



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**



**TESE DE DOUTORADO**

***NOVAS FASES ESTACIONÁRIAS PARA CLAE PREPARADAS POR  
IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DE PMODS SOBRE DIFERENTES  
SUPORTES DE SÍLICA***

**Candidata: Zahra Fazal Chaudhry**

**Orientadora: Profa. Dra. Carol H. Collins**

**02/ 2005**

UNIDADE I. Q.  
Nº CHAMADA T/UNICAMP  
2939m

V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_

TOMBO BC/ 65301

PROC 16.0086-05

C \_\_\_\_\_ D \_\_\_\_\_

PREÇO 11,00

DATA 17-8-05

Vº CPD \_\_\_\_\_

Bib. id. 361312

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
DA UNICAMP

C939n

Chaudhry, Zahra Fazal.

Novas fases estacionárias para CLAE preparadas por imobilização térmica de PMODS sobre diferentes suportes de sílica / Zahra Fazal Chaudhry. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientadora: Carol H. Collins.

Tese – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Fases estacionárias. 2. C18. 3. Imobilização térmica. 4. Cromatografia. I. Collins, Carol H. II. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** New stationary phases for HPLC prepared by thermal immobilization of PMODS on different types of silica supports.

**Palavras-chave em inglês:** Stationary phases, C18, Chromatography, Thermal immobilization.

**Área de concentração:** Química Analítica.

**Titulação:** Doutora em Química Analítica.

**Banca examinadora:** Profa. Dra. Carol H. Collins (orientadora), Prof. Dr. Emanuel Carrilho (USP-São Carlos), Profa. Dra. Susanne Rath (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (IQ-UNICAMP) e Prof. Fábio Augusto (IQ-UNICAMP).

**Data de defesa:** 28/02/2005.

# Homenagem

*Quando cheguei à Unicamp, em 1999, vim disposta a mudar meu rumo na área científica. Tinha decidido trabalhar, fazer meu Doutorado, em Cromatografia, mesmo sem nunca ter visto um cromatógrafo na frente! Quem iria achar esta decisão razoável?*

*Tive a imensa felicidade (e sorte!) de conhecer a Profa. Carol Collins e o Prof. Ken, que em nenhum momento deixaram de incentivar a minha decisão. E eu ainda tinha uma ressalva a fazer: queria entrar no programa de doutorado e fazer, ao mesmo tempo, um curso de especialização de 18 meses. Quando expus esta condição, a resposta da Profa. Carol não poderia ter sido mais encorajadora: “É ciência, não é? Então faça!!”*

*Foi esta dedicação integral à ciência e à Cromatografia que formaram, direta ou indiretamente, grande parte dos bons profissionais e cromatografistas deste país e também muitos dos atuais professores do Instituto de Química da Unicamp!!*

*À este casal, que uniu o amor à ciência, que trocou de país e de nacionalidade para se dedicar com todo o profissionalismo à área científica no Brasil, gostaria de render minhas homenagens.*

*Nestes 30 anos de Brasil, os seus trabalhos renderam muitos “filhos” e eu, com muito orgulho, tenho o prazer de fazer parte desta grande família. Devo à vocês, todo o crescimento pessoal, profissional e científico que adquiri nestes anos*

*Aos Professores Ken e Carol Collins, MUITO OBRIGADA!!!*

*Dedico esta tese,*

*aos meus pais, Fazal e Shamim,  
a quem devo tudo o que sou, e por sempre  
acreditarem em minha "loucuras"...,*

*às minhas irmãs, Bushra e Alia,  
que mesmo à distância estiveram  
"aqui ao lado"*

*Ao meu marido,  
querido Marcos, (Zezinho)  
graças à você, ganhei felicidades sem tamanho.  
Obrigada pelo apoio, paciência, carinho e compreensão...  
Este trabalho também é seu!!*

## *Agradecimentos*

- À Profa. Carol Collins pela orientação, pela paciência e amizade como sempre me tratou e, principalmente, por acreditar em meu trabalho.
- Ao Prof. Ken, pela amizade e pela ajuda nas discussões de nosso trabalho científico.
- À Profa. Bel, pela amizade e sincera e pela colaboração nas discussões científicas durante estes anos,
- Aos amigos do LabCrom, com quem tive a felicidade de conviver. Graças a vocês a vida no laboratório ficou muito mais divertida (quem disse que uma coluna com picos duplos é triste ??). Obrigada, Allan, Anisio, Christian, Daniel, Edivan, Lúcio, Marcos, Marcelo, Neto, Roberto... E é claro, às “meninas”, Alessandra, Camila, Cintia, Dione, Joseane, Josimara, Karen, Gláucia, Laís, Liane, Lika, Louise, Marcia, Priscila, Rose, Soninha, Tafs eVanessa,
- À Nilva, minha “colega de cromatógrafo”, pela amizade e ótima convivência,
- À Dania, Carla, Lucia e Angela que me ensinaram o valor da amizade, dedicando carinho, seus tempos, ombros e ouvidos quando mais precisei...
- Ao Valtinho (coleguinha), pela convivência divertida e por permitir que o trabalho seguisse adiante, ah! as suas colunas...
- Ao (super) César pela amizade e ajuda nas incontáveis vezes em que fui pedir socorro,
- Aos queridos moradores de minha república, que dividiram os meus “momentos Unicamp”,
- Aos Professores e funcionários da Unicamp, pela amizade e ajuda profissional, e aos funcionários da CPG, André, Bel, Rodrigo, Elias e Celi
- Ao Stefan Bachman e ao Prof. Klaus Albert do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Tübingen, pelas análises de RMN e as discussões sobre este trabalho,
- Ao Marcelo Sena e Prof. Ronei Poppi, pela oportunidade de aplicarmos conjuntamente os resultados de nossos trabalhos científicos,
- Ao pessoal do Laboratório de Carotenóides, da FEA-Unicamp, em especial à Hannah e à Rose pela ajuda essencial em meu trabalho,
- À Unicamp e ao Instituto de Química pela oportunidade,
- Ao CNPq pela bolsa concedida,

## **CURRICULUM VITAE**

### **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

#### Pós Graduação

- - Especialista (Lato Sensu) em Jornalismo Científico – Labjor – UNICAMP, 2000.
- Mestrado: Área de concentração Físico Química - Grupo de Bioquímica e Biomateriais - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 1997.
- Pós Graduação Lato Sensu em Administração de Empresas - “Gestão Empresarial” - ASSER - INPG, São Carlos, 1996.

#### Graduação

Bacharelado em Química com ênfase em Química Tecnológica - Instituto de Física e Química de São Carlos (atual Instituto de Química de São Carlos) - Universidade de São Paulo, 1991.

### **EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL**

- Pesquisadora através do programa RHAE-CNPq

Período: 06.97 a 07.98

- Cia. Cervejaria Brhama - Filial Agudos

Período: 19.12.94 a 10.02.97

- Hoechst do Brasil S/A

Período: 01.07.91 a 31.12.91

### **ATIVIDADES DIDÁTICAS**

- Programa PED – GII: Monitoria na Disciplina Laboratório de Instrumentação Analítica - QA 581 – IQ-Unicamp. Período: 03.2001 a 07.2001

- Auxiliar Didático - : Monitoria na disciplina Laboratório de Química Inorgânica - QI 542 – IQ-Unicamp. Período: 03.2000 a 07.2000

- - Curso e Colégio Objetivo – monitoria em Química paa o 2ºGrau e pré-vestibular. Período: 10.97 a 03.99

### **INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

- Bolsista do programa Institucional de Bolsas CNPq

- Orientador: Prof. Dr. Lufs Alberto Avaca

Departamento de Eletroquímica – Instituto de Química de São Carlos – USP

### **PRÊMIO RECEBIDO**

Prêmio “Bernard Gross”, concedido ao melhor desempenho acadêmico no ano letivo de 1990, Instituto de Química de São Carlos, USP.

**CURSOS EXTRACURRICULARES**

- Princípios básicos de Eletroforese Capilar, outubro de 2003,
- Técnicas Avançadas de HPLC – Waters, novembro de 2002,
- Curso Teórico e Prático de Cromatografia de Análise de Alimentos – aplicado ao Engenheiro de Alimentos, novembro de 2001,
- Curso de Química Forense, SBQ – 2001,
- Noções Básicas de Qualidade Total - EAD” - SENAI/RJ, julho de 1996.
- “ISO 9000 - Uma abordagem prática para facilitadores” - Fundação Christiano Ottoni, Agudos, março de 1995.
- Métodos Modernos de Cromatografia Líquida - Universidade Federal de São Carlos, fevereiro de 1991.

**TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NACIONAIS: 8****TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS: 4****AUXÍLIOS RECEBIDOS**

1. Categoria: viagem Internacional para participação em evento científico  
Evento: 27<sup>th</sup> Internacional Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, maio de 2003, Nice, França.
2. Categoria: viagem Internacional para participação em evento científico  
Evento: 26<sup>th</sup> Internacional Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, maio de 2002, Montreal, Canadá.  
Agência Financiadora: Fundo de Apoio ao ensino e à Pesquisa (FAEP), Unicamp.

**TRABALHOS PUBLICADOS**

- Sena, M.M., Chaudhry, Z.F., Collins, C.H., Poppi, R.J., “Direct determination of diclofenac in pharmaceutical formulations containing B vitamins by using UV spectrophotometry and partial least squares regression”, J. Pharmaceutical and Biomed. Analysis, 36 (2004) 743-749
- Bottoli, C. B.G., Chaudhry, Z. F., Fonseca, D. A., Collins, K. E., collins, C. H., “Thermal immobilization of poly(methylsiloxanes) thermally immobilized on sílicas as stationary phases for HPLC”, J. Chromatogr. A, 948 (2002) 121-128.

# Resumo

Título: Novas Fases Estacionárias para CLAE Preparadas Através de Imobilização Térmica de PMODS Sobre Diferentes Suportes de Sílica

Autora: Zahra Fazal Chaudhry

Orientadora: Profa. Dra. Carol H. Collins

As fases estacionárias (FE) são consideradas uma das peças chave na técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Neste trabalho foram avaliadas FE preparadas a partir de seis diferentes sílicas utilizadas como suporte para a imobilização do polímero poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS). Três destes suportes são sílicas com poros grandes, que atualmente apresentam grande aplicação em separações de macromoléculas.

O primeiro passo para os testes cromatográficos das FE desenvolvidas foi o preparo de uma nova mistura padrão. A partir dela foi possível avaliar comparativamente as principais características das novas FE como a eficiência, a hidrofobicidade, a capacidade de separação de compostos de estruturas espaciais similares além de compostos de diferentes polaridades.

Durante o estudo da metodologia de preparo das FE, definiu-se o tratamento térmico como a técnica utilizada para a imobilização do polímero sobre o suporte. Análises de ressonância magnética nuclear mostraram que, através desta metodologia, o polímero é adsorvido sobre a superfície de sílica formando uma monocamada estável distribuída de forma altamente favorável ao processo de transferência de massa entre a FE e a fase móvel (FM).

Os suportes de sílica foram divididos em dois grupos, de acordo com suas características estruturais, e em cada um dos grupos, foi realizada a otimização de variáveis como a carga de polímero adsorvido na superfície do suporte, a temperatura ideal de imobilização térmica e o tempo de imobilização. Os resultados obtidos através de testes cromatográficos mostraram que a variável tempo de imobilização é extremamente relevante no desempenho e eficiência das FE devendo ser ajustada segundo as características estruturais do suporte. Isto se deve principalmente à maneira como se organizam as cadeias do PMODS dentro dos poros da sílica e sobre sua superfície.

Esta técnica de imobilização por tratamento térmico produziu FE de grande eficiência, capazes de realizar separações similares às observadas em colunas cromatográficas comerciais, como foi comprovado pelos resultados de separações de fármacos e pesticidas avaliados neste trabalho.

# Abstract

Title: New Stationary Phases for HPLC Prepared by Thermal Immobilization of PMODS on Different Types of Silica Supports.

Author: Zahra Fazal Chaudhry

Orientadora: Profa. Dra. Carol H. Collins

Stationary phases (SP) are an important component in HPLC technique. In this work, SP with the polymer *poly*(methyl octadecylsiloxane) (PMODS) immobilized onto six different silica surfaces were evaluated. Three of these supports were wide pore silicas that offer ample application in macromolecule separations.

The first step for the chromatographic tests was to develop a new test mixture of analytes. This test made possible comparative evaluations of the main characteristics of the newly prepared SP, such as efficiency, hydrophobicity and the separation capacity of compounds with different polarities.

During the study of SP preparation methodology, thermal treatments were defined as the technique for immobilization of PMODS onto the silica supports. Analyses of nuclear magnetic resonance demonstrated that, through this methodology, the polymer is sorbed on the silica surface forming a distributed stable monolayer, leading to a highly favorable mass transfer process between SP and mobile phase (MP).

The silica supports were divided into two groups according to their structural characteristics. In each group, optimization of variables, such as polymer load and the ideal temperature and time of thermal immobilization, was performed. The chromatographic results showed that time of immobilization is an extremely important variable for SP efficiency and that it should be adjusted according to the structural characteristics of the support. This is due mainly to the manner in which PMODS chains are organized inside the pores of silica surface.

The proposed technique of immobilization by thermal treatment produced high efficiency SP that offer potential for applications in chemical separations similar to those observed with commercially available columns, as showed by separations of pharmaceutical compounds and herbicides with these new chromatographic columns.

# ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Sistema cromatográfico típico utilizado para CLAE.....	2
Figura 1.2: Reações de sílica e organossilanos com formação de estruturas monoméricas ou poliméricas.....	13
Figura 1.3: Fase estacionária de sílica com polimerização horizontal.....	14
Figura 1.4: Fases estericamente protegidas.....	14
Figura 1.5: Estrutura química das FE bidentadas <sup>28</sup> .....	15
Figura 1.6: a) Partícula de sílica com representação dos poros em sua superfície. No detalhe os poros estão apresentados: b) com as paredes recobertas com um filme de polímero, c) cheio de polímero e d) com as paredes recobertas além de conter cadeias entrecruzadas de polímero em seu interior.....	18
Figura 3.1: Cromatograma genérico com medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos <sup>2</sup> .....	27
Figura 3.2: Curva da equação de van Deemter.....	32
Figura 3.3: Determinação do fator de assimetria e alargamento de pico.....	32
Figura 3.4: Cromatograma da separação de uma mistura teste contendo (1) uracil, (2) ácido benzóico, (3) fenol, (4) piridina, (5) tolueno e (6) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FE Rainin C18, fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.....	37
Figura 3.5: Cromatograma da separação de mistura teste contendo (1) uracil, (2) ácido benzóico, (3) fenol, (4) anilina, (5) tolueno e (6) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FE Rainin C18, fase móvel metanol:água 60:40 (v/v), vazão 0,5 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.....	37
Figura 3.6: Cromatograma da separação de uma mistura teste contendo (1) uracil, (2) ácido benzóico, (3) fenol, (4) piridina, (4) tolueno e (5) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FE Rainin C18, fase móvel metanol:água 50:50 (v/v), vazão 0,5 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.....	38
Figura 3.7: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste A contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno e 5) naftaleno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.....	41
Figura 3.8: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste B contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno e 5) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.....	41
Figura 3.9: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste A+B contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno 5) naftaleno e 6) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.....	42
Figura 3.10: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste C contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno 5) naftaleno e 6) acenafteno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.....	42
Figura 3.11: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste D contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno 5) etilbenzeno e 6) acenafteno.....	

Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.	43
.....	
Figura 3.12: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste E contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno 5) naftaleno 6) etilbenzeno 7) acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.	43
.....	
Figura 3.13: Cromatogramas de uma separação analítica para avaliação comparativa entre quatro colunas comerciais do tipo C8 e C18. Mistura teste contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) naftaleno 5) acenafteno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,5 mL min <sup>-1</sup> . Detecção em 254 nm.	45
.....	
Figura 4.1: Representação dos diferentes tipos de silanóis na superfície da sílica.	49
.....	
Figura 4.2: Coluna cromatográfica confeccionada no LabCrom.	58
.....	
Figura 4.3: Sistema de enchimento Haskel. No detalhe, a coluna cromatográfica já está com seus terminais conectados.	61
.....	
Figura 4.4: Cromatogramas obtidos para FE de sílica Davisil 10 µm com PMODS a) sem pulverizar e b) pulverizada. Mistura teste 1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL min <sup>-1</sup> , volume de injeção: 5 µL, detecção: UV, 254 nm.	66
.....	
Figura 4.6: Cromatogramas obtidos com as FE preparadas com sílica Davisil 10 µm e carga de 40 % de PMODS imobilizadas em diferentes temperaturas por 4 horas. Mistura teste 1 contendo: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL min <sup>-1</sup> , volume de injeção: 5 µL, detecção: UV, 254 nm.	68
.....	
Figura 4.7: Cromatogramas obtidos com as FE preparadas com sílica Davisil 10 µm e carga de 50 % de PMODS imobilizadas em diferentes temperaturas por 4 horas. Mistura teste 1 contendo: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL.min <sup>-1</sup> , volume de injeção: 5 µL, detecção: UV, 254 nm.	69
.....	
Figura 4.8: Termogramas (sob atmosfera inerte) de FE imobilizadas em diferentes temperaturas, preparadas a partir de sílica Davisil 10 µm com carga de 50 % de PMODS inicial, as amostras utilizadas foram as recuperadas após enchimento das colunas cromatográficas.	71
.....	
Figura 4.9: Estruturas das espécies Q <sup>2</sup> , Q <sup>3</sup> , Q <sup>4</sup> presentes em espectros de RMN de Si <sup>29</sup> referentes ao suporte cromatográfico.	73
.....	
Figura 4.10: Estruturas das espécies D <sup>2'</sup> e D <sup>2''</sup> , T <sup>1</sup> , T <sup>2</sup> , T <sup>3</sup> presentes em espectros de RMN de <sup>29</sup> Si relacionados aos modificadores da sílica.	74
.....	
Figura 4.11: Espectroscopia de RMN <sup>29</sup> Si de FE (suporte Davisil 10 µm carga de 40 % de PMODS) sem tratamento térmico e imobilizadas a temperaturas de 80 a 180 °C.	75
.....	
Figura 4.12: Espectroscopia de RMN <sup>13</sup> C de FE (suporte Davisil 10 µm carga de 40 % de PMODS) sem tratamento térmico e imobilizadas a temperaturas de 80 a 180 °C. Em destaque sinais em 60-80 ppm a partir da imobilização a 150 °C referentes à espécies T <sup>2</sup> e T <sup>3</sup> .	76

- Figura 4.13: Espectros de absorção no IV das FE de sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  com carga de 40 %, apresentando as variações nas fases estacionárias após o aumento de temperatura de tratamento térmico. Em destaque as bandas na região de 1700  $\text{cm}^{-1}$  referentes à aos grupos carbonilas..... 79
- Figura 4.14: Cromatogramas obtidos com as FE imobilizadas sobre sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  (carga de 50%) durante 0 (controle), 2, 4 8 e 16 horas em estufa a 100 °C. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm. .... 81
- Figura 4.15: Espectros de RMN de  $^{29}\text{Si}$  de FE imobilizadas sobre sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  a 100 °C durante diferentes períodos de tempo. .... 82
- Figura 4.16: Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das FE imobilizadas sobre sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  a 100 °C durante 2, 4, 8 e 16 horas..... 84
- Figura 4.17: Cromatogramas obtidos com as FE (de sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  e 50 % PMODS) submetidas a tratamento térmico prévio a 60 °C, durante 1 hora e em seguida imobilizadas durante 2, 4, 8 e 16 horas em estufa a 100 °C. Mistura teste 1 contendo: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm..... 86
- Figura 4.19: Perfil cromatográfico das FE a partir de sílica Kromasil (a) sem pré-tratamento, imobilizada durante 8 horas, a 100 °C, (b) sem pré-tratamento, imobilizada durante 16 horas a 100 °C, (c) com pré-tratamento, imobilizada durante 8 horas a 100 °C e (d) com pré-tratamento, imobilizada durante 16 horas a 100 °C. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV 254 nm..... 89
- Figura 4.20: Cromatogramas de FE preparadas com sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  pré-tratada com ácido e PMODS (carga inicial de 50 %) e imobilizadas a 100 °C durante 8 e 16 horas. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno, (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm. .... 92
- Figura 4.21: Cromatogramas obtidos com as FE preparadas com sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  pré-tratada com ácido e PMODS (carga inicial de 50 %), imobilizadas a 100 °C durante 8 e 16 horas utilizando a mistura 2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm..... 93
- Figura 4.22: Comparação do comportamento cromatográfico entre colunas recheadas com FE de sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  imobilizadas termicamente a 100 °C, durante 8 e 16 horas, logo após seu preparo e colunas recheadas com FE do mesmo lote (com as mesmas condições) após 180 dias de sua extração. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm. .... 96
- Figura 4.23: Imobilização do polímero PMODS após a passagem do tempo. .... 97
- Figura 4.24: Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com FE imobilizadas em estufa a 100 °C durante 8 horas com e sem fluxo de nitrogênio. Mistura teste 1 contendo: (1) uracil (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm. .... 99

- Figura 4.25: Cromatogramas obtidos com colunas recheadas com FE de sílica Kromasil e PMODS (50 % de carga inicial) utilizando 2 procedimentos de imobilização de PMODS: térmica e por refluxo. Mistura teste 1 contendo: (1) uracil (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: utilizou-se fases móveis distintas para cada cromatograma: para FE imobilizada termicamente metanol:água 70:30 v/v e para FE por refluxo metanol:água 50:50 v/v, vazão: 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5 µL, detecção: UV 254 nm. .... 101
- Figura 4.26: Estrutura química dos herbicidas estudados..... 104
- Figura 4.27: Cromatograma da separação da mistura de herbicidas: (1) bentazona, (2) cianazina, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron e (6) linuron. Condições cromatográficas: Coluna 150 x 3,9 mm. FE preparada com sílica Rainin 5 µm pré-tratada com ácido e PMODS (50 % carga inicial) imobilizada a 100 °C, durante 8 horas. Fase móvel metanol/água 50:50 (v/v), pH 3,75 e vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV em 230 nm, volume de injeção 5 µL..... 105
- Figura 4.28: Cromatograma da separação da mistura de herbicidas relatadas na literatura<sup>73</sup>: (1) bentazona, (2) cianazina, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron e (6) linuron. Condições cromatográficas: Coluna 150 x 3,9 mm Novapak C18 4µm (Waters). Fase móvel metanol/água 50:50 (v/v), pH 3,75, vazão: 0,8 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV em 230 nm, volume de injeção 5 µL..... 106
- Figura 4.29: Estrutura dos fármacos estudados. .... 107
- Figura 4.30: Cromatograma da separação dos princípios ativos diclofenaco, vitamina B1 e vitamina B6 presentes no fármaco comercial Alginac (amostra 1). No detalhe, foi feito um ajuste de escala para melhor visualização. Coluna 150 x 3,9 mm recheada com FE de sílica Rainin 5 µm pré-tratada com ácido e PMODS (50 % carga inicial) imobilizada a 100 °C, durante 8 horas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 v/v, ajustada a pH 3,8 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5 µL, detecção: UV 275 nm..... 107
- Figura 4.31: Curva analítica para determinação da concentração de DCF..... 109
- Figura 5.1: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS imobilizadas termicamente a 80 °C durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 50 %. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm..... 121
- Figura 5.2: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS imobilizadas termicamente a 100 °C durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 50 %. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm..... 122
- Figura 5.3: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS imobilizadas termicamente a 120 °C durante 8 e 16 horas. O carregamento de polímero foi de 50 %. Mistura teste I: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm..... 122
- Figura 5.4: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS imobilizadas termicamente a 80 °C durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 70 %. Mistura teste I: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 50:50 v/v, vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm..... 123

- Figura 5.5: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS imobilizadas termicamente a 100 °C durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 70 %. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.....* 123
- Figura 5.6: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil 5 µm e PMODS imobilizadas termicamente a 120 °C durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 70 %. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.....* 124
- Figura 5.7: Microfotografias de partículas de sílica Astrosil 5 µm pura, antes do preparo de FE. a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 15000 vezes.....* 124
- Figura 5.8: Microfotografias de FE de sílica Astrosil 5 µm com polímero PMODS imobilizado durante 8 horas a 100°C a) aumento de 1500 vezes e b) detalhe das partículas com aumento de 10000 vezes.....* 125
- Figura 5.9: MEV de FE de sílica Astrosil 5 µm com polímero PMODS imobilizado durante 16 horas a 100°C a) aumento de 1500 vezes e b) detalhe da partícula com aumento de 15000 vezes.....* 125
- Figura 5.10: Cromatogramas das FE de sílica Astrosil 5 µm com 50 % de carga inicial de PMODS imobilizado a 100 °C durante 8 e 16 horas. O enchimento da coluna cromatográfica foi feito sob uma pressão de 27 MPa. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel para o cromatograma de 8 horas foi metanol:água 50:50 v/v, FM para 16 horas foi metanol:água 70:30 v/v, vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.....* 126
- Figura 5.11: Microfotografias de FE de sílica Astrosil 5 µm com polímero PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizado durante 8 horas a 100 °C e recheada sob pressão de 27 MP. a) aumento de 1500 vezes e b) detalhe das partículas com aumento de 15000 vezes.....* 127
- Figura 5.12: Microfotografias de FE de sílica Astrosil 5 µm com polímero PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizado durante 16 horas a 100°C e recheada sob pressão de 27 MP. a) aumento de 1500 vezes e b) detalhe das partículas com aumento de 15000 vezes.....* 128
- Figura 5.13: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Rainin 3 µm e PMODS com carga inicial de 50 % imobilizadas a 100 °C durante 8 e 16 horas. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm. ..* 130
- Figura 5.14: Microfotografias de sílica Rainin 3 µm (30 nm) pura, antes do preparo de FE. a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes.....* 131
- Figura 5.15: Microfotografias das FE preparada com sílica Rainin 3 µm (30 nm) e PMODS com carga inicial de 50 %, imobilizadas a 100°C, durante 8 horas a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes.....* 131
- Figura 5.16: Microfotografias da FE preparada com sílica Rainin 3 µm (30 nm) e PMODS com carga inicial de 50 %, imobilizada a 100 °C durante 16 horas a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes.....* 132

