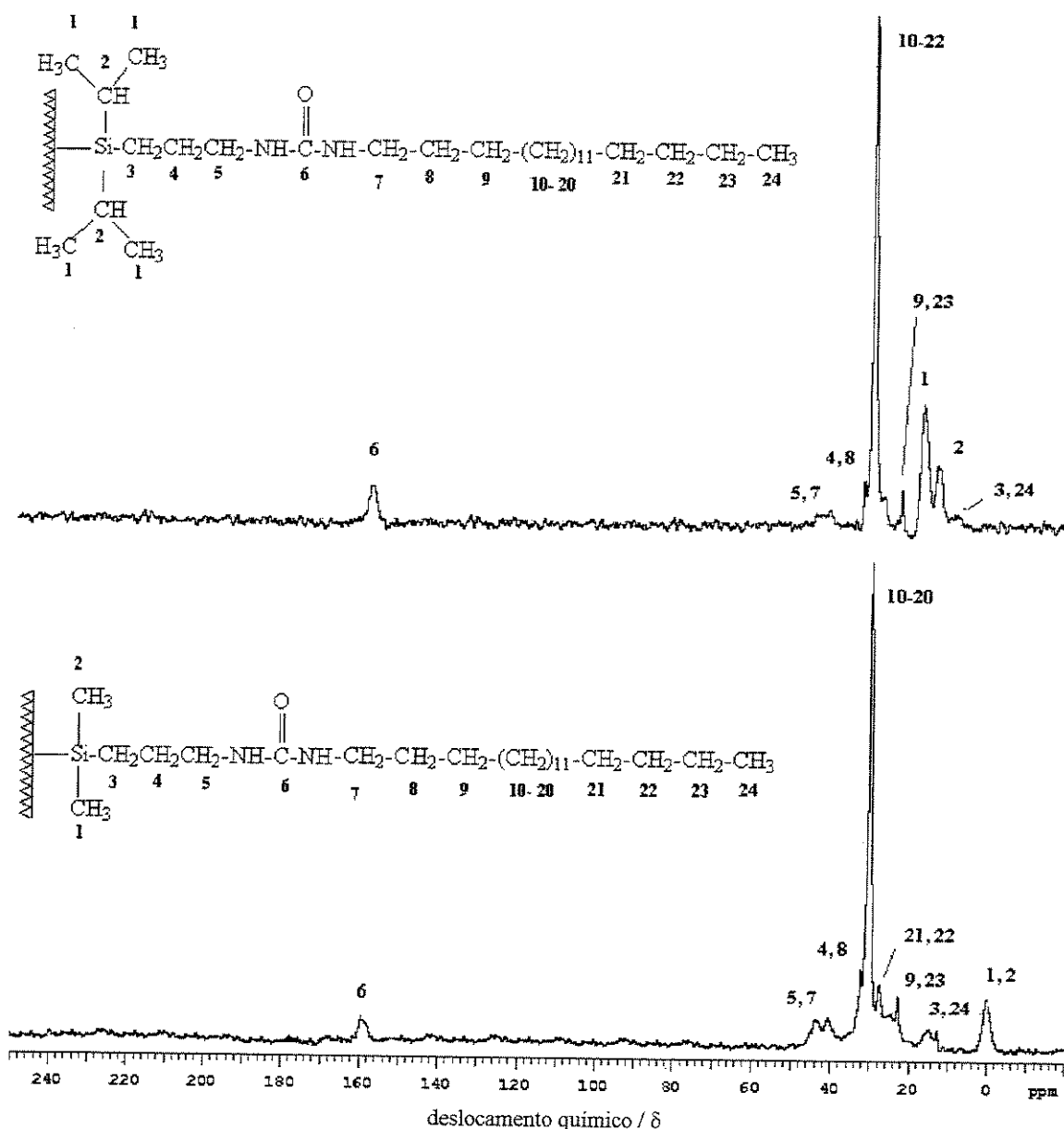


Figura 49: Espectros de RMN de ^{13}C utilizando a técnica de CP/MAS para as fases C_{18} dimetil e diisopropil uréia.

Nos espectros de RMN de ^{13}C das sílicas monofuncionais C_{18} dimetil e diisopropil uréia não foram observados os sinais referentes ao grupo etóxi dos respectivos agentes sililantes, diferente do ocorrido nos demais espectros da sílicas modificadas com os etoxissilanos trifuncionais. Essa é a grande vantagem da utilização do etoxissilano monofuncional em relação ao trifuncional, que após a imobilização pode ainda apresentar grupos etóxi que não reagiram com os silanóis da sílica, sendo necessário um cuidado maior durante a etapa de lavagem, para tentar promover a hidrólise desses grupos remanescentes antes da reação de capeamento com os agentes sililantes mais reativos.

4.3.4 Análise dos espectros de RMN de ^{29}Si

A Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si no estado sólido é uma técnica analítica bastante versátil na determinação das espécies de silício na matriz de sílica antes e após as várias modificações químicas realizadas [67]. A figura 50 mostra os espectros de RMN de ^{29}Si das sílicas modificadas antes do processo de capeamento.

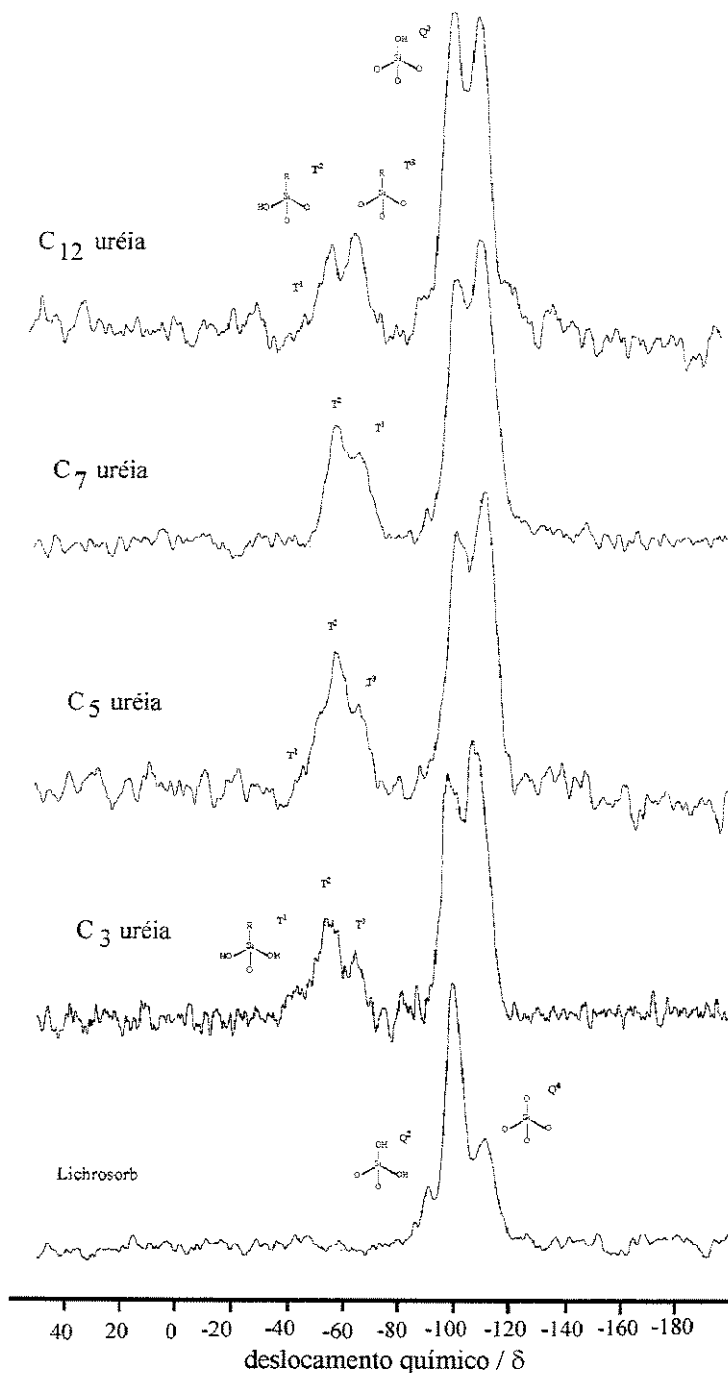


Figura 50: Espectros de CP/MAS de RMN de ^{29}Si para a Lichrosorb e as sílicas modificadas C₃, C₅, C₇ e C₁₂ uréia.

As espécies detectadas na superfície da sílica são descritas como Q^n e T^n em que n representa o número de grupos siloxanos ligados ao átomo de silício [68]. No espectro da sílica original (Lichrosorb), os silanóis geminais (Q^2), os silanóis livres (Q^3) e os siloxanos (Q^4) foram detectados em -92, -101 e -110 ppm, respectivamente. Esses grupos pertencem a estrutura inorgânica da sílica. Nos espectros das sílicas modificadas, os novos picos em -52, -56 e -65 ppm referem-se às espécies T^1 , T^2 e T^3 , respectivamente [67]. Esses grupos são derivados da reação da molécula do agente sililante com os silanóis da sílica e a presença dos mesmos no espectro de ^{29}Si é uma clara indicação da ligação dos grupos orgânicos ao suporte cromatográfico. As espécies do tipo T^2 , apresentando grupos do tipo etóxi como vizinhos ao átomo central de silício não podem ser diferenciadas daquelas que apresentam os grupos OH ligados ao silício. Ambas espécies apresentam o mesmo deslocamento químico no espectro de RMN de ^{29}Si . As estruturas dessas espécies encontram-se esquematizadas na figura 51.

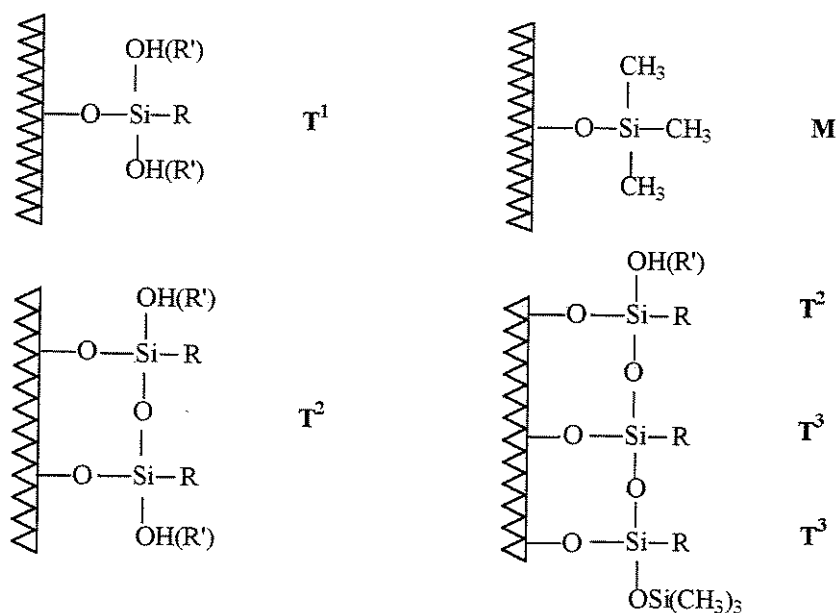


Figura 51: Estruturas propostas para as espécies T^n e M encontradas na superfície da sílica modificada.

Outro detalhe que deve ser ressaltado aqui diz respeito à técnica de CP/MAS, que apesar de não ser quantitativa, permite que comparações sejam feitas, considerando que os espectros foram feitos sempre nas mesmas condições. Verificou-se um decréscimo na população de grupos silanóis (Q^3 e Q^2) em relação às espécies Q^4 após a reação com os agentes sililantes, indicando mais uma vez o sucesso da imobilização destes novos agentes na superfície da sílica.

Depois da reação de capeamento, foi observado um novo sinal em + 12 ppm nos espectros de RMN de ^{29}Si na figura 52, devido à presença do grupo $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ na superfície da sílica, produto da

reação dos silanóis residuais com o trimetilclorossilano, conforme foi mostrado nos esquemas das figuras 42 e 43.

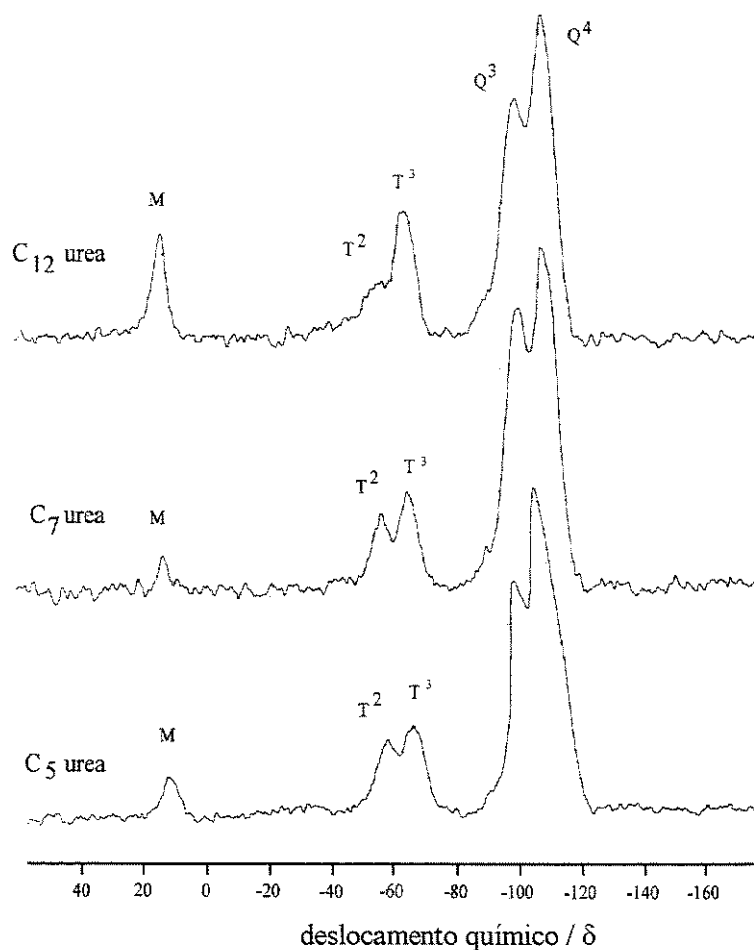


Figura 52: Espectros de RMN CP/MAS de ^{29}Si das sílicas modificadas C_5 , C_7 e C_{12} uréia após a reação de capeamento.

A reação de capeamento com TMCS das sílicas C_5 , C_7 e C_{12} uréia foi obtida com sucesso pelo aparecimento do pico em + 12 ppm, referente às espécies M. O desaparecimento das espécies T^1 e uma diminuição gradativa das espécies T^2 em -56 ppm após a reação de capeamento, indicam que não somente os grupos silanóis da superfície da sílica sofreram a reação de capeamento, mas também os grupos silanóis originados a partir da hidrólise dos grupos etóxi remanescentes na primeira etapa da modificação química da sílica. Tal comportamento também fica evidenciado pelo aumento da população das espécies T^3 , quando comparado com os espectros da figura 50. Os espectros da figura 53 foram obtidos para a sílica C_{18} uréia antes e após a reação de capeamento com TMCS. Como os espectros foram obtidos nas mesmas condições experimentais, algumas considerações sobre a população das espécies T^n e Q^n podem ser feitas, comparando-se os dois espectros.

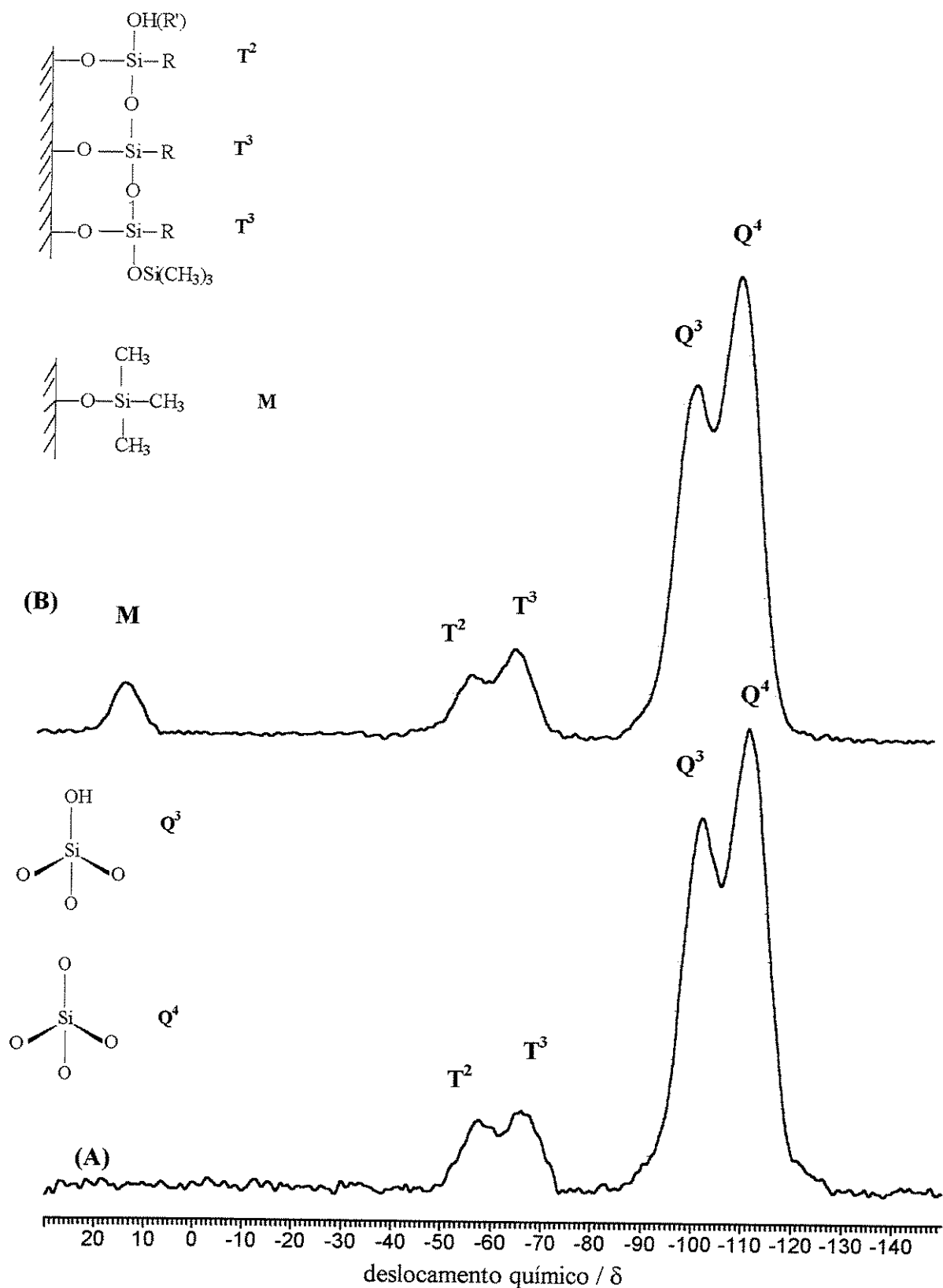


Figura 53: Espectro RMN CP/MAS de ²⁹Si para a sílica C₁₈ uréia antes (A) e (B) após a reação de bloqueio dos grupos silanóis residuais com TMCS.