- Figura 5.17: Microfotografias da sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  pura, antes do preparo de FE a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 2000 vezes. .... 133*
- Figura 5.18: Microfotografias da FE preparada com sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  e PMODS (50 % de carga inicial) imobilizada a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes. .... 134*
- Figura 5.19: Microfotografias da FE preparada com sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  e PMODS (50 % de carga inicial) imobilizada a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes. .... 134*
- Figura 5.20: Cromatogramas de FE de sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  e PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizadas a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 e 16 horas. Mistura teste I: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ , detecção em UV, 254 nm. .... 135*
- Figura 5.21: Efeito dos caminhos múltiplos percorridos pelo soluto na FE. .... 136*
- Figura 5.22: Cromatogramas das separações da mistura 2 utilizando as FE preparadas com PMODS sobre os três suportes de sílica de 30 nm com carga de 50% e imobilização a 100  $^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ , detecção em UV, 254 nm. .... 139*
- Figura 5.23: Termogramas (sob atmosfera inerte) de FE preparadas com sílicas de poros grandes imobilizadas durante 8 e 16 horas. A carga foi de 50 % de PMODS inicial, as amostras utilizadas foram as recuperadas após enchimento das colunas cromatográficas. .... 139*
- Figura 5.24: Cromatograma da separação de carotenóides presentes em folhas de alface utilizando a) coluna com FE preparada com sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  e PMODS (carga de 50 %) imobilizada a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas de dimensões 150 x 3,9 mm e b) coluna com FE quimicamente ligada, Spherisorb ODS2, 3  $\mu\text{m}$  de dimensões 150 x 4,6 mm. (1) neoxantina, (2) violaxantina, (3) lactucaxantina, (4) luteína, (5) zeaxantina, (6) e (7) clorofilas, (8) trans- $\beta$ -caroteno, (9) e (10) cis- $\beta$ -caroteno. Condições cromatográficas: fase móvel trifásica contendo acetonitrila, metanol e acetato de etila (contendo 0,05 % de trietilamina). Gradiente de 95:5:0 a 60:20:20 com vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Detecção com arranjo de diodos no  $\lambda$  max de cada composto. .... 141*

# ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 3.1: Composições das misturas teste avaliadas em colunas C8 e C18 da Rainin: .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 3.2: Parâmetros cromatográficos de diversas misturas em coluna C8 (Rainin), recheada no LabCrom .....</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 3.3: Parâmetros cromatográficos de diversas misturas em coluna C18 (Rainin), recheada no LabCrom .....</i>	<i>40</i>
<i>Tabela 3.4: Comparação dos parâmetros cromatográficos de 4 colunas de diferentes fabricantes. ....</i>	<i>45</i>
<i>Tabela 4.1: Suportes de sílica estudados e suas características .....</i>	<i>53</i>
<i>Tabela 4.2: Variáveis estudadas durante a imobilização de PMODS sobre suporte de sílica .....</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 4.3: Parâmetros cromatográficos obtidos com a FE (utilizando sílica Davisil de 10 <math>\mu\text{m}</math>) pulverizada ou não antes do enchimento. ....</i>	<i>65</i>
<i>Tabela 4.4: Resultados cromatográficos das FE de sílica Davisil 10 <math>\mu\text{m}</math> com cargas de 40 e 50 % de PMODS imobilizadas termicamente por um período de 4 horas a diversas temperaturas e extraídas. 67</i>	
<i>Tabela 4.5: Espessura da camada, (<math>\tau</math>), de polímero PMODS imobilizado em diferentes temperaturas para FE de sílica Davisil 10 <math>\mu\text{m}</math> com carga inicial de PMODS de 50 %. ....</i>	<i>70</i>
<i>Tabela 4.6: Perda de massa obtida das curvas de TGA para FE (com suporte de sílica Davisil 10 <math>\mu\text{m}</math>) imobilizadas em diferentes temperaturas. ....</i>	<i>71</i>
<i>Tabela 4.7: Variação dos tempos de tratamento térmico a 100 °C em sílica Rainin 5 <math>\mu\text{m}</math> (50 % de carga de PMODS).....</i>	<i>80</i>
<i>Tabela 4.8: Avaliação de condição de pré-tratamento térmico a 60 °C (1 hora) antes do tratamento térmico a 100 °C por diferentes períodos de tempo para FE com sílica Rainin 5 <math>\mu\text{m}</math>. ....</i>	<i>85</i>
<i>Tabela 4.9: Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura II em FE de sílica Rainin 5 <math>\mu\text{m}</math> e 50 % de PMODS com tratamento prévio de 60 °C e em seguida imobilizada por diferentes períodos de tempo. ....</i>	<i>86</i>
<i>Tabela 4.10: Avaliação cromatográfica das FE de PMODS sobre sílica Kromasil 5 <math>\mu\text{m}</math>, imobilizadas a 100 °C durante 8 e 16 horas com e sem pré tratamento (60 °C/1 h). ....</i>	<i>88</i>
<i>Tabela 4.11: Parâmetros cromatográficos para mistura 2 das FE de PMODS sobre de sílica Kromasil 5 <math>\mu\text{m}</math>. ....</i>	<i>90</i>
<i>Tabela 4.12: Comparação de conteúdo de alguns elementos metálicos presentes na sílica Rainin e Kromasil, ambas de 5 <math>\mu\text{m}</math>, obtidos por espectrometria de absorção atômica <sup>75</sup> .....</i>	<i>90</i>
<i>Tabela 4.13: Resultados cromatográficos de FE preparada com sílica Rainin pré tratada e PMODS, imobilizada a 100 °C durante 8 e 16 horas.....</i>	<i>91</i>
<i>Tabela 4.14: Parâmetros cromatográficos da mistura 2 utilizando FE preparada com sílica Rainin 5 <math>\mu\text{m}</math> pré-tratada com ácido e PMODS (carga inicial 50 %), imobilizadas a 100 °C durante 8 e 16 horas. ....</i>	<i>92</i>
<i>Tabela 4.15: Parâmetros cromatográficos de colunas recheadas com FE recém extraídas e FE extraídas e mantidas em repouso por 180 dias.....</i>	<i>95</i>

<i>Tabela 4.16: Quantidade de polímero PMODS (carga inicial de 50 %) auto-imobilizado na superfície de sílica Davisil 10 <math>\mu\text{m}</math> com a passagem do tempo.</i>	98
<i>Tabela 4.17: Parâmetros cromatográficos obtidos de colunas recheadas com FE de sílica Rainin 5 <math>\mu\text{m}</math> e PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizadas a 100°C, durante 8 horas, sob fluxo ou não de nitrogênio.</i>	99
<i>Tabela 4.18: Parâmetros cromatográficos obtidos com colunas recheadas com FE de sílica Kromasil e PMODS (50 % de carga inicial) com 2 metodologias de imobilização de PMODS: térmica e por refluxo.</i>	101
<i>Tabela 4.19: Comparação dos parâmetros cromatográficos de três suportes de sílica: Davisil 10 <math>\mu\text{m}</math>, Rainin 5 <math>\mu\text{m}</math> e Kromasil 5 <math>\mu\text{m}</math>.</i>	102
<i>Tabela 4.20: Parâmetros cromatográficos obtidos com as FE preparadas a partir de três suportes de sílica diferentes e PMODS (carga inicial de 50 %) utilizando a mistura teste 2.</i>	103
<i>Tabela 4.21: Parâmetros cromatográficos da separação de misturas de herbicidas em coluna recheada com FE com sílica Rainin (pré-tratada) e PMODS imobilizada durante 8 horas a 100 °C.</i>	105
<i>Tabela 4.22: Parâmetros cromatográficos da separação de DCF, Vitmainas B1 e B6, usando FE preparada com sílica Rainin 5 <math>\mu\text{m}</math> pré-tratada com ácido e PMODS (50 % carga inicial) imobilizada a 100 °C, durante 8 horas.</i>	108
<i>Tabela 4.23: Comparação da determinação de analítica de DCF através de métodos cromatográficos e espectrofotométrico.</i>	109
<i>Tabela 5.1: Suportes de sílica estudados e suas características físicas.</i>	114
<i>Tabela 5.2: Variáveis utilizadas durante a imobilização de PMODS sobre suporte de sílica.</i>	115
<i>Tabela 5.3: Parâmetros cromatográficos para a FE com carga de 50 % de PMODS sobre sílica Astrosil 5 <math>\mu\text{m}</math>, 30 nm de diâmetro de poro, imobilizada em diferentes temperaturas.</i>	118
<i>Tabela 5.4: Parâmetros cromatográficos para a FE com carga de 70% de PMODS sobre sílica Astrosil 5 <math>\mu\text{m}</math>, 30 nm de diâmetro de poro, imobilizada em diferentes temperaturas.</i>	118
<i>Tabela 5.5: Espessura, (<math>\tau</math>), da camada de polímero PMODS imobilizado em diferentes temperaturas durante 8 e 16 horas para FE com carregamento de 50% e 70%.</i>	119
<i>Tabela 5.6: Parâmetros cromatográficos para a FE (Astrosil-PMODS 50 %, imobilizada a 100°C durante 16 horas). As colunas foram recheadas com pressão de 27 MPa.</i>	126
<i>Tabela 5.7: Parâmetros cromatográficos das FE preparadas com sílica Rainin 3 <math>\mu\text{m}</math> e PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizadas a 100 °C durante diferentes tempos.</i>	129
<i>Tabela 5.8: Parâmetros cromatográficos de FE preparadas com sílica Nucleosil 7 <math>\mu\text{m}</math> e PMODS (50 % de carga) imobilizadas a 100 °C durante diferentes tempos.</i>	133
<i>Tabela 5.9: Parâmetros cromatográficos obtidos com as FE preparadas com PMODS sobre os três suportes de sílica de 30 nm com carga inicial de 50% e imobilização a 100 °C por 16 horas.</i>	137
<i>Tabela 5.10: Parâmetros cromatográficos obtidos das FE preparadas com PMODS sobre os três suportes de sílica de 30 nm, com carga inicial de 50% e imobilização a 100 °C por 16 horas, utilizando-se a mistura teste 2.</i>	138
<i>Tabela 5.11: Perda de massa durante a análise termogravimétrica de FE de diferentes sílicas de 30 nm com PMODS imobilizado durante 8 e 16 horas.</i>	138

# SUMÁRIO

<i>Capítulo I - INTRODUÇÃO GERAL</i>	1
1.1 - O Sistema Cromatográfico	2
1.2 Fases Estacionárias para CLAE	3
1.2.2 Suportes para Fases Estacionárias	4
1.2.2.1 Sílica	4
1.2.2.2 Materiais poliméricos	6
1.2.2.3 Suportes Cromatográficos de óxidos de metal de transição	7
Alumina	7
Zircônia	7
Titânia	8
Suportes de óxidos binários	8
1.2.2.4 Outros Suportes Cromatográficos	9
Carbono Grafitizado	9
Partículas Híbridas	9
Monolitos de sílica	10
1.2.3 Fases Estacionárias Quimicamente Ligadas	11
1.2.4 Fases Estacionárias com Polímeros Adsorvidos e Imobilizados	16
<i>Capítulo II - OBJETIVOS</i>	21
<i>Capítulo III - MISTURAS TESTES</i>	22
3. INTRODUÇÃO	22
3.1 Propriedades das Colunas Cromatográficas	22
3.1.1. Eficiência	23
3.1.2. Propriedades hidrofóbicas	24
3.1.3. Propriedades silanofílicas	25
3.1.4. Presença de metais	26
3.1.5. Outras considerações	27
3.2 Parâmetros utilizados para se avaliar colunas cromatográficas	27
Tempo de Retenção ( $t_R$ )	28

	xxvi
Fator de Retenção (k)	28
Resolução( $R_s$ ) e Fator de Separação ( $\alpha$ )	29
Número de Pratos (N)	29
Altura de um prato, (H)	31
Assimetria, (As)	32
3.3 Parte Experimental	33
3.3.1. Reagentes	33
3.3.2 – Colunas Cromatográficas	33
3.3.3 - Equipamento – Cromatógrafo a Líquido	34
3.4 Resultados e Discussão – Avaliação Cromatográfica	34
3.5 - Considerações Gerais sobre Misturas Testes	47
<i>Capítulo IV - SÍLICAS DE 10 nm</i>	48
4.1 INTRODUÇÃO	48
4.2. Parte Experimental	51
4.2.1 - Equipamentos	51
4.2.2 - Reagentes	52
4.2.3 - Sílicas utilizadas na confecção da FE	52
4.2.3.2 – Tratamento ácido da sílica	53
4.2.4 - Fase líquida (modificador da superfície)	53
4.2.5 - Preparação da fase estacionária com polímero poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) por evaporação	54
4.2.6 - Preparação das fases estacionárias com polímero poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) através de refluxo	54
4.2.7 - Procedimentos de Imobilização do PMODS sobre o suporte de sílica	55
4.2.7.1 – Imobilização por tratamento térmico	55
4.2.7.2 – Estudo de auto-imobilização	55
4.2.7.3 – Imobilização por tratamento térmico em atmosfera inerte (sob fluxo de N <sub>2</sub> )	56
4.2.8 - Extração das Fases Estacionárias após imobilização térmica	56
4.2.9 - Caracterização das fases estacionárias preparadas	57
4.2.9.1 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	57
4.2.9.2 - Análise termogravimétrica	57

4.2.9.3. - Espectroscopia no infravermelho (IV)	57
4.2.9.4 - Análise Elementar	57
4.2.10 - Enchimento de colunas cromatográficas	58
4.2.10.2 - Preparação de colunas cromatográficas: Polimento	58
4.2.10.3 – Preparação da suspensão e enchimento da coluna	59
4.2.11 - Condicionamento de colunas cromatográficas	61
4.2.12 - Avaliação cromatográfica das colunas recheadas	62
4.2.13 – Exemplos de aplicação de colunas recheadas com novas FE	62
4.2.13.1 – Separação de uma mistura de herbicidas	62
4.2.13.2 – Separação de princípios ativos do fármaco comercial Alginac	63
4.3. Resultados e Discussão	63
4.3.1 – Primeira Etapa: Determinar a quantidade ideal de PMODS a ser adsorvido e a melhor temperatura de imobilização térmica	63
4.3.2 – Avaliações espectrométricas das fases estacionárias	72
4.3.3 – Segunda Etapa: Determinação do melhor tempo de imobilização térmica	79
4.3.4 – Avaliação da otimização de tempo de imobilização térmica através de RMN	81
4.3.5 – Efeito de um pré aquecimento imediatamente anterior à imobilização térmica	84
4.3.6 – Efeito do tratamento ácido na superfície de sílica Rainin	91
4.3.7 – Efeito do tempo de armazenagem das FE imobilizadas e extraídas	94
4.3.8 – Estudo sobre diferentes técnicas de imobilização de PMODS sobre sílica	96
4.3.8.1 – Auto imobilização	96
4.3.8.2 – Imobilização térmica em atmosfera inerte (N <sub>2</sub> )	99
4.3.8.3 – Técnica de incorporação/imobilização de PMODS através de um sistema de refluxo	100
4.3.9 – Comparação entre FE preparadas a partir de uma mesma metodologia	102
4.3.10 – Exemplos de aplicações práticas das FE preparadas	103
4.3.10.1 – Separação de uma mistura de herbicidas	104
4.3.10.2 – Separação dos princípios ativos do fármaco comercial Alginac.	106
4.4. Considerações Gerais sobre sílicas de 10 nm	110

	xxviii
<i>Capítulo V - SÍLICAS DE 30 nm</i>	<i>112</i>
<i>V. INTRODUÇÃO</i>	<i>112</i>
5.2. Parte Experimental	113
5.2.1 – Equipamentos e Reagentes	113
5.2.2 - Sílicas utilizadas na confecção da FE	113
5.2.2 – Preparo das FE de sílica de poros grandes	114
5.2.3 - Procedimentos de Imobilização do PMODS sobre o suporte de sílica	114
5.2.4 - Caracterização das Fases Estacionárias Preparadas	115
5.2.4.2 - Análise Termogravimétrica	115
5.2.4.3 - Análise Elementar	115
5.2.4.4 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	115
5.2.5 - Enchimento de colunas cromatográficas	116
5.2.6 - Avaliação Cromatográfica das colunas recheadas	116
5.3. Resultados e Discussão	117
5.3.1. Estudos com a sílica Astrosil com poros de 30 nm	117
5.3.2 - Utilização de outras sílicas de 30 nm para o preparo de FE	128
5.3.2.1 - Sílica Rainin com poros de 30 nm	129
5.3.2.2 - Sílica Nucleosil com poros de 30 nm	132
5.3.3 - Comparação entre FE preparadas a partir de uma mesma metodologia	137
5.3.4 - Exemplo de aplicação prática de uma FE com sílica de poros grandes imobilizada termicamente	140
5.3.4.1 - Separação de carotenóides	140
5.4. Considerações Gerais sobre sílicas de 30 nm	142
<i>Capítulo VI – CONCLUSÕES</i>	<i>144</i>
<i>Capítulo VII – BIBLIOGRAFIA</i>	<i>147</i>

# *Capítulo I - INTRODUÇÃO GERAL*

Em 1903, M. S. Tswett apresentou um seminário, no qual discutia seus estudos sobre uma técnica que permitia a separação de vários pigmentos de folhas de plantas. Três anos mais tarde, em 1906, ele publicou seus trabalhos completos em uma das mais conceituadas revistas da Sociedade Botânica Alemã, batizando esta nova técnica de cromatografia<sup>1</sup>. Nascia aí uma das técnicas de separação analítica mais utilizada na química e na bioquímica modernas.

A separação em cromatografia ocorre devido às diferenças no equilíbrio de distribuição dos componentes de uma amostra entre duas fases imiscíveis. Uma destas fases sempre estará em movimento, por isto chamada de fase móvel (FM) enquanto a outra será uma fase estacionária (FE). As diferentes classificações de cromatografia se devem, em primeiro lugar, ao estado da FM: se ela for um gás, teremos a cromatografia gasosa, se ela for um líquido (ou mistura deles) estaremos utilizando a cromatografia líquida<sup>2</sup>.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma das vertentes desta técnica e constitui-se numa poderosa ferramenta da Química Analítica. Atualmente é considerada a técnica mais empregada na indústria química, mas suas aplicações se estendem a muitas outras áreas. Na indústria farmacêutica, por exemplo, a CLAE é indispensável no controle de qualidade desde a matéria prima até o produto final. Em laboratórios de controle ambiental a CLAE é utilizada para monitorar e analisar pesticidas e outros contaminantes da água e do solo. As indústrias alimentícias também fazem uso da CLAE para controle e determinação de toxinas, quantificação de nutrientes como as vitaminas e até a presença de aditivos. Isto sem contar as suas aplicações na área médica, em investigações forenses e, desde o final da década de 80, na área esportiva em exames anti-dopping.

As razões para esta vasta aplicação podem ser atribuídas aos baixos limites de detecção possíveis neste método, a possibilidade de determinações quantitativas com grande repetitividade e, principalmente, à sua capacidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis (características que apresentam sérios problemas para determinações por cromatografia gasosa). A grande versatilidade da CLAE se deve também à uma grande variedade de mecanismos de separações

possíveis, podendo ser aplicada em compostos orgânicos e inorgânicos. Além disso, a CLAE permite a análise de moléculas em uma vasta faixa de massas molares, desde moléculas pequenas até polímeros e biomoléculas de massas molares na ordem de milhares Daltons.

### 1.1 - O Sistema Cromatográfico

Na CLAE, a FM é bombeada sob alta pressão a uma vazão controlada e a introdução da amostra ocorre por meio de uma válvula de injeção ligada à um a alça de volume fixo. A amostra é arrastada pela FM percorrendo a coluna cromatográfica, que contem a FE, onde é feita a separação. Após a separação a FM segue arrastando os componentes da amostra até o detector, onde um sinal, proporcional à concentração do analito é convertido, através de uma interface, em gráficos de intensidade de sinal *versus* tempo de análise. Um sistema típico está apresentado na Figura 1.1.

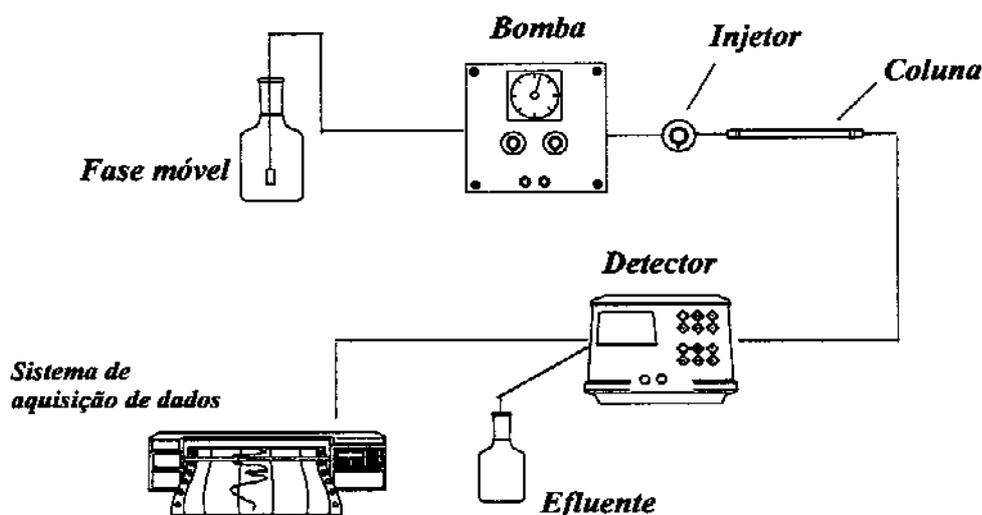


Figura 1.1: Sistema cromatográfico típico utilizado para CLAE.

Entretanto, a CLAE, como toda técnica analítica, apresenta algumas desvantagens, entre elas estão:

- ❖ Dependendo da especificidade da análise ou da variabilidade de compostos analisados em um único sistema, pode haver a necessidade de utilização de diferentes detectores,

elevando o custo do sistema cromatográfico em comparação à outras técnicas analíticas. Além disto, há o custo elevado de fases móveis de alto grau de pureza e de colunas cromatográficas (FE) que exigem reposição constante.

- ❖ A necessidade de manutenção constante, principalmente em indústrias, onde, a partir da implantação de certificações ISO 9000 e outras, a manutenção preventiva passou a ser uma exigência anual.
- ❖ Os detectores mais comercializados ainda não são universais, pois são específicos para diferentes classes químicas. Atualmente, já existe o detector espectrométrico de massas acoplado ao sistema cromatográfico, que pode ser considerado universal, mas ainda há a necessidade de maior desenvolvimento da interface sistema cromatográfico-espectrômetro de massas. De qualquer modo, este detector eleva o custo do sistema de forma considerável.

## ***1.2 Fases Estacionárias para CLAE***

Embora a fase móvel também apresente um grau de interação com os analitos, é a partir dos diferentes tipos de interações com a FE que a separação de uma infinidade de analitos desde pequenas moléculas até macromoléculas, como proteínas pode ser realizada. As FE são constituídas basicamente de um suporte, modificado com camadas de compostos quimicamente ligados, ou não, ao suporte. As FE podem ser mais polares do que a FM e, por isso, são chamadas de fase normal, ou mais apolares do que a FM, conhecidas como fase reversa.

Atualmente, estima-se que 90% das aplicações da CLAE empregadas no mundo todo utilizam a modalidade de fase reversa (FR)<sup>3</sup>. Estas FE são compostas de uma fase líquida com características apolares e um suporte cromatográfico, com caráter polar. A fase líquida pode formar ligações covalentes com os grupos polares do suporte, as chamadas fases quimicamente ligadas<sup>4-6</sup>, ou formar uma camada orgânica que pode estar sorvida<sup>7-12</sup>, ou imobilizada<sup>13-19</sup> nos poros da superfície do suporte.

Todas estas variações sempre irão depender das características do suporte utilizado. Nos próximos itens serão apresentados alguns tipos de suportes mais utilizados. Na seqüência, a partir dos suportes mais conhecidos, serão apresentadas as FE mais utilizadas e comercializadas em CLAE.

### **1.2.2 Suportes para Fases Estacionárias**

Os suportes utilizados para fases estacionárias de fase reversa (FE-FR) devem apresentar uma superfície polar que seja capaz de se ligar, quimicamente ou através de interações, à modificadores de sua superfície de caráter apolar.

Muitos materiais têm sido utilizados como suportes para FE-FR. Os mais utilizados são os óxidos de silício (sílica), de alumínio (alumina), de titânio (titânia), de zircônio (zircônia) e materiais poliméricos porosos, entre outros que estão sendo desenvolvidos atualmente. A seguir, serão descritas as características e aplicações dos suportes mais utilizados em CLAE.

#### **1.2.2.1 Sílica**

A sílica é o material mais abundante da crosta terrestre. É também o material mais utilizado como suporte para FE em CLAE. Suas características como resistência mecânica, porosidade e área superficial ainda são superiores aos outros óxidos<sup>20</sup>.

A sílica utilizada em cromatografia é um material amorfo, ou não-cristalino, que não produz nenhum padrão de difração de raios-X<sup>20</sup>. Com exceção das diatomitas, todas as outras sílicas são sintéticas e há várias rotas de síntese conhecidas. Entre elas estão:

- hidrólise de silicatos inorgânicos, este método produz partículas de sílica irregulares, com contaminação de metais como Fe e Al.
- hidrólise de alcoxissilanos na presença de surfactantes, que produz partículas esféricas com uma menor concentração de traços de contaminantes metálicos.
- hidrólise a altas temperaturas (ou queima) de tetracloreto de silicone. A sílica resultante (aerosil) é muito utilizada em estudos espectroscópicos das propriedades de superfície.

Dependendo do roteiro de síntese da sílica, serão encontradas diferentes quantidades de impurezas metálicas. Alguns pesquisadores sugerem<sup>4</sup> uma classificação quanto ao seu grau de pureza, sendo a sílica tipo A aquela com maior quantidade de metais, enquanto as do tipo B seriam mais puras. Hoje, a maioria das sílicas disponíveis para fins cromatográficos são classificadas como tipo B e possuem normalmente entre 0,1 a 0,3 % de impurezas metálicas<sup>21</sup> compostas basicamente de sódio, alumínio e ferro. Alguns autores<sup>22</sup> têm anunciado as sílicas modernas como as que apresentam menos de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de sódio, cálcio, magnésio e alumínio e uma concentração um pouco maior de ferro. A preocupação com a presença de metais se deve ao fato de que os metais presentes interferirão indiretamente na eluição de compostos básicos.