Concluindo, a reação de capeamento ocorreu com sucesso em todos os casos, mas ainda existem grupos silanóis remanescentes na sílica devido à presença dos sinais em -56 e -101 ppm. Do ponto de vista cromatográfico, seria ideal que nos espectros de RMN de ^{29}Si , após a reação com TMCS não fossem detectadas as espécies T^2 , indicando uma total conversão para as espécies T^3 , após o bloqueio dos silanóis residuais originados da hidrólise dos grupos etóxi do trialcóxissilano. No caso onde foram empregados os agentes sililantes monofuncionais na modificação da sílica Prontosil, espera-se apenas uma única espécie de silício, além das espécies Q^n do suporte da sílica. O sucesso da primeira modificação química, cujo procedimento está na figura 43, é comprovado pelo sinal em 12 ppm no espectro de RMN de ^{29}Si para as duas fases C_{18} dimetil e diisopropil uréia, das figuras 54 e 55.

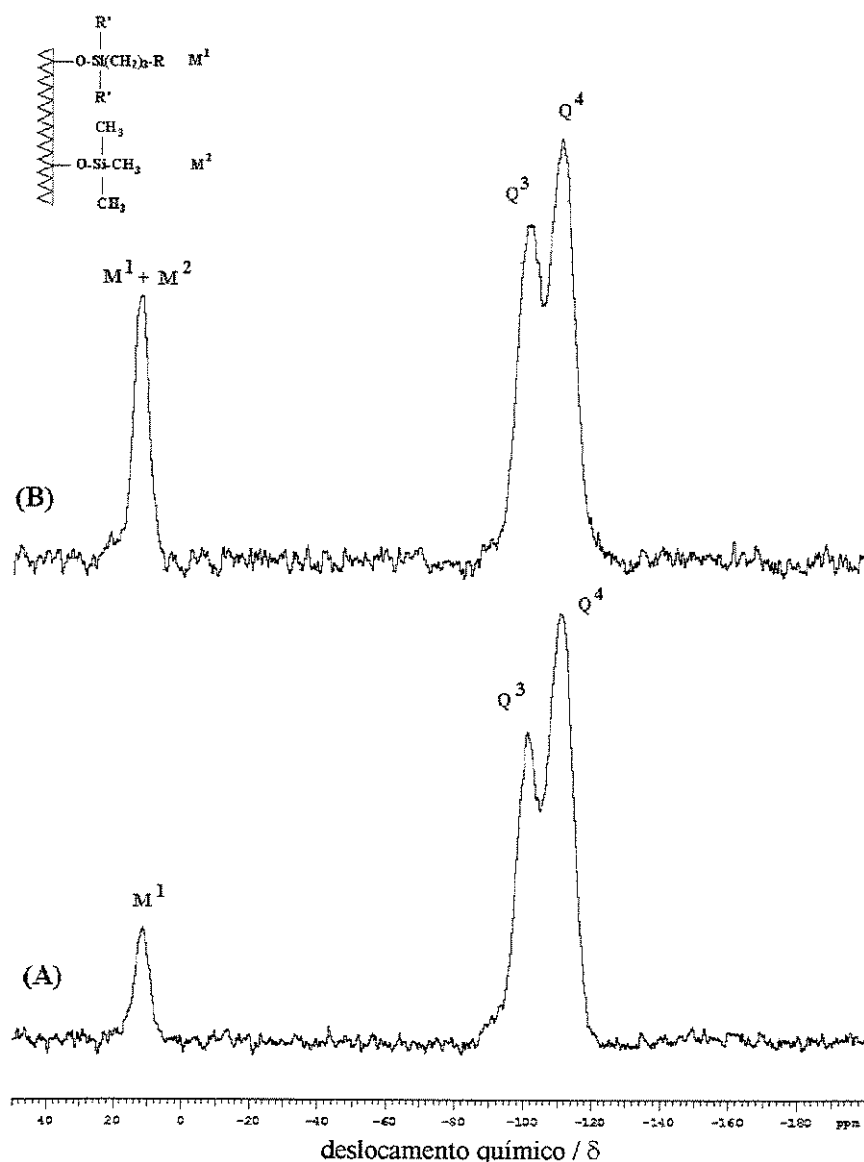


Figura 54: Espectros de RMN de ^{29}Si utilizando a técnica de CP/MAS para a fase monomérica C_{18} dimetil uréia antes (A) e após (B) a reação com TMCS / HMDS.

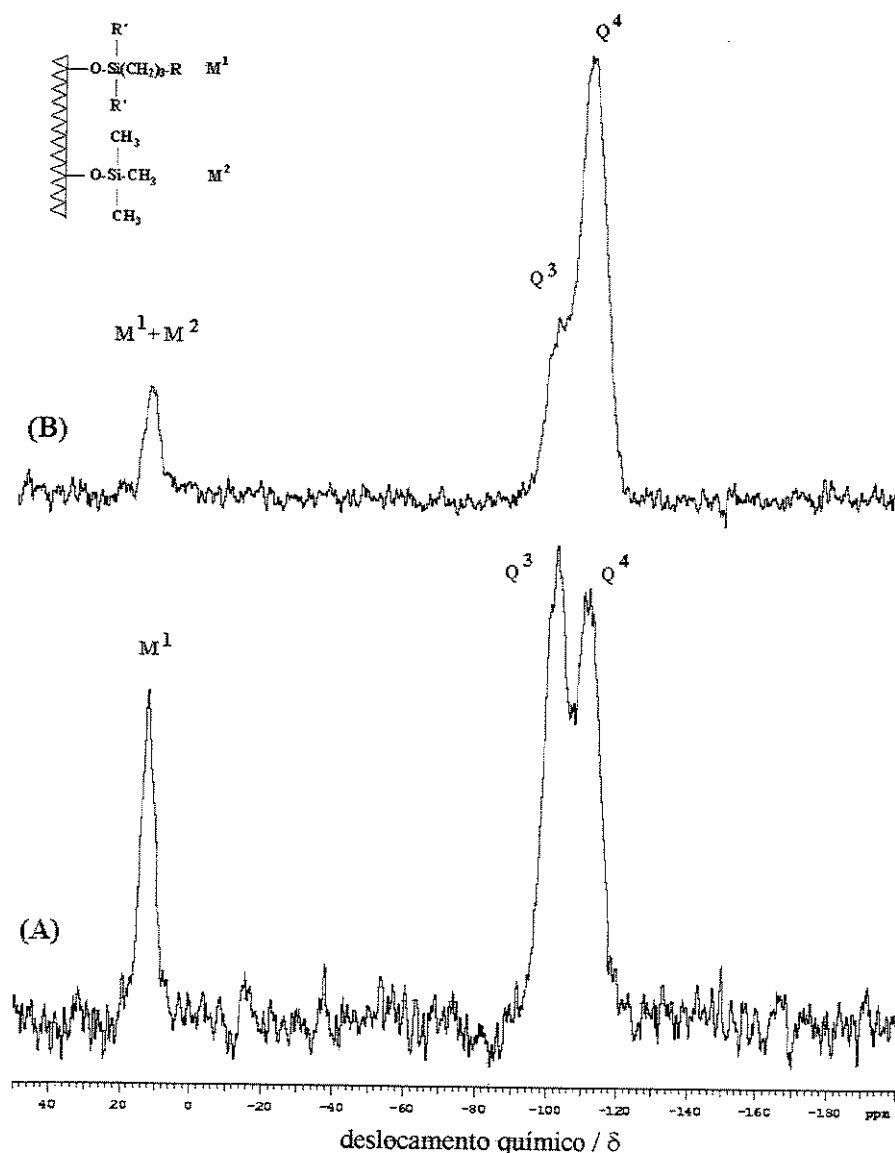


Figura 55: Espectros de RMN de ^{29}Si utilizando a técnica de CP/MAS para a fase monomérica C₁₈ diisopropil uréia antes (A) e após (B) a reação com TMCS/HMDS.

Como foi discutido anteriormente, as espécies M¹ representam os átomos de silício originados do silano monofuncional utilizado na modificação química. A presença dos dois grupos metilas, ligados diretamente ao átomo de silício, não pode ser diferenciada das espécies M¹ tendo os grupos isopropilas como vizinhos ao invés dos grupos metila, por apresentarem o mesmo deslocamento químico. Após a reação de capeamento, espera-se que os grupos silanóis residuais sejam substituídos pelos grupos $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, formando novas espécies do tipo M². As novas espécies M² introduzidas na segunda etapa da modificação química não podem ser diferenciadas das espécies M¹ por apresentarem o mesmo deslocamento químico em 12 ppm, como ilustrado nos espectros das figuras 54B e 55B.

Como os espectros foram obtidos nas mesmas condições experimentais, eles podem ser comparados e analisando o espectro da figura 54B para a fase C₁₈ dimetil uréia, percebeu-se um aumento na intensidade do pico das espécies M em 12 ppm, após a reação de capeamento dos silanóis residuais. No espectro da figura 55B para sílica C₁₈ diisopropil uréia, a intensidade do pico referente à espécie Q³ (silanóis livres) é bastante reduzida após a etapa do capeamento, uma vez que o grau de recobrimento da superfície da sílica na primeira etapa de reação foi relativamente menor, 1,87 $\mu\text{mol m}^{-2}$, quando comparado ao valor de 3,33 $\mu\text{mol m}^{-2}$, para a fase C₁₈ dimetil uréia.

4.4 Avaliações Cromatográficas

4.4.1 Avaliações Cromatográficas com as fases C₅, C₇ e C₁₂ uréia

Como discutido na parte experimental, após cada enchimento realizado, as colunas eram testadas cromatograficamente através da separação de uma mistura teste em uma fase móvel composta por acetonitrila e água sem a adição de um tampão, como mostra a figura 56. Dependendo do resultado obtido, principalmente em termos de eficiência e de assimetria, a coluna era esvaziada e um novo enchimento era realizado.

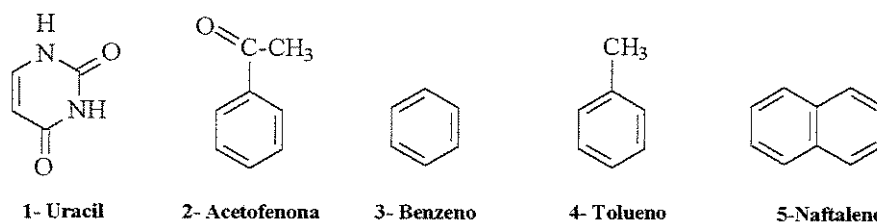


Figura 56: Estruturas dos compostos da mistura teste 1, empregada na avaliação inicial das colunas recheadas utilizando uma fase móvel não tamponada.

As fases C₃, C₅, C₇ e C₁₂ uréia foram preparadas utilizando como suporte a sílica cromatográfica Lichrosorb que apresenta partículas irregulares, de tamanho médio de 5 μm . A fase estacionária C₃ uréia não apresentou resultados satisfatórios nas separações cromatográficas realizadas em condições de fase reversa, possivelmente devido à sua baixa hidrofobicidade. Os cromatogramas obtidos com as fases C₅, C₇, e C₁₂ uréia são apresentados na figura 57, sendo que todos os casos os componentes da mistura teste foram separados com sucesso, após os ajustes da composição da fase móvel para cada fase estacionária avaliada.

A diferença na hidrofobicidade de cada fase é claramente observada, através do aumento da concentração do solvente orgânico para que se obtivesse uma separação satisfatória dos componentes da mistura teste 1. Por exemplo, uma composição de acetonitrila:água 70:30 v/v foi utilizada para a

coluna C_{12} , enquanto para as colunas C_5 e C_7 foram utilizadas fases móveis de composição de 50:50 e 60:40 v/v, respectivamente.

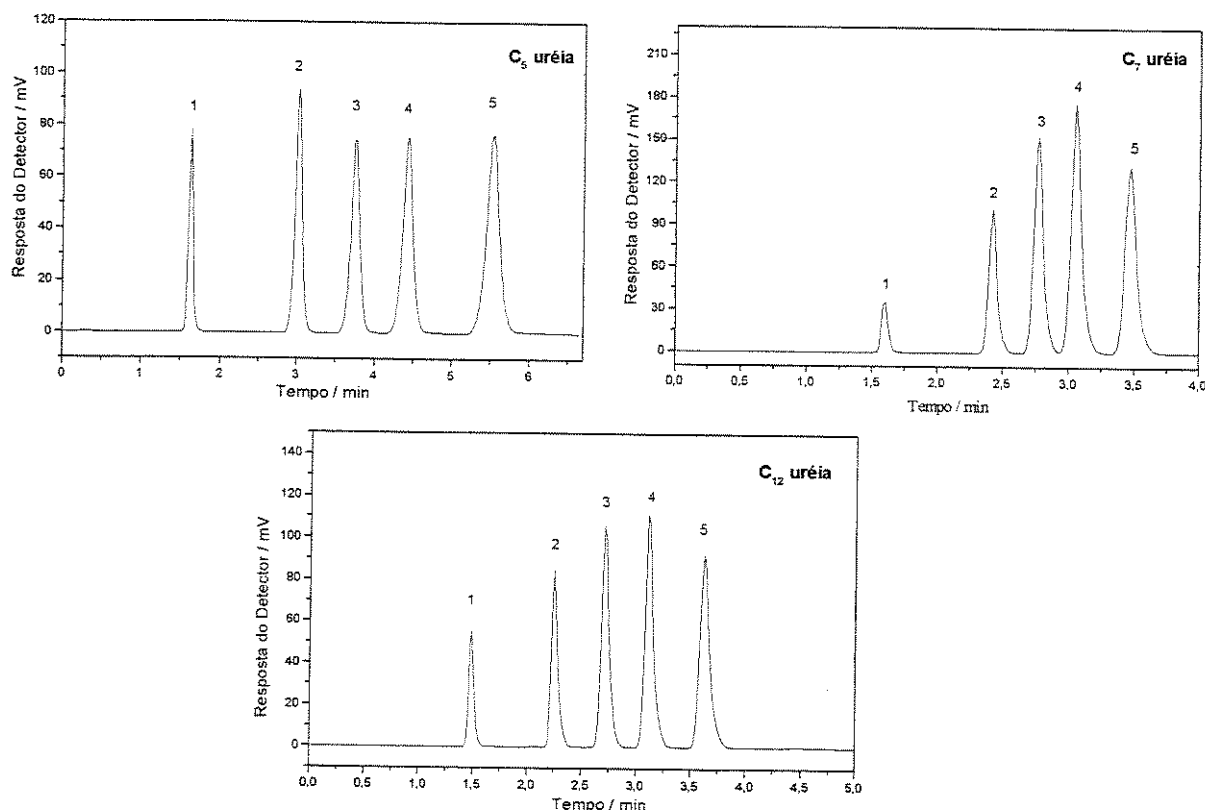


Figura 57: Cromatogramas da separação da mistura teste 1 composta por: uracil (1), acetofenona (2), benzeno (3), tolueno (4) e naftaleno (5), utilizando as colunas de 150 x 3,9 mm recheadas com as fases C_5 , C_7 e C_{12} uréia. Condições: fase móvel: acetonitrila:água 50:50, 60:40 e 70:30 v/v para as colunas C_5 , C_7 e C_{12} uréia respectivamente, vazão ótima: $0,8 \text{ ml min}^{-1}$, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 5 μl .

Analisando os cromatogramas da figura 57, pode-se concluir que foram obtidas colunas com bom desempenho cromatográfico, pois todos os componentes da mistura teste foram separados com êxito. Embora, no preparo dessas fases estacionárias foi utilizada a sílica irregular Lichrosorb, de tamanho de partícula de 5 μm . Os valores de N/m para o naftaleno variou de 57000 para a sílica C_{12} uréia até 38000 para a sílica C_5 uréia e os valores do fator de alargamento de pico (Tf) estão próximos a 1,3 para todas as colunas testadas, como mostra a tabela 3. A diferença entre os valores de N/m para coluna recheada com a fase C_5 em comparação aos valores obtidos para as colunas C_7 e C_{12} , sugere que esta não foi bem recheada quando comparado com as outras duas colunas, C_7 e C_{12} uréia.