Além da separação ocorrer pelo fenômeno de partição, a separação cromatográfica em CLAE de fases reversa pode também ocorrer por adsorção na superfície da sílica<sup>23</sup>, se o suporte não for totalmente recoberto. Desta forma, é preciso conhecer todas as características que envolvem esta superfície. A superfície da sílica porosa amorfa é composta de silanóis,  $\equiv\text{Si-OH}$ , e de ligações siloxano,  $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ . Estudos confirmam que os sítios das ligações siloxano contribuem muito pouco ou insignificamente para a retenção dos solutos, porém, este não é o mesmo comportamento observado entre os silanóis. Os silanóis são também importantes centros de ligação covalente do tipo silil-éster que poderão servir para modificar a superfície de sílica com outros tipos de moléculas<sup>21</sup>.

No entanto, os grupos silanóis são ácidos e, dependendo do pH, a superfície de sílica pode estar carregada negativamente devido à dissociação de seus grupos ácidos. Este comportamento não é tão bom para a cromatografia pois leva à assimetria do pico, principalmente com solutos básicos e  $\alpha$  ionizáveis.

Além do problema da presença de silanóis ácidos, a sílica apresenta um outro inconveniente: sua limitação em trabalhos com pH extremos. Em pH acima de 8 ela será extremamente instável, pois os grupos siloxanos e silanóis reagem nestes pH, sofrendo dissolução, causando a perda da FE e, conseqüentemente, o colapso da estrutura do leito cromatográfico<sup>20</sup> e, portanto, uma irreversível queda de eficiência<sup>24</sup>. Em pH menores que 2, a FE propriamente dita, é perdida devido à quebra da ligação  $\equiv\text{Si-C}$ , também resultando em uma irreversível perda de eficiência.

Diante destes problemas foram surgindo novas alternativas para se utilizar a sílica como suporte, aproveitando-se as suas melhores qualidades e tornando-a menos susceptível a pH extremos. Uma destas alternativas é a possibilidade de se modificar a superfície de sílica com óxidos de magnésio, titânio e zircônio que, aliados a presença de polímeros alquilsiloxanos adsorvidos conferem

à FE uma grande seletividade em pH variando de 1 a 12<sup>15-18</sup>, estes suportes serão discutidos em item à parte. Uma outra alternativa para a instabilidade química da sílica são as FE quimicamente ligadas com alta densidade de modificador (do tipo cloro-alkilsiloxanos) que conferem estabilidade em altos pH<sup>25-27</sup>.

### **1.2.2.2 Materiais poliméricos**

Muito antes do desenvolvimento da CLAE, recheios de estireno-divinilbenzeno já eram utilizados em cromatografia por exclusão de tamanho ou como suportes em cromatografia de troca iônica. Uma de suas grandes vantagens é a sua estrutura química basicamente composta de ligações C-C, hidroliticamente muito estável, permitindo variações de pH de 0 a 13 durante as análises cromatográficas<sup>28</sup>. Esta característica viabiliza a análise de solutos básicos sem a interferência de sítios ácidos adsorptivos do suporte, resultando em picos cromatográficos sem cauda. Além disto, é possível controlar a porosidade das partículas poliméricas, com poros estreitos para moléculas menores e poros grandes para macromoléculas.

Além de estireno-divinilbenzeno, são encontradas também fases que utilizam polímeros do tipo poli-metacrilatos ou de álcool polivinílico como suportes<sup>21</sup>. No caso do metacrilato, a hidrofobicidade é controlada pela variação de suas cadeias alifáticas. A resistência à pH é um pouco menor que a observada para estireno-divinilbenzeno, normalmente na faixa de 2-12, podendo se estender a 13, durante períodos de tempo menores (para limpeza por exemplo). A mesma faixa também é utilizada nas FE com suporte de álcool polivinílico, com a possibilidade de se derivatizar a superfície com grupos octadecanila, octanila e butila. As partículas deste tipo de suporte, especificamente, são encontradas apenas com diâmetro de poro de 25 nm, tornando-as apropriadas para análise de peptídeos e proteínas<sup>29</sup>.

Porém, os recheios poliméricos possuem a desvantagem de não suportar altas pressões e, no caso do estireno-divinilbenzeno, sofrer inchaço ou encolhimento na presença de diversos modificadores orgânicos da FM<sup>28</sup>. Uma outra desvantagem está na falta de homogeneidade do fluxo da FM resultando em separações menos eficientes do que as observadas em suportes de sílica. Neue<sup>29</sup> relata que esta menor eficiência é mais observada no caso de separação de moléculas menores, nas quais a transferência de massa é mais lenta, do que com macromoléculas. Diante destes problemas, as FE

poliméricas passaram a ser mais utilizadas na separação de macromoléculas como biopolímeros e proteínas.

### **I.2.2.3 Suportes Cromatográficos de óxidos de metal de transição**

Entre os óxidos utilizados como suportes cromatográficos destacam-se a alumina, a zircônia e a titânia, cada um deles apresentando vantagens e desvantagens com relação ao suporte de sílica.

#### **Alumina**

A alumina é conhecida por apresentar razoável resistência mecânica e uma estabilidade hidrolítica superior à da sílica, principalmente em pH alcalinos, permitindo a separação de compostos básicos até pH 12. A superfície da alumina também pode ser modificada (ou derivatizada) de maneira similar à sílica, com a presença de polímeros como o polibutadieno e polissiloxanos. Neste caso, a separação é baseada apenas no mecanismo de partição, sem interferência do suporte com o analito básico<sup>28</sup>. As aplicações relatadas na literatura com este tipo de FE são muito similares às da sílica e, muitas vezes, as diferenças encontradas nas separações<sup>30,31</sup>, principalmente em termos de retenção dos analitos, se devem, exclusivamente, ao fato de se trabalhar em pH maiores que 10, com relativa longevidade da coluna cromatográfica, sem nenhuma outra vantagem óbvia. Segundo Neue<sup>29</sup>, estas FE suportam pH até 13, porém, a sua maior desvantagem em relação a sílica é a reduzida taxa de transferência de massa, resultando em eficiências mais baixas.

#### **Zircônia**

A zircônia é o único óxido metálico que apresenta quatro propriedades químicas diferentes em sua superfície. Sendo assim e, dependendo do meio, pode agir como ácido ou base de Lewis, assim como agente redutor ou oxidante. Além disto, dependendo da rota de síntese e da temperatura utilizada durante este processo, pode ser encontrada em quatro formas: amorfa, tetragonal, cúbica e monoclinica. Ainda estão sendo avaliadas as influências de cada uma destas estruturas nas propriedades cromatográficas<sup>32</sup>.

A zircônia utilizada em cromatografia líquida é um material anfotérico, com propriedades de trocador aniônico em meios ácido e neutro e trocador catiônico em meio básico. A grande vantagem

dos suportes de zircônia são a sua alta estabilidade a pH extremos<sup>28</sup> (de 1 a 14), e em temperaturas, até 100 °C<sup>33</sup>. A resistência a pH extremos permite a sua utilização em separações de analitos básicos no estado não-ionizado. Os suportes de zircônia também são encontrados ligados a grupos octadecil, com mecanismos de retenção semelhantes às da sílica. Segundo Li e Carr<sup>34</sup>, quando estas FE estão associadas a outros polímeros como o polibutadieno, permitem separações rápidas de compostos polares e apolares como proteínas e peptídeos. Também estão relatados na literatura<sup>28</sup> trabalhos utilizando FE de partículas de zircônia modificadas com uma fina camada de carbono em sua superfície, que apresentam altas polarizabilidade e hidrofobicidade em comparação às fases alquila convencionais. Estas fases apresentam, além da estabilidade química a altos pH, uma seletividade específica para isômeros e diastereoisômeros.

Entretanto, a grande limitação no uso de colunas cromatográficas baseadas em zircônia, é a necessidade de se eliminar qualquer vestígio de dióxido de carbono do meio cromatográfico, principalmente da FM. Caso contrário, o CO<sub>2</sub> ou carbonatos irão bloquear os sítios ácidos de Lewis e, gradualmente, toda as propriedades da superfície do suporte irão se alterar durante a corrida<sup>32</sup>. Outro problema associado aos sítios ácidos da zircônia é a forte interação com fosfatos, fluoretos e outros ácidos fortes de Lewis, favorecendo até mesmo uma adsorção irreversível<sup>33</sup>.

### **Titânia**

A titânia possui as mesmas propriedades mecânicas da sílica, mas com uma maior estabilidade química. É um óxido metálico anfótero que apresenta propriedades de trocador aniônico e catiônico e, quando associada à presença de cadeias alquila, é simultaneamente apta para interações hidrofóbicas<sup>28</sup>. Assim como a sílica, na superfície de titânia são encontrados os grupos Ti-OH, titanóis, levemente ácidos<sup>35</sup> que conferem à este suporte uma alta seletividade na separação de isômeros. Sua estabilidade química em pH extremos (1 e 14) e a resistência às lavagens de colunas com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> torna-a de interesse especial para CLAE preparativa. Uma das desvantagens da titânia está na sua baixa área superficial, limitando a modificação de sua superfície com agentes hidrofóbicos como os utilizados com sílica, alumina e zircônia.

### **Suportes de óxidos binários**

Um suporte cromatográfico considerado ideal deveria apresentar alta resistência mecânica, permitir reações para modificações de sua hidrofobicidade ou polaridade através da variabilidade em sua área superficial e, associada à estas características, também permitir separações cromatográficas em uma faixa irrestrita de pH.

Neste sentido, inúmeras de pesquisas vêm sendo desenvolvidas no LabCrom (Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida) do Instituto de Química da Unicamp. Estes trabalhos associam a sílica a outros óxidos metálicos como, por exemplo, sílica modificada com óxido de titânio<sup>16,17,36,37,38</sup> e zircônio<sup>18,19</sup>. Na literatura encontram-se alguns exemplos utilizando sílica modificada com magnésio<sup>39</sup> e, principalmente, para titânia<sup>40-42</sup> devido às suas aplicações catalíticas.

#### **1.2.2.4 Outros Suportes Cromatográficos**

##### **Carbano Grafitizado**

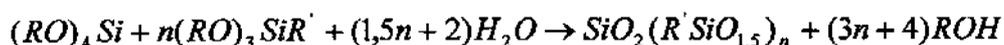
Carbano grafitizado é um outro tipo de suporte comercialmente disponível desde 1988, que possui características muito interessantes e ainda não totalmente esclarecidas. A estrutura deste suporte consiste em bandas entrelaçadas de grafite, permitindo seu uso em pressões razoavelmente altas (até 40 MPa) e em pH na faixa de 1 a 14, sem o fenômeno de encolhimento ou inchaço observado em suportes poliméricos. A retenção de analitos neste suporte é devida a dois fatores, a hidrofobicidade e a aos elétrons  $\pi$  delocalizados das bandas de grafite. Isto confere à fase um alto poder retentivo, com a desvantagem de exigir FM altamente purificadas para evitar a adsorção irreversível de impurezas.

Suas principais aplicações são a separação de compostos de estruturas químicas similares como anilina e seus derivados, assim como estereoisômeros, compostos polares, não polares, aniônicos e catiônicos, não iônicos e isoméricos<sup>43,44</sup>.

##### **Partículas Híbridas**

É um suporte recentemente desenvolvido<sup>45,46</sup> que se constitui em uma mistura de grupos orgânicos e inorgânicos combinados com propriedades intermediárias aos dos grupos puros. Com maior quantidade de material orgânico, as partículas apresentam características de polímeros, com baixa resistência mecânica e menor eficiência. Por outro lado, com maior quantidade de grupos inorgânicos, as partículas comportam-se como a sílica, ou seja, apresentam muitos grupos silanóis

livres, causando problemas na eluição de solutos básicos e baixa estabilidade em FM com condições agressivas. As partículas são obtidas a partir da síntese de sol-gel usando organossilanos. A rota de síntese completa destas partículas consiste na reação de um tetraalcoxissilano com um alquiltrialcoxissilano para formar um precursor, que é então utilizado para criar as partículas:



Como resultado final obtém-se a partícula contendo unidades inorgânicas ( $SiO_2$ ) e orgânicas ( $R'SiO_{1,5}$ ), com o grupo ( $R'$ ) incorporado na matriz. Pesquisando diferentes materiais de partida e diferentes grupos alquila foi encontrado<sup>45</sup> o material que apresentava as melhores propriedades cuja composição era  $SiO_2(CH_3SiO_{1,5})_{0,5}$ .

Uma extensão no desenvolvimento deste tipo de partícula foi a introdução de alquildissilanos, como o 1,2 bis-(trietoxissilil)-etano<sup>47</sup>, criando entrecruzamentos (“cross-links”) entre as os silanos das partículas. A concentração deste reagente (% bis) afeta diretamente a estrutura do leito cromatográfico. Acima de 20 % de bis, as partículas já não se apresentarão na forma de esferas. Com esta modificação, segundo os fabricantes, a estabilidade das FE irá aumentar 10 vezes mais.

### **Monolitos de sílica**

Outro desenvolvimento recente, a sílica monolítica difere das partículas convencionais pois, na verdade, não existem tais partículas. As colunas consistem em sílica formada cilíndricamente na forma de haste<sup>48</sup>. Sua característica é uma estrutura biporosa, com meso e macroporos bem definidos em um único sólido, possuindo aproximadamente uma porosidade 15% maior comparada à um leito de partículas convencionais. Devido à grande quantidade de macroporos, há uma alta permeabilidade da FM, sem que haja aumento de pressão e separação efetivamente ocorre nos mesoporos. Esta particularidade permite que as corridas cromatográficas sejam feitas sob vazões 10 vezes mais altas de FM do que as convencionalmente usadas, levando à separações muito rápidas e eficientes.

### **1.2.3 Fases Estacionárias Quimicamente Ligadas**

Foram as FE de fase reversa quimicamente ligadas, introduzidas por Kirkland<sup>49</sup> a partir da década de 70 do século XX, as responsáveis pelo crescimento explosivo da CLAE.

A introdução de uma camada de modificadores orgânicos quimicamente ligada à superfície da sílica e de outros óxidos metálicos tem como finalidade unir as propriedades dos grupos orgânicos (como polaridade, hidrofobicidade) à estabilidade térmica e hidrolítica do óxido inorgânico.

Entre as reações de formação da camada quimicamente ligada estão a esterificação, a cloração seguida de reação com reagente de Grignard ou composto organo-lítio e organossilanização<sup>33</sup>. Esta última é mais utilizada e consiste na reação entre os grupos hidroxila do suporte de sílica e um organossilano, no qual o átomo de silício tem um ou mais grupos funcionais ativos como o cloro, o alcóxi ou amino<sup>5,50</sup>.

Alguns fatores exercem grande influência na estrutura da FE quimicamente ligada, tais como o tipo e a funcionalidade do modificador além do ambiente de reação: com ou sem a presença de água. Após vários estudos sobre estes parâmetros feitos inicialmente por Unger<sup>51</sup> e colaboradores, seguidos por Sander e Wise<sup>52</sup>, chegou-se à conclusão que o uso de modificadores mono-, di- ou trifuncionais na ausência de água levavam à formação de estrutura definidas e monoméricas. Também observaram que os modificadores di- ou trifuncionais na presença de água levariam à formação de estruturas poliméricas entrecruzadas. Estas fases monoméricas e poliméricas podem ser visualizadas na Figura 1.2. As FE monoméricas permitem rápido equilíbrio com FM e eficiências mais altas. As FE poliméricas oferecem maior estabilidade da coluna cromatográfica, principalmente quando são usadas FM mais aquosas<sup>53</sup>, além de permitir maior quantidade de amostra. Geralmente, classificam-se como FE poliméricas aquelas que apresentam um recobrimento superior a  $4 \mu\text{mol m}^{-2}$ .

Há uma grande variedade de FE quimicamente ligadas disponíveis comercialmente utilizando organossilanos de cadeia longa, variando de C8 a C30, sendo que as mais difundidas são C8 e C18. Em sua grande maioria, as fases comercialmente disponíveis são preparadas utilizando os silanos monofuncionais. A principal razão desta escolha é a busca de repetitividade na preparação de diferentes lotes de sílica modificada<sup>29</sup>.

Mas, o maior problema das reações na superfície da sílica é que não importa quanto modificador seja usado, será impossível reagir todos os grupos hidroxila superficiais. Estes silanóis residuais são fracamente ácidos, com valores de  $\text{pK}_a$  entre 5 e 7, podendo ser responsáveis por

interações com grupos polares, como os compostos básicos, através de ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo<sup>21</sup>.

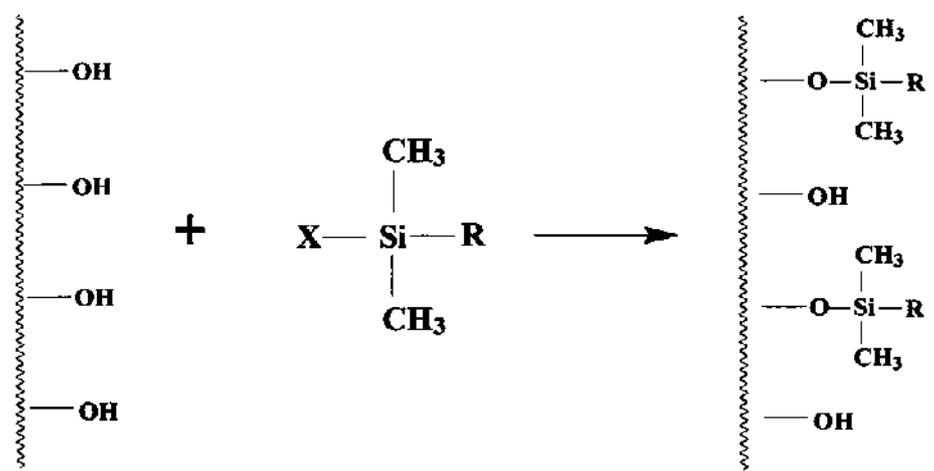
Na tentativa de diminuir a influência dos silanóis residuais, várias estratégias foram desenvolvidas pelos pesquisadores de desenvolvimento de FE. Um dos primeiros procedimentos propostos foi a silanização secundária, ou seja, após a reação com um organossilano de cadeia longa, promove-se uma nova reação com um reagente organossilano de cadeias laterais pequenas, como o clorotrimetilsilano (TCMS) ou o hexametildisilazano (HMDS)<sup>54</sup>. Este procedimento foi chamado de capeamento (“end-capping”) e produziu FE de alta eficiência com redução da interação com grupos polares. Entretanto, o capeamento não diminuiu a ocorrência de hidrólise da ligação Si-C dos organossilanos em meio ácido ( $\text{pH} \leq 2$ )<sup>28</sup>, restringindo seu uso para aplicações em meios com  $\text{pH} \geq 2,0$ .

Wirth e Fatunmbi<sup>55</sup> desenvolveram uma nova estratégia: recobrir a superfície de sílica com uma mistura de silanos trifuncionais de cadeias longas e cadeias curtas que, ao entrarem em contato com uma monocamada de água da sílica, se polimerizam no local. Este processo foi chamado de polimerização horizontal (Figura 1.3) e produziu FE hidroliticamente mais estáveis que as FE monomérica convencionais, tanto para hidrólise ácida como para hidrólise básica.

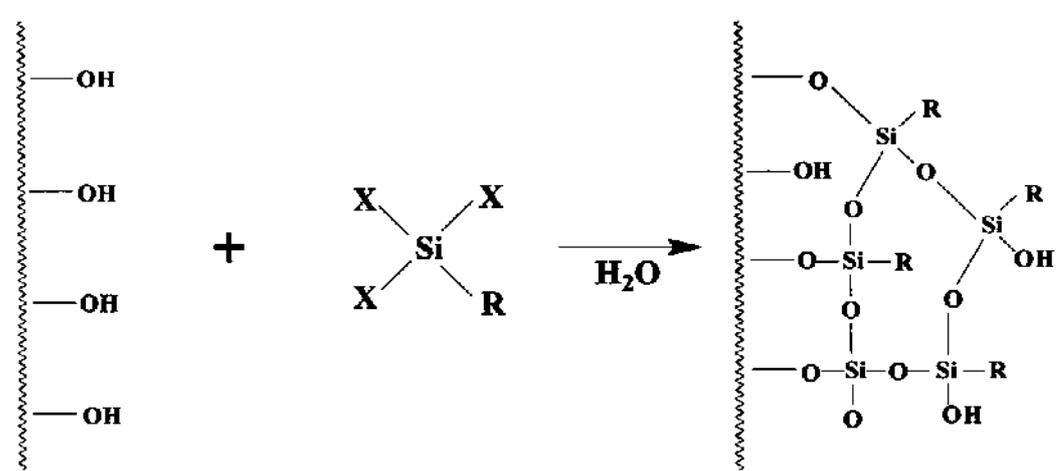
Ainda visando diminuir a influência dos silanóis residuais da sílica, Kirkland e colaboradores<sup>56</sup> propuseram fases monoméricas estericamente protegidas contendo grupos diisopropil- ou diisobutil-silano ligados diretamente ao átomo de silício do modificador (Figura 1.4). A inserção destes grupos volumosos próximos à superfície de sílica permite uma maior estabilidade hidrolítica em pH baixos, além de tornar mais difícil o acesso de solutos polares aos sítios ativos de silanóis livres. Entretanto, estas FE apresentam um menor recobrimento do suporte de sílica devido ao impedimento estérico durante a reação de silanização, tornando-as menos estáveis em pH acima de 7.

As FE bidentadas foram outra recente alternativa proposta por Kirkland e colaboradores<sup>57</sup>, nas quais o suporte de sílica é modificado com agentes sililantes bidentados, formados por dois átomos de silício ligados também à grupos de dois ou três átomos de carbono (Figura 1.5).

R = C8 a C30  
 X = Cl, EtO, etc.



**Fase monomérica**



**Fase polimérica**

Figura 1.2: Reações de sílica e organossilanos com formação de estruturas monoméricas ou poliméricas.

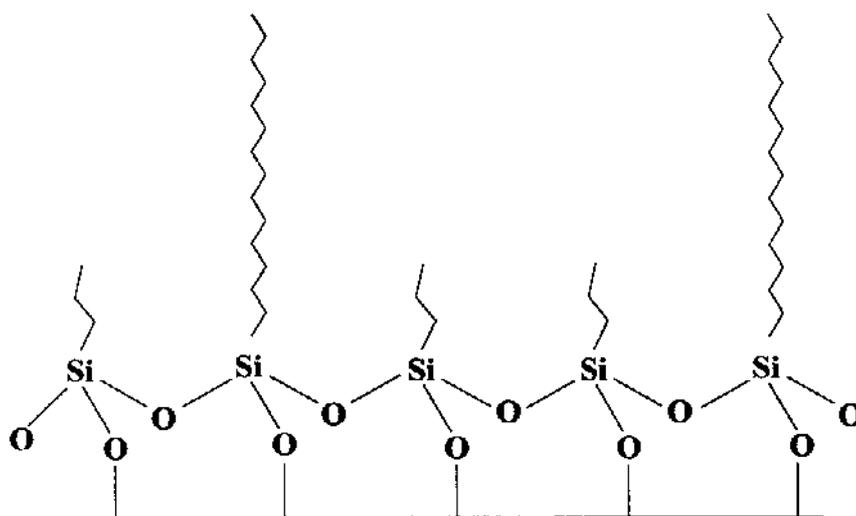


Figura 1.3: Fase estacionária de sílica com polimerização horizontal.

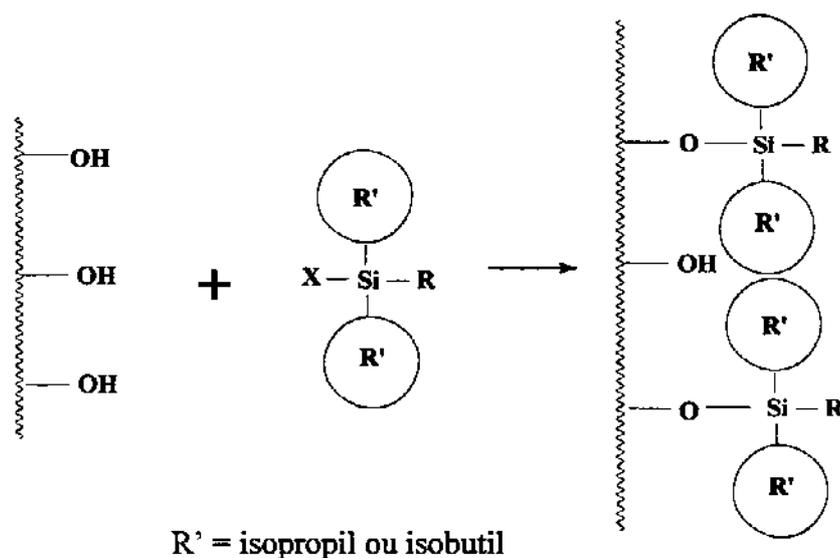


Figura 1.4: Fases estericamente protegidas.

Sua principal vantagem em relação às FE monofuncionais é uma estabilidade maior em FM agressivas com pH acima de 7. Embora este agente sililante também apresente problemas com o grau de recobrimento do suporte, devido ao impedimento estérico, esta FE permite trabalhar em pH altos, chegando até 11. Nesta situação os analitos básicos (com pKa menor que a FM) estarão em sua forma

não protonada e os silanóis residuais na forma  $\text{SiO}^-$ , sem possibilidades de interações e, portanto, evitando o alargamento do pico cromatográfico.

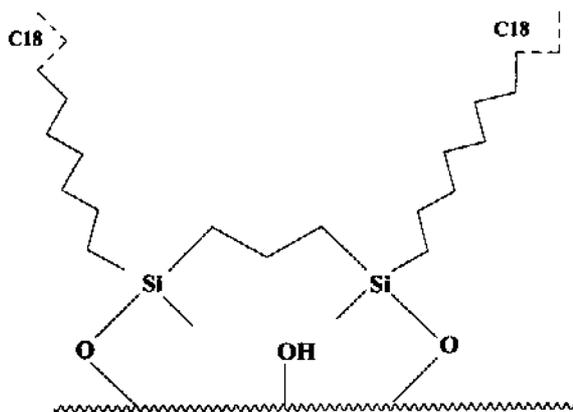


Figura 1.5: Estrutura química das FE bidentadas<sup>28</sup>.

Para os pesquisadores de novas fases estacionárias, o ponto chave para diminuir a influência dos silanóis residuais é o tipo de recobrimento feito sobre o suporte. Assim, alguns pesquisadores desenvolveram estratégias para recobrir densamente os suportes de sílica<sup>58,59</sup> com silanos. Recentemente, foi lançada comercialmente uma coluna cromatográfica utilizando este conceito, apresentando cadeias alquila C12 (MAX-RP<sup>TM</sup>, Phenomenex). Comparada às colunas C18 convencionais, ela apresenta 25% a mais de recobrimento da superfície. Em geral, foi demonstrado que, quanto menor for a cadeia alquila ligada, maior será o recobrimento da superfície. Como vantagem, estas FE apresentam alta estabilidade hidrolítica<sup>28</sup>.

As modificações nos suportes de sílica, vistas até este momento, sempre priorizaram a hidrofobicidade da FE, ou seja, todas as modificações foram feitas inserindo-se cadeias de hidrocarbonetos alifáticos. Em outra abordagem, são empregados grupos polares embutidos, tais como amida<sup>60</sup>, éster<sup>20,61</sup>, carbamatos<sup>62</sup>, uréia<sup>63,64</sup> ou grupos de amônia quaternária<sup>65</sup>. Em um primeiro momento, as FE eram preparadas em duas etapas: primeiro o suporte era modificado com um amino-silano e, em uma segunda etapa, era feita a reação de acetilação do grupo amino. Embora estes grupos polares atuassem como uma proteção eletrostática dos silanóis para analitos básicos, o procedimento de preparo da FE realizado em 2 etapas não se apresentava muito eficiente, além de não fornecer grande repetitividade. Em um outro procedimento desta modificação, o preparo das FE passou a ser realizado

em uma única etapa. Nesta nova rota de síntese, o silano, já contendo o grupo funcional embutido, foi o modificador da superfície de sílica<sup>66</sup>. Este novo método foi considerado a 2ª geração de FE reversas. Atualmente, estão sendo feitas pesquisas e aplicações para estas novas FE que já mostraram uma seletividade diferente das fases quimicamente ligadas que não apresentam estes grupos embutidos.

Todas as FE citadas até agora foram preparadas sobre suportes de sílica. Mas as mesmas modificações feitas sobre a superfície de sílica, com cadeias alquilas quimicamente ligadas, já foram realizadas e testadas sobre a zircônia<sup>67,68</sup>, titânia<sup>69,70</sup> e alumina<sup>68</sup>. Entretanto, seus desempenhos são menores que os obtidos com sílica, devido a problemas de repetitividade no preparo das partículas do suporte e no rendimento da reação de modificação. Quanto a estabilidade hidrolítica da ligação Si-O-Metal destas FE, a hidrólise segue a ordem: Si >> Ti ~Zr >> Al.

#### ***1.2.4 Fases Estacionárias com Polímeros Adsorvidos e Imobilizados***

Uma FE ideal deveria ser um material que apresentasse a melhor capacidade de transferência de massa (e, portanto, eficiência), que fosse estável quimicamente frente às características da fase móvel e dos próprios analitos e, finalmente, que as características químicas do suporte não interferissem na separação cromatográfica. Como foi visto no item anterior, as pesquisas na área de novas FE quimicamente ligadas sempre foram voltadas para encontrar um equilíbrio entre todas estas exigências. A maior desvantagem encontrada nas FE quimicamente ligadas está na ligação Si-C, que pode ser hidrolisada a partir de pH 2. Embora o controle de reações químicas sobre a superfície do suporte tenha melhorado bastante, uma outra desvantagem destas FE está ligada à sua repetitividade entre os diferentes lotes de FE produzida.

Nos últimos 20 anos, algumas linhas de pesquisa alternativas às FE ligadas, têm unido com sucesso as excelentes qualidades do suporte da sílica com a baixa reatividade química das resinas orgânicas no preparo de FE para CLAE. O principal objetivo destas FE é a modificação do suporte de sílica pela deposição de polímeros, formando um compósito sílica-polímero<sup>71</sup>. O polímero pode estar apenas adsorvido sobre a superfície da sílica ou imobilizado. Algumas das vantagens deste tipo de FE são:

- ❖ a seletividade destas FE pode ser variada dependendo do grupo imobilizado sobre a sílica,
- ❖ maior recobrimento dos sítios ativos do suporte em comparação à FE ligadas,

- ❖ maior proteção do suporte de sílica contra ataques químicos de fases móveis agressivas.

A imobilização de polímeros sobre um suporte poroso como a sílica é um processo complexo, influenciado por contribuições de diferentes tipos de interações adsorptivas, pelo ataque químico das macromoléculas sobre a sua superfície, pelo entrecruzamento das cadeias do polímero e/ou pela insolubilidade do polímero imobilizado nos eluentes<sup>71</sup>.

A química da superfície da sílica tem uma influência significativa no processo de imobilização. Os grupos silanóis podem atuar com o âncoras para a ligação dos polímeros adsorvidos. Além disto, a geometria das partículas do suporte é determinante na deposição/imobilização do polímero e das propriedades resultantes. Por exemplo, no caso de poros com formato irregular, que se apresentam mais estreito em sua entrada e mais largos em sua profundidade, tornam-se inacessíveis para macromoléculas, impedindo uma boa adsorção do modificador.

Mas, as propriedades dos polímeros utilizados na modificação como sua estrutura e natureza química, tamanho e o grau de entrecruzamento das macromoléculas, bem como a solubilidade dos polímeros análogos lineares não entrecruzados e seu grau de adsorptividade também influenciam consideravelmente na imobilização sobre o suporte de sílica.

Há uma enorme variedade de polímeros usados como FE líquida. Entre eles podem ser citados: os polissiloxanos<sup>8-11,16-19,36,37,72,73,74</sup> polibutadienos<sup>75-77</sup>, poliacrilatos<sup>78,79</sup>, poliestirenos<sup>80,81</sup> e poliaminas<sup>82</sup>.

Existem vários tipos de recobrimentos de superfície de suportes, especialmente para a sílica. A forma mais simples de preparar o compósito suporte-polímero é pela deposição da camada polimérica sobre a superfície do suporte, sem promover o entrecruzamento entre as cadeias do polímero e sem nenhum tipo de ligação química entre suporte e polímero. Neste caso ocorre uma contribuição de um ou mais tipos de interações como dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas entre polímero e suporte. A insolubilidade do polímero na fase móvel será crucial neste tipo de FE<sup>71</sup>.

Após a formação do compósito polímero-suporte, pode ocorrer um processo posterior de imobilização por entrecruzamento das cadeias do polímero induzidas por peróxidos<sup>8,13,71</sup>, tratamento térmico<sup>72-75</sup>, radiação ionizante<sup>8,9,11,83</sup> e outras, ou ainda, promover a ligação covalente entre suporte e o polímero, produzindo uma monocamada ancorada. Neste último caso, o polímero deve apresentar grupos funcionais específicos ou reativos para se ligar ao suporte.

As técnicas de imobilização dos polímeros podem ser classificadas de acordo com a forma do polímero ou de acordo com sua rota de imobilização. Os polímeros podem formar um filme fino sobre a superfície ou preencher todo o volume do poro. Uma outra possibilidade seria a combinação das duas formas anteriores, na qual superfície de sílica estaria “densamente” recoberta pelo polímero. A Figura 1.6 apresenta estas três possibilidades <sup>71</sup>.

Recentes trabalhos desenvolvidos no LabCrom com polissiloxanos <sup>73,74,83</sup> imobilizados sobre sílica mostraram que estas FE, sorvidas e imobilizadas, apresentam propriedades cromatográficas similares às colunas comerciais, competindo em qualidade e estabilidade, levando vantagem inclusive na metodologia de preparação que é mais simples e de menor custo. A partir destes trabalhos, foi proposto um modelo de distribuição do polímero dentro dos poros da sílica. Um estudo da distribuição do PMOS líquido nos poros da sílica indicou que o polímero se deposita, preferencialmente, na forma de gotas estendidas ou “plugs”<sup>12</sup>. A explicação para esta distribuição é baseada no fenômeno de “instabilidade de Rayleigh” no qual é energeticamente desfavorável para um líquido atingir uma configuração estável em uma grande área, como por exemplo, uma camada fina depositada sobre a superfície da sílica, se houver a opção de formar “plugs”.

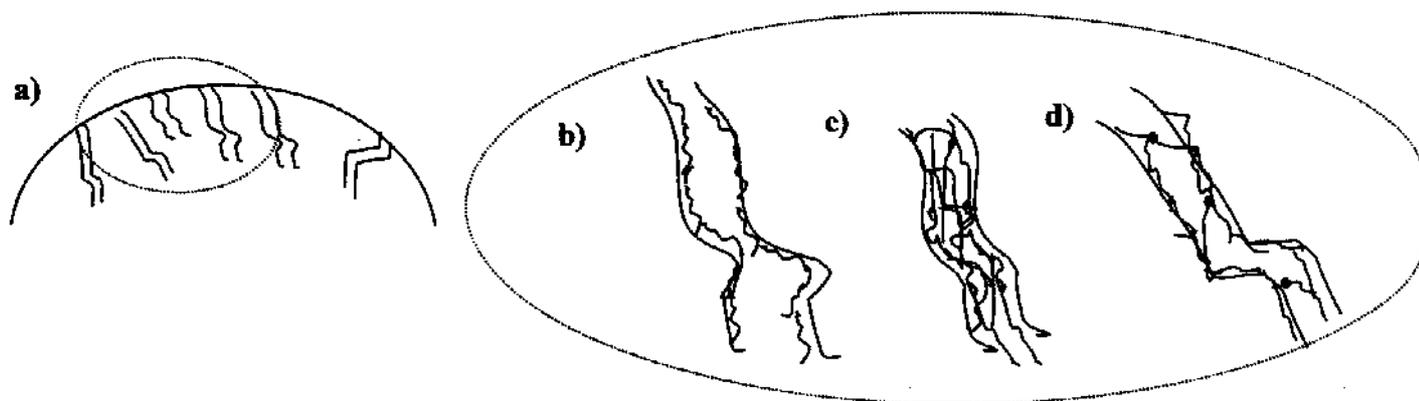


Figura 1.6: a) Partícula de sílica com representação dos poros em sua superfície. No detalhe os poros estão apresentados: b) com as paredes recobertas com um filme de polímero, c) cheio de polímero e d) com as paredes recobertas além de conter cadeias entrecruzadas de polímero em seu interior.

A necessidade de imobilização em FE modificadas com polímero é praticamente consenso desde as década de 70 e início de 80 quando os pesquisadores da época apontavam resultados negativos para FE sorvidas sobre a superfície de sílica. Os trabalhos indicavam perda de FE por sua solubilização

na fase móvel. Na maioria dos casos, houve a necessidade de reações entre as cadeias do polímero ou entre o polímero e a superfície de sílica para estabilizar a camada de polímero. Estas reações resultavam em FE com camadas estáveis, insolúveis em fases móveis.

Um grupo, chefiado por Carr, trabalha extensivamente com a imobilização de polímeros, principalmente polibutadieno, sobre suportes de zircônia<sup>52,76,84-87</sup>. As FE reversas resultantes mostraram grande estabilidade, combinando as propriedades do polibutadieno com a estabilidade química da zircônia. Em um dos trabalhos<sup>88</sup>, a FE obtida permaneceu estável mesmo depois de exposta à uma solução de hidróxido de sódio 1 mol L<sup>-1</sup> a 100 °C.

Na década de 80, um outro grupo de pesquisas em FE, liderado por Schomburg, preparou e avaliou diversas FE através do entrecruzamento de polissiloxanos, induzidos por peróxidos seguida de tratamento térmico ou radiação gama<sup>8,13,14,84</sup>. No caso das FE com entrecruzamento induzido por peróxidos, a sílica era suspensa em soluções de polissiloxanos com adição de peróxido de dicumila, e após remoção do solvente o material era aquecido em alta temperatura (200 °C) sob atmosfera inerte. Alternativamente, foi utilizada radiação gama com fonte de <sup>60</sup>Co para imobilizar as FE após a remoção do solvente sem a presença do peróxido. As FE resultantes mostraram bons resultados cromatográficos e boa taxa de recobrimento de polímero, indicada pela %C, que foi em média de 15%.

Seguindo esta tendência, alguns trabalhos realizados no LabCrom também exploraram a imobilização de polissiloxanos por radiação gama em FE de sílica nua e modificada com zircônia e titânia<sup>15-19</sup>. A radiação gama em FE com suportes de sílica nua aumentou a eficiência na separação cromatográfica. Com relação às FE com suportes de sílica modificada, a imobilização por radiação gama foi imprescindível para a estabilização das fases, uma vez que, para estas FE apenas sorvidas, observava-se o fácil arraste do polímero pela fase móvel. Isto se deve principalmente às características da radiação gama que, quando incide na matéria, produz excitação eletrônica e ionização. Estes processos podem provocar cisões nas moléculas e, a partir de íons ou radicais livres, produzir novas substâncias químicas. Nos polímeros estes processos se traduzem em formação de produtos menores, com a degradação da molécula inicial ou maiores resultantes dos entrecruzamento das cadeias.

Além da radiação gama são descritos outros métodos de imobilização de polímeros sobre suportes de sílica. Entre eles encontram-se a radiação por microondas<sup>88</sup>, o tratamento térmico<sup>13,72,73</sup> e a auto-imobilização<sup>74,89</sup>.

No caso da radiação microondas e do tratamento térmico o agente de imobilização é a temperatura. A radiação microondas é um tipo de energia não ionizante que causa movimento

molecular pelos fenômenos de migração iônica e rotação dipolar. O campo elétrico gerado pelas microondas é capaz de alinhar as moléculas polarizadas e, quando o campo decresce, as moléculas voltam ao estado inicial de desordem. Dependendo da frequência aplicada, esta movimentação de estado ordenado para a desordem molecular pode ocorrer milhões de vezes por segundo, proporcionando um aquecimento do meio muito rápido. A radiação microondas não tem energia suficiente para romper ligações químicas, mas o aquecimento rápido induzido será o responsável pela imobilização do polímero sobre o suporte de sílica. Alguns trabalhos neste sentido, imobilizando polímeros sobre a superfície de sílica nua e modificada já foram concluídos no LabCrom e mostraram resultados promissores<sup>90,91</sup>.

Como já foi visto, os primeiros trabalhos de Schomburg e colaboradores na área imobilização de polímeros<sup>92</sup>, utilizavam peróxidos como indutores na formação de cadeias entrecruzadas de polissiloxanos e o tratamento térmico era apenas um fator coadjuvante deste processo. Na verdade, os experimentos com tratamento térmico na época eram uma tentativa de adaptar à Cromatografia Líquida, os processos já conhecidos e utilizados em FE para cromatografia gasosa<sup>93-95</sup>. Até a década de 90, o tratamento térmico era utilizado em associação aos peróxidos como azo-t-butóxido, peróxido de dicumila ou alilmetacrilato para produzir reações de entrecruzamento e conseqüente imobilização do polímero. Mais tarde, ainda na presença de peróxidos, as pesquisas com tratamento térmico passaram a explorar altas temperaturas. Neste sentido, Ohmachi<sup>96</sup> utilizou temperaturas de 200 a 400 °C para imobilização de PMOS (com presença de peróxido). Ele chegou a conclusão que as FE que apresentaram os melhores resultados foram as tratadas a 400 °C, com bons resultados cromatográficos a altos pH.

Em um estudo mais recente, sem a presença de peróxidos ou outros agentes indutores para quebra de ligações, avaliou-se o tratamento térmico, de 20 a 280 °C<sup>97</sup>, como agente de imobilização de PMOS sobre suporte de sílica. Os resultados indicaram que temperaturas até 120 °C produzem FE com uma monocamada sobre o suporte de sílica, com resultados promissores para sua utilização cromatográfica.

Neste trabalho será explorada esta nova perspectiva utilizando o tratamento térmico como agente de imobilização de polímeros, tratando-se de uma técnica simples, de custo relativamente baixo e boa reprodutibilidade operacional.

## *Capítulo II - OBJETIVOS*

Atualmente são encontradas comercialmente uma infinidade de tipos de FE para CLAE de fase reversa com diferentes propriedades de separação voltadas para as mais diversas aplicações .

Mas, na área de pesquisa de novas FE, não basta a escolha de um suporte e um modificador para se preparar FE. É necessário antes um trabalho investigativo sobre as variáveis envolvidas como, por exemplo, as características físicas e químicas do suporte e a natureza química do modificador a ser utilizado. Além disto, após o preparo de uma nova FE, é preciso avaliar seu comportamento frente à solutos de diferentes classes químicas para se reconhecer suas aplicações.

Neste trabalho o suporte utilizado será a sílica que apresenta características diferenciadas como forma e tamanho das partículas, área superficial, porosidade e presença de possíveis contaminantes, decorrentes do método de sua síntese, que certamente influenciam no comportamento da FE. Sobre a superfície de sílica será imobilizado o polímero poli(metiloctadecilsiloxano), PMODS. A técnica de imobilização do polímero sobre o suporte será o tratamento térmico.

Considerando-se estes aspectos, os objetivos deste trabalho serão:

- Propor uma mistura teste contendo solutos de diferentes características químicas capazes de diferenciar qualquer FE quanto ao seu potencial de separação,
- Preparar FE imobilizadas a partir de sílicas de diferentes características como partículas irregulares e esféricas, diferentes tamanhos de poros e vários tamanhos médios de partículas, utilizando o polímero PMODS como modificador.
- Avaliar a influência das variáveis envolvidas na imobilização por tratamento térmico do PMODS sobre o suporte de sílica.
- Caracterizar por métodos químicos, físicos e cromatográficos as FE preparadas.
- Avaliar a aplicabilidade de algumas destas novas FE em amostras reais.

# *Capítulo III - MISTURAS TESTES*

## **3. INTRODUÇÃO**

A retenção de solutos na cromatografia de líquida é baseada em uma série de interações entre as moléculas do soluto e das fases móvel e estacionária. Entre estas interações destacam-se os efeitos hidrofóbicos, as interações do tipo dipolo-dipolo, transferências de carga, exclusão de tamanho e efeitos iônicos, ou seja, todo o tipo de interações moleculares que podem ocorrer em interfaces líquidas e sólidas.

Estas interações serão governadas principalmente pelas características da fase estacionária utilizada na separação em cromatografia líquida. Basicamente, as propriedades de uma fase estacionária e, portanto da coluna cromatográfica, dependem das propriedades físico-químicas de seu suporte, sendo a sílica a principal representante desta categoria. Desta forma, ao se desenvolver uma nova FE, devem ser consideradas algumas características da sílica, como a sua área superficial, a distribuição do diâmetro de poro, as propriedades químicas de sua superfície<sup>98</sup>, concentração de silanóis geminais, vicinais ou isolados, presença de cátions ou outras impurezas, etc<sup>99</sup>. Mas, mesmo trabalhando com sílicas de características nominais semelhantes, as modificações realizadas em sua superfície irão produzir inúmeras FE, com diferentes propriedades para a realização de separações analíticas.

### **3.1 Propriedades das Colunas Cromatográficas**

Normalmente, as colunas cromatográficas são adquiridas pelos usuários baseadas em informações fornecidas pelo fabricante como área superficial, quantidade de carbono (% C), formato e tamanho da partícula do suporte e as modificações de sua superfície<sup>100</sup>. As misturas testes utilizadas

para avaliar o desempenho da coluna cromatográfica priorizam o parâmetro eficiência (em pratos/m) mas, nem sempre, revelam toda a especificidade da FE.

Diante deste quadro, encontra-se a necessidade de se avaliar e, se possível, comparar as diferentes colunas cromatográficas em termos de suas capacidades de separação frente aos analitos de diferentes classes químicas. Diversos trabalhos na literatura têm discutido qual seria a melhor maneira de se avaliar uma coluna cromatográfica e apresentar uma mistura teste padrão capaz de levantar todas as características da fase estacionária, independentemente de sua constituição estrutural e modificação química.

Uma das primeiras pesquisas a este respeito foi realizada por Goldberg<sup>101</sup> que, na década de 1980, usou quatro fases móveis para ilustrar a enorme diferença das propriedades cromatográficas das colunas comerciais da época. Em 1987, Walters<sup>102</sup>, na FDA, mostrou a necessidade de se desenvolver testes que pudessem selecionar colunas similares ou equivalentes e definir seu papel para a separação de analitos de diferentes classes químicas. No mesmo período, Sander e Wise<sup>103</sup> propuseram um teste universal para caracterizar a natureza da ligação em fases estacionárias monoméricas (monocamada), poliméricas ou fases intermediárias (que poderiam ser consideradas tanto como fases monoméricas densas ou poliméricas pouco densas ou ainda fases oligoméricas). O teste avaliou 39 colunas tipo C18 e para diferenciar fases monoméricas e poliméricas foram usados alguns hidrocarbonetos aromáticos policíclicos sintetizados pelos autores.

Após estes trabalhos pioneiros, Engelhardt e colaboradores<sup>79,99</sup>, e Tanaka<sup>104</sup> e colaboradores, desenvolveram uma série de trabalhos nos quais definiram algumas das propriedades que efetivamente deveriam caracterizar e diferenciar fases estacionárias. A partir de suas definições outros autores passaram a complementar estes dados e, hoje, é possível traçar um perfil completo de uma coluna cromatográfica através do comportamento frente a estas propriedades que serão descritas nos próximos tópicos.

### **3.1.1. Eficiência**

Embora não seja conceitualmente uma propriedade, a eficiência é um dos únicos parâmetros apresentados pelos fabricantes de colunas cromatográficas como medida de avaliação, tornando-se um

fator decisivo no momento da escolha de uma coluna cromatográfica. A eficiência é medida em número de pratos, que corresponde, teoricamente, a uma etapa de equilíbrio da substância entre a fase estacionária e a fase móvel, analogamente aos pratos teóricos da técnica de destilação. Quanto maior o número de pratos, mais “equilíbrios” existirão, melhor será a separação e, portanto, maior será a eficiência da coluna cromatográfica. A eficiência é uma função de vários fatores, como o diâmetro da partícula do suporte, o coeficiente de difusão do soluto (depende da viscosidade do solvente) e a ausência de interação secundária entre o soluto e a fase estacionária.

Em colunas de fase reversa, a tendência mundial é utilizar hidrocarbonetos aromáticos como solutos (padrões) para avaliar a eficiência de uma coluna. Como estes compostos têm caráter fortemente hidrofóbico, ficarão mais tempos retidos pela FE. E, portanto, criando mais etapas de equilíbrio entre FE e FM, o que irá determinar o maior número de pratos possível para a coluna que está sendo avaliada. Porém, não há um consenso entre os fabricantes e centros de pesquisas em cromatografia quanto a um composto universal. Os padrões mais utilizados são naftaleno, antraceno<sup>98</sup>, acenafteno<sup>105,106</sup> pentilbenzeno<sup>107</sup>.

### **3.1.2. Propriedades hidrofóbicas**

As propriedades hidrofóbicas revelam a capacidade da FE em reter compostos hidrofóbicos e está diretamente ligada à densidade do ligante modificador da superfície de um suporte cromatográfico<sup>107</sup>. No caso das FE baseadas em sílica estes modificadores podem ser alquilsiloxanos de diferentes tamanhos de cadeia (entre os mais utilizados encontram-se os C1, C4, C8 e C18). Quanto maior for a quantidade (carga) destes modificadores sobre a superfície da sílica, maior será o caráter hidrofóbico da FE e, portanto, maior será a retenção do composto apolar. A hidrofobicidade de uma FE também será determinada pela distribuição do modificador na superfície do suporte (uma ou mais camadas) e um eventual capeamento da FE. Estas características hidrofóbicas da FE permitem a retenção/separação de compostos de diferentes graus de hidrofobicidade, levando à separação, por exemplo, de hidrocarbonetos com estruturas químicas muito próximas. A esta capacidade de separação dá-se o nome de seletividade hidrofóbica e pode ser avaliada a partir do parâmetro fator de separação, mais conhecido como  $\alpha$  (ver item 3.2 deste capítulo).

Avaliando estas duas propriedades, Tanaka e colaboradores<sup>104</sup>, encontraram uma relação linear entre a seletividade de compostos diferenciados por uma unidade CH e a percentagem de carbono (carga de alquilsiloxanos) em uma determinada coluna cromatográfica (Develosil). Porém, em outro trabalho, Engelhardt e colaboradores<sup>99</sup>, apresentaram resultados opostos: uma relação parcialmente não linear entre os dois parâmetros avaliados por Tanaka e colaboradores, desta vez utilizando colunas cromatográficas de diferentes fabricantes. Baseados nestes resultados, ambos sugerem o uso de seletividade hidrofóbica como parâmetro para se avaliar a hidrofobicidade de uma FE. Neue e colaboradores<sup>105</sup>, por sua vez, sugere que para avaliar a “capacidade de retenção hidrofóbica” da FE basta observar o tempo de retenção de compostos como tolueno, naftaleno ou acenafteno, ou ainda, calcular o fator de retenção destes compostos. Este último conceito ainda é o mais utilizado na avaliação de FE entre os fabricantes de FE.

### **3.1.3. Propriedades silanofilicas**

A preocupação com as propriedades silanofilicas de uma FE se deve, principalmente, ao crescente aumento da utilização de cromatografia líquida em análises de fármacos (essencialmente compostos de caráter básico ou polar) e compostos de interesse biomédico e ambiental<sup>108</sup>.