Tabela 3: Parâmetros cromatográficos calculados para a separação da mistura teste 1 nas colunas C₅, C₇ e C₁₂ uréia, obtidos nas condições cromatográficas da figura 57.

	C ₅ uréia			C ₇ uréia			C ₁₂ uréia		
	k	N/m	Tf	k	N/m	Tf	k	N/m	Tf
acetofenona	0,95	35400	1,34	0,52	47700	1,30	0,52	49800	1,34
benzeno	1,50	37800	1,22	0,74	48000	1,16	0,83	49200	1,22
tolueno	2,10	39000	1,22	0,92	50100	1,22	1,10	54000	1,30
naftaleno	2,90	38000	1,30	1,20	51600	1,22	1,50	57300	1,34

Para cada coluna recheada com as fases C₅, C₇, C₁₂ uréia foi determinada a vazão ótima através da injeção de amostras da mistura teste 1 em diferentes vazões de fase móvel, que variaram de 0,2 ml min⁻¹ até 1,5 ml min⁻¹. O gráfico obtido está mostrado na figura 58, onde a vazão ótima, ou seja a vazão na qual a coluna apresenta máxima eficiência, foi de 0,8 ml min⁻¹ em todos os casos.

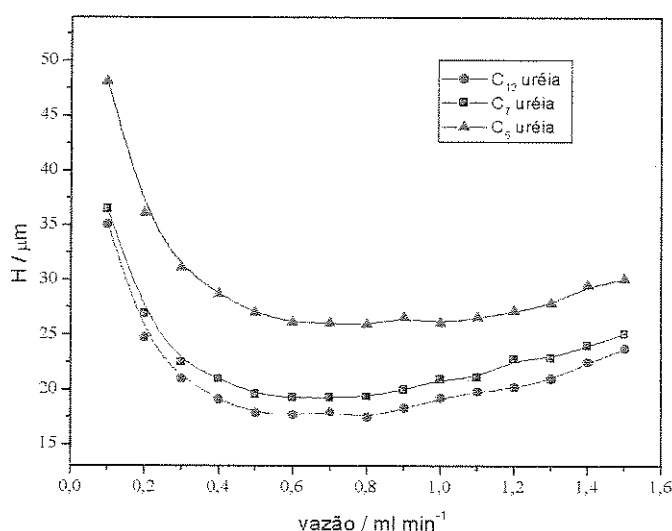


Figura 58: Curvas da altura de prato (H) para o naftaleno em diferentes vazões de fase móvel para colunas de 150 x 3,9 mm recheadas com as fases C₅, C₇ e C₁₂ uréia. Condições: fase móvel: acetonitrila:água 50:50, 60:40 e 70:30 v/v para as fases C₅, C₇ e C₁₂ uréia respectivamente, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 5 μl.

4.4.2 Avaliações Cromatográficas com a fase C₁₈ uréia

A fase C₁₈ uréia foi empregada no recheio das colunas para CLAE, seguindo o mesmo procedimento utilizado no enchimento das colunas C₅, C₇ e C₁₂ uréia. A primeira avaliação foi realizada através da separação da mistura teste 1, como mostra o cromatograma de figura 59.

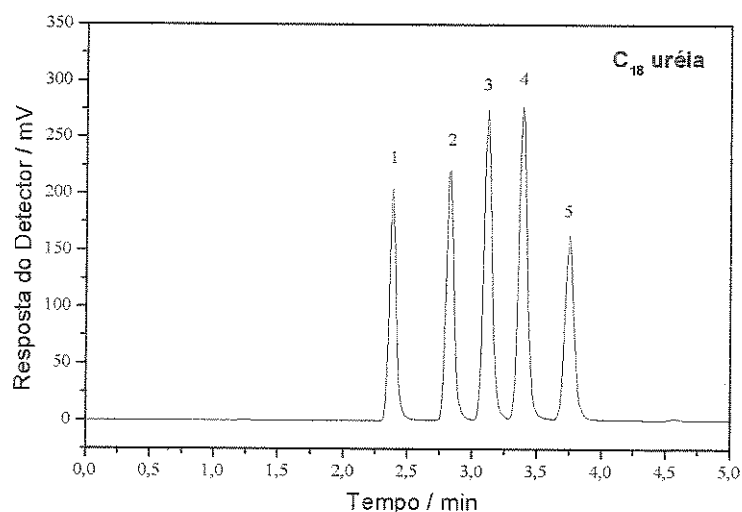


Figura 59: Cromatograma da separação da mistura teste composta por uracil (1), acetofenona (2), benzeno (3), tolueno (4) e naftaleno (5) na coluna de 150 x 3,9 mm recheada com a fase C_{18} uréia. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila:água 80:20 v/v, vazão ótima: $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ e detecção UV em 254 nm.

Para o cromatograma da figura 59, a eficiência expressa em pratos por metro (N/m), fator de retenção (k) e o fator de alargamento de pico (Tf) foram calculados para cada um dos solutos. A tabela 4 mostra os valores de cada um dos parâmetros cromatográficos.

Tabela 4: Parâmetros cromatográficos obtidos com a nova coluna C_{18} uréia para a separação dos compostos da mistura teste 1.

	k	N/m	Tf
acetofenona	0,16	70400	1,08
benzeno	0,31	79000	1,16
tolueno	0,42	81600	1,24
naftaleno	0,58	87700	1,14

Analisando os valores mostrados na tabela 4, pode-se concluir que a coluna foi recheada com sucesso, obtendo-se uma eficiência de aproximadamente 88000 N/m e um valor de alargamento de pico de 1,14. Comparando os valores de N/m para essa coluna com as demais colunas (C_5 até C_{12}) verifica-se que os valores de N/m são relativamente maiores. Isso se deve ao tipo de sílica utilizado na modificação. Nas modificações químicas feitas anteriormente a sílica utilizada continha partículas de forma irregular e de tamanho médio de 5 μm . Nesta modificação com o silano C_{18} uréia, como já foi

descrito, a sílica utilizada apresentava partículas esféricas, de tamanho médio de 3 μm . O tamanho da partícula influenciou bastante no aumento de eficiência quando comparado com as fases preparadas com as partículas de sílica irregulares de tamanho médio de 5 μm . Entretanto, os valores de altura de prato reduzido, h , para o naftaleno foram em torno de 4, tanto para as sílicas irregulares como para as esféricas, indicando que o enchimento foi realizado com sucesso.

Para determinar qual a vazão na qual a eficiência desta coluna é máxima, foi construída a curva da altura de prato, determinada pela injeção de amostras da mistura teste 1 em diferentes vazões da fase móvel, que variaram de 0,2 até 1,5 ml min^{-1} . A figura 60 mostram as curvas para duas colunas recheadas com a fase C_{18} uréia. As curvas mostram que a eficiência é máxima na vazão de 0,6 ml min^{-1} para ambas colunas.

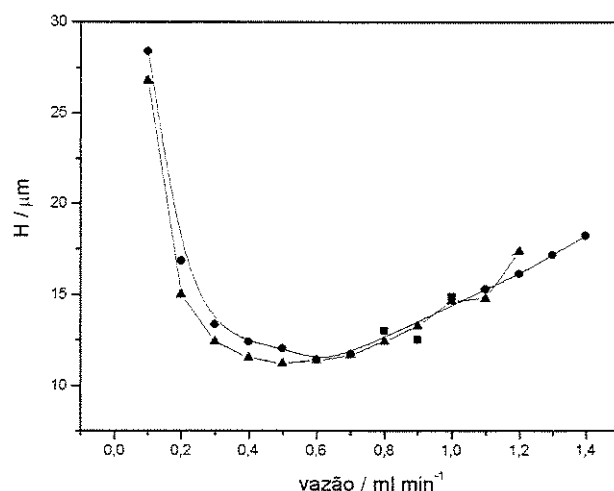


Figura 60: Curvas da altura de prato para o naftaleno em diferentes vazões de fase móvel para duas colunas de 150 x 3,9 mm recheadas com a fase C_{18} uréia. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água 80/20 (v/v), detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 5 μl .

4.4.2.1 Separação das misturas testes SRM869a e SRM1647c na coluna C_{18} uréia

A mistura SRM 869a, composta por três diferentes hidrocarbonetos poliaromáticos cujas estruturas estão mostradas na figura 61, foi escolhida para avaliar a seletividade desta nova fase.

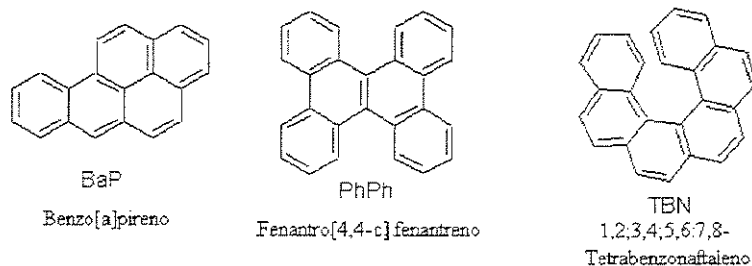


Figura 61: Estrutura dos solutos da mistura teste SRM 869a, composta por três diferentes hidrocarbonetos poliaromáticos BaP, PhPh e TBN.

O uso desta mistura teste é bastante comum para avaliar se as colunas adquiridas comercialmente são monoméricas ou poliméricas. A classificação diz respeito de que forma ocorre a ligação química entre o agente sililante e os grupos silanóis da superfície da sílica. Dessa maneira, em fases reversas monoméricas do tipo C_{18} , preparadas através da reação com silanos monofuncionais, a ordem de eluição é $BaP \leq PhPh < TBN$. As fases estacionárias preparadas através da reação com agentes sililantes di ou trifuncionais apresentam a seguinte ordem de eluição $PhPh < TBN \leq BaP$. As fases estacionárias com propriedades intermediárias geralmente apresentam a seguinte ordem de eluição: $PhPh < BaP < TBN$ [12].

Uma medida da seletividade da fase estacionária pode ser feita, calculando o fator de separação entre os solutos TBN e BaP. Dessa maneira, valores de $k_{TBN} / k_{BaP} \leq 1$ sugerem uma coluna do tipo polimérica e valores de $k_{TBN} / k_{BaP} \geq 1,7$ sugerem uma fase do tipo monomérica. Para colunas com valores intermediários da razão entre os fatores de retenção, considera-se que a respectiva coluna apresenta propriedades intermediárias entre as fases poliméricas e monoméricas [62]. O cromatograma da separação da mistura SRM 869a na coluna C_{18} uréia está na figura 62.

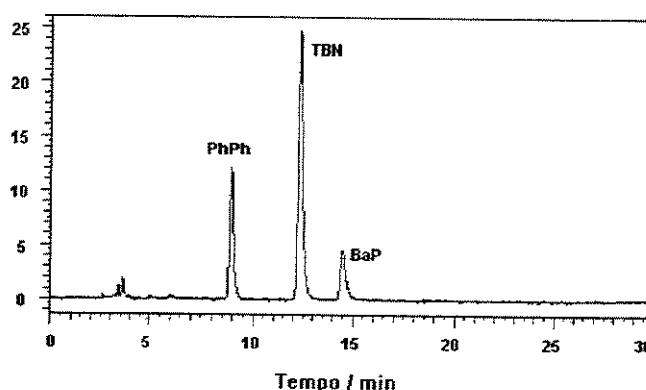


Figura 62: Cromatograma da separação da mistura teste SRM 869a composta por PhPh, TBN e BaP na coluna de 250 x 4,6 mm recheada com a fase C_{18} uréia. Condições cromatográficas: fase móvel: acetonitrila/água 85:15 v/v, vazão: $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 10 μl e temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$.

A ordem de eluição do cromatograma da figura 62 foi $PhPh < TBN < BaP$. O valor de k_{TBN} / k_{BaP} 0,8. O valor sugere que a fase C_{18} uréia é do tipo polimérica. O resultado está coerente uma vez que na preparação desta nova fase estacionária foi utilizado um agente sililante trifuncional.

As fases do tipo polimérica podem apresentar algumas vantagens quando comparadas com as monoméricas. A primeira seria uma maior estabilidade hidrolítica da sílica, aumentando a vida útil da coluna em análises que requerem o uso de fases móveis com pH superiores a 7. O alto grau de recobrimento da superfície protege o óxido inorgânico, evitando uma maior dissolução em fases móveis com pH acima de 7, quando comparada com as fases do tipo monomérica. Uma desvantagem é que a modificação química da superfície seria mais difícil de ser reproduzida, quando comparada com a síntese que utiliza os agentes sililantes monofuncionais [3].

A nova fase C₁₈ uréia também foi avaliada através da separação da mistura teste SRM 1647c composta por dezesseis diferentes hidrocarbonetos poliaromáticos, identificados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos como poluentes em efluentes aquosos [61]. A estrutura de cada um dos solutos desta mistura teste está mostrada na figura 63.

O monitoramento da concentração desses poluentes no meio ambiente é de grande interesse nos dias atuais. Sabe-se que a separação total destes dezesseis compostos só é obtida em colunas de fase reversa polimérica do tipo C₁₈ com valores de $k_{\text{TBN}} / k_{\text{BaP}} \leq 1,2$. As colunas monoméricas são incapazes de separar todos os hidrocarbonetos poliaromáticos [61].

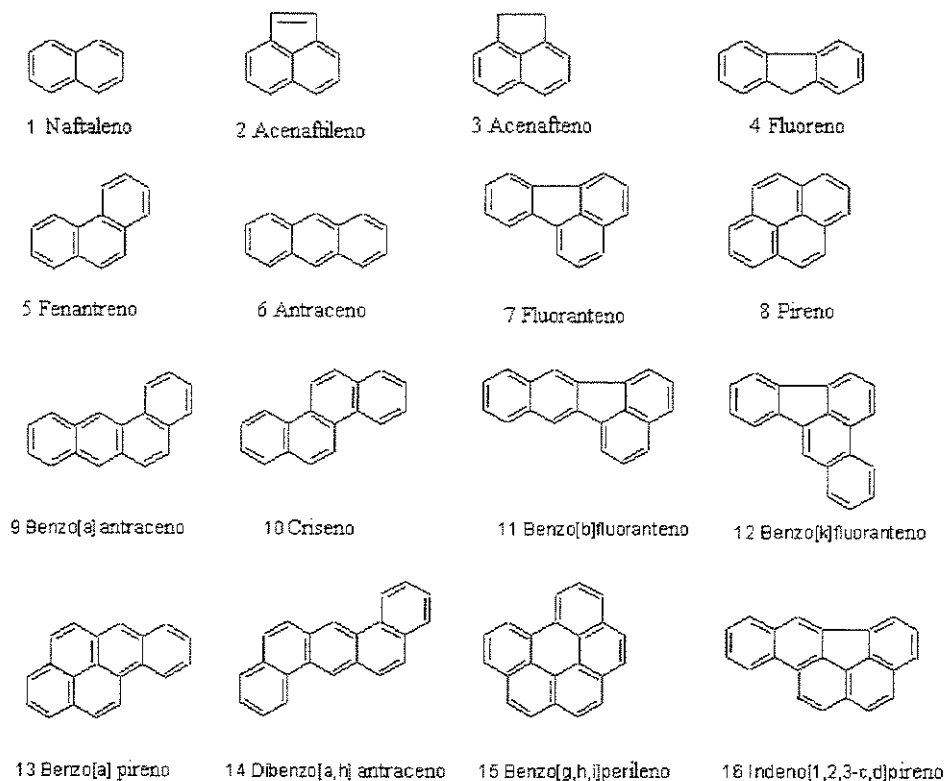


Figura 63: Estruturas dos hidrocarbonetos poliaromáticos da mistura teste SRM 1647c.

A separação desta mistura, mostrada na figura 64, foi obtida para quase todos os componentes com exceção dos compostos 9 e 10 e também os compostos 15 e 16.

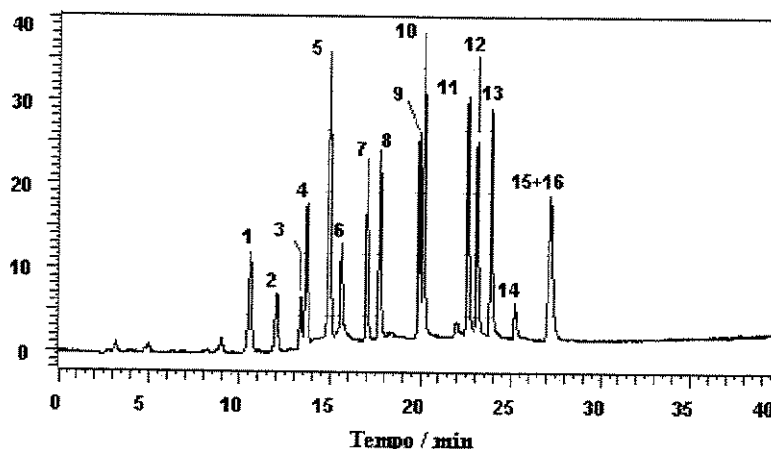


Figura 64: Cromatograma de separação dos hidrocarbonetos poliaromáticos da mistura teste SRM 1647c na coluna 250 x 4,6 mm recheada com a fase C_{18} uréia. Condições cromatográficas: eluição por gradiente com o seguinte programa: 5 min com acetonitrila/água 50:50 v/v, 15 min gradiente linear até 100 % de acetonitrila e mais 15 min mantendo a 100 % de acetonitrila, vazão: $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: $10 \text{ }\mu\text{l}$ na temperatura: $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O cromatograma da mistura SRM 1647c mostra a potencialidade da nova fase estacionária C_{18} uréia na separação desta mistura complexa de compostos orgânicos, pertencentes a uma classe importante de poluentes ambientais. Através dos resultados obtidos, é possível verificar também que a fase é do tipo polimérica, o que já havia sido determinado pela separação da mistura 869a.

4.4.2.2 Separação da mistura teste de Neue na coluna C_{18} uréia

A habilidade dos grupos polares da nova fase C_{18} uréia em enfraquecer as interações indesejáveis entre os compostos básicos e os silanóis residuais foi analisada através da separação de uma mistura teste contendo alguns compostos básicos. Sabe-se que, quando compostos básicos interagem com os silanóis residuais da superfície da sílica, o alargamento de pico é observado, diminuindo drasticamente a eficiência.

A mistura proposta por Neue et al. [13] é composta por uracil, para determinar o tempo do composto não retido, naftaleno e acenafteno como compostos hidrofóbicos, os ésteres: dibutilparabeno e ftalato de dibutila polares e amitriptilina e propranolol como moléculas básicas. Em recentes trabalhos, essa mistura foi empregada para avaliar colunas de diferentes marcas, disponíveis comercialmente [13]. A estrutura de cada um dos compostos é mostrada na figura 65.

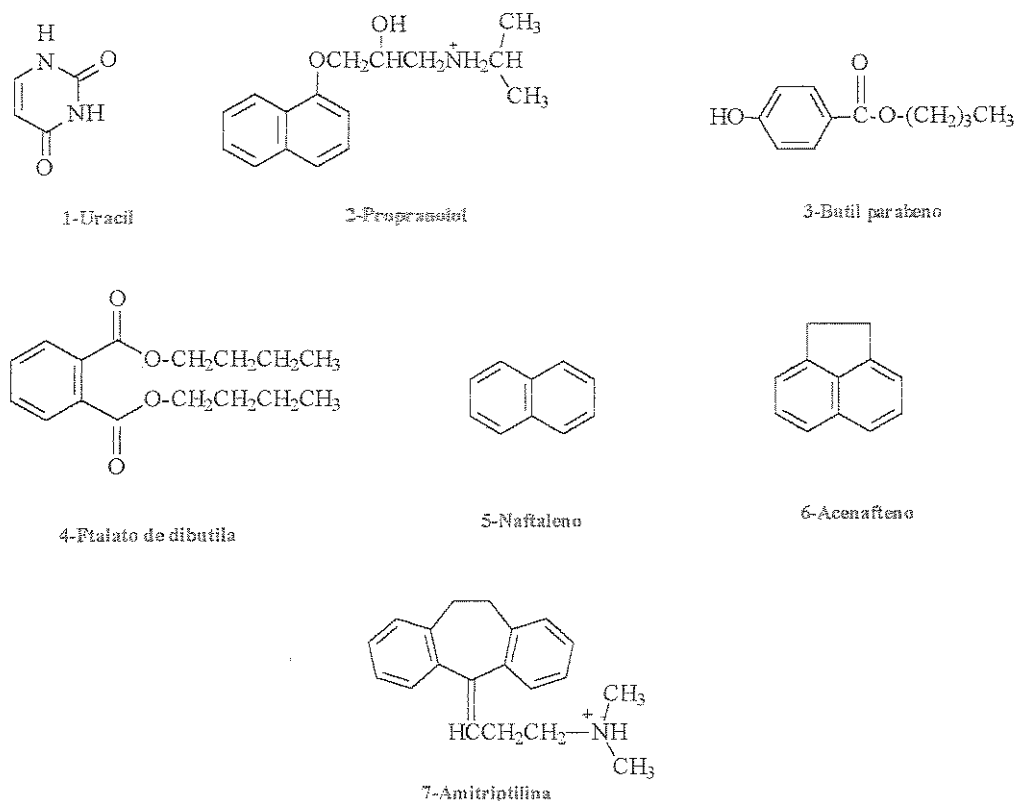


Figura 65: Estrutura dos compostos utilizados na mistura teste proposta por Neue.

Os dois compostos mais interessantes desta mistura teste são o propranolol e amitriptilina. Esses compostos são de grande interesse na indústria farmacêutica e são comumente analisados por CLAE. Entretanto, esses compostos exibem um grande alargamento de pico quando separados utilizando as colunas convencionais do tipo C_{18} .

A assimetria de pico ou a cauda resulta de uma interação indesejável entre os grupos silanóis residuais da superfície da sílica e o analito básico, que está sendo analisado. Em algumas situações esse efeito pode ser intensificado, impedindo que certos compostos sejam separados, principalmente os fármacos básicos. Em uma fase móvel tamponada com pH em torno de 7, é esperado que parte dos grupos silanóis residuais da superfície da sílica estejam desprotonados na forma $\equiv Si-O^-$. Assim na presente análise, as interações dos silanóis com os solutos básicos são maximizadas, porque a amitriptilina e o propranolol apresentam valores de pK_a acima de 9 e, em pH 7 estes compostos estão parcialmente protonados na forma BH^+ . O alargamento de pico para esses dois compostos será uma boa medida da população dos grupos silanóis na superfície destes suportes cromatográficos [46].

O cromatograma da separação desta mistura na nova coluna C_{18} uréia é mostrado na figura 66.

Com exceção da amitriptilina e do acenafeno, todos os componentes foram separados com boa eficiência e baixo alargamento de pico.

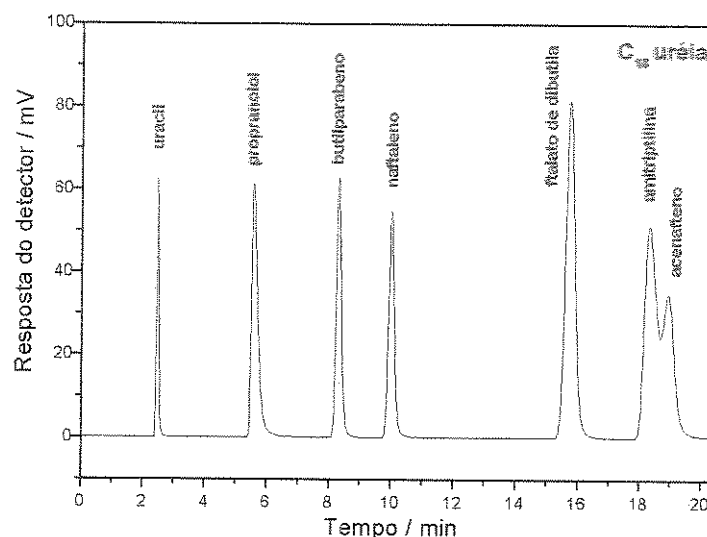


Figura 66: Cromatograma da separação da mistura teste de Neue na coluna 150 x 3,9 mm recheada com a fase C₁₈ uréia. Condições cromatográficas: fase móvel metanol/tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ 65:35 v/v a 20 mmol dm⁻³, vazão ótima: 0,6 ml min⁻¹, detecção: UV em 254 nm e volume de injeção: 5 µl.

Uma coluna com as mesmas dimensões foi recheada em nosso laboratório com uma sílica Rainin do tipo C₁₈, com tamanho de partículas esféricas de 5 µm. O intuito foi comparar a separação da mistura teste de Neue obtida na coluna comercial e na coluna recheada com a fase C₁₈ uréia sintetizada. Antes da separação da mistura de Neue, a coluna foi inicialmente avaliada através da separação da mistura teste 1, e os resultados obtidos mostraram que a coluna foi recheada com sucesso, como pode ser observado na figura 67.

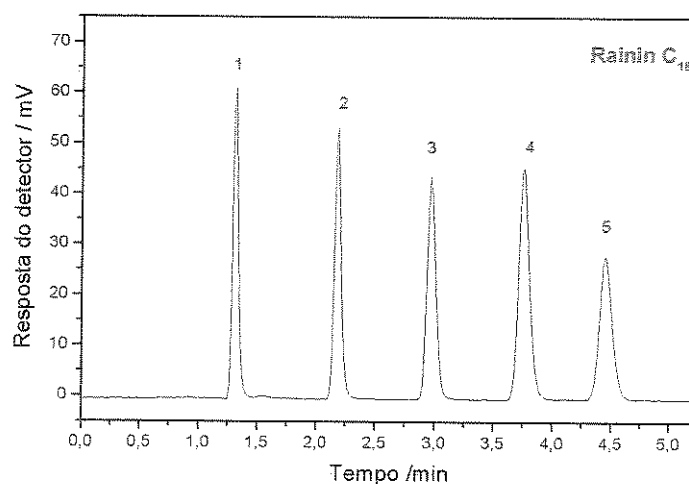


Figura 67: Cromatograma da separação da mistura teste 1 composta por uracil (1), acetofenona (2), benzeno (3), tolueno (4) e naftaleno (5) na coluna de 150 x 3,9 mm recheada com a fase comercial

Rainin C₁₈. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água 70:30 v/v, vazão: 0,8 ml min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 5 µl.

Nesta separação obteve-se uma eficiência de aproximadamente 55000 N/m e um valor para o fator de alargamento de pico do naftaleno de 1,2 que foi o composto mais retido. A vazão ótima da coluna foi determinada, obtendo-se o valor de 0,8 ml min⁻¹. O cromatograma da separação da mistura de Neue na fase comercial Rainin C₁₈ é mostrado na figura 68.

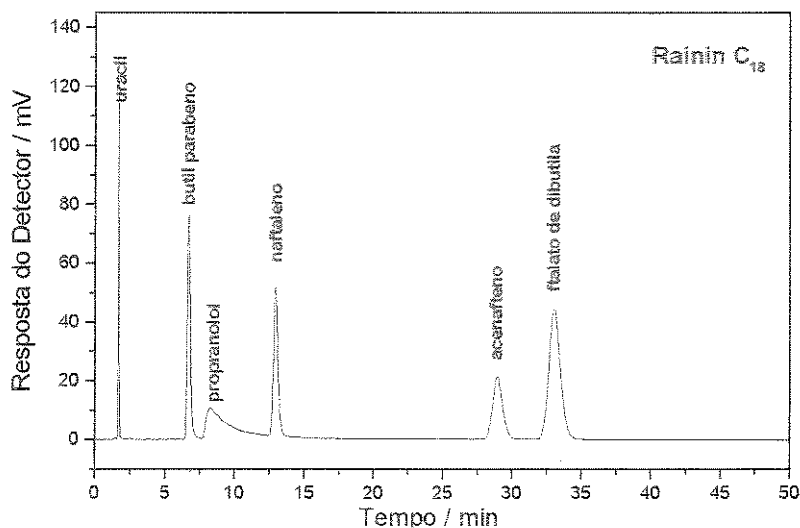


Figura 68: Cromatograma da separação da mistura teste de Neue composta por uracil, butilparabeno, propranolol, naftaleno, acenafteno e ftalato de dibutila, na coluna de 150 x 3,9 mm, recheada com a fase comercial Rainin C₁₈. Condições cromatográficas: fase móvel metanol/tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ (65:35 v/v) 20 mmol dm⁻³, vazão: 0,8 ml min⁻¹, detecção: UV em 254 nm e volume de injeção: 5 µl.

Analisando o cromatograma da figura 68, percebe-se claramente que o propranolol apresenta uma cauda bastante acentuada, provavelmente devido às interações com os grupos silanóis desta fase, fazendo com que esse composto fique mais retido nesta fase comercial. Percebe-se também que a amitriptilina ficou adsorvida irreversivelmente na coluna contendo a fase comercial C₁₈, não podendo ser eluída nestas condições.

Com esse experimento, fica claro que a presença dos grupos uréia minimizam as interações indesejáveis entre os grupos silanóis da sílica e os compostos básicos como, por exemplo, o propranolol e amitriptilina. Mais uma vez a nova fase mostrou ser bastante promissora na separação destas importantes classes de fármacos, entretanto, o mesmo comportamento não foi observado na fase Rainin C₁₈. Os parâmetros cromatográficos da separação da mistura teste de Neue na coluna recheada com a fase comercial Rainin C₁₈ e com a fase C₁₈ uréia estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros cromatográficos da separação da mistura teste de Neue nas colunas C₁₈ uréia e Rainin C₁₈.

	C ₁₈ uréia			Rainin C ₁₈		
	<i>k</i>	N/m	<i>Tf</i>	<i>k</i>	N/m	<i>Tf</i>
propranolol	1,25	24500	1,95	3,96	1240	4,44
butilparabeno	2,35	79600	1,15	3,01	34700	1,34
naftaleno	3,04	96600	1,14	6,75	54200	1,15
ftalato dibutila	5,35	87900	1,06	18,8	51600	1,13
acenafteno ^a	6,64	75300	1,12	16,34	52900	1,13
amitriptilina ^a	6,39	59500	1,80	-	-	-

^a Esses valores foram determinados através da injeção individual do referido composto.

O valor de N/m para o naftaleno para a fase C₁₈ uréia foi de 96700 e valores para o fator de alargamento de pico de 1,95 e 1,80 para o propranolol e para a amitriptilina, respectivamente. Os resultados obtidos para a nova fase C₁₈ uréia, quando comparados com as fases do tipo N-octadecil carbamato com o mesmo tamanho da cadeia carbônica, já disponíveis comercialmente, verifica-se que a fase C₁₈ uréia é mais polar por fornecer menores fatores de retenção para o naftaleno e acenafteno. Nas fases comerciais com grupos polares do tipo carbamato, a amitriptilina também é eluída antes do acenafteno [45].

Deve ser ressaltado aqui que os valores de alargamento de pico para o propranolol e a amitriptilina são relativamente maiores quando comparados com as fases reversas do tipo C₈ e C₁₈ disponíveis comercialmente contendo grupos polares do tipo carbamato [46] e amida [69].

Os valores de *Tf* para os fármacos básicos [70] reforçam a idéia de que ainda existem silanóis não bloqueados na superfície da sílica, entretanto, os valores de alargamento de pico são menores que os observados para as fases C₁₈ comerciais, mesmo àquelas baseadas em suportes livres de contaminantes metálicos [71]. O acentuado alargamento de pico e a alta retenção para o propranolol, assim como a adsorção irreversível da amitriptilina são claras indicações da alta atividade silanofílica nesta fase comercial. Provavelmente, a sílica Rainin contém um alto teor de impurezas metálicas, fazendo com que a acidez dos silanóis aumente consideravelmente.

Para verificar tal comportamento, as concentrações de alguns metais nas matrizes das sílicas Rainin e Prontosil foram determinados por absorção atômica.

Os resultados encontrados mostraram que, na sílica Rainin, a concentração de alumínio foi de $146 \mu\text{g g}^{-1}$, um valor dez vezes maior que o encontrado para a sílica Prontosil. Já o teor de ferro foi semelhante para as duas amostras de sílica, estando em torno de $15 \mu\text{g g}^{-1}$.

A alta concentração de alumínio na sílica Rainin reflete a história de síntese do referido suporte cromatográfico. É muito provável que a sílica Rainin é uma sílica do tipo A, ou seja, ela foi preparada utilizando silicato de sódio. A baixa concentração de alumínio na sílica Prontosil, sugere que a sílica é do tipo B e que foi preparada utilizando o TEOS. O alto teor de íons Al^{3+} na matriz da sílica Rainin aumenta a acidez dos silanóis consideravelmente e conseqüentemente causa o alargamento de pico para o propranolol e adsorção irreversível da amitriptilina na condição cromatográfica utilizada no teste de Neue.

4.4.2.3 Separação dos isômeros da Vitamina E na coluna C_{18} uréia

Sabendo-se que a coluna C_{18} uréia apresentava características de uma fase do tipo polimérica, resolveu então aplicar essa coluna na separação de alguns isômeros da vitamina E. Sabe-se que a vitamina E é importante devido a sua atuação como um antioxidante no organismo humano.

A aplicação desta vitamina, especialmente em combinação com a vitamina A, alguns carotenóides e a vitamina C, diminui o risco do câncer e parece retardar o crescimento de tumores cancerígenos [72]. Essas vitaminas podem ser encontradas em diferentes formas isoméricas, como mostra a figura 69.

É importante determinar qual dos isômeros da vitamina E apresenta uma maior atividade biológica e, dessa maneira, a sua separação por cromatografia líquida é de grande interesse. A separação cromatográfica dos quatro isômeros α , β , δ , e γ tocoferóis também pode ser realizada em condições normais utilizando como fase estacionária uma sílica modificada com grupos aminopropila e como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila.