A atividade silanofilica é um termo empírico que inclui provavelmente interações eletrostáticas e de troca iônica entre soluto e FE<sup>109</sup>. Claessens e colaboradores<sup>110</sup> afirmam inclusive, que a atividade silanofilica compreende uma série de interações e, dentre as demais, as interações do tipo íon-íon e ligações de hidrogênio são as mais relevantes em cromatografia líquida de fase reversa. A silanofilicidade é considerada a propriedade mais importante das FE de fase reversa, pois revela a interação de analitos básicos com os silanóis residuais presentes na superfície do suporte, tornando óbvia a enorme diversidade entre as FE encontradas comercialmente. Foi através do comportamento de eluição de compostos básicos, que Engelhardt e colaboradores<sup>98</sup> observaram alterações na retenção relativa e absoluta e na assimetria do pico cromatográfico entre diferentes FE. A princípio, a eluição de compostos básicos, considerada ideal, deveria apresentar picos simétricos e seu tempo de retenção deveria ser independente do tamanho do analito. No entanto, é sabido que quanto maior for a atividade silanofilica da FE, maior será a retenção do analito básico e maior será a assimetria de seus picos, promovendo uma baixa resolução cromatográfica. Além disto, uma maior interação destes sítios

contendo silanóis livres (ou não, quando recobertos por modificadores) com o analito poderá causar outras conseqüências indesejáveis em uma separação analítica como, por exemplo, baixo índice de quantificação, irreprodutibilidade dos tempos de retenção ou até mesmo retenção irreversível dos analitos.

Na avaliação das propriedades silanofílicas, um ponto tem sido muito contestado na literatura: a utilização de fase móvel tamponada durante as análises cromatográficas. Este questionamento é válido, porque a presença de íons do tampão irá suprimir algumas das interações entre os analitos básicos e a superfície silanofílica da FE<sup>105</sup>, principalmente quando são usadas bases fracas, resultando em um cromatograma com picos totalmente ou quase simétricos. A justificativa apontada pelos defensores da utilização de fases móveis tamponadas é que, com a presença do tampão, há uma melhora significativa na repetitividade das análises.

Mas, por outro lado, deve se considerar que a utilização de tampão irá mascarar as possíveis “deficiências” da FE como, por exemplo, a presença de silanóis livres em uma quantidade maior do que a desejada e a presença de metais no suporte de sílica, além do fato que a utilização de tampão poderia diminuir bastante o tempo útil da coluna cromatográfica.

Como a interação silanofílica afeta principalmente o formato do pico, esta propriedade é avaliada através da assimetria do pico de um analito básico e, alguns autores<sup>102,111</sup> sugerem também avaliar o fator de separação entre dois compostos básicos em uma mesma análise como, por exemplo, N,N-dimetilanilina e anilina.

#### **3.1.4. Presença de metais**

A última característica, concentração de metal, é vital quando se trata de separações de analitos com propriedades de complexação. Os compostos quelantes são sensíveis a impurezas metálicas e apresentarão os mesmos problemas relativos à simetria e ao formato do pico cromatográfico observados nas interações silanofílicas. Além disto, a presença de metais torna os silanóis livres na superfície da sílica muito mais ácidos, transformando-os em sítios propícios para interações iônicas, indesejáveis em separações contendo misturas de compostos de diferentes características químicas.

### 3.1.5. Outras considerações

Em seus trabalhos, Eurby e Petersson<sup>107</sup> aplicaram mais três características dentro deste quadro de avaliação de fases estacionárias: capacidade de ligação de hidrogênio, que mede o número de grupos silanóis disponíveis e o grau de capeamento; capacidade de troca iônica a pH 7,6, que estima a atividade total de silanóis e a capacidade de troca iônica a pH 2,7, que define a acidez dos grupos silanóis. Há ainda uma outra propriedade, a seletividade estérica, que define a capacidade da FE de diferenciar analitos de estruturas espaciais diferentes. Alguns autores consideram, nesta categoria, a capacidade de separação de compostos de estrutura química semelhante, porém espacialmente diferenciados, como por exemplo, compostos planares e não planares<sup>112</sup>. Para este fim, Tanaka e colaboradores<sup>104</sup>, sugerem compostos como o trifenileno e o orto-terfenil. Entretanto, estas considerações ainda não foram adotadas pelos fabricantes e estão, gradativamente, sendo utilizadas e questionadas em novos trabalhos científicos.

### 3.2 Parâmetros utilizados para se avaliar colunas cromatográficas

A partir do cromatograma genérico apresentado na Figura 3.1 é possível definir e calcular alguns parâmetros cromatográficos mais utilizados em separações analíticas.

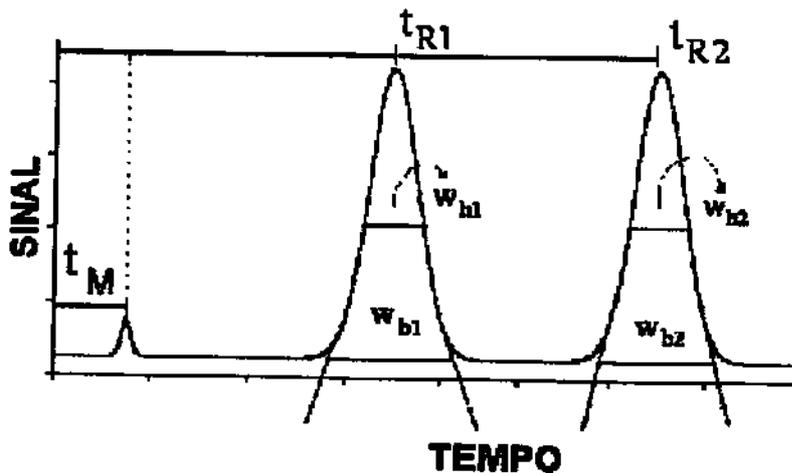


Figura 3.1: Cromatograma genérico com medidas relacionadas à determinação de parâmetros cromatográficos<sup>2</sup>.

### **Tempo de Retenção ( $t_R$ )**

Um dos termos mais empregados é o grau de retenção de um componente específico da mistura que é expresso quantitativamente em termos de tempo de retenção,  $t_R$ , sendo definido como o tempo que transcorre desde o ponto de injeção até o máximo do pico de eluição (é repetível desde que as condições de operação sejam exatamente idênticas)<sup>113</sup>. Analogamente, o tempo de retenção de um soluto não retido,  $t_M$ , representa o tempo necessário para a fase móvel passar pela coluna. A partir de  $t_M$  é possível calcular o tempo em que um determinado soluto fica retido na fase estacionária, o tempo de retenção ajustado,  $t'_R$ , calculado através da equação:

$$t'_R = t_R - t_M \quad (3.1)$$

Em análises de rotina para confirmação de substâncias na indústria farmacêutica, por exemplo, este é o primeiro parâmetro a ser considerado em uma separação analítica e, caso seja observada alguma irregularidade que não atenda a uma metodologia previamente estabelecida, todo o resultado será descartado, atendendo o protocolo vigente.

### **Fator de Retenção ( $k$ )**

Um outro parâmetro que diz respeito à retenção de um soluto é o fator de retenção,  $k$ , que corresponde à razão entre os tempos em que as moléculas de soluto ficam retidas na fase estacionária e percorrendo a coluna na fase móvel. Pode ser calculado através da equação:

$$k = \frac{t'_R}{t_M} \quad (3.2)$$

Os valores ideais de  $k$  devem variar entre 2 e 10. Valores maiores indicam uma maior interação entre FE e soluto e, conseqüentemente, um longo tempo de análise. O inverso ocorrerá quando os valores forem menores do que 2, prejudicando o processo de separação em uma separação analítica<sup>114,115</sup>.

A retenção do soluto está diretamente relacionada à termodinâmica de distribuição entre duas fases distintas. Portanto, pode ser alterada a) por mudanças na natureza química e/ou temperatura das duas fases cromatográficas, e b) por mudanças no volume das duas fases.

### **Resolução( $R_s$ ) e Fator de Separação ( $\alpha$ )**

Um cromatograma típico apresenta os resultados de eluição sempre na forma de uma curva gaussiana. Com base nisto, podem ser definidos dois outros parâmetros cromatográficos que relacionam dois picos adjacentes: a resolução,  $R_s$ , e o fator de separação,  $\alpha$ . A resolução refere-se à separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada com base nos tempos de retenção ( $t_R$ ) e nas larguras da base ( $w_b$ ) ou nas larguras dos picos à meia altura ( $w_h$ ), conforme a equação:

$$R_s = 2 \left[ \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \right] = 1,177 \left[ \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}} \right] \quad (3.3)$$

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

O fator de separação,  $\alpha$ , está relacionado à separação entre dois componentes adjacentes e depende da retenção ( $t'_R$ ) de cada componente na fase estacionária, podendo-se dizer que representa a seletividade de um sistema cromatográfico. Para dois picos adjacentes, quanto mais seletivamente a FE reter o segundo componente, maior será o fator de separação. Pode ser calculado a partir da equação:

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (3.4)$$

Assim, quanto mais seletivamente a fase estacionária reter o segundo componente da mistura analisada, maior será o fator de separação. Para que ocorra a separação cromatográfica o valor de  $\alpha$  deve ser maior que 1<sup>116</sup>. Se  $\alpha = 1$  em um dado sistema, não há diferenças termodinâmicas entre os componentes e, portanto, não poderão ser separados. Entretanto, vale lembrar que valores de  $\alpha > 1$ , não significam necessariamente uma boa separação, pois os picos podem estar largos e/ou parcialmente sobrepostos.

### **Número de Pratos (N)**

A eficiência da coluna é observada a partir do formato do pico no cromatograma. Quanto mais estreito for o pico, maior será a eficiência da coluna na análise do soluto em questão. A eficiência também dá uma indicação da qualidade do recheio da coluna, através de medidas das contribuições cinéticas do espalhamento de banda.

O parâmetro utilizado para avaliar a eficiência da coluna é o número de pratos,  $N$ . Um prato é definido como sendo um equilíbrio teórico de distribuição de soluto entre as fases móvel e estacionária; quanto maior o valor de  $N$  mais equilíbrios existirão e a separação será maximizada. Na prática, o número de pratos para um dado componente é calculado a partir do próprio cromatograma<sup>2</sup> através da expressão:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,545 \left( \frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad (3.5)$$

Como podem ser utilizadas colunas cromatográficas de diferentes tamanhos, é usual expressar a eficiência em pratos por metro ( $N/m$ ):

$$N/m = \frac{N}{L} \quad (3.6)$$

onde  $L$  é comprimento da coluna em metros.

Diversos são os fatores que afetam o número de pratos, dentre os quais: condições de enchimento da coluna, temperatura da coluna, soluto, tamanho da amostra, tempo de retenção, técnica de injeção, etc, além das propriedades físicas da FE como tamanho das partículas e comprimento da coluna. Portanto, para comparar a eficiência de colunas cromatográficas comerciais com suporte de sílica, não basta que estas apresentem o mesmo tipo de modificação química de sua superfície, mas também apresentem o mesmo tamanho da partícula do suporte.

Quando há a necessidade de se comparar eficiências de colunas cromatográficas com FE de tamanho de partículas diferentes utiliza-se o conceito de prato reduzido,  $h$ , que é a eficiência da coluna considerando-se também o tamanho da partícula do suporte. O cálculo pode ser feito através da equação:

$$h = \frac{L}{N \times d_p} \quad (3.7)$$

onde  $L$  é comprimento da coluna em metros,  $N$  é a eficiência e  $d_p$  é o tamanho da partícula em metros.

Neste caso, quanto maior for a eficiência menor será o valor de  $h$ . As colunas cromatográficas comerciais para CLAE consideradas boas atualmente apresentam eficiências em uma faixa de 70000 a 100000  $N/m$  e o prato reduzido tem uma faixa entre 2,0 e 3,0.

### Altura de um prato, (H)

Os parâmetros operacionais de uma coluna podem também ser avaliados e comparados com outras colunas através da altura equivalente a um prato, H, que corresponde à razão entre o comprimento da coluna e o número de pratos<sup>2</sup>.

$$H = \frac{L}{N} \quad (3.8)$$

Assim, H é o comprimento necessário de uma coluna para gerar um prato; quanto maior o número de pratos, menor será H e mais eficiente será a coluna.

A equação de van Deemter (eq. 3.9), utiliza este conceito de altura de prato, H, para calcular a vazão ótima de trabalho para uma coluna levando em consideração também a influência de outros fatores determinantes da eficiência:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad (3.9)$$

sendo  $\mu$  a velocidade linear da fase móvel determinado também pela equação:

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad (3.10)$$

O termo A ou difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos causado pelo efeito dos múltiplos caminhos percorridos pelas moléculas de soluto em colunas recheadas, este fator está diretamente ligado à qualidade do recheio da fase estacionária dentro da coluna. O efeito de enchimento pode ser minimizado, usando-se colunas de diâmetros internos reduzidos, bem recheadas, e partículas de tamanho pequeno e uniforme. O termo B, ou difusão longitudinal, está relacionado à difusão molecular do soluto na fase móvel e pode ser minimizado utilizando-se altas velocidades lineares da fase móvel. O termo C, ou transferência de massa, está relacionado à facilidade de transferência de moléculas do soluto entre fase estacionária e fase móvel ou a resistência à transferência de massa (entre fase móvel e fase estacionária). Um fator que minimiza a resistência à transferência de massa é a espessura da fase estacionária líquida que recobre as partículas de suporte; quanto maior a espessura desta camada, menor a eficiência da coluna<sup>23</sup>. Enfim, conclui-se que a eficiência de uma coluna cromatográfica será tanto melhor quanto menor forem estes fatores. A Figura 3.2 apresenta um gráfico típico da equação de van Deemter<sup>118</sup> e a contribuição de todos os termos da

equação. A curva indica que há uma vazão ótima, relacionada com a velocidade linear da fase móvel,  $\mu$ , em uma altura de prato,  $H$  mínima, ou seja, no momento em que a eficiência será máxima.

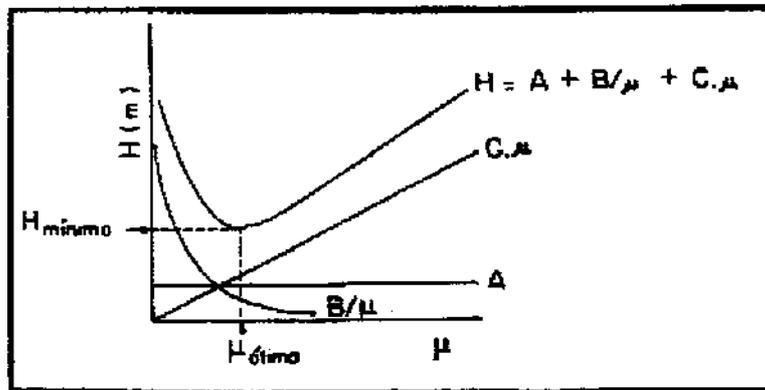


Figura 3.2: Curva da equação de van Deemter

### Assimetria, ( $A_s$ )

A expressão para o cálculo de número de pratos só é válida para os picos simétricos. Assim, a medida de simetria de um pico cromatográfico é um parâmetro de grande importância e é calculado através do fator de assimetria,  $A_s$ , uma medida da proporção entre as duas partes de um pico cromatográfico, no sentido horizontal, a 10% de sua altura. A literatura indica que o valor de  $A_s$  deve estar entre 0,9 e 1,2 sendo admitidos valores até 1,6<sup>4</sup>. Outra maneira de definir a forma do pico é através do fator de alargamento a 5% de sua altura<sup>116</sup>. A Figura 3.3 mostra as duas metodologias de cálculo para a assimetria.

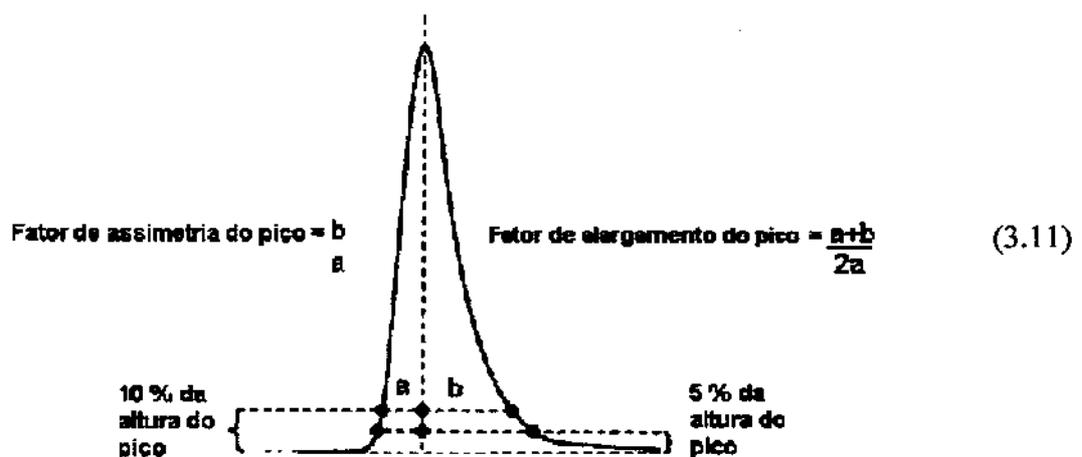


Figura 3.3: Determinação do fator de assimetria e alargamento de pico.

Atualmente, na indústria farmacêutica, o cálculo mais aceito para assimetria nos métodos definidos pelas farmacopéias é fator de alargamento, ou seja, a avaliação é feita a 5% da altura do pico cromatográfico.

### **3.3 Parte Experimental**

#### **3.3.1. Reagentes**

Todos os reagentes utilizados nas diversas etapas deste trabalho são de grau p.a. salvo mencionado em contrário e estão listados abaixo:

Acenafteno, 99% Aldrich

Água deionizada, Sistema Mili-Q plus

Anilina p.a. Merck

Benzeno, Synth

Benzonitrila, Riedel-de Haën

Etilbenzeno p.a. Merck

Fenol, 99%, Aldrich

Metanol, Mallinckrodt e Tedia (grau HPLC)

N,N-dimetilanilina, 98%, Fluka. (bidestilado no LabCrom)

Naftaleno, Carlo Erba

Tolueno, Merck

Uracil, 98%, Aldrich

#### **3.3.2 – Colunas Cromatográficas**

Nesta etapa do trabalho foram utilizadas 5 fases estacionárias comerciais todas elas com a FE quimicamente ligadas:

- Spherisorb ODS2 , 3 $\mu$ m, 100 mm, 150 x 4,6 mm. } Recheadas pelo fabricante

- Spherisorb S10 C8, 10 $\mu$ m, 150 x 4,6 mm.
- Keystone DeltaBond Octyl, 5 $\mu$ m, 150 x 4,6 mm.
- Rainin C8, 5 $\mu$ m, 120 x 3,9 mm. } Recheadas no LabCrom\*
- Rainin C18 5 $\mu$ m, 120 x 3,9 mm. }

### 3.3.3 - Equipamento – Cromatógrafo a Líquido

As separações cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo compacto Shimadzu constituído de uma bomba de alta pressão, modelo LC 10AD, um detector espectrofotométrico de absorção no UV/VIS com comprimento de onda variável, modelo SPD 10AV, e injetor da Rheodyne, modelo 8125-095, com alça de injeção de 5  $\mu$ L. O processamento dos dados cromatográficos foi feito através do software ChromPerfect e Report Write-Plus da Justice Innovations. As separações foram realizadas utilizando-se fase móvel metanol:água70:30 v/v.

### 3.4 Resultados e Discussão – Avaliação Cromatográfica

Os testes normalmente utilizados pelos fabricantes de colunas cromatográficas têm como objetivo avaliar o desempenho da coluna em termos de eficiência e assimetria frente a compostos neutros. Mas, o ideal seria se estas misturas testes considerassem não só a eficiência da coluna, como também a capacidade de separar compostos neutros, básicos e ácidos, além de apresentar resolução entre compostos de características semelhantes<sup>119</sup>. Uma mistura teste deve obedecer a pelo menos dois requisitos básicos essenciais: os solutos devem ser de fácil obtenção em qualquer laboratório analítico e as condições utilizadas nos testes devem ser sempre as mesmas de modo a diferenciar uma grande variedade de colunas cromatográficas, ou melhor, de FE.

Os testes devem ser realizados de maneira a apresentar toda a realidade do comportamento cromatográfico dos solutos (independentemente de sua característica química) e, por esta razão, durante

---

\* \* colunas gentilmente cedidas por Edivan Tonhi, responsável também pelo enchimento das colunas

todo o trabalho foram utilizadas fases móveis neutras de água-modificador orgânico sem adição de tampão ou presença de sais que pudessem mascarar a eluição de determinados tipos de compostos.

O modificador orgânico utilizado na preparação da FM também apresenta um papel importante na avaliação de misturas testes de colunas cromatográficas. Para Engelhardt e colaboradores<sup>98</sup>, a acetonitrila apresenta diferentes seletividades em relação ao metanol principalmente quando são analisados solutos básicos. Segundo seus estudos, as interações silanofílicas não são tão perceptíveis em acetonitrila quanto na presença de metanol e os requisitos a serem avaliados para classificação de uma boa coluna cromatográfica acabam tornando-se inválidos. Assim, todas as comparações entre colunas devem sempre ser feitas utilizando a mesma fase móvel.

No caso dos analitos, foram escolhidos inicialmente dez compostos para compor a mistura sintética a ser adotada, cada um deles esteve presente para avaliar uma determinada característica da FE:

- Uracil, um soluto inerte não retido por fases estacionárias apolares, foi utilizado para avaliação do tempo de passagem da fase móvel ( $t_M$ )
- Ácido benzóico e Fenol, para se observar a interação de um composto ácido com a fase estacionária. O fenol consegue interagir com as partes polares e apolares da FE<sup>98,110</sup>. Assim, sua eluição pode mostrar a presença de interações polares e a capacidade de formações de ligações de hidrogênio.
- Piridina, anilina e N,N- dimetilanilina, para a observação de propriedades silanofílicas. Estes analitos interagem fortemente com sítios ácidos como os silanóis livres presentes no suporte de sílica. Suas eluições são um ótimo parâmetro de avaliação para a silanofilicidade da FE, porque quanto maior for a interação do composto com os silanóis, maior será a interferência no aspecto do cromatograma final, ou seja, o pico cromatográfico apresentará uma alta assimetria com cauda ao final. Posteriormente, os testes foram realizados apenas com a N,N-dimetilanilina. Um dos fatores para a escolha da N,N-dimetilanilina, frente à anilina, piridina e dentre tantos outros compostos básicos descritos na literatura, foi o fato dela não se degradar facilmente, sendo possível, inclusive, utilizá-la sem a necessidade de destilação.
- Tolueno, etilbenzeno, naftaleno e acenafteno, foram usados para avaliar a separação entre pares (tolueno-etilbenzeno, tolueno-naftaleno e naftaleno-acenafteno) e, conseqüentemente, determinar as características hidrofóbicas das FE.

Em uma primeira etapa de testes foram estudados os tempos de retenção de cada um dos compostos isoladamente, sendo escolhidos apenas seis analitos de diferentes características químicas. Foram eles: uracil, ácido benzóico, fenol, piridina, tolueno e etilbenzeno. As colunas utilizadas para estes testes foram recheadas no LabCrom com fases estacionárias comerciais, quimicamente ligadas do tipo C8 e C18 da Rainin.

Em um primeiro momento, para as análises desta mistura foi utilizada fase móvel em três diferentes composições: 50:50, 60:40 e 70:30 v/v de metanol:água na coluna C18 Rainin. A Figura 3.4 apresenta o cromatograma desta separação em fase móvel metanol:água 70:30 v/v. Neste caso, os picos referentes ao ácido benzóico e fenol não foram bem resolvidos e o composto piridina coeluiu com o fenol apresentando cauda. A cauda também foi observada quando apenas o composto piridina foi analisado sob as mesmas condições sugerindo que a fase estacionária deve conter uma quantidade considerável de silanóis livres interagindo com o composto básico.

Na tentativa de melhorar a resolução do segundo e terceiro pico (ácido benzóico e fenol) foi alterada a força cromatográfica da fase móvel utilizando-se a composição metanol:água 60:40, v/v. Também, alterou-se o composto básico, agora utilizando anilina. Observou-se no cromatograma da Figura 3.5 que, embora o fenol tenha apresentado uma resolução melhor na separação, ocorreu uma coeluição agora entre os primeiros picos (uracil e ácido benzóico) e a anilina apresentou o mesmo comportamento, com cauda, já descrito anteriormente para a piridina.

Uma nova tentativa foi feita analisando-se o comportamento da mistura sintética frente à uma fase móvel de metanol:água na composição 50:50 v/v. O cromatograma está apresentado na Figura 3.6. A resolução dos primeiros picos melhorou mas o composto ácido benzóico coeluiu provavelmente com a uracil (avaliação feita através dos tempos de retenção em injeções separadas) durante a corrida cromatográfica não sendo possível distinguir o pico correspondente. Embora a resolução da anilina tenha melhorado, novamente sua eluição apresentou uma cauda semelhante ao comportamento observado em outras composições da fase móvel. Por outro lado, o par tolueno-etilbenzeno apresenta uma queda de sua resolução, indicando que esta fase móvel não é adequada para esta separação. Apesar das modificações das fases móveis, os compostos utilizados nesta primeira etapa não apresentaram bons resultados cromatográficos, pois os picos mostraram caudas e as seletividades ficaram comprometidas. Com relação ao composto básico, a partir da segunda tentativa, utilizou-se anilina sempre tri-destilada (para garantir a sua pureza) para que este composto pudesse ser utilizado sem picos interferentes. Mas, apesar deste cuidado e, mesmo com a estocagem em geladeira, após 7 dias a anilina

voltou a apresentar contaminantes. A degradação da anilina durante as avaliações foi um outro fator determinante para que fossem alterados os analitos dentro de cada classe química, na tentativa de se obter uma nova mistura sintética contendo compostos básicos, ácidos e neutros, que não apresentassem os problemas de coeluição e degradação (caso da anilina) anteriormente observados e que também pudessem apresentar uma boa avaliação da fase estacionária testada.

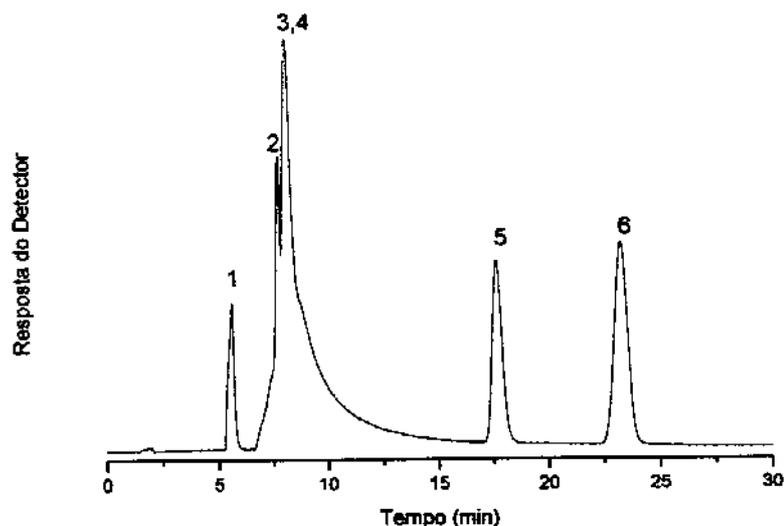


Figura 3.4: Cromatograma da separação de uma mistura teste contendo (1) uracil, (2) ácido benzóico, (3) fenol, (4) piridina, (5) tolueno e (6) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FE Rainin C18, fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm.