A mistura destes isômeros juntamente com o acetato de α -tocoferol pode ser separada utilizando colunas do tipo C_{18} poliméricas, entretanto os melhores resultados até agora apresentados foram obtidos utilizando uma fase estacionária polimérica do tipo C_{30} [73]

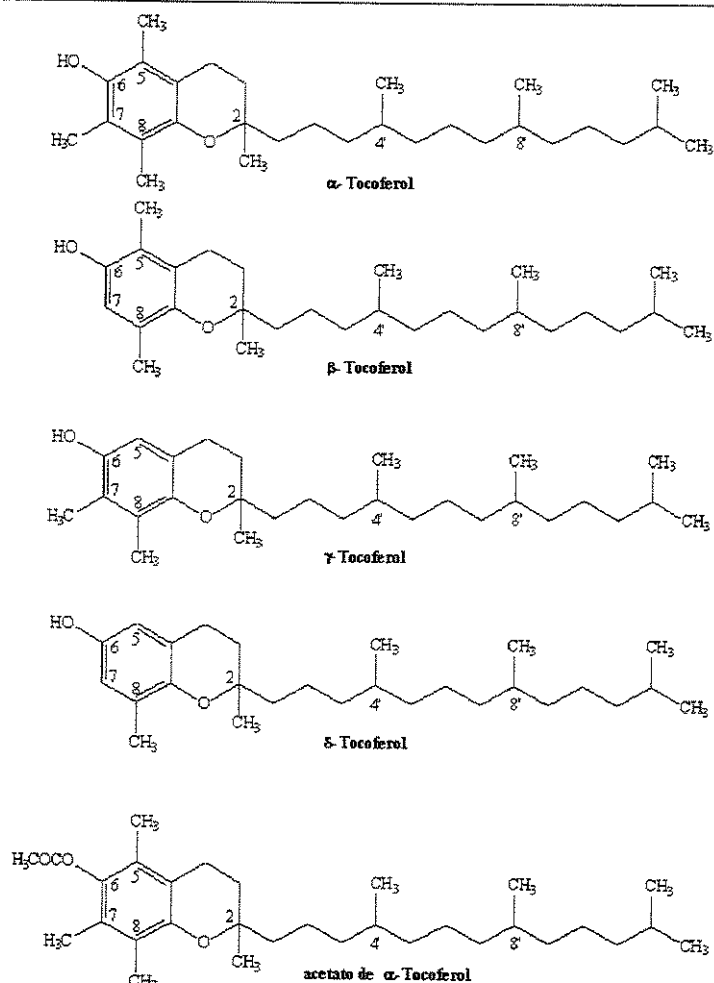


Figura 69: Estrutura dos isômeros da Vitamina E, incluindo o acetato de α -tocoferol.

Tendo em vista a importância da separação analítica destes compostos, esta foi realizada empregando a coluna C_{18} uréia, como mostra a figura 70.

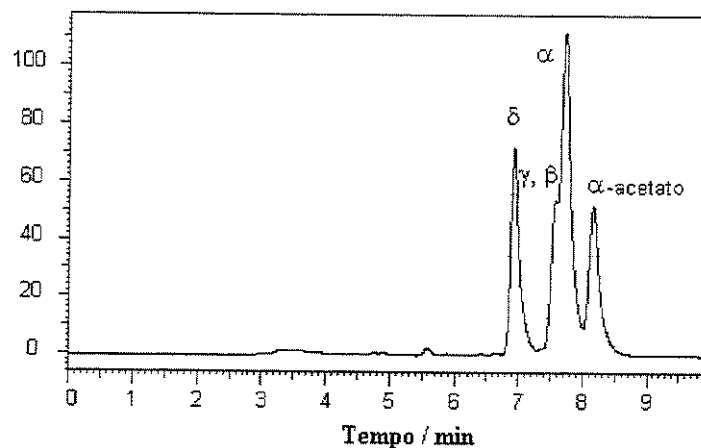


Figura 70: Separação dos isômeros da vitamina E, incluindo o acetato de α -tocoferol na coluna de 250 x 4,6 mm recheada com a fase C_{18} uréia. Condições cromatográficas: fase móvel metanol/água 80:20 v/v, vazão: $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, detecção: UV em 295 nm e volume de injeção: 10 μl .

Infelizmente a separação dos isômeros γ e β não foi obtida com sucesso, pois esses dois isômeros coeluem com o isômero α . No entanto, a coluna é adequada para a separação do acetato de α -tocoferol dos isômeros α e δ , como mostra a figura 71.

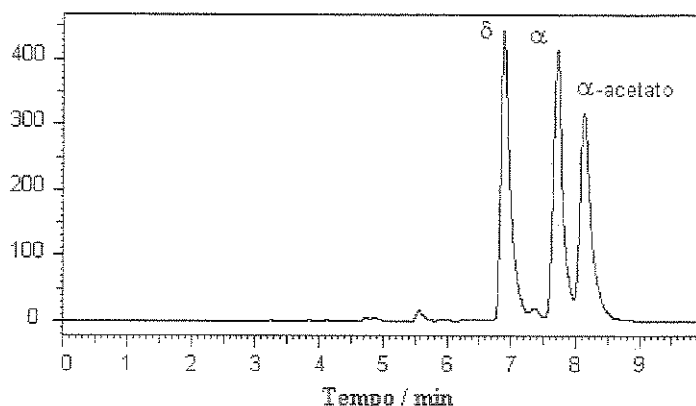


Figura 71: Cromatograma da separação de uma mistura contendo os isômeros α e δ tocoferol e o acetato de α -tocoferol na nova coluna C_{18} uréia. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 80:20, vazão: $1,0 \text{ ml min}^{-1}$, detecção: UV em 295 nm, volume de injeção: $10 \mu\text{l}$.

4.4.2.4 Separação de uma mistura de herbicidas

A análise ambiental representa, nos dias atuais, uma das maiores preocupações da comunidade científica. Dentre as técnicas mais empregadas nestas análises, destacam-se as cromatografias líquida e gasosa.

A CLAE tem-se firmado como uma técnica analítica de destaque na análise de matrizes ambientais, como águas e solos, para determinação de contaminantes orgânicos, principalmente os herbicidas.

Um dos principais fatores que favoreceu o desenvolvimento recente da CLAE foi o surgimento de novas fases estacionárias, capazes de permitir maior versatilidade à técnica, fazendo com que esta apresente inúmeras vantagens na determinação de analitos com uma ampla faixa de polaridade.

O experimento realizado consistiu na determinação de alguns herbicidas: cianazina, simazina, atrazina, ametrin, diuron e linuron, presentes em amostras ambientais de água, cujas estruturas estão apresentadas na figura 72.

Nesta separação foi utilizada uma coluna de $150 \times 3,9 \text{ mm}$, recheada com a nova fase estacionária C_{18} uréia.

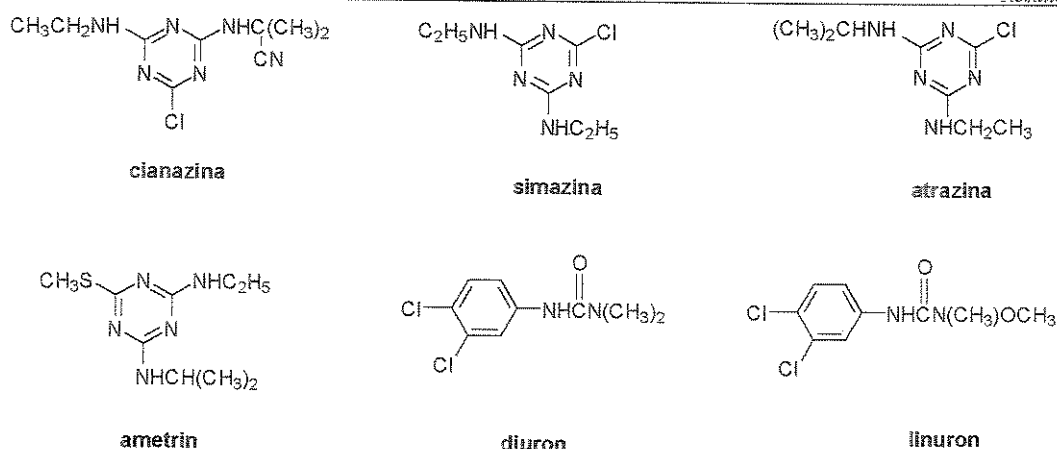


Figura 72: Estruturas dos herbicidas estudados.

A separação da mistura de herbicidas, mostrada na figura 73, indica a potencialidade da aplicação desta nova coluna na determinação destes herbicidas em amostras ambientais.

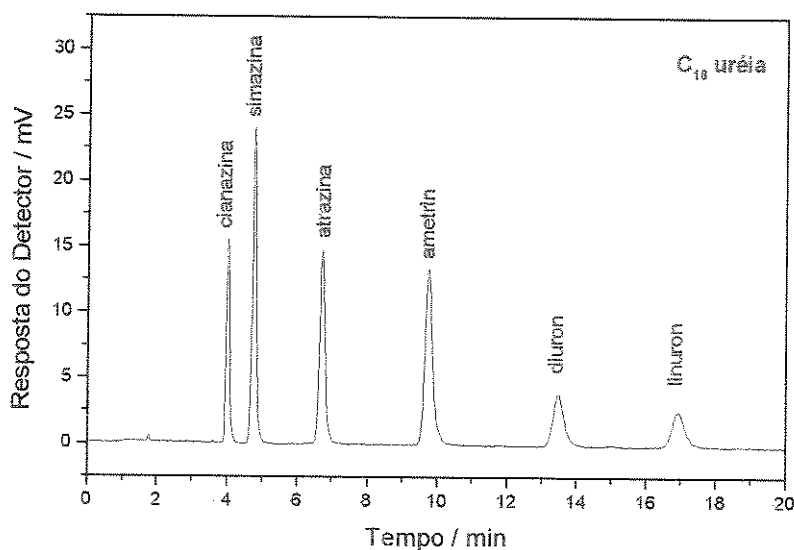


Figura 73: Cromatograma da separação da mistura de herbicidas na coluna 150 x 3,9 mm recheada com a fase C₁₈ uréia. Condições cromatográficas: fase móvel metanol / água 50:50 (v/v), vazão ótima: 0,8 ml min⁻¹, detecção: UV em 230 nm, volume de injeção: 5 µl, e temperatura ambiente.

A mesma mistura dos herbicidas também foi separada em uma coluna 150 x 3,9 mm, comercial do tipo C₁₈ da Waters (NovaPak), recheada com partículas de sílica esférica de 4 µm, com as mesmas dimensões das colunas recheadas em nosso laboratório. A separação cromatográfica dos herbicidas foi realizada empregando as mesmas condições que as utilizadas com a coluna C₁₈ uréia. O cromatograma da separação é mostrado na figura 74.

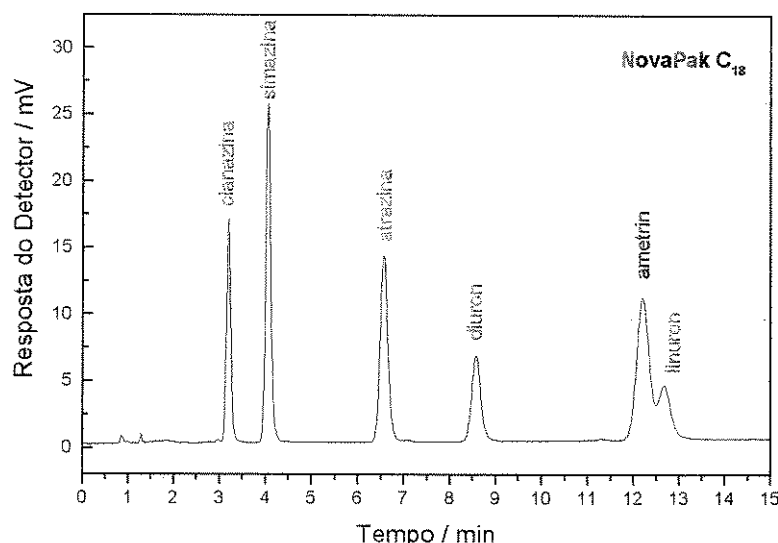


Figura 74: Cromatograma da separação da mistura de herbicidas na coluna comercial de 150 x 3,9 mm recheada com uma fase reversa do tipo C₁₈. Condições cromatográficas: fase móvel metanol/água 50:50 (v/v), vazão: 0,8 ml min⁻¹, detecção: UV em 230 nm, volume de injeção: 5 µl.

Comparando a separação obtida na coluna comercial e na coluna C₁₈ uréia, verifica-se a fase C₁₈ uréia apresenta uma seletividade bastante diferente em relação às fases convencionais do tipo C₁₈, permitindo uma boa separação desta mistura de herbicidas. Os parâmetros cromatográficos estão na tabela 7 e mostram valores menores de N/m (eficiência) para a coluna NovaPak C₁₈, quando comparado com os obtidos na coluna C₁₈ uréia.

Tabela 6: Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura de herbicidas nas colunas C₁₈ uréia e NovaPak C₁₈ com fase móvel MeOH/H₂O 50:50 v/v.

	C ₁₈ uréia			NovaPak C ₁₈		
	k	N/m	Tf	k	N/m	Tf
cianazina	1,27	55800	1,20	1,50	38600	1,15
simazina	1,69	59200	1,12	2,17	43800	1,10
atrazina	2,80	60700	1,17	4,14	49000	1,11
ametrin	4,50	67900	1,31	8,54	58300	1,62 ^a
diuron	6,61	60500	1,27	5,73	58500	0,97
linuron	8,56	68300	1,24	8,95	46300	1,32

^a Valor determinado pela injeção individual do ametrin.

Na separação dos herbicidas na coluna C_{18} uréia, os valores de eficiência variaram de 68300 para o linuron, o composto mais retido até 55700 para a cianazina, que foi o composto menos retido. Os maiores valores de alargamento de pico foram observados para o ametrin e o diuron, cujos valores foram em torno de 1,3. Já a separação realizada na coluna comercial NovaPak, os valores de eficiência, expressos por N/m , foram relativamente menores, e o valor de T_f para o ametrin foi maior.

De acordo com a estrutura do ametrin, mostrada na figura 72, a presença do grupo $-SCH_3$ faz com que esse composto seja mais básico que as outras triazinas. Dessa forma a alta retenção e o alargamento de pico observado para o ametrin na coluna comercial NovaPak C_{18} deve ser atribuído às interações com os silanóis residuais desta fase. Na prática, para solucionar a coeluição do ametrin com o linuron, o pH da fase móvel é ajustado para o valor 4,0 com ácido fosfórico, fazendo com que ametrin fique menos retido, minimizando o alargamento de pico [74].

A principal vantagem da nova fase C_{18} uréia, em relação à fase comercial C_{18} na separação destes herbicidas, reside no fato que a separação dos herbicidas pode ser realizada sem ajuste de pH, o que permite um maior tempo de vida da fase estacionária, além de ser mais viável em análise de rotina. Além disso a nova fase desenvolvida em nosso laboratório apresenta diferente seletividade (ametrin e linuron sobrepõem-se na coluna comercial), uma melhor eficiência na separação dos herbicidas, incluindo os básicos, com menor assimetria para o ametrin.

4.2.3 Avaliações Cromatográficas das fases C_{18} dimetil e diisopropil uréia

Inicialmente, as colunas cromatográficas de 50 mm de comprimento por 3,9 mm de diâmetro interno foram recheadas com as fases C_{18} dimetil e diisopropil uréia. As colunas de menores comprimentos foram escolhidas ao invés das colunas de 150 mm que estavam sendo utilizadas com o propósito de minimizar a quantidade de sílica modificada necessária para o enchimento das colunas, assim como o tempo de análise durante a separação cromatográfica. Após o enchimento, as colunas foram inicialmente avaliadas utilizando a mistura teste 1.

Os cromatogramas obtidos com as colunas C_{18} dimetil e diisopropil uréia estão mostrados na figura 75. Todos os componentes foram separados com sucesso em ambas as colunas, após o ajuste da composição da fase móvel acetonitrila e água. Para a fase C_{18} diisopropil uréia, a quantidade de acetonitrila na fase móvel teve que ser diminuída, indicando uma menor hidrofobicidade devido ao baixo recobrimento da superfície de $1,87 \mu\text{mol m}^{-2}$

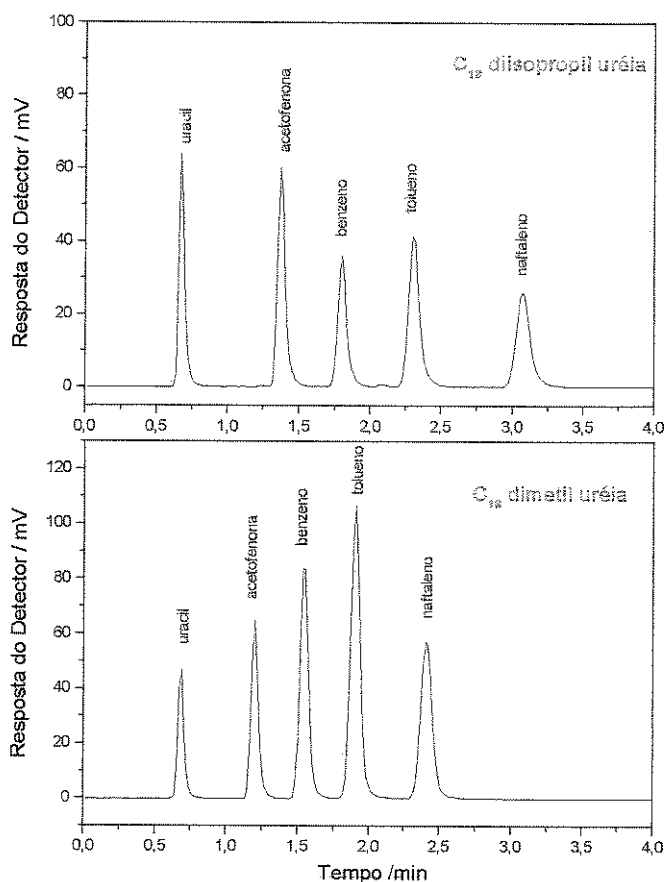


Figura 75: Cromatogramas da separação da mistura teste 1 nas colunas de 50 x 3,9 mm recheadas com as fases C₁₈ dimetil e diisopropil uréia. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila/água 60:40 v/v para C₁₈ dimetil uréia e 50:50 v/v para C₁₈ diisopropil uréia, vazão ótima: 0,8 ml min⁻¹, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 5 µl.

Para os cromatogramas da figura 75, a eficiência, expressa em pratos por metro (N/m), fator de retenção (*k*) e o fator de alargamento de pico (*Tf*) foram calculados para cada um dos solutos e estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7: Parâmetros cromatográficos calculados para as novas fases monoméricas.