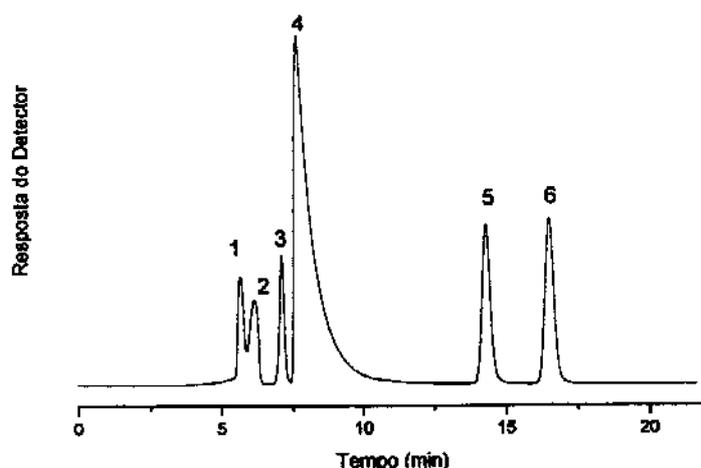


Figura 3.5: Cromatograma da separação de mistura teste contendo (1) uracil, (2) ácido benzóico, (3) fenol, (4) anilina, (5) tolueno e (6) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FE Rainin C18, fase móvel metanol:água 60:40 (v/v), vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm.

Diante da necessidade de se colocar na mistura teste os reagentes que apresentassem boas resoluções, com estabilidade longa, ou seja, depois de preparada a mistura, os componentes não sofressem nenhum tipo de degradação ou fossem responsáveis pela presença de interferentes, decidiu-se testar seis soluções teste descritas na Tabela 3.1

Tabela 3.1: Composições das misturas teste avaliadas em colunas C8 e C18 da Rainin:

Solução	Componentes da mistura
A	uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, tolueno e naftaleno
B	uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, tolueno e etilbenzeno
A + B	uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, tolueno, etilbenzeno e naftaleno
C	uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, tolueno, naftaleno e acenafteno
D	uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, tolueno etilbenzeno e acenafteno
E	uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, tolueno, naftaleno, etilbenzeno e acenafteno

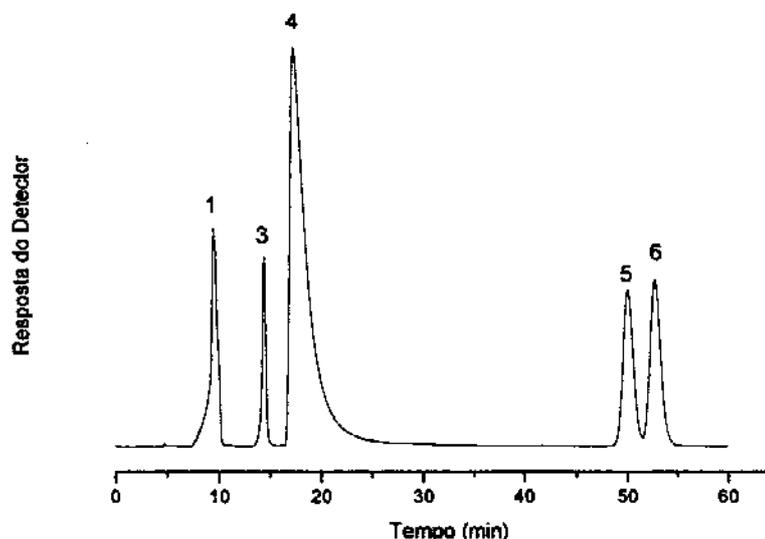


Figura 3.6: Cromatograma da separação de uma mistura teste contendo (1) uracil, (2) ácido benzóico, (3) fenol, (4) piridina, (4) tolueno e (5) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FE Rainin C18, fase móvel metanol:água 50:50 (v/v), vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm

As separações destas misturas foram feitas nas colunas C8 e C18 para comparações das separações cromatográficas. Para a avaliação de  $t_M$  manteve-se o composto uracil. As características hidrofóbicas foram avaliadas através da separação dos compostos tolueno e naftaleno (solução A) ou tolueno e etilbenzeno (solução B). A escolha do etilbenzeno é justificada porque este composto apresenta uma pequena cadeia alifática, permitindo uma melhor interação com a cadeia de carbonos do modificador (C8 ou C18) presente na fase estacionária. Para a observação de propriedades silanofílicas foi utilizado a N,N-dimetilanilina por ser um composto básico que não se degrada facilmente, sendo possível, inclusive, utilizá-lo sem a necessidade de destilação. A presença de fenol em todas as soluções deve-se a necessidade de se observar o comportamento de compostos ácidos. Por apresentar pouca interação com uma fase estacionária, fortemente hidrofóbica, o fenol é o primeiro composto a ser eluído após a uracil usualmente com boa simetria. Finalmente, para se avaliar a eficiência foram testados os compostos naftaleno e acenafteno, dependendo da solução, pois são exatamente os compostos de maior afinidade com a FE e, portanto, mais retidos. Vale ressaltar que um destes compostos está presente em todas as misturas testes encontradas na literatura recente, bem como na literatura divulgada pelos fabricantes de colunas.

Os parâmetros cromatográficos referentes a cada uma das soluções estão apresentados nas Tabelas 3.2 e 3.3 para colunas C8 e C18 da Rainin, respectivamente, sendo que foram feitas 5 injeções consecutivas de cada amostra. Os dados são uma média dos valores observados nesta série de injeções.

Tabela 3.2: Parâmetros cromatográficos de diversas misturas em coluna C8 (Rainin), recheada no LabCrom

Mistura	Eficiência <sup>a</sup> (Pratos/m)	Eficiência (Pratos/m)	Tempo de retenção (min)	$\alpha_{hidrof}$	$A_{básico}$ <sup>b</sup>	As (neutros)
A	66300 ± 132	-	7,8 <sup>a</sup>	1,4	4,3	1,2 <sup>a</sup>
B	68100 ± 332 <sup>c</sup>	-	8,9 <sup>c</sup>	1,6	4,2	1,0 <sup>c</sup>
A+B	65000 ± 286 <sup>a</sup>	63200 ± 112 <sup>c</sup>	8,5 <sup>a</sup>	1,6	-	1,2 <sup>a</sup>
C	70400 ± 1061	65300 ± 535 <sup>d</sup>	13,9 <sup>c</sup>	1,9	2,6	1,1 <sup>d</sup>
D	69700 ± 320 <sup>d</sup>	65300 ± 88 <sup>c</sup>	7,9 <sup>c</sup>	1,7	-	1,1 <sup>d</sup>
E	64000 ± 327	68800 ± 243 <sup>d</sup> 60200 ± 320 <sup>c</sup>	13,4 <sup>c</sup>	1,9	-	1,1 <sup>d</sup>

a- determinado para o naftaleno

b- determinado para a N,N-dimetilanilina

c- determinado para o etilbenzeno

d - determinado para o acenafteno

Nas misturas A e A+B o naftaleno foi o composto utilizado para o cálculo dos parâmetros cromatográficos enquanto que na mistura B o composto estudado foi o etilbenzeno. Ao se adicionar acenafteno em cada uma delas observou-se que a eficiência apresenta valores mais altos sem prejuízo para a assimetria. Desta forma, o acenafteno revelou-se um composto útil tanto para a avaliação de sua seletividade hidrofóbica entre ele e o naftaleno e/ou etilbenzeno como também sendo um excelente composto para o parâmetro de eficiência das colunas C8.

Os mesmos comportamentos cromatográficos descritos para C8 foram observados na coluna C18, embora os valores de eficiência tenham sofrido menor variação, continua sendo válida a utilização do composto acenafteno como base para o cálculo dos parâmetros cromatográficos. As Figuras 3.7 a 3.12 apresentam os cromatogramas referentes a cada uma das soluções, nas colunas C8 e C18.

Tabela 3.3: Parâmetros cromatográficos de diversas misturas em coluna C18 (Rainin), recheada no LabCrom

Mistura	Eficiência <sup>a</sup> Pratos/m	Eficiência <sup>b</sup> Pratos/m	Tempo de retenção	$\alpha_{hidrof}$	AS básico	AS
A	60000 ± 293	-	12,5 <sup>a</sup>	1,5	3,1 <sup>c</sup>	1,2 <sup>a</sup>
B	58100 ± 182 <sup>d</sup>	-	13,0 <sup>d</sup>	1,6 <sup>e</sup>	2,9	1,1 <sup>d</sup>
A+B	45000 ± 1324	51300 ± 160	13,7 <sup>a</sup>	1,6 <sup>e</sup>	2,4	1,2 <sup>a</sup>
C	54600 ± 580	57700 ± 1236	27,0 <sup>b</sup>	1,8	1,8	1,1 <sup>b</sup>
D	55400 ± 411	57500 ± 158	26,5 <sup>b</sup>	1,7	1,9	1,1 <sup>b</sup>
E	54200 ± 118	56500 ± 186	26,5 <sup>b</sup>	1,7	2,0	1,1 <sup>b</sup>

a- determinado para o naftaleno

b- determinado para o acenafteno

c- - determinado para o par tolueno/naftaleno

d - determinado para o etilbenzeno

e - determinado para o par etilbenzeno/tolueno

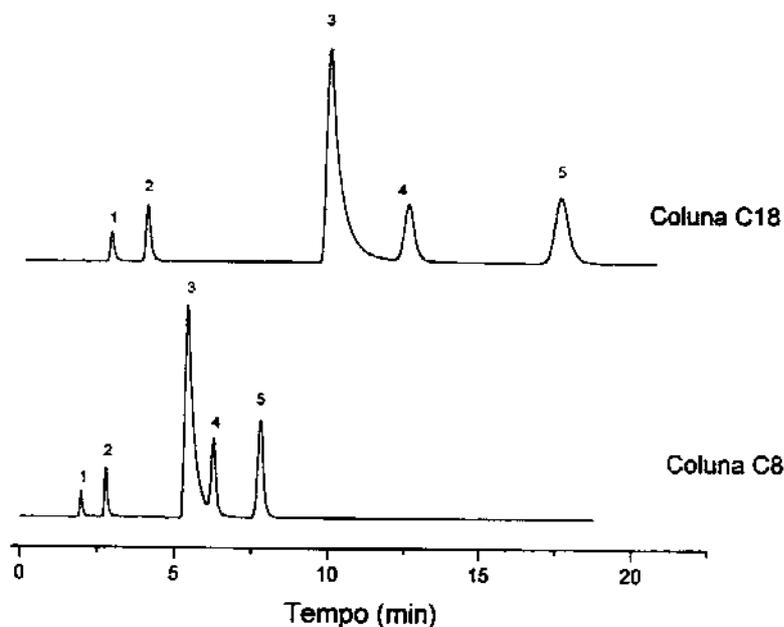


Figura 3.7: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste A contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno e 5) naftaleno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm.

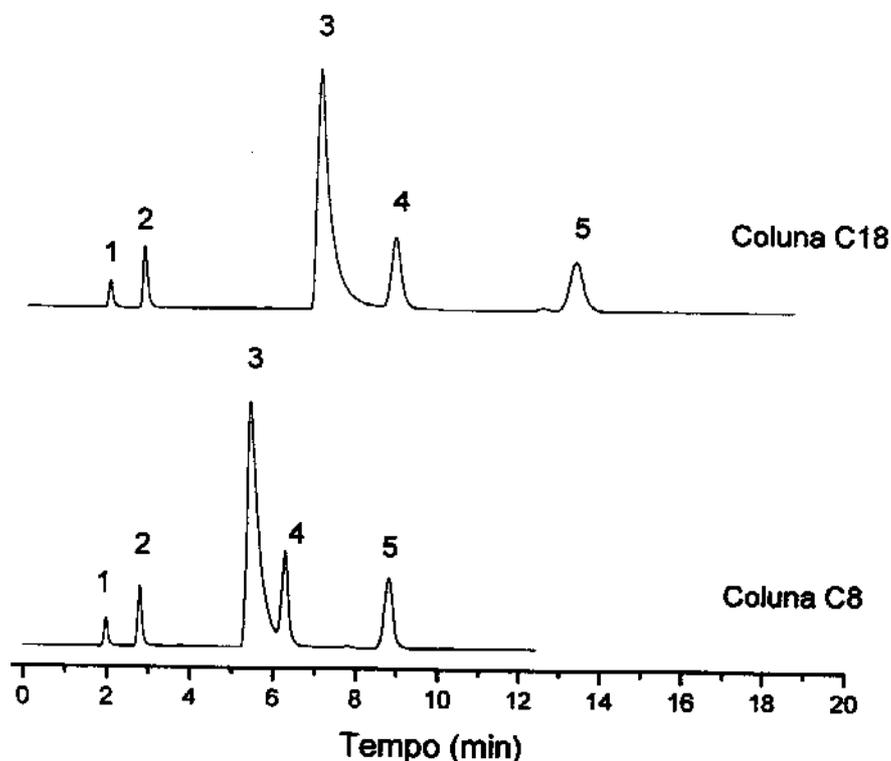


Figura 3.8: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste B contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno e 5) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm.

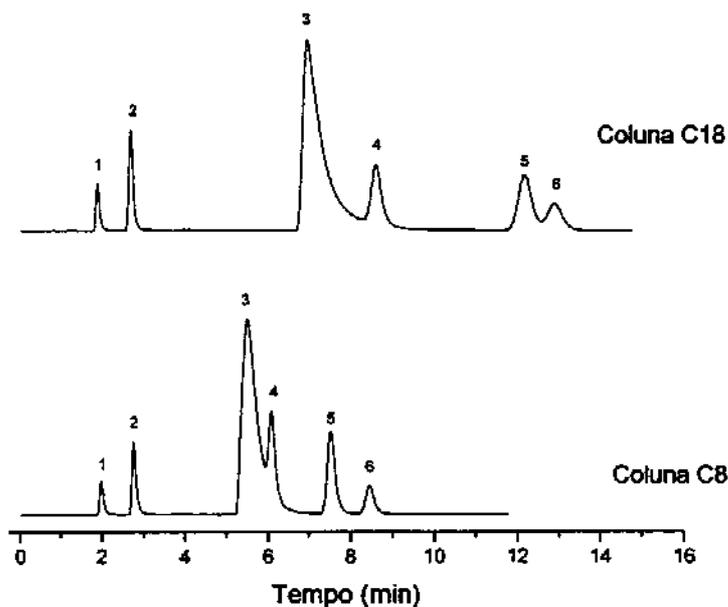


Figura 3.9: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste A+B contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno 5) naftaleno e 6) etilbenzeno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm.

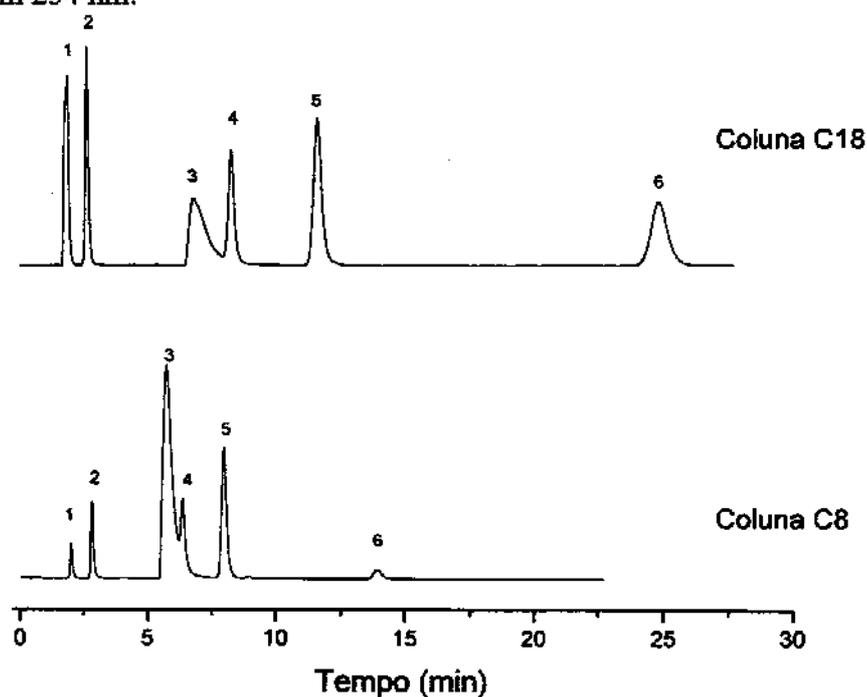


Figura 3.10: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste C contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno 5) naftaleno e 6) acenafteno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm.

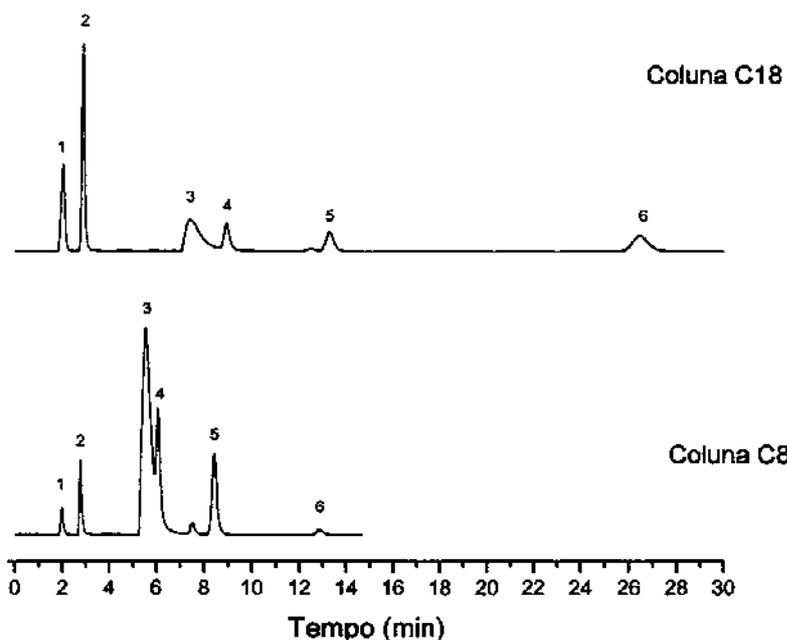


Figura 3.11: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste D contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno 5) etilbenzeno e 6) acenafteno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm.

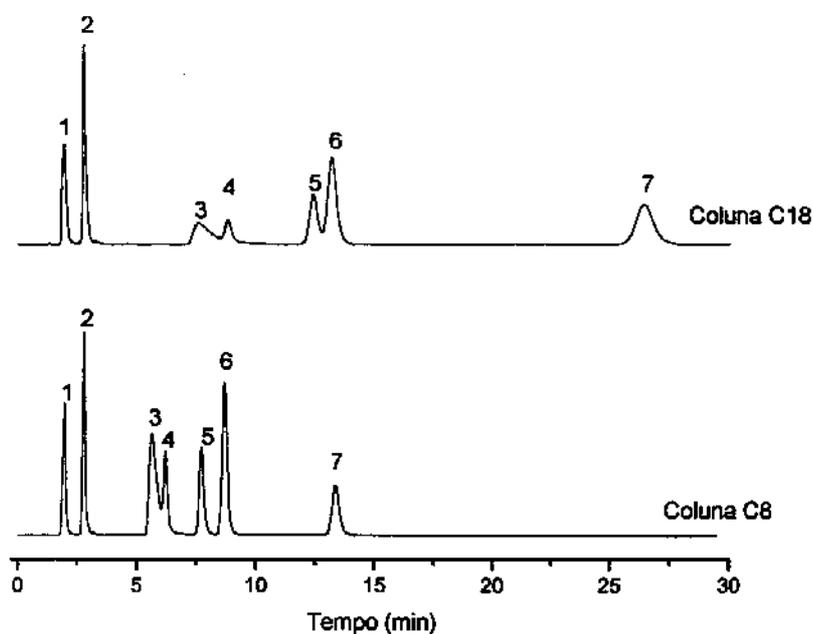


Figura 3.12: Cromatogramas obtidos nas avaliações em colunas C8 e C18 (Rainin) de Mistura Teste E contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) tolueno 5) naftaleno 6) etilbenzeno 7) acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm.

É possível observar em todos os cromatogramas das misturas teste que o fenol apresenta uma eluição relativamente rápida (logo após a uracil, composto utilizado para o cálculo de  $t_M$ ) porque, sendo um composto ácido, há poucos sítios de interação com a fase estacionária. Já a N,N-dimetilanilina apresenta-se com cauda tanto em colunas C8 quanto em C18, indicando a presença de interação polar com silanóis livres da sílica. Segundo Euerby e colaboradores<sup>107</sup>, quando há inversão de eluição entre o composto básico e o composto apolar próximo, pode-se dizer que a cobertura hidrofóbica da FE não é suficiente para recobrir todos os silanóis presentes na superfície da sílica. Este comportamento não foi observado nas FE avaliadas, podendo-se afirmar que a modificação na superfície da sílica é eficiente. Entretanto, um outro fator pode ser responsável pela acidez dos silanóis livres: a presença de metais. Neste caso, os silanóis livres que não reagiram quimicamente com o modificador da superfície da sílica, na presença de metais\* tornam-se ainda mais ácidos, apresentando-se como sítios ativos para interações polares com compostos básicos.

O composto tolueno co-eluiu com a N,N-dimetilanilina em todas as misturas teste, portanto, não foi considerado viável a sua presença quando for feita avaliação em colunas menores que 100 mm. O etilbenzeno também foi suprimido da mistura teste pois o cálculo de hidrofobicidade (fator de separação entre tolueno e etilbenzeno) não será mais viável e o valor do parâmetro eficiência pode ser avaliado com o naftaleno ou acenafeno, principalmente em colunas com fases estacionárias mais hidrofóbicas (por exemplo, C18). O acenafeno, mesmo apresentando um tempo de retenção relativamente alto para a análise, mostrou-se o melhor composto para a avaliação dos parâmetros cromatográficos de eficiência, com a vantagem de não haver possibilidade de co-eluição com nenhum dos outros compostos neutros hidrofóbicos. Quanto maior o tempo de retenção do acenafeno com relação ao naftaleno e/ou etilbenzeno, maior a quantidade de cadeia orgânica disponível para interações e, portanto, mais hidrofóbica a FE.

Com a mistura teste praticamente definida, foi possível fazer uma comparação entre quatro outras colunas de diferentes fabricantes, apresentando características “nominalmente” semelhantes. Para tanto, as propriedades básicas das FE foram avaliadas por três parâmetros: eficiência, através do cálculo de N e prato reduzido,  $h$ ; propriedades silanofílicas, através do valor de assimetria do composto N, N-dimetilanilina e propriedades hidrofóbicas avaliadas pelo fator de separação entre naftaleno e

---

\* Avaliações de algumas amostras de sílica e FE da Rainin indicam a presença de Na<sup>+</sup>, Fe (III) e Al (III), além de outros metais<sup>75</sup>

acenafteno. A fase móvel utilizada foi metanol:água 70:30 v/v em todas separações. Os resultados podem ser vistos na Tabela 3.4 e os cromatogramas estão apresentados na Figura 3.13.

Tabela 3.4: Comparação dos parâmetros cromatográficos de 4 colunas de diferentes fabricantes.

Tipo	Coluna	Eficiência (N/m) <sup>a</sup>	Prato reduzido (h) <sup>a</sup>	Assimetria (A <sub>s</sub> ) <sup>b</sup>	Fator de separação (α) <sup>c</sup>	Resolução (R <sub>s</sub> ) <sup>d</sup>
C8	Spherisorb S10 C8 (10 μm)	55600	3,6	1,2	1,2	1,7
	Delta Bond Octyl (5 μm)	69800	2,9	n.d.	1,2	0,9
C18	Spherisorb ODS 2 (3 μm)	61600	1,6	6,2	1,6	2,9
	Rainin C18 (5 μm)	59200	3,4	1,5	1,8	8,0

<sup>a</sup>: calculado para o pico do acenafteno

<sup>b</sup>: calculado para o pico da N,N-dimetilanilina

<sup>c</sup>: calculado para o par N,N-dimetilanilina/naftaleno

<sup>d</sup>: calculado para o par naftaleno/acenafteno

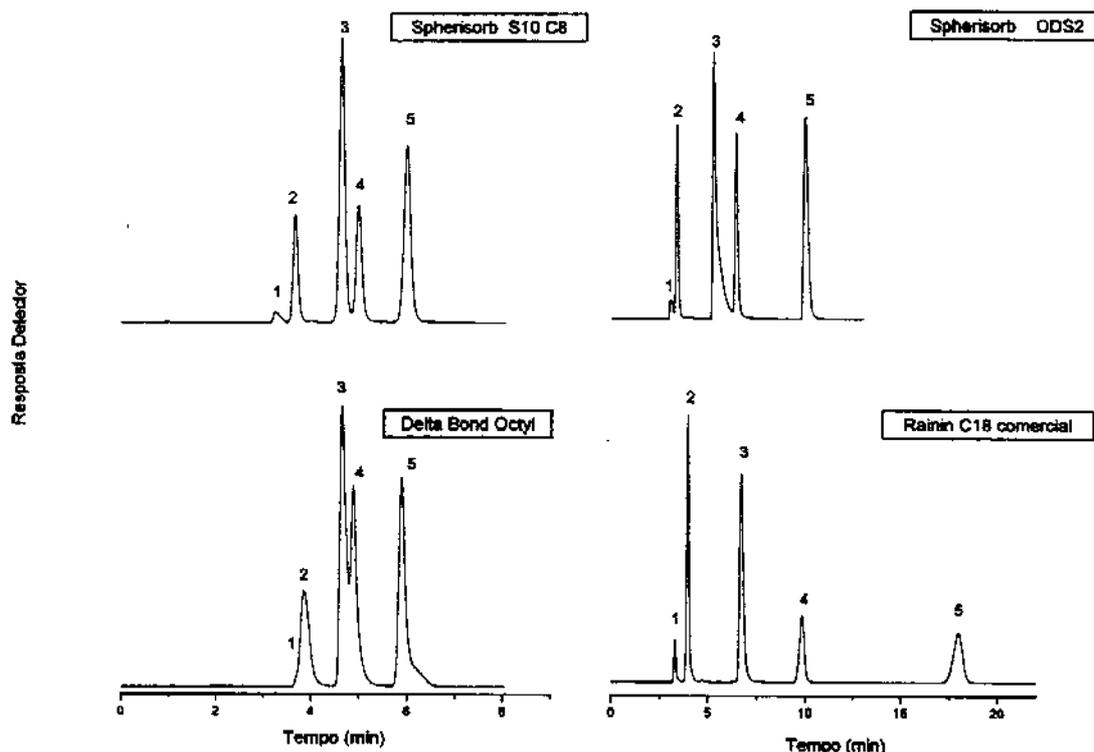


Figura 3.13: Cromatogramas de uma separação analítica para avaliação comparativa entre quatro colunas comerciais do tipo C8 e C18. Mistura teste contendo 1) uracil, 2) fenol, 3) N,N-dimetilanilina, 4) naftaleno 5) acenafteno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Detecção em 254 nm.

Em termos de eficiência há uma consideração a se fazer: não foi determinada por este teste a vazão ótima de cada coluna, ou seja, a vazão em que uma determinada coluna apresentará o seu melhor desempenho cromatográfico. Nesta comparação todos os cromatogramas foram obtidos em uma mesma vazão de  $0,5 \text{ mL min}^{-1}$  que pode não representar exatamente a vazão de máxima eficiência de todas as colunas. Portanto, toda as discussões quanto a coluna mais eficiente serão feitas levando-se em consideração a vazão de trabalho.

Naturalmente, ao se comparar as eficiências de diferentes FE, deve-se tomar o cuidado de avaliar colunas com o mesmo tamanho de partícula. Mas, ao se utilizar o parâmetro prato reduzido,  $h$ , este cuidado torna-se desnecessário, pois a variável tamanho de partícula é considerada em sua expressão matemática (Equação 3.7). Assim, pode-se dizer que as quatro colunas comerciais avaliadas por esta mistura teste apresentaram boas eficiências. Entre as colunas C8, embora a separação entre os compostos N,N-dimetilanilina/naftaleno não tenha apresentado boa resolução, a Delta Bond foi a que apresentou melhor eficiência. Entre as C18 a melhor eficiência foi da coluna Spherisorb ODS2.

Observando-se o padrão de separação dos compostos da mistura teste sugerida neste trabalho, fica claro que a hidrofobicidade das FE tipo C18 é maior, como indicam os fatores de separação,  $\alpha_{\text{hidrof}}$ . Esta característica também é confirmada pelos tempos de retenção dos compostos neutros (hidrofóbicos) naftaleno e acenafteno, que aumentam muito em relação à retenção apresentada pelas fases C8. Além disto, a separação do par N,N-dimetilanilina/naftaleno nas colunas C18 apresenta boa resolução, enquanto as colunas C8 não conseguem separar estes compostos até a linha de base. A baixa resolução deste último par sugere que, quando forem comparadas apenas FE do tipo C8, seria interessante utilizar uma FM de menor força cromatográfica, por exemplo, MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40 v/v, para se observar uma melhor separação destes compostos, sem que haja prejuízo na avaliação das demais propriedades das cromatográficas destas colunas.

Com relação às propriedades silanofílicas, a mistura teste provou que colunas do mesmo tipo podem apresentar comportamentos opostos: no caso das colunas C18, embora a coluna Spherisorb ODS2 apresente uma eficiência similar à coluna Rainin C18, ela não é indicada para a separação de compostos básicos, visto que o pico da N,N-dimetilanilina apresenta uma grande cauda no final da eluição, indicando provável interação do composto com os silanóis livres do suporte de sílica. É importante ressaltar que o comportamento de eluição do composto básico nesta mistura não está influenciado por nenhuma alteração de pH, portanto, é possível dizer que a melhor coluna

cromatográfica (entre as avaliadas até aqui) para a separação de compostos básicos em qualquer pH - respeitando-se as limitações da própria sílica - é a coluna Rainin C18.

### **3.5 - Considerações Gerais sobre Misturas Testes**

Como finalização desta parte do trabalho pode-se dizer que a melhor composição para a mistura teste na avaliação de colunas cromatográficas pequenas, até 100 mm, especialmente as confeccionadas no próprio laboratório, LabCrom, deve ser constituída dos seguintes compostos: uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno. No caso de colunas a partir de 150 mm, as presenças dos compostos tolueno e etilbenzeno não irão prejudicar as separações, ou seja, eles não serão co-eluídos com a N,N-dimetilanilina ou o naftaleno, permitindo que seja avaliado mais um par no parâmetro de hidrofobicidade da coluna. Esta mistura testes mostrou-se viável para a comparação de todos os tipos de fases estacionárias e para todas as dimensões de colunas cromatográficas, apresentando boas separações e boas resoluções em FM neutras.

# *Capítulo IV - SÍLICAS DE 10 nm*

## **4.1 INTRODUÇÃO**

Como já foi citado, em CLAE-FR o suporte de sílica é o mais utilizado atualmente, principalmente devido às suas características físicas e químicas, apesar de limitações em seu uso a pH extremos. O grande sucesso da utilização da sílica como suporte para FE está na variabilidade de suas propriedades físicas, entre as quais se destacam:

- Forma da partícula – dependendo da rota de sua síntese, a sílica pode ser classificada em várias categorias: irregulares, esféricas (ambas do tipo poroso), peliculares, onde um núcleo não poroso tem uma camada fina de sílica porosa na superfície externa e, mais recentemente, as sílicas com “canais multi-porosos” ou monolíticas.

- Tamanho da partícula - as sílicas hoje apresentam vários tamanhos de partículas, sendo que as mais utilizadas estão em torno de 5  $\mu\text{m}$ , mas são encontradas partículas de sílica variando de 1, 6 a 10  $\mu\text{m}$ , com aumento considerável da eficiência com a diminuição do tamanho das partículas. Em contrapartida, partículas menores do suporte causam um aumento da pressão no sistema cromatográfico, restringindo o uso destas partículas menores apenas para alguns tipos de analitos, com colunas menores e sistemas cromatográficos equipados com bombas especiais, que suportam altas pressões.

- Distribuição dos tamanhos da partícula – deve ser menos dispersa possível, segundo alguns autores, a razão entre a maior e a menor partícula deve estar entre 1:1.5 e 1:2<sup>22</sup>. Isto porque as partículas menores determinam a permeabilidade da FE e as partículas maiores serão responsáveis pela menor eficiência da coluna cromatográfica. Além destes fatores, as partículas menores produzem maior resistência à passagem de FM e as partículas maiores produzirão picos mais largos (apontando menor eficiência do processo de separação).

- Tamanho (diâmetro) do poro - permite a aplicação do suporte de sílica em uma larga faixa de analitos, desde pequenas moléculas (com poros de até 10 nm) até proteínas (com poros de 30 nm).

- Área superficial específica - é de grande importância na preparação de fases estacionárias, pois permite que sejam feitas uma série de alterações melhorando a transferência de massa entre as fases móvel e estacionária e, portanto, aumentando a eficiência do processo de separação analítica

Em termos de estrutura química, a sílica é um sólido inorgânico poroso formado por unidades tetraédricas,  $\text{SiO}_4$ . Os átomos de silício internos tendem a manter sua coordenação tetraédrica com oxigênio, formando a ligação siloxano ( $\text{Si-O-Si}$ ). Os silícios mais externos completam seu número de coordenação através da ligação com grupos hidroxilas, formando os chamados grupos silanóis ( $\text{Si-OH}$ ).

Embora todos os grupos funcionais sobre a superfície de sílica funcionem como centros de adsorção<sup>22</sup>, os silanóis são muito mais importantes para a cromatografia. Eles se apresentam na superfície de sílica em uma concentração máxima de  $8 \mu\text{mol m}^{-2}$  e podem ser encontrados em diferentes conformações, conforme pode ser visto na Figura 4.1, com propriedades únicas<sup>20</sup>:

- silanóis livres ou isolados são ligeiramente mais ácidos e, por isto, tornam-se centros de adsorção de compostos básicos. Esta adsorção irá causar uma cauda no pico cromatográfico

- silanóis geminais (geralmente são menos ácidos)

- silanóis vicinais ou associados são menos ácidos, mas compostos com grupos OR tendem a adsorver nesta região. Muitas vezes, os siloxanos são o produto de condensação deste tipo de silanóis quando a sílica é aquecida a temperaturas superiores a  $200^\circ\text{C}$ .

- silanóis próximos a cátions de metais são fortemente ácidos. A presença destes cátions aumenta a heterogeneidade da superfície de sílica e afetam muito a separação de compostos básicos.

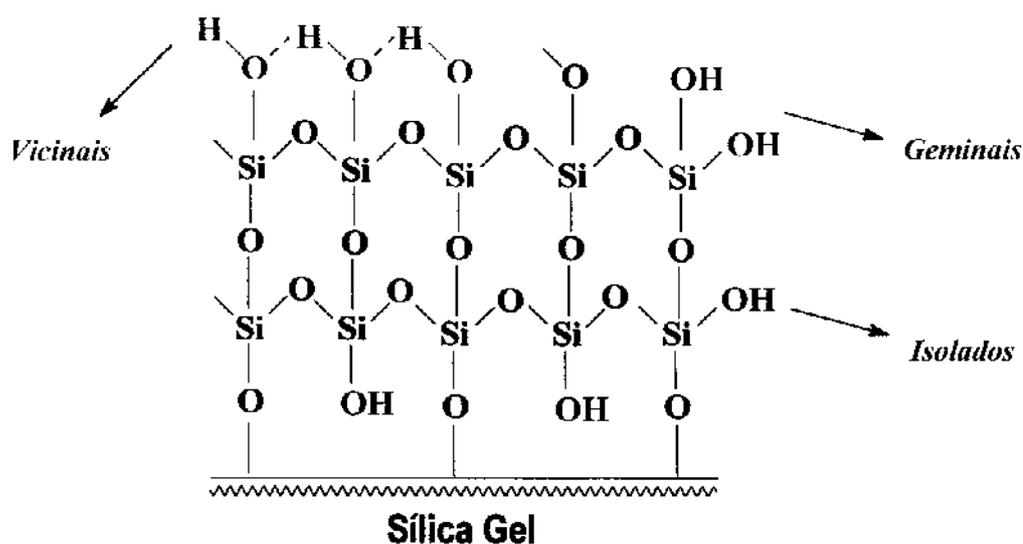
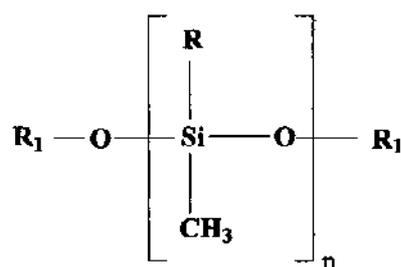


Figura 4.1: Representação dos diferentes tipos de silanóis na superfície da sílica

Aquecer a sílica é uma alternativa para evitar que os silanóis tornem-se sítios de adsorção de moléculas polares, pois os silanóis mais próximos se condensam para formar pontes de siloxanos<sup>29</sup>. Boudreau e Cooper<sup>120</sup> mostraram que a energia dos silanóis superficiais da sílica, entre 180 e 400 °C, não é significativamente diferente, porém, os espectros de infravermelho mostraram que, à temperaturas mais altas, a superfície era composta apenas de silanóis livres. Neue<sup>29</sup> afirma que à temperaturas acima de 800 °C mais de 90 % dos silanóis foram removidos e a sílica resultante apresentará um caráter hidrofóbico, porém, sem os silanóis como centros de modificação da superfície, esta sílica possui pouco valor para cromatografia de fase reversa. No entanto, se o aquecimento for feito em temperaturas inferiores a 450 °C, esta reação é reversível, ou seja, a sílica volta a apresentar silanóis em sua superfície se for exposta à presença de uma atmosfera úmida.

Estas características da sílica abrem espaço para uma grande área de pesquisas que é o desenvolvimento de FE. No Capítulo I estão descritos os vários tipos de modificações feitas sobre o suporte de sílica. Uma das mais interessantes é o recobrimento da superfície porosa da sílica com polímeros, por se tratar de um procedimento simples e de relativamente baixo custo e que apresenta um bom grau de reprodutibilidade.

Entre os polímeros mais utilizados nesta técnica estão os polissiloxanos, que são encontrados em uma faixa extensa de seletividade, de acordo com os grupos substituintes existentes nas diversas estruturas, como por exemplo: poli(dimetilsiloxano), poli(metiloctilsiloxano), poli(metilfenilsiloxano), poli(metiloctadecilsiloxano), etc. Sua fórmula geral é:



Onde: R = octil, octadecil, etc.

R<sub>1</sub> = trimetilsilil ou dimetilvinilsilil

Os polissiloxanos são conhecidos por suas propriedades quimicamente úteis, tais como a flexibilidade, sua permeabilidade a gases, baixa temperatura de transição vítrea e baixa energia

superficial. Estes polímeros são flexíveis pois apresentam dois tipos de “flexibilidade”: torsional e flexional<sup>121</sup>. A flexibilidade torsional é a habilidade dos átomos rotacionarem em torno da ligação química sem, no entanto, alterar os ângulos ou o comprimento das ligações. A flexibilidade tipo flexão ou flexional ocorre quando há um obstáculo ou repulsão entre átomos não ligados. Além disto, é possível aumentar a rigidez do polímero variando-se a os ligantes da estrutura dos polissiloxanos, por exemplo, inserindo grupos laterais “volumosos” ou mais rígidos. Com estas propriedades e sua característica altamente hidrofóbica (quanto maior for a cadeia R, maior a hidrofobicidade) os tomam especialmente viáveis para a preparação FE da fase reversa.

Estima-se, que cerca de 75% do total de análises em CLAE de fase reversa utilizam FE de sílica modificada com cadeias longas de siloxanos como C8 e C18<sup>122</sup>. Os motivos para esta preferência estão na sua aplicabilidade em uma variedade de compostos de diferentes classes químicas, curto tempo de equilíbrio exigido pelas FE durante as corridas, a possibilidade de utilizar gradientes e de suportar eluentes e amostras razoavelmente aquosos. Diante desta realidade, neste trabalho foi selecionado o polímero poli(metiloctadecilssiloxano), PMODS como o modificador do suporte de sílica.

## **4.2. Parte Experimental**

### **4.2.1 - Equipamentos**

- Cromatógrafo a líquido, modelo compacto Shimadzu constituído de uma bomba de alta pressão, modelo LC 10AD, um detector espectrofotométrico de absorção no UV/VIS com comprimento de onda variável, modelo SPD 10AV, e injetor da Rheodyne, modelo 8125-095, com alça de injeção de 5 µL. O equipamento está acoplado a um microcomputador 200 MHz, e o processamento dos dados cromatográficos é realizado através do software ChromPerfect e Report Write-Plus da Justice Innovations.
- Sistema de extração em fluxo contínuo, constituído de bomba de alta pressão, Waters modelo 510, e um forno de coluna Eldex modelo CH-150.
- Bomba de enchimento de colunas, Haskel, com faixa de pressão disponível até 340 MPa (50000 Psi), modelo 51769.

- Banho Ultra-Som, Thorton T14.
- Agitador Roto Torque, Cole-Palmer modelo 7637-01.
- Agitadores magnéticos, Modelo Fisatom modelo 753 A e Corning modelo PC-351.
- Balança analítica, Fischer Scientific, modelo A-250.
- Sistema Milli-Q Plus, Millipore.
- Estufa a vácuo, Yamoto modelo ADP-21.
- Forno EDG, modelo 10P-S, equipado com sistema para fluxo de nitrogênio.

#### **4.2.2 - Reagentes**

- Ácido nítrico, p.a., Synth e Nuclear
- Água deionizada, Sistema Milli-Q plus
- Clorofórmio, p.a., Merck
- Hexano grau HPLC, Mallinckrodt e p.a. Tedia
- Isopropanol grau p.a. Tedia
- Metanol grau HPLC, Mallinckrodt
- Padrão analítico: Diclofenaco, Galena (Campinas, SP)

#### **4.2.3 - Sílicas utilizadas na confecção da FE**

As sílicas utilizadas como suporte cromatográfico neste trabalho são provenientes de diversos fabricantes, com características diferenciadas entre si como diâmetro do poro, tamanho da partícula, volume de poro e área superficial. A Tabela 4.1 apresenta os diferentes suportes de sílica utilizados e suas características principais.

Tabela 4.1: Suportes de sílica estudados e suas características

Marca	Tamanho de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Diâmetro de Poro (nm)	Volume de poro ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	Área ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )
Davisil 630 (Alltech Associates)	13 <sup>a</sup>	8,7	0,75	350
Rainin (Rainin)	5 <sup>b</sup>	11,3	0,54	190
Kromasil (Akzo Nobel)	5 <sup>b</sup>	11,1	0,88	320

<sup>a</sup> Determinado em laboratório

<sup>b</sup> Dado do fabricante

#### **4.2.3.2 – Tratamento ácido da sílica**

No caso da sílica Rainin houve uma etapa prévia na qual foi realizado um tratamento ácido. Foi feito um refluxo (100 °C por 4 horas) de 4,0 gramas de sílica em 400 mL de solução de  $\text{HNO}_3$  0,01 mol  $\text{L}^{-1}$ . Em seguida, a sílica Rainin foi lavada no sistema de extração em fluxo contínuo com metanol (3 mL  $\text{min}^{-1}$  durante 3 h); isopropanol (2 mL  $\text{min}^{-1}$  durante 30 minutos) e hexano (2 mL  $\text{min}^{-1}$  durante 2 horas). Ao final das lavagens, a sílica foi seca a 40 °C por 4 horas e armazenada para posterior preparação da FE.

#### ***4.2.4 - Fase líquida (modificador da superfície)***

Como líquido estacionário foi utilizado um polímero da classe das siliconas:

- Poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS), United Chemical Technologies, viscosidade 250 a 300 centistokes a 25 °C, densidade de 0,89  $\text{g/cm}^3$ , massa molar por peso médio ( $M_w$ ) de 11000, lote n° 125-199.

#### **4.2.5 - Preparação da fase estacionária com polímero poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) por evaporação**

Com ou sem a etapa de tratamento ácido, todas as sílicas foram ativadas em forno a 150 °C durante 24 horas, e em seguida utilizadas no preparo da FE.

O recobrimento da sílica ativada com o PMODS foi feito de forma a produzir um material de recheio com aproximadamente 40 ou 50 % de polímero, através do método de evaporação do solvente. Para tanto, o polímero foi dissolvido em hexano (p.a.) e a esta solução foi adicionada lentamente a sílica ativada (suporte). A quantidade de hexano utilizado na preparação foi sempre respeitando a proporção de 12 mL para cada 1 grama de fase estacionária (sílica+polímero). O conjunto suporte sólido + FE líquida + solvente foi mantido sob agitação magnética lenta (para evitar distorção do tamanho médio das partículas) durante 3 horas e em seguida transferido para a capela em um recipiente de superfície grande e plana (um béquer grande, por exemplo). Este procedimento facilitou a incorporação do polímero no suporte sólido durante a evaporação lenta do solvente à temperatura ambiente.

#### **4.2.6 - Preparação das fases estacionárias com polímero poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS) através de refluxo**

Para incorporação do polímero sobre a superfície de sílica foi testado um método alternativo que consistia em manter a sílica em refluxo com uma solução de tolueno e PMODS. Para tanto, foram dissolvidos 3 gramas de PMODS em 100 mL de tolueno p.a. e adicionados 3 gramas de sílica Kromasil ativada. O refluxo foi mantido sob agitação na capela durante 8 horas. Após esta etapa, a FE resultante foi mantida na capela em um recipiente adequado para a evaporação do solvente à temperatura ambiente.

## 4.2.7 - Procedimentos de Imobilização do PMODS sobre o suporte de sílica

### 4.2.7.1 – Imobilização por tratamento térmico

Foram estudadas de imobilização do PMODS em cada um dos tipos de sílica utilizando-se o tratamento térmico. As variáveis estudadas e as faixas utilizadas estão apresentadas na Tabela 4.2. No caso da sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  e da sílica Kromasil 5  $\mu\text{m}$ , investigou-se, ainda, a influência de um pré-aquecimento da FE a 60 °C durante 1 hora imediatamente anterior ao tratamento térmico.

Tabela 4.2: Variáveis estudadas durante a imobilização de PMODS sobre suporte de sílica

Variável	Faixa
quantidade (carga) de polímero no suporte (%)	40 <sup>a</sup> e 50 <sup>b</sup>
temperatura de imobilização (°C)	80 <sup>a</sup> , 100 <sup>b</sup> , 120 <sup>a</sup> , 150 <sup>a</sup> e 180 <sup>a</sup>
tempo de tratamento (horas)	2 <sup>c</sup> , 4 <sup>a</sup> , 8 <sup>b</sup> e 16 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> - Davisil

<sup>b</sup> - todas

<sup>c</sup> - apenas Rainin

<sup>d</sup> - exceto Davisil

A imobilização térmica foi feita em estufa na presença de ar, acondicionando-se cerca de 5 gramas da FE, em placas de Petri envoltas em três camadas de papel alumínio de maneira que estivessem vedadas pelo período e temperaturas descritos na Tabela 4.2.

### 4.2.7.2 – Estudo de auto-imobilização

Para este estudo foi utilizada a sílica Davisil, preparando-se um lote de 10 gramas de FE com carregamento inicial de 50 % como descrito no item 4.2.5

Logo após a completa evaporação do solvente, foi retirada uma amostra de aproximadamente 0,5 gramas que passou por um processo de extração por fluxo contínuo de hexano a 50 °C em uma

vazão de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$  durante 4 horas. Após a evaporação do solvente, o material residual contido dentro do tubo de extração foi armazenado em tubo de vidro fechado, à temperatura ambiente. A quantidade de polímero extraída da sílica foi calculada através do método de análise elementar de carbono do material residual obtido após extração.

Este processo foi repetido a cada 5 dias durante 2 meses e quinzenalmente por mais 40 dias.

#### **4.2.7.3 – Imobilização por tratamento térmico em atmosfera inerte (sob fluxo de $\text{N}_2$ )**

Um lote de FE de sílica Rainin com carregamento inicial de 50 %, foi preparada como descrito no item 4.2.5. Após a secagem do solvente, a FE foi acondicionada em um tubo inox (150 x 10 mm) e este colocado no forno EDG. O tubo inox apresentava uma entrada por onde passou um fluxo contínuo de  $\text{N}_2$  durante o aquecimento. A FE permaneceu durante 8 horas neste sistema a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **4.2.8 - Extração das Fases Estacionárias após imobilização térmica**

Cada FE imobilizada termicamente passou por uma etapa de extração para que o excesso de polímero não imobilizado fosse eliminado. Para tanto, a FE foi acondicionada em tubo de aço inox (60 x 10 mm, com capacidade máxima para 5 gramas) dentro de um forno acoplado a uma bomba cromatográfica (Waters modelo 510). Foram utilizados dois processos de extração: a) para as fases estacionárias com suporte de sílica Davisil o solvente extrator foi hexano a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ , bombeado a uma vazão de  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ , durante 4 horas, b) para as fases estacionárias com os suportes de sílica Kromasil e Rainin utilizou-se, à temperatura ambiente, clorofórmio a uma vazão de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$  para cada grama de material, durante 4 horas seguido de metanol a mesma vazão durante 3 horas. Os solventes metanol e clorofórmio utilizados foram de grau cromatográfico. Antes de serem utilizados, foram filtrados em uma membrana de Nylon de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$  (Millipore) e degaseificados por 30 minutos em ultrasom marca Thornton.

## **4.2.9 - Caracterização das fases estacionárias preparadas**

### **4.2.9.1 - Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN de  $^{29}\text{Si}$  com CP/MAS (polarização cruzada segundo rotação em ângulo mágico) foram obtidos em um espectrômetro Bruker ASX 300, usando um rotor de zircônia de 7 mm de diâmetro interno, em uma velocidade de rotação de 3500 Hz, contendo amostras de 200-250 mg. Os espectros foram obtidos com um tempo de contato de polarização cruzada de 5 ms e o tempo de intervalo de pulso de 1,5 s. O alargamento da banda usada foi de 30 Hz e a largura espectral para todos os espectros foi de aproximadamente de 25 Hz. Estes espectros foram obtidos pelo Dr. Stefan Bachmann, na Universidade de Tübingen, Alemanha.

### **4.2.9.2 - Análise termogravimétrica**

Os termogramas foram obtidos utilizando 10 mg de amostra e velocidade de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  no intervalo de 25 a  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em um equipamento da TA Instruments, modelo TGA 2050. Algumas análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio ou argônio (atmosfera inerte) e outras sob ar (atmosfera oxidante).

### **4.2.9.3 - Espectroscopia no infravermelho (IV)**

Os espectros de IV foram obtidos na região de  $4000$  a  $450\text{ cm}^{-1}$  utilizando a técnica de refletância difusa. Foi utilizado um espectrofotômetro de infravermelho Perkin Elmer, modelo FT-IR 1600

### **4.2.9.4 - Análise Elementar**

As análises foram realizadas utilizando-se 1 mg de amostra (FE) adicionada a 1 mg de mistura oxidante composta de  $\text{Pb}_2\text{O}_4$  e NaF na proporção de 1:1. O procedimento foi realizado em duplicata, em um aparelho Perkin Elmer, modelo 2400. Caso houvesse uma divergência maior que 0,4% era feita uma nova análise. O resultado final foi obtido a partir da média de todas as análises.