	C ₁₈ dimetil			C ₁₈ diisopropil		
	<i>k</i>	<i>N/m</i>	<i>Tf</i>	<i>k</i>	<i>N/m</i>	<i>Tf</i>
acetofenona	0,76	55900	1,19	1,04	58800	1,36
benzeno	1,26	61700	1,28	1,68	65800	1,22
tolueno	1,79	76200	1,15	2,44	73400	1,25
naftaleno	2,53	82200	1,20	3,58	77200	1,20

Analisando os valores mostrados na tabela 7, pode-se concluir que as colunas foram recheadas com sucesso, obtendo-se valores de N/m para o naftaleno de 82200 e 77200 para as colunas C_{18} dimetil e diisopropil uréia, respectivamente, e um valor alargamento de pico de 1,20 para ambas colunas.

Para determinar qual a vazão, em que a eficiência destas colunas seria máxima, amostras da mistura teste 1 foram analisadas em diferentes vazões da fase móvel, que variaram de 0,2 até 1,5 ml min^{-1} . A figura 76 mostra as curvas obtidas para duas colunas recheadas com as novas fases monoméricas.

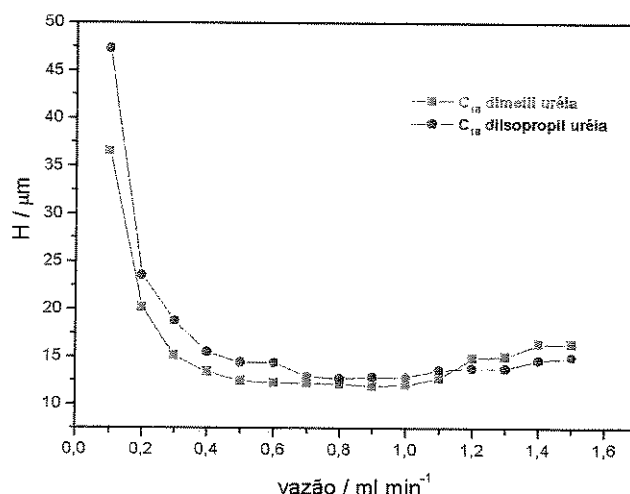


Figura 76: Gráficos da altura de prato (N/L) para o naftaleno em diferentes vazões de fase móvel nas colunas C_{18} dimetil e diisopropil uréia. Na separação realizada na coluna C_{18} dimetil uréia a fase móvel era composta por acetonitrila:água 60:40 v/v, enquanto para a fase C_{18} diisopropil uréia a composição era 50:50 v/v.

As curvas mostradas na figura 76 mostram que a eficiência é máxima, quando o valor de H é mínimo, na vazão de 0,8 ml min^{-1} para as duas colunas C_{18} dimetil e diisopropil uréia.

4.2.3.1 Separação da mistura teste de Neue

A segunda mistura empregada foi a mistura teste de Neue [13]. A separação dos componentes desta mistura, empregando uma fase móvel tamponada a pH 7,00, permite avaliar a atividade dos grupos silanóis residuais nas respectivas fases estacionárias monoméricas. Pelo fato de estar utilizando uma coluna cromatográfica de menor comprimento, nem todos os componentes da mistura teste de Neue puderam ser escolhidos. Foram selecionados: uracil para determinar o tempo de retenção do composto não retido, naftaleno como composto apolar, ftalato de dibutila e dipropila como compostos polares e amitriptilina e propranolol como moléculas básicas.

Os cromatogramas da separação dos componentes da mistura teste de Neue, utilizando as fases C_{18} dimetil e diisopropil uréia são mostrados na figura 77. Percebe-se claramente que na coluna C_{18} dimetil uréia os compostos foram separados com sucesso, com boa eficiência e baixo alargamento de pico para os analitos básicos. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado para a fase C_{18} diisopropil uréia onde o naftaleno e o ftalato de dipropila não foram bem separados, além da alta assimetria para a amitriptilina e o propranolol.

Para obter uma melhor separação na fase C_{18} diisopropil uréia, a proporção do metanol na fase móvel tamponada foi ajustada para 55:45 v/v. O novo cromatograma obtido está apresentado na figura 78.

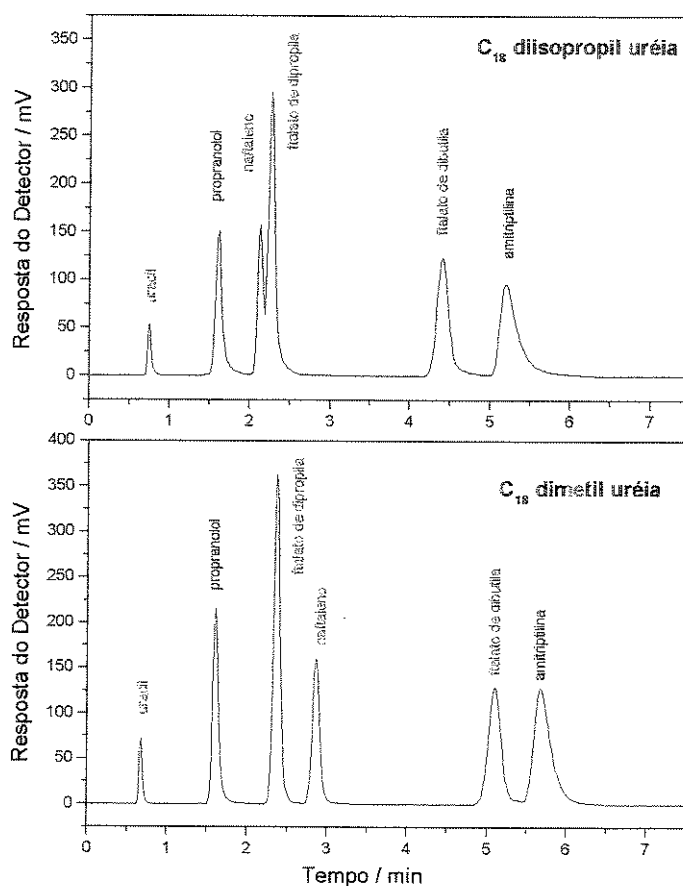


Figura 77: Cromatogramas da separação da mistura teste de Neue nas colunas de 50 x 3,9 mm, recheadas com as fases C_{18} dimetil e diisopropil uréia. Condições cromatográficas: fase móvel metanol/tampão KH_2PO_4/K_2HPO_4 65:35 v/v a 20 mmol dm^{-3} , vazão ótima: 0,8 $ml\ min^{-1}$, detecção: UV em 254 nm e volume de injeção: 5 μl .

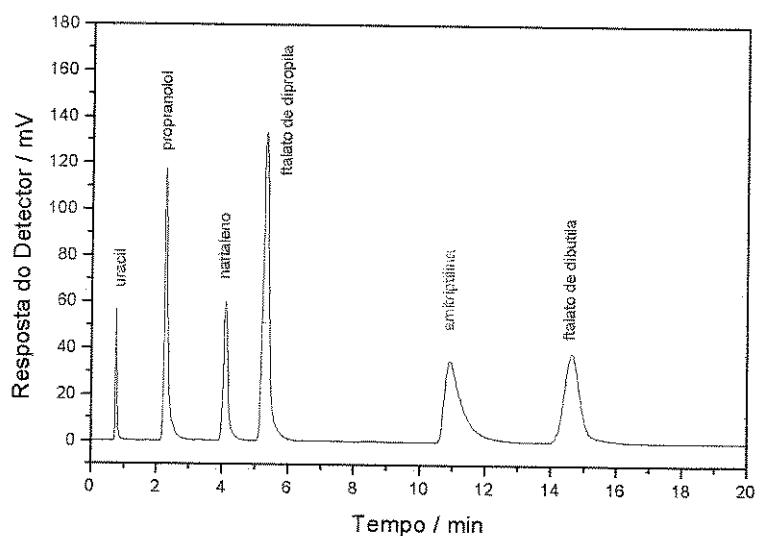


Figura 78: Cromatograma da separação da mistura teste de Neue na coluna C_{18} diisopropil uréia. Condições cromatográficas: fase móvel metanol/tampão KH_2PO_4/K_2HPO_4 55:45 v/v a 20 mmol dm^{-3} , vazão ótima: 0,8 $ml\ min^{-1}$, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 5 μl .

Analisando o cromatograma da figura 78, verifica-se que os compostos básicos apresentam uma alta assimetria, indicando que existe uma quantidade considerável de grupos silanóis residuais na fase C_{18} diisopropil uréia. A amitriptilina, nas novas condições cromatográficas de separação é eluída antes do fitalato de dibutila. Tal comportamento não era esperado, uma vez que compostos mais hidrofóbicos, tendem a ficar mais tempo retidos na coluna com a diminuição da concentração do modificador orgânico na fase móvel.

Entretanto, deve-se lembrar que parte das moléculas da amitriptilina podem estar na forma protonada BH^+ . Com a diminuição da concentração do metanol na fase móvel, o valor do pK_a para esta substância possivelmente foi alterado e como resultado tem-se uma maior fração de moléculas de amitriptilina na forma protonada. Com isso, a amitriptilina fica menos tempo retida na coluna, entretanto o alargamento de pico é ainda mais expressivo devido às interações iônicas das moléculas carregadas positivamente com os grupos silanóis, que em pH 7,0, devem estar carregados negativamente, $\equiv Si-O^-$.

A Tabela 8 apresenta os valores dos parâmetros cromatográficos calculados para os cromatogramas das figuras 77 e 78. De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a fase C_{18} diisopropil uréia não foi muito eficiente na separação dos compostos básicos em uma fase móvel tamponada a pH 7,0.

Tabela 8: Parâmetros cromatográficos calculados para a separação da mistura teste de Neue nas fases C₁₈ dimetil e diisopropil uréia.

C ₁₈ dimetil uréia				C ₁₈ diisopropil uréia		
	k	N/m	Tf	k	N/m	Tf
propranolol	1,48	48600	1,47	1,18 (2,05) ^a	35000 (42700)	1,44 (1,99)
ftalato de propila	2,68	79700	1,12	2,07 (6,05)	60200 (76200)	1,41 (1,39)
naftaleno	3,44	95000	1,07	1,88 (4,45)	67400 (83300)	- (1,35)
ftalato de butila	7,05	91300	1,02	4,95 (18,3)	72500 (80700)	1,32 (1,31)
amitriptilina	8,03	66800	1,59	6,03 (13,5)	48600 (43000)	2,12 (2,67)

^a* Os valores em parênteses são os parâmetros obtidos usando a fase móvel metanol/ tampão KH₂PO₄/K₂HPO₄ na concentração de 20,0 mmol dm⁻³ na proporção de 55:45 v/v.

A explicação para os menores fatores de retenção para quase todos os compostos da mistura e fatores de alargamento de pico bem maiores, quando comparados com os obtidos para a fase monomérica C₁₈ dimetil uréia, está no baixo recobrimento da superfície da sílica durante a imobilização, deixando um número considerável de grupos silanóis residuais, mesmo após a etapa da reação de capeamento.

O objetivo principal da síntese da fase estericamente protegida com os grupos isopropila era aumentar a estabilidade hidrolítica do suporte de sílica, que possivelmente é reduzida na presença dos grupos polares. Entretanto, a partir dos resultados experimentais obtidos, o uso deste tipo de fase estacionária para a separação de compostos básicos não é recomendado devido ao alto alargamento de pico observado.

A partir desse resultado, pode-se concluir também que a habilidade inerente dos grupos polares do tipo uréia em minimizar as interações indesejáveis entre os silanóis residuais e os analitos básicos, que causam o alargamento de pico, é bastante afetada pelo baixo recobrimento da superfície.

Por outro lado, resultados bastante promissores foram obtidos com a fase C₁₈ dimetil uréia principalmente quando comparados com os da fase polimérica C₁₈ uréia, que foi preparada utilizando o mesma sílica cromatográfica. Os valores de alargamento de pico para as amostras básicas, incluindo o propranolol e amitriptilina foram bem menores que os obtidos na coluna C₁₈ uréia. Os valores de eficiência, quando comparados com os obtidos na fase C₁₈ uréia, foram relativamente maiores para esses dois analitos básicos.

A melhor eficiência cromatográfica da fase monomérica em relação à fase polimérica pode ser atribuída a dois fatores. O primeiro estaria relacionado ao alto recobrimento da superfície e o segundo seria a vantagem em utilizar o agente sililante monofuncional na primeira etapa da modificação química, que permite uma única forma de ligação química com a superfície da sílica, além de evitar a formação de grupos silanóis adicionais após a hidrólise.

4.5 Testes de Estabilidade

4.5.1 Testes de Estabilidade para a fase C_{18} uréia

Uma coluna de dimensões de 50 x 3.9 mm foi recheada com a fase C_{18} uréia e a seguir fez-se o teste de estabilidade. Foi escolhida uma coluna de comprimento menor porque ela apresenta algumas vantagens, principalmente quanto a menor quantidade de fase estacionária requerida no enchimento, e o menor tempo de análise, que é imprescindível no teste de estabilidade.

Inicialmente, a coluna foi avaliada cromatograficamente através da separação da mistura teste 1. Neste teste, foi obtida uma eficiência de aproximadamente 70000 N/m e um valor para o fator de alargamento de pico de 1,1 para o naftaleno, que foi o composto mais retido. Para determinar a vazão onde a eficiência desta coluna seria máxima, injetou-se a mistura teste 1 em diferentes vazões, obtendo-se o valor de 0,4 ml min⁻¹.

Determinada a vazão, as avaliações cromatográficas foram realizadas nesta vazão, empregando a mistura teste de Neue. A coluna foi testada periodicamente após a passagem de um volume conhecido de fase móvel, composta de metanol/ tampão KH_2PO_4/K_2HPO_4 20 mmol dm⁻³, pH = 7,0, na proporção de 65:35 (v/v), a qual era bombeada através da coluna a uma vazão de 0,8 ml min⁻¹. Essa fase móvel foi escolhida pois sabe-se que os tampões fosfatos são muito mais agressivos ao suporte de sílica, quando comparado com os outros tampões como, por exemplo, o citrato e o TRIS [48].

Os parâmetros cromatográficos, a eficiência expressa por N/m, o fator de retenção, k , e fator de alargamento de pico, T_f , foram utilizados para monitorar o comportamento da coluna durante o teste de estabilidade. Dos componentes da mistura teste de Neue foram escolhidos apenas a uracil (para determinar o tempo de retenção do composto não retido), o propranolol (fármaco básico), o naftaleno (hidrocarboneto aromático), a amitriptilina (fármaco básico) e o ftalato de dibutila (éster).

O comportamento do naftaleno durante o teste cromatográfico pode trazer informações sobre a hidrofobicidade da fase estacionária que está sendo testada, assim como o ftalato de dibutila. Já a amitriptilina e o propranolol, conhecidos por apresentarem bastante cauda devido às interações com os

silanóis da sílica, pode fornecer informações sobre a população de grupos silanóis presentes na superfície da sílica. Como discutido anteriormente, o fato de se utilizar uma fase móvel tamponada a $\text{pH} = 7,0$ faz com que as interações dos silanóis com esses dois analitos sejam maximizadas [13]. Os resultados obtidos no teste de estabilidade para a coluna C_{18} uréia estão apresentados na figura 79.

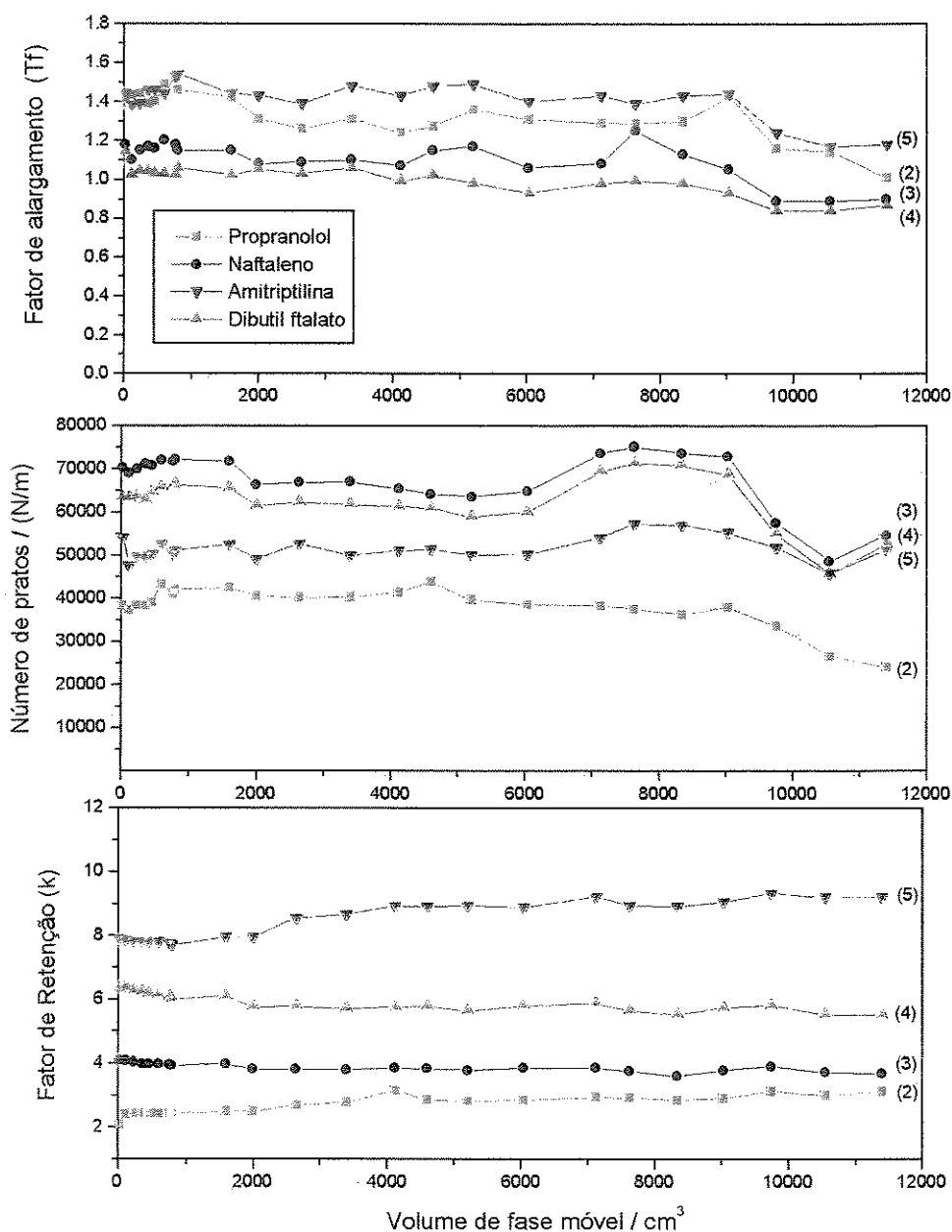


Figura 79: Parâmetros cromatográficos calculados durante o teste de estabilidade a $\text{pH} 7$ para a fase C_{18} uréia. Coluna: 50×3.9 mm, fase móvel: metanol/ tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) 20 mmol dm^{-3} , na proporção de 65:35 (v/v). Teste cromatográfico: uracil (1), propranolol (2), naftaleno (3), ftalato de dibutila (4) e amitriptilina (5), fase móvel a vazão de $0,4 \text{ ml min}^{-1}$, detecção em 254 nm e volume de injeção de $5 \mu\text{l}$.

Através da análise da figura 79, verifica-se que os fatores de retenção para os compostos escolhidos para o teste de estabilidade praticamente permaneceram inalterados até a passagem de aproximadamente 11500 cm³ de fase móvel, o que corresponde a aproximadamente um mês de trabalho contínuo com a coluna. Percebe-se um pequeno aumento nos fatores de retenção principalmente para a amitriptilina, o que poderia ser um indício da degradação da fase estacionária. Conseqüentemente, ocorreu um aumento no número de silanóis residuais, devido ao acréscimo das interações destes grupos com o analito básico, fazendo com que este ficasse mais retido na coluna.

Entretanto, o fator de retenção não é um parâmetro cromatográfico adequado para verificar possíveis degradações no leito cromatográfico. Para este fim é melhor analisar os valores de eficiência, que diminuíram somente após a passagem de aproximadamente 9500 cm³ de fase móvel, como mostra a figura 79.

Outro fato interessante é que, por volta de 8000 cm³, foi observado um considerável aumento nos valores de N/m para o naftaleno e o ftalato de dibutila em relação aos valores obtidos no início do teste de estabilidade, que estavam em torno de 70000 N/m. Logo em seguida, esses valores começaram a declinar, indicando uma possível mudança no leito da coluna, possivelmente causada pela dissolução da sílica.

Para os valores de alargamento de pico, observou-se que, após a passagem de 9500 cm³ de fase móvel, verifica-se uma diminuição no alargamento de pico para todos os componentes da mistura teste, como mostra a figura 79.

Essa diminuição deve-se a uma cauda frontal que, segundo a literatura [3], indica que houve perda da fase estacionária, provavelmente pela dissolução da sílica, fazendo com que pequenos buracos sejam formados no leito da coluna.

Para melhor visualizar a degradação causada pela passagem da fase móvel pela coluna, a figura 80 mostra os cromatogramas da separação da mistura teste empregada obtidos antes e após o teste de estabilidade.

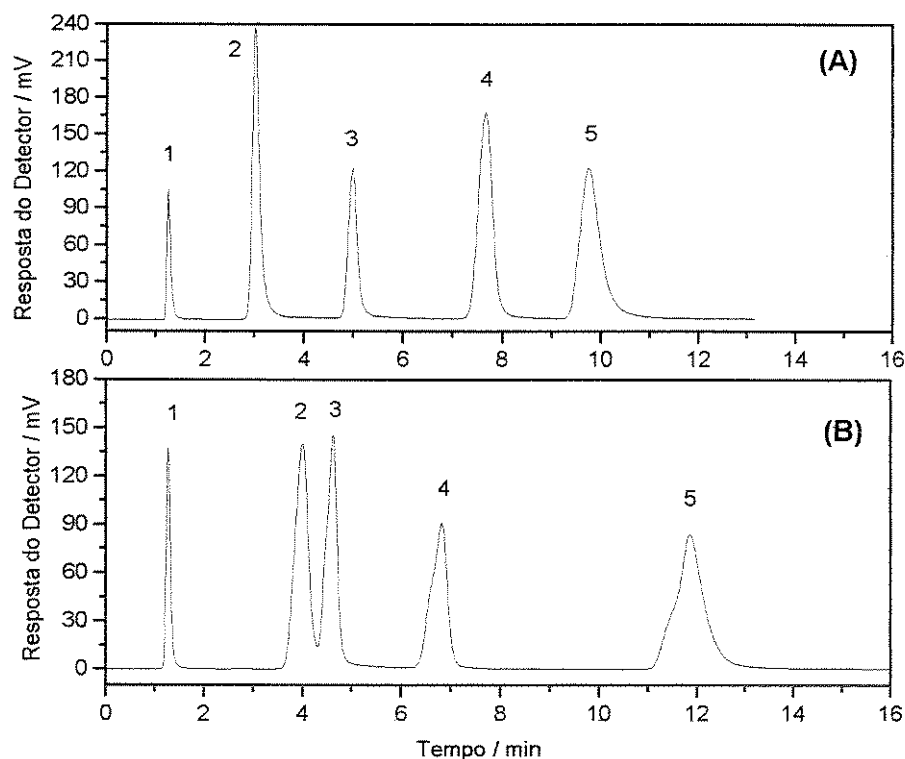


Figura 80: Cromatogramas da separação da mistura teste (1) uracil, (2) propranolol, (3) naftaleno, (4) ftalato de dibutila e (5) amitriptilina no início (A) e no final do teste de estabilidade (B). Condições cromatográficas: coluna 50 x 3,9 mm recheada com a fase C_{18} uréia, fase móvel metanol/tampão KH_2PO_4/K_2HPO_4 20,0 mmol dm^{-3} pH = 7,0, vazão ótima: 0,4 ml min^{-1} , detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 5 μ l.

Pode-se constatar que após a passagem de aproximadamente 11500 cm^3 de fase móvel pela coluna C_{18} uréia, os compostos 2 e 3, ou seja, o propranolol e o naftaleno que no início do teste estavam bem resolvidos, passaram a ter tempos de retenção bastante próximos, dificultando a separação. O tempo de retenção do naftaleno diminuiu, enquanto o do propranolol aumentou, fazendo com que esses dois picos apresentassem uma baixa resolução. A amitriptilina teve o seu tempo de retenção aumentado, além do fato que no final do teste, observou-se um alargamento frontal, bastante acentuado, para este composto.

Para o ftalato de dibutila também foi observada essa cauda frontal, assim como uma diminuição significativa no seu tempo de retenção, quando comparado ao cromatograma obtido no início do teste de estabilidade. Concluindo, verifica-se que, para os compostos apolares, o tempo de retenção diminuiu, enquanto que para os compostos básicos, esses passaram a ficar mais retidos na coluna. Isso é uma clara indicação da degradação da fase estacionária, que começou a sofrer hidrólise, perdendo a

parte orgânica, evidenciada pela diminuição do tempo de retenção para o naftaleno e com isso novos silanóis residuais são formados na superfície da sílica, aumentando assim a retenção, principalmente da amitriptilina.

Contudo, os resultados foram satisfatórios para a fase estacionária desenvolvida em nosso laboratório, uma vez que foi utilizado uma fase móvel agressiva, devido à presença do tampão fosfato, que é conhecido por acelerar a hidrólise e dissolução da sílica, quando comparado a outros tampões e outras fases móveis preparadas apenas com água e o modificador orgânico. Além disso, o teste de estabilidade aqui empregado utilizou compostos extremamente básicos, sendo o propranolol e a amitriptilina bastante sensíveis à presença de silanóis residuais na superfície da sílica.

É difícil comparar o resultado obtido neste teste com os estudos de estabilidade para fases convencionais e para as fases contendo grupos polares, utilizando fases móveis com tampão fosfato em pH 7, pois neste último caso foram utilizadas condições mais agressivas, uma vez que se empregou uma concentração de tampão bem maior e temperaturas acima da temperatura ambiente. Por exemplo, em um estudo sistemático, a fase Supercolsil ABZ+ foi avaliada, e observou uma degradação significativa após a passagem de 200 volumes de coluna, utilizando uma fase móvel composta por acetonitrila e tampão fosfato na concentração de $0,25 \text{ mol dm}^{-3}$, na proporção de 20:80 v/v e na temperatura de 60°C . Os analitos escolhidos para a avaliação foram uma mistura de antidepressivos cíclicos, incluindo a amitriptilina como molécula sonda [48].

Sabendo-se que as fases estacionárias, contendo grupos polares embutidos (ou inseridos) podem apresentar um maior grau de hidratação devido à habilidade dos grupos polares de manter ligações de hidrogênio com as moléculas de água, é provável que a superfície da sílica esteja mais susceptível às interações com os ânions fosfatos da fase móvel. Como consequência, a hidrólise das ligações siloxanos pode ser facilitada, aumentando a solubilidade da sílica. Por razões práticas, para aumentar o tempo de vida útil das fases estacionárias contendo grupos polares embutidos, deve ser evitado o uso de tampões como o fosfato.

4.5.2 Teste de estabilidade para a fase C_{18} dimetil uréia

Devido ao alto alargamento de pico e à baixa eficiência da coluna C_{18} diisopropil uréia, tanto para os compostos apolares como polares, durante os testes cromatográficos iniciais, decidiu-se não realizar esse teste de estabilidade para esta fase estacionária.

O teste de estabilidade para a fase C_{18} dimetil uréia foi realizado nas mesmas condições empregadas para a fase trifuncional C_{18} uréia, com exceção da mistura teste empregada para a avaliação cromatográfica, que continha seis componentes.

Os parâmetros cromatográficos, obtidos durante o teste de estabilidade foram calculados e estão apresentados na figura 81.

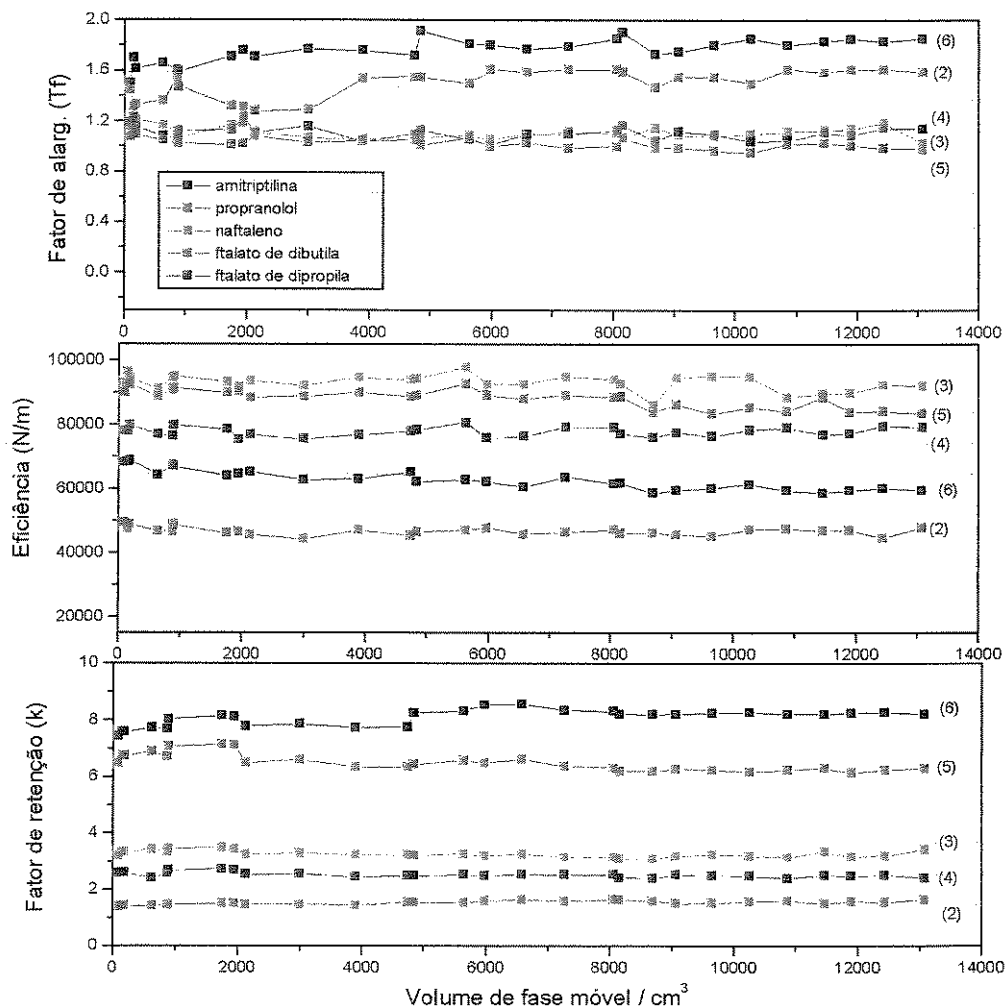


Figura 81: Parâmetros cromatográficos calculados durante o teste de estabilidade em fase tamponada em pH 7,0 na temperatura ambiente com a coluna C_{18} dimetil uréia empregando uma mistura composta por: uracil (1), propranolol (2), naftaleno (3), ftalato de propila (4), ftalato de dibutila (5) e amitriptilina (6). Condições cromatográficas: fase móvel metanol / tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (65:35 v/v) 20 mmol dm^{-3} , vazão: $0,8 \text{ ml min}^{-1}$, detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 5 μl .

Analisando os resultados da figura 81, nota-se que o fator de retenção permaneceu praticamente inalterado durante o teste de estabilidade. Apenas para a amitriptilina, percebeu-se um ligeiro aumento

no fator de retenção, o que deve estar relacionado a um acréscimo na população dos grupos silanóis na fase estacionária. Os valores de eficiência também se mantiveram constante durante o teste cromatográfico, mesmo com a passagem de 13000 cm³ de fase móvel tamponada, o que corresponde a aproximadamente 20000 volumes de coluna. Os valores de alargamento de pico ficaram constantes para o naftaleno e os ésteres, enquanto que para as moléculas básicas, propranolol e amitriptilina, esses valores foram ligeiramente maiores no final do teste cromatográfico. Os resultados foram bastantes satisfatórios quando comparados com os resultados obtidos no teste de estabilidade para fase trifuncional C₁₈ uréia, cujos valores de eficiência começaram a declinar após a passagem 9500 cm³ de fase móvel tamponada, indicando a degradação da coluna, enquanto que para a coluna C₁₈ dimetil uréia nenhuma mudança significativa nos parâmetros cromatográficos foi observada após a passagem do mesmo volume de fase móvel.

Para melhor visualizar o comportamento da coluna C₁₈ dimetil uréia, a figura 82 mostra os cromatogramas da separação da mistura teste no início do teste de estabilidade e após a passagem de aproximadamente 13000 cm³ de fase móvel.

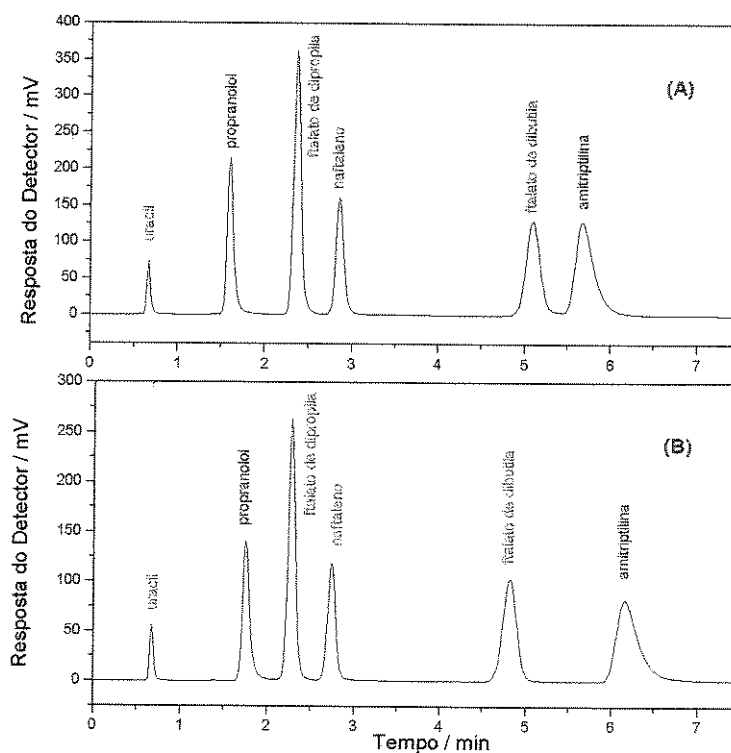


Figura 82: Cromatogramas da separação da mistura teste de Neue no início (A) e no final do teste de estabilidade (B), após a passagem de aproximadamente 13000 cm³ de fase móvel. Condições cromatográficas: coluna 50 x 3,9 mm recheada com a fase C₁₈ dimetil uréia, fase móvel:

metanol/tampão $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 20,0 mmol dm^{-3} pH = 7,0, vazão ótima: 0,8 ml min^{-1} , detecção: UV em 254 nm, volume de injeção: 5 μl .