#### 4.2.10 - Enchimento de colunas cromatográficas

##### 4.2.10.2 - Preparação de colunas cromatográficas: Polimento

Após o preparo das fases estacionárias foi feito o enchimento de colunas cromatográficas. As colunas utilizadas são de aço inox, confeccionadas na oficina mecânica da Unicamp (Figura 4.2) e, antes do uso, tiveram sua superfície interna previamente polida. O processo de polimento mecânico foi feito através de uma haste de metal envolta em lã de aço presa à um mandril (semelhante ao de uma furadeira comum) com rotação constante de 1000 rpm. A lã de aço foi primeiramente impregnada com pasta abrasiva de alta granulação, para que a superfície interna da coluna atingisse um grau de polimento sem grandes irregularidades. Isto foi possível movimentando-se a coluna pela haste (que estava em rotação) com movimentos verticais (para cima e para baixo). A seguir, para garantir a uniformidade da superfície foi utilizada uma pasta abrasiva de granulação menor, mantendo-se os movimentos sempre no mesmo sentido. Era imprescindível que a coluna apresentasse uma superfície interna totalmente polida e uniforme pois imperfeições como pequenos sulcos ou “riscos” na superfície do aço iriam comprometer a qualidade do enchimento e, portanto, a eficiência da coluna cromatográfica<sup>123</sup>.

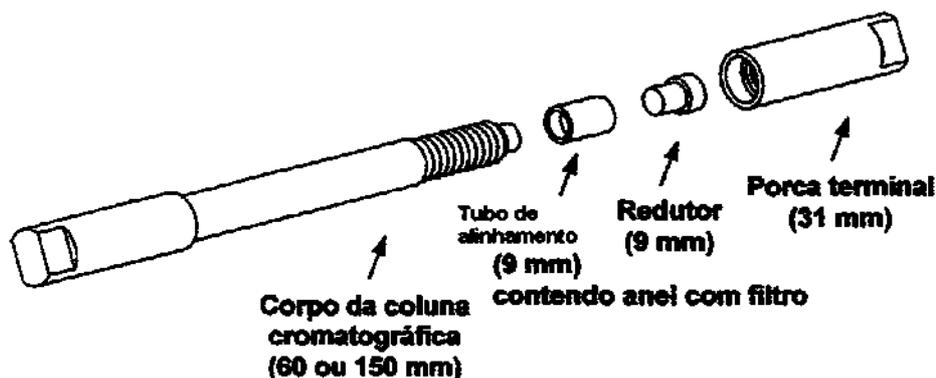


Figura 4.2: Coluna cromatográfica confeccionada no LabCrom.

Devido ao estudo de vários parâmetros no desenvolvimento da metodologia de preparo das FE, foram necessárias grandes quantidades de material de alto valor comercial como as sílicas e o polímero PMODS. Para evitar que muito material fosse dispendido, foram adotadas colunas cromatográficas de comprimento menor do que as usualmente utilizadas (entre 100 e 150 mm). Assim,

as colunas polidas prontas para receberem FE tinham 60 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno. Para todos os experimentos feitos neste trabalho foram confeccionadas 6 colunas que eram recheadas com as FE preparadas, avaliadas e esvaziadas para novamente serem utilizadas. Esta medida não prejudicou as avaliações cromatográficas das FE, uma vez que foram utilizadas apenas misturas padrões que apresentassem separações simples, independente do tamanho da coluna.

Durante o decorrer de todo o trabalho desenvolvido, para cada FE avaliada cromatograficamente, foram recheadas duas colunas, no mesmo dia, para a obtenção de duplicatas, embora os cromatogramas apresentados sempre sejam referentes a apenas uma coluna. Havendo uma discrepância igual ou superior a 10 % ou anomalias no perfil do pico cromatográfico, (com resultado superior a 1,8 para a assimetria do pico do naftaleno ou presença de picos duplos) as colunas eram recheadas novamente, para se garantir que a variação era apenas devida ao processo de enchimento e não uma característica intrínseca à FE obtida.

#### **4.2.10.3 – Preparação da suspensão e enchimento da coluna**

A FE preparada apresenta-se em partículas pequenas (entre 10 e 5  $\mu\text{m}$ ) e de grande área superficial ( $> 190 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ) e, nestes casos, o método de enchimento a partir de uma suspensão é mais recomendado, pois as partículas ficarão dispersas, sem a formação de agregados. No enchimento a seco, a presença de pequenos aglomerados de FE no momento do enchimento poderia levar a uma coluna com um leito instável e com muitos espaços vazios.

Assim, foi preparada uma suspensão a 10 % m/v de FE em solvente, mantida sob agitação em roto torque durante aproximadamente 16 horas. A função do solvente de suspensão é impedir a aglomeração e sedimentação das partículas de FE, portanto, o critério de escolha deste solvente deve levar em conta as características químicas e físicas do material de enchimento. As FE preparadas com polímero de cadeia longa, como o PMODS, apresentam-se naturalmente com grumos, dificultando a “uniformidade” da suspensão. Devido a este fator, além da escolha do clorofórmio como solvente de suspensão foi utilizado o ultra-som durante 30 s a 1 minuto (um período maior poderia alterar a estrutura da FE).

Os requisitos necessários para um bom enchimento são:

- apresentar deposição rápida das partículas no leito cromatográfico,

- cada partícula de FE deve estar totalmente sedimentada (“acomodada”) antes que outra partícula se choque contra ela,
- o clorofórmio (solvente da suspensão) deve ser puro (para que possíveis impurezas não reajam com a FE) e deve conseguir manter toda a superfície da partícula “úmida”,
- o solvente de suspensão deve ser prontamente removido após o enchimento, sem reagir com o solvente que se segue (solvente de propulsão).

Para a realização do enchimento, a coluna foi conectada ao reservatório da suspensão, sendo previamente colocados na sua parte inferior o anel de alinhamento contendo o filtro, o redutor e a porca terminal. A suspensão foi rapidamente transferida para o reservatório de suspensão, sendo adicionado clorofórmio até preencher todo o volume e, em seguida, o reservatório foi tampado.

Na seqüência, o enchimento foi realizado a uma pressão de 34,5 MPa (5000 psi), utilizando metanol como solvente de propulsão, em uma bomba de enchimento Haskel, (Figura 4.3) sendo o leito cromatográfico retido pelo filtro na extremidade da saída da coluna cromatográfica. Após o término do bombeamento de material de recheio para o interior da coluna, ainda foram realizados 3 pulsos, de 20 segundos cada, intercalados entre si em 10 segundos. Acredita-se que estes pulso têm como função melhorar o assentamento do leito cromatográfico, evitando espaços vazios ou rachaduras próximas à parede da coluna. Após o procedimento de enchimento, há um repouso de 15 minutos para que haja equilíbrio da pressão interna da coluna. O excesso de FE foi removido do sistema e, caso fosse necessário, usado para uniformizar a superfície da entrada da coluna. Em seguida o anel de alinhamento contendo o filtro, o redutor de vazão e a porca terminal da coluna foram acoplados em sua extremidade de entrada.

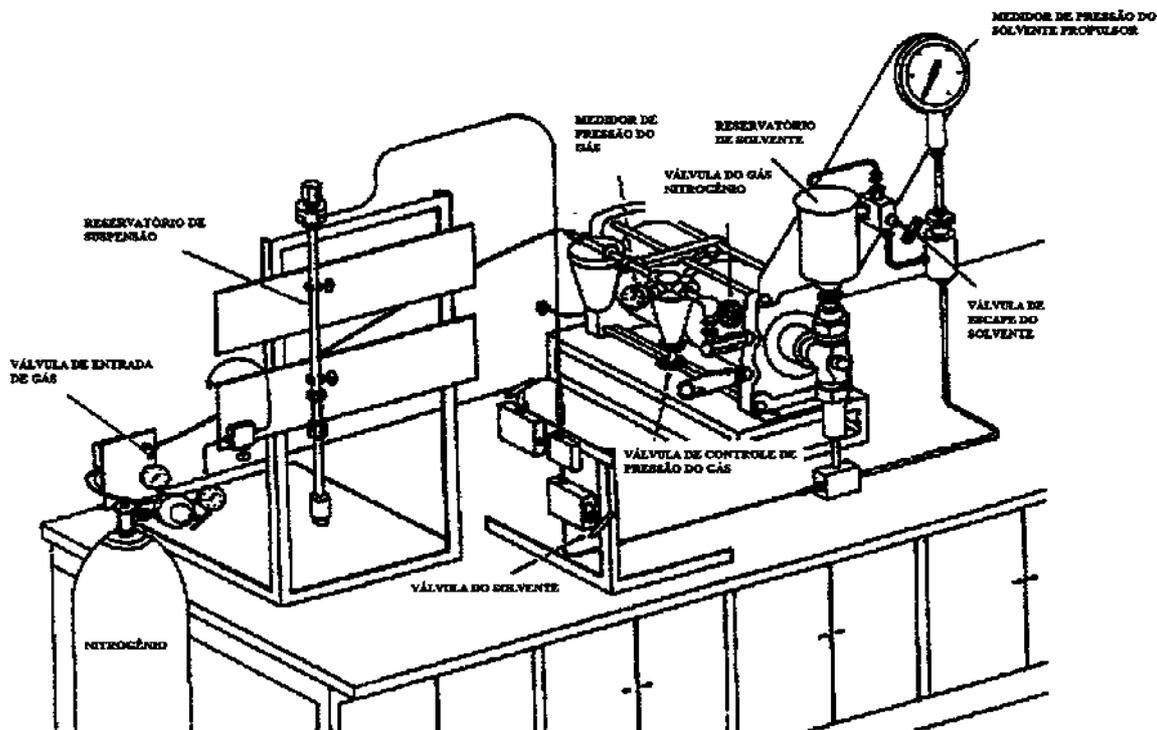


Figura 4.3: Sistema de enchimento Haskel. No detalhe, a coluna cromatográfica já está com seus terminais conectados.

O procedimento de esvaziamento é feito de forma semelhante, porém é conduzido apenas pela passagem de metanol através da coluna, sob alta pressão (27 MPa), sem os terminais e a FE recuperada em um recipiente, que é posteriormente tampado.

#### 4.2.11 - Condicionamento de colunas cromatográficas

Logo após a etapa de normalização da pressão pós enchimento, é necessário condicionar a coluna. O condicionamento é feito para eliminar todos os vestígios dos solventes usados, para permitir um equilíbrio entre FE e FM e também para garantir a repetitividade nos tempos de retenção dos compostos a serem eluídos.

Para este procedimento foi usada a FM metanol:água na composição mais usual, 70:30 v/v, a uma vazão de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , durante 3 horas.

#### **4.2.12 - Avaliação cromatográfica das colunas recheadas**

Para avaliação dos parâmetros cromatográficos como eficiência, (N/m, número de pratos por metro de coluna), resolução,  $R_s$ , assimetria,  $A_s$  (a 10%), e fator de retenção,  $k$ , utilizaram-se duas misturas testes: a primeira (mistura 1) era padrão do LabCrom constituída de uracil (para o cálculo do  $t_M$ ), acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno; a segunda (mistura 2) está descrita no Capítulo 3. As separações foram realizadas utilizando-se a fase móvel metanol:água, comumente na proporção 70:30 v/v, à vazão ótima de cada coluna, determinada através da curva de van Deemter, com detector em comprimento de onda de 254 nm. Em alguns casos, devido à pobre resolução dos picos, a fase móvel foi ajustada para metanol:água 60:40 e 50:50 v/v. O volume de amostra injetado foi sempre de 5  $\mu\text{L}$ .

Antes de serem utilizados os solventes como fase móvel, eles foram filtrados em uma membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  e foram desgaseificados no ultra-som, por aproximadamente 30 minutos.

#### **4.2.13 – Exemplos de aplicação de colunas recheadas com novas FE**

##### **4.2.13.1 – Separação de uma mistura de herbicidas**

A separação cromatográfica de uma mistura de herbicidas contendo bentazona, cianazina, simazina, atrazina, diuron e linuron foi analisada no cromatógrafo Shimadzu (descrito no item 3.2.1), utilizando-se uma coluna com dimensões de 150 mm x 3,9 mm de diâmetro interno, recheada com FE experimental. A FM empregada foi metanol:água 50:50, vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . O volume de injeção foi 5  $\mu\text{L}$  e o comprimento de onda no detector de 230 nm.

#### **4.2.13.2 – Separação de princípios ativos do fármaco comercial Alginac**

Para se avaliar a separação cromatográfica dos compostos Diclofenaco (DFC), Tiamina (vitamina B1) e pirodoxina (vitamina B6), princípios ativos presentes em fármacos comerciais foram utilizadas duas amostras reais. A amostra 1 consistia em tabletes do fármaco comercial Alginac comprado em farmácia e a amostra 2 consistiu de uma formulação manipulada preparada em estabelecimento comercial, contendo as dosagens rigorosamente descritas no fármaco comercial.

As amostras foram preparadas a partir de 10 tabletes de Alginac (amostra 1) e 10 cápsulas da formulação manipulada (amostra 2) trituradas em almofariz. A seguir foram pesadas as quantidades equivalentes a uma cápsula e a um tablete e dissolvidas em 250 mL de uma solução de metanol:água 50:50 v/v. Para a separação cromatográfica foram preparadas triplicatas, tomando-se alíquotas de 500 µL desta solução diluídas em 5 mL de solução tampão  $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH = 4 e o volume completado para 10 mL com água deionizada

Para a curva analítica foram preparadas soluções em triplicata, com concentrações na faixa de 10-50 µmol.L<sup>-1</sup> de diclofenaco em soluções de metanol:água 50:50, (v/v). O sistema cromatográfico empregado foi Shimadzu e as condições cromatográficas foram: FM metanol/água 70:30 (v/v), ajustada a pH 3,8 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , em uma vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O volume de injeção foi de 5 µL e o comprimento de onda no detector de 275 nm.

### **4.3. Resultados e Discussão**

#### **4.3.1 – Primeira Etapa: Determinar a quantidade ideal de PMODS a ser adsorvido e a melhor temperatura de imobilização térmica**

O primeiro parâmetro a ser considerado foi a quantidade de PMODS (carga) a ser incorporada na superfície de sílica. Deve-se ressaltar que neste processo de preparação da fase estacionária o polímero não ficará covalentemente ligado à superfície de sílica, podendo ser arrastado durante o procedimento de enchimento da coluna, mesmo passando por algum processo de imobilização. Portanto, é muito importante que os poros da sílica estejam preenchidos com polímero, neste caso, o

PMODS, antes da imobilização, para maximizar a quantidade de FE que ficou retida nos poros, após a extração e o processo de enchimento da coluna.

Um cálculo simples foi feito para se avaliar a quantidade necessária de polímero para preencher completamente os poros do suporte de sílica, através da equação:

$$m_{PMODS\ porescheios} = v p_{sílica} (mL / g) \times \rho_{polímero} (g / mL) \quad (4.1)$$

onde  $v p$  é o volume de poro da sílica e  $\rho$  a densidade do polímero.

Foi encontrado o valor de 0,66 g de polímero para cada grama de FE final. Baseando-se nestes dados e nos resultados de Anazawa & Jardim<sup>9</sup> e Silva & Jardim<sup>15</sup> que realizaram estudos a este respeito com PMOS e PMODS respectivamente, foram feitos ensaios com fases estacionárias apresentando 40 e 50 % de carga de PMODS sobre sílica Davisil de 10  $\mu m$ . A carga de 40 % representa a quantidade exata para preencher os poros da sílica e 50 % irá produzir uma FE com excesso de polímero.

Sabe-se que durante o procedimento de enchimento da coluna ocorrerá um arraste mecânico do polímero excedente, porém, como o processo é realizado sob alta pressão não há tempo de contato suficiente para permitir que a superfície da sílica ainda sem polímero seja recoberta. Para que o excesso de polímero seja extraído e, durante este processo, tenha ainda a possibilidade de se reorganizar sobre a superfície do suporte, criou-se um processo de extração da FE, utilizando-se solvente apropriado, por um longo período, sob vazão lenta. Na primeira etapa deste trabalho, as extrações foram realizadas à uma temperatura de 50 °C com hexano à uma vazão de 0,4 mL min<sup>-1</sup> durante 4 horas.

Os primeiros testes da técnica de incorporação do polímero PMODS na superfície da sílica Davisil (10  $\mu m$ ) foram feitos utilizando-se uma quantidade de polímero equivalente a 40 % da massa total de FE final. A FE resultante era branca e se apresentava na forma de placas no fundo do recipiente em que foi deixada na capela para a evaporação do solvente. Ao acondicionar a FE em frascos/reservatórios, ela se apresentava na forma de pequenos grumos. Esta característica era própria de uma FE com excesso de polímero.

A extração com hexano (no caso específico da sílica Davisil) foi o método utilizado para eliminar o excesso de polímero. Após a evaporação do solvente de extração excedente, a FE resultante ainda apresentava-se na forma de pequenos grumos, que dificultavam a formação de uma boa suspensão, condição imprescindível para que, durante o processo de enchimento, o recheio se distribuisse uniformemente no interior da coluna.

Para melhorar a homogeneidade da FE na suspensão e, portanto, garantir um recheio mais uniforme dentro da coluna cromatográfica, fez-se uma trituração simples da FE em almofariz imediatamente antes do preparo da suspensão. A avaliação dos resultados foi feita apenas em termos cromatográficos e estão apresentados em Tabela 4.3, com os respectivos cromatogramas na Figura 4.4. O decréscimo da assimetria após a homogeneização indica uma melhor acomodação da FE no leito da coluna, devido principalmente à menor dispersão do tamanho entre as partículas de FE. Mas a trituração trouxe um fator negativo associado: as partículas de sílica com polímero partiram-se, prejudicando o processo de transferência de massa na separação cromatográfica e, portanto, causando uma perda de eficiência. A partir desta observação, todo o trabalho realizado com relação ao preparo de FE foi desenvolvido mantendo-se as características iniciais do material, mesmo após procedimentos diferenciados de imobilização de polímero. Porém, para garantir uma boa suspensão, esta passou a se mantida em um banho de ultra-som durante 30 s a 1min antes de ser colocada sob agitação no roto torque por 16 horas.

Tabela 4.3: Parâmetros cromatográficos obtidos com a FE (utilizando sílica Davisil de 10 µm) pulverizada ou não antes do enchimento.

Composto	FE s/ pulverizar			FE pulverizada		
	k	As	N/m	k	As	N/m
Acetona	7,9	2,6	16500	8,0	1,6	17360
Benzonitrila	9,7	2,3	14740	10,0	1,5	15870
Benzeno	11,6	2,1	17860	12,1	1,4	14940
Tolueno	16,0	2,0	15610	17,0	1,6	14000
Naftaleno	24,8	2,4	20050	26,3	1,5	16670

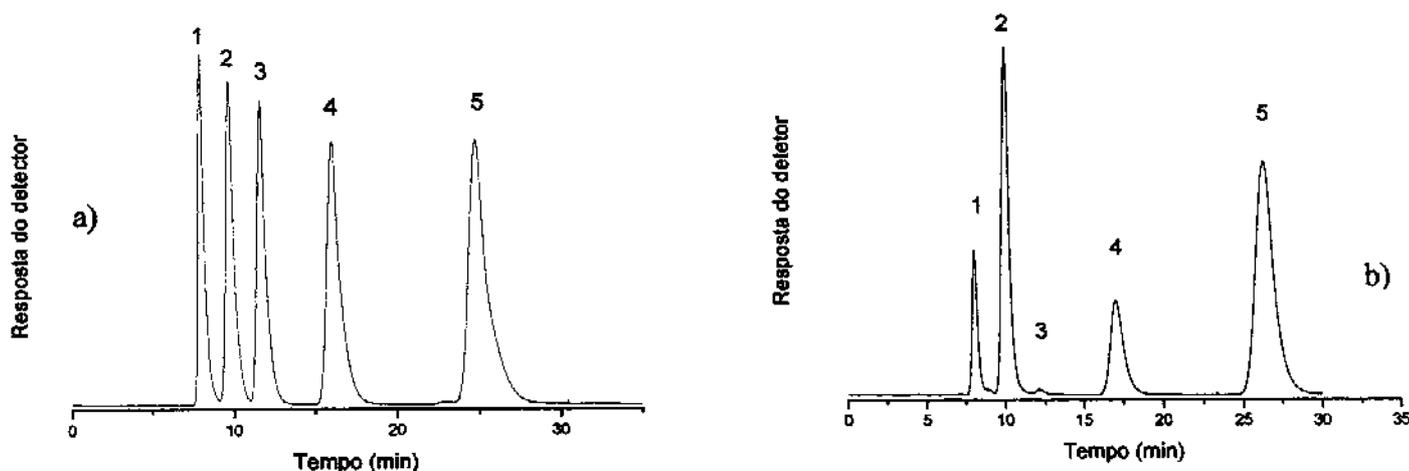


Figura 4.4: Cromatogramas obtidos para FE de sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  com PMODS a) sem pulverizar e b) pulverizada. Mistura teste 1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno, (5) naftaleno. Condições cromatográficas: FM metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL  $\text{min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm.

Durante os ensaios para otimização do parâmetro carga de polímero sobre o suporte, foi avaliado um outro item a ser otimizado: a temperatura de imobilização. Trabalhos prévios desenvolvidos no LabCrom com o polimetiloctilsiloxano (PMOS) mostraram que as temperaturas na faixa de a 150 a 220  $^{\circ}\text{C}$  eram promissoras para a imobilização do polímero na superfície da sílica, sendo a temperatura de 150  $^{\circ}\text{C}$  a responsável pela melhor coluna cromatográfica. O PMODS apresenta uma cadeia carbônica lateral muito maior que o PMOS, (o monômero de PMOS possui 10 carbonos a menos na cadeia) sendo necessário, portanto, uma avaliação mais cuidadosa para a escolha da faixa de temperaturas de imobilização a serem otimizadas. O primeiro ensaio de imobilização térmica do PMODS em sílica Davisil, 10  $\mu\text{m}$ , foi realizado a 180  $^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas e resultou em uma fase estacionária de coloração fortemente castanha, (a FE após o seu preparo e antes da imobilização térmica apresenta-se branca) indicando uma provável degradação das cadeias poliméricas do PMODS. A análise termogravimétrica do PMODS (Figura 4.5) indicou pequena alteração no gráfico à 145 e 195  $^{\circ}\text{C}$  e, em seguida, uma perda de massa mais pronunciada a 400  $^{\circ}\text{C}$ . A partir destes resultados, concluiu-se que a temperatura de 180 $^{\circ}\text{C}$  deveria ser o limite superior da faixa de temperatura a ser avaliada e 80 $^{\circ}\text{C}$  seu limite inferior (nesta temperatura nem mesmo a água superficial poderia ser removida).

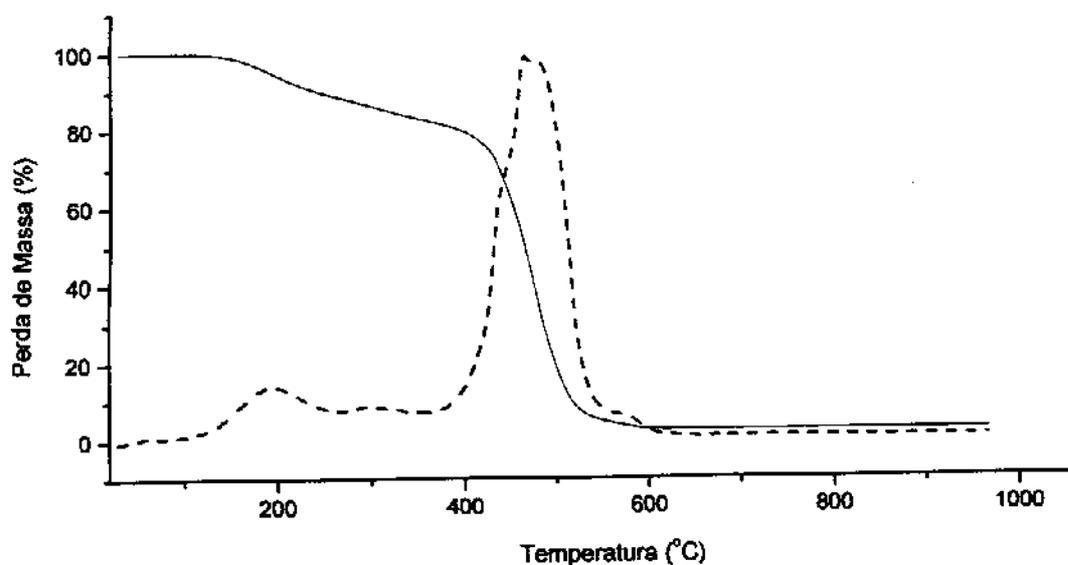


Figura 4.5: Termograma do PMODS. Na linha tracejada está apresentada a derivada da curva de perda de massa.

A partir deste momento, foram preparadas FE com sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  e carga inicial de PMODS de 40 e 50 % imobilizadas durante 4 horas através de tratamento térmico em diferentes temperaturas: 80, 100, 120, 150 e 180  $^{\circ}\text{C}$ . Os resultados cromatográficos destas primeiras FE estão apresentados na Tabela 4.4 e os cromatogramas apresentados na Figuras 4.6 e 4.7.

Tabela 4.4: Resultados cromatográficos das FE de sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  com cargas de 40 e 50 % de PMODS imobilizadas termicamente por um período de 4 horas a diversas temperaturas e extraídas.

Imobilização ( $^{\circ}\text{C}$ )	40 %				50 %			
	As <sup>a</sup>	k	N/m <sup>a</sup>	%C	As <sup>a</sup>	k	N/m <sup>a</sup>	%C
80	2,1	1,3	23500	24,8	1,4	1,5	34000	20,0
100	1,0	2,5	22800	17,0	1,5	2,2	38100	26,1
120	1,2	4,8	17500	22,2	1,1	5,1	29400	24,9
150	2,1	8,5	5400	22,5	1,9	9,6	1600	27,8
180	8,1	10,7	13900	25,6	1,3	11,1	4900	29,1

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

As colunas com carga de 50 % de polímero apresentaram maior quantidade de polímero imobilizado, após a extração, e também as melhores eficiências demonstrando que um excesso de polímero é benéfico na preparação da FF levando a um processo de transferência de massa entre FM e FE mais eficiente. Por outro lado, os resultados de %C mostraram que há uma tendência de maior imobilização do polímero com o aumento da temperatura. Este comportamento fica muito mais evidente nas FE com carga de 50 % de polímero, na qual a fixação do polímero foi sempre maior. Os cromatogramas destas FE estão apresentados nas Figuras 4.6 e 4.7. Para as duas porcentagens de carga avaliadas, os melhores resultados