Pode-se constatar que mesmo após a passagem de 13000 cm^3 de fase móvel, a coluna ainda apresentou boa eficiência na separação de todos os compostos. O tempo de retenção da amitriptilina foi ligeiramente maior, assim como o alargamento de pico, indicando uma maior população de grupos silanóis, o que não inviabiliza a utilização da coluna por um tempo mais longo. Com esse experimento fica evidente que a fase C_{18} dimetil uréia apresenta uma vida útil bem maior em relação à fase trifuncional C_{18} uréia.

5. Conclusões

O método de preparação dos novos agentes sililantes trifuncionais ou monofuncionais, desenvolvido neste trabalho de pesquisa, permitiu que diferentes fases estacionárias fossem preparadas, utilizando esses novos agentes sililantes, contendo grupos polares do tipo uréia, inseridos na cadeia orgânica, de diferentes tamanhos variando desde C_3 até C_{18} .

As fases obtidas são bastante promissoras, principalmente aquelas em que se utilizou, como suporte cromatográfico, a sílica esférica de tamanho de partícula de 3,0 μm .

A fase C_{18} uréia mostrou ser promissora na separação de diferentes misturas teste incluindo os hidrocarbonetos poliaromáticos e os herbicidas. No teste de estabilidade com uma coluna de menor de dimensões de 50 x 3,9 mm, recheada com a fase C_{18} uréia, verificou que a coluna pode ser utilizada por um longo período sem que a sua eficiência seja comprometida, apresentando um bom desempenho cromatográfico, inclusive para compostos básicos como a amitriptilina e o propranolol.

Também foram preparadas duas novas fases estacionárias monoméricas: C_{18} dimetil uréia e C_{18} diisopropil uréia, utilizando os alcoxissilanos monofuncionais recentemente preparados em nosso laboratório seguindo uma rota similar àquela utilizada na preparação dos trialcoxissilanos C_3 a C_{18} . Baseado nas avaliações cromatográficas, verificou que a fase estericamente protegida C_{18} diisopropil uréia não é muito eficiente na separação de compostos básicos devido ao grande número de silanóis remanescentes na sua superfície, conseqüente do baixo recobrimento da sílica por esse alcoxissilano.

No teste de estabilidade química de uma coluna recheada com a fase C_{18} dimetil uréia, ficou evidenciado que essa fase foi bem mais estável que a fase C_{18} uréia, indicando ser a mais promissora de todas aquelas que foram sintetizadas, principalmente na separação dos compostos básicos.

6. Referências Bibliográficas

- [1] K.K. Unger, "Porous Silica, Its Properties and Use as Support in Column Liquid Chromatography", 2ª edição, Elsevier, New York, 1979.
- [2] J. Nawrocki, "The silanol group and its role in liquid chromatography", J. Chromatogr., 779 (1997) 29.
- [3] U.D. Neue, "HPLC Columns, Theory, Technology and Practice", Wiley-VCH, New York, 1997.
- [4] L.S. Ettre, "Nomenclature for chromatography", Pure Appl. Chem., 65 (1993) 819.
- [5] C.H. Collins, G.L. Braga, P. S. Bonato, "Introdução a Métodos Cromatográficos", 4ª edição, Editora da Unicamp, Campinas, 1990.
- [6] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, "Practical HPLC Method Development", John Wiley & Sons, 2ª ed., New York, 1997.
- [7] U. Deschler, P. Kleinschmit, P. Panter, "3-chloropropyltrialkoxysilanes - key intermediates for the commercial production of organofunctionalized silanes and polysiloxanes", Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 25 (1986) 236.
- [8] L.N.H. Arakaki, C. Airoidi, "The considerable role of silylant agent in polymer surface modification", Quím Nova, 22 (1999) 246.
- [9] L.N.H. Arakaki, C. Airoidi, "Ethylenimine in the synthetic routes of a new silylating agent: chelating ability of nitrogen and sulfur donor atoms after anchoring onto the surface of silica gel", Polyhedron 19 (2000) 367.
- [10] J.N. Kinkel, K.K. Unger, "Role of solvent and base in the silanization reaction of silicas for reversed-phase high-performance liquid-chromatography", J. Chromatogr. A, 316 (1984) 193.
- [11] H. Engelhardt, P. Orth, "Alkoxy silanes for the preparation of silica based stationary phases with bonded polar functional-groups", J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol., 10 (1987) 1999.
- [12] L.C. Sander, S.A. Wise, "Influence of stationary-phase chemistry on shape-recognition in liquid-chromatography", Anal. Chem., 67 (1995) 3284.

- [13] U.D. Neue, E. Serowik, P. Iraneta, B. A. Alden, T.H. Walter, "Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings - I. Assessment of the reproducibility of reversed-phase packings", *J. Chromatogr. A*, 849 (1999) 87.
- [14] R. E. Majors, "Advances in the design of HPLC packings", *LC-GC.*, 18 (2000) 586.
- [15] J. W. Dolan, "Column packing - what's at the bottom of it?", *LC-GC.*, 16 (1998) 350.
- [16] R. E. Majors, "Stationary-phase technology in separation science", *LC-GC.*, 18 (2000) 1214.
- [17] G. Schomburg, J. Köhler, H. Figge, A. Deege, U. Bien-Vogelsang, "Immobilization of stationary liquids on silica particles by gamma-radiation", *Chromatographia* 18 (1984) 265.
- [18] T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, "The chromatographic behavior of coated stationary phases with different silicas", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 21 (1998) 645.
- [19] J. Li, D.H. Reeder, A.V. McCornick, P.W. Carr, "Factors influencing polybutadiene deposition within porous chromatographic zirconia", *J. Chromatogr. A*, 791 (1997) 45.
- [20] E. Forgács, T.Cserhádi, "Use of principal component analysis for studying the separation of pesticides on polyethylene-coated silica columns" *J. Chromatogr. A*, 797 (1998) 33.
- [21] Y.F. Cheng, T.H. Walter, Z. Lu, P. Iraneta, B.A. Alden, C. Genderau, U.D. Neue, J.M. Grassi, J.L. Carmody, J.E. O'Gara, R.P. Fisk, "Hybrid organic-inorganic particle technology: Breaking through traditional barriers of HPLC separations", *LC-GC.*, 18 (2000) 1162.
- [22] R.P. Fisk, T.H. Walter, J. Zhiping, Z. Jiang, "New porous inorganic/organic hybrid particles having chromatographically-enhancing pore geometry for chromatographic separations", U.S Patent 2001033931-A1, 2001.
- [23] J. Mazzeo, D. Wagroski, E. Grumbach, K. Tran, U.D. Neue, "Characterization of a new hybrid particle with improved efficiency and high pH stability", P-400 apresentado no 26th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques- HPLC 2002, Montreal, Canadá, junho de 2002.
- [24] J.J. Kirkland, J.L. Glajch, R. D. Farlee, "Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid-chromatography column packings" *Anal. Chem.*, 61 (1989) 2.

- [25] J.J. Kirkland, J.L. Glajch, "Stable support structure for chromatography columns - comprising a substrate coated with a mono-functional silane containing two sterically-protecting groups", U.S. Patent 4705725-A, 1987.
- [26] U.D. Neue, B.A. Alden, T.H. Walter, "Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings - II. Classification of reversed-phase packings", *J. Chromatogr. A*, 849 (1999) 101.
- [27] H.A. Claessens, M.A. van Straten, J.J. Kirkland, "Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography" *J. Chromatogr. A*, 728 (1996) 259.
- [28] J.J. Kirkland, J.B. Adams Jr., M.A. van Straten, H.A. Claessens, "Bidentate silane stationary phases for reversed phase high-performance liquid chromatography", *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4344.
- [29] J.J. Kirkland, J.B. Adams Jr., "New asymmetric bidentate silane compounds - useful for modifying the surface of liquid chromatographic support materials", U.S. Patent 5869724-A, 1999.
- [30] J.J. Kirkland, J.B. Adams Jr., "Propylene-bridged bidentate silane reagents, used for modifying the surface of silica-based liquid chromatography supports", U.S. Patent 5948531-A, 1999.
- [31] K. Nakanishi, T. Nagakane, N. Soga, "Designing double pore structure in alkoxy-derived silica incorporated with nonionic surfactant", *J. Porous Mat.*, 5 (1998) 103.
- [32] K. Cabrera, G. Wieland, D. Lubda, K. Nakanishi, N. Soga, H. Minakuchi, K.K. Unger, Silicarod - A new challenge in fast high-performance liquid chromatography separations", *Trends Anal. Chem.*, 17 (1998) 50.
- [33] B. Bidlingmaier, K.K. Unger, N. von Doehren, "Comparative study on the column performance of microparticulate 5 μ m C-18-bonded and monolithic C-18-bonded reversed-phase columns in high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 832 (1996) 259.
- [34] A. Nomura, J. Yamada, K. Tsunoda, "Acylation of aminopropyl-bonded silica gel for liquid chromatography", *Anal. Sci.*, 3 (1987) 209.
- [35] T. L. Ascah, B. Feibush, "Novel, highly deactivated reversed-phase for basic compounds" *J. Chromatogr.*, 506 (1990) 357.

- [36] B. Feibush, "Silica gel supports for chromatographic separations. - modified with amino:silyl groups. having reverse-phase character to reduce interaction between analyte(s) and silanol groups", U.S. Patent 5137627-A, 1990.
- [37] B. Buszewski, J. Schmid, K. Albert, E. Bayer, "Chemically bonded phases for the reversed-phase high-performance liquid-chromatographic separation of basic substances", *J. Chromatogr.*, 552 (1991) 415.
- [38] J. Schmid, K. Albert, E. Bayer, "Synthesis and characterization of unsaturated bonded phases for high-performance liquid-chromatography", *J. Chromatogr. A*, 694 (1995) 333.
- [39] B. Buszewski, M. Jaroniec, R.K. Gilpin, "Influence of eluent composition on retention and selectivity of alkylamide phases under reversed-phase conditions", *J. Chromatogr. A*, 668 (1994) 293.
- [40] B. Buszewski, M. Jaroniec, R.K. Gilpin, P. Kasturi, M.E. Gangoda, "Chromatographic and related studies of alkylamide phases", *Chromatographia*, 39 (1994) 155.
- [41] T. Czajkowska, I. Hrabovsky, B. Buszewski, M. Jaroniec, R.K. Gilpin, "Comparison of the retention of organic-acids on alkyl and alkylamide chemically bonded phases" *J. Chromatogr. A*, 691 (1995) 217.
- [42] T.L. Ascah, K.M.L. Kallury, C.A. Szafranski, S.D. Corman, F. Lui, "Characterization and high performance liquid chromatographic evaluation of a new amide-functionalized reversed phase column", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 19 (1996) 3049.
- [43] J.E. O'Gara, B.A. Alden, T.H. Walter, J.S. Petersen, C.L. Niederlander, U.D. Neue, "Simple preparation of a C-8 HPLC stationary-phase with an internal polar functional-group", *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3809.
- [44] U.D. Neue, C.L. Niederlander, J.S. Petersen, "New O-silyl-alkyl-carbamate compounds. for surface modifying silica - used as shielded stationary phase in high performance liquid chromatography especially. with basic sample and new O-alkenyl carbamate cpds", U.S. Patent 5374755-A, 1994.
- [45] J.E. O'Gara, D.P. Walsh, B.A. Alden, P. Casellini, T.H. Walter, "Systematic study of chromatographic behavior vs alkyl chain length for HPLC bonded phases containing an embedded carbamate group", *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2992.

- [46] J.E. O'Gara, D.P. Walsh, C.H. Phoebe Jr., B.A. Alden, E.S.P. Bouvier, P.C. Iraneta, M. Capparella, T.H. Walter, "Embedded-polar-group bonded phases for high performance liquid chromatography" *LC-GC*, 19 (2001) 632.
- [47] J.J. Kirkland, J.W. Henderson, J.D. Martosella, B.A. Bidlingmeyer, J. Vasta-Russell, J.B. Adams Jr, "A highly stable alkyl-amide silica-based column packing for reversed-phase HPLC of polar and ionizable compounds" *LC-GC*, 17 (1999) 634.
- [48] J.J. Kirkland, J.W. Henderson, J.J. DeStefano, M.A. van Straten, H.A. Claessens, "Stability of silica-based, endcapped columns with pH 7 and 11 mobile phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 762 (1997) 97.
- [49] C.R. Silva, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, "Development of new urea-functionalized silica stationary phases - Characterization and chromatographic performance", *J. Chromatogr. A*, 913 (2001) 65.
- [50] C.R. Silva, S. Bachmann, R.R. Schefer, K. Albert, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, "Preparation of a new C-18 stationary phase containing embedded urea groups for use in high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 85.
- [51] C.R. Silva, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, *J. Chromatogr. A*, "Evaluation of the applicability and the stability of a C₁₈ stationary phases containing embedded urea groups" *aceito para publicação*.
- [52] C.R. Silva, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, *J. Chromatogr. A*, "A new generation of sterically protected C₁₈ stationary phases containing embedded urea groups for use in HPLC", *aceito para publicação*.
- [53] R.D. Morrison, J.W. Dolan, "Reversed-phase LC in 100% water", *LC-GC*, 18 (2000) 936.
- [54] C.R. Silva, C. Airoidi, "Processo de preparação de novos trialcóxissilanos com grupos reativos derivados da uréia", *Patente Brasileira requerida nº PI 9903110-8*, 1999.
- [55] P.A. Bristow, P.N. Brittain, C.M. Riley, B.F. Williamson, "Upward slurry packing of liquid chromatography columns" *J. Chromatogr.*, 131 (1977) 57.
- [56] R.A. Shalliker, B.S. Broyles, G. Guiochon, "Evaluation of the secondary consolidation of columns for liquid chromatography by ultrasonic irradiation", *J. Chromatogr. A*, 878 (2000) 153.
- [57] M. Verzele, C. Dewaele, D. Duquet "Observations and ideas on slurry packing of liquid-chromatography columns", *J. Chromatogr.*, 391 (1987) 111.

- [58] J.P.C. Vissers, H.A. Claessens, J. Laven, C. A. Cramers, "Colloid-chemical aspects of slurry packing techniques in microcolumn liquid-chromatography", *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2103.
- [59] M. Verzele, "Miniaturization of the particle-size and low dispersion liquid-chromatography - low viscosity solvent upward packing procedure", *J. Chromatogr.*, 295 (1984) 81.
- [60] K.E. Collins, A.C. Franchon, I.C.S.F. Jardim, E. Radovanovic, M.C. Gonçalves, "The effects of inner surface roughness of microbore column blanks on column performance", *LC-GC*, 18 (2000) 106.
- [61] L.C. Sander, S.A. Wise, W. E. May, "Standard Reference Material 1647c, Priority Pollutant Polycyclic aromatic Hydrocarbons", NIST, Gaithersburg, MD.
- [62] L.C. Sander, S.A. Wise, "Standard Reference Material 869a, Column Selectivity Test Mixture for Liquid Chromatography", NIST, Gaithersburg, MD.
- [63] D.L. Pavia, G.M. Lampman, G.S. Kriz, "Introduction to Spectroscopy", 2^a ed, Saunders College Publishing, New York, 1996.
- [64] P. van der Voot, E.F. Vansant, "Silylation of the silica gel surface - a review", *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 19 (1996) 2723.
- [65] G.E. Berendsen, K.A. Pikaart, L. de Galan, "Preparation of various bonded phases for HPLC using monochlorosilanes", *J. Liq. Chromatogr.*, 3 (1980) 1437.
- [66] B. Pfeleiderer, K. Albert, E. Bayer, "Investigations by Si-29 cross-polarization magic angle spinning NMR-spectroscopy of reaction pathways of silica-gel polyfunctional modification", *J. Chromatogr.*, 506 (1990) 343.
- [67] K. Albert, E. Bayer, "Characterization of bonded phases by solid-state NMR-spectroscopy", *J. Chromatogr.*, 544 (1991) 345.
- [68] S. Bachmann, L.F.C. Melo, R.B. Silva, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, K. E. Collins, C. H. Collins, K. Albert, "Synthesis and solid-state NMR investigations of radiation-immobilized polysiloxanes on bare, titanium-grafted, and zirconium-grafted silicas", *Chem. Mater.*, 13 (2001) 1874.
- [69] H. Engelhardt, R. Grüner, M. Scherer, "The polar selectivities of non-polar reversed phases", *Chromatographia*, 5 (2001) S154.

- [70] J. Layne, "Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases", *J. Chromatogr. A*, 957 (2002) 149.
- [71] D. V. McCalley, "Comparison of the performance of conventional C-18 phases with others of alternative functionality for the analysis of basic compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. A*, 844 (1999) 23.
- [72] S. Strohschein, M. Pursch, D. Lubda, K. Albert, "Shape selectivity of C-30 phases for RP-HPLC separation of tocopherol isomers and correlation with MAS NMR data from suspended stationary phases", *Anal. Chem.*, 70 (1998) 13.
- [73] K. Albert, T. Lackner, M. Raitza, M. Pursch, H. Egelhaaf, D. Oelkrug, "Investigating the selectivity of triacontyl interphases", *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1998) 777.
- [74] G.M.F. Pinto, I.C.S.F. Jardim, "Use of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography for the determination of triazine residues in water: validation of the method", *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 463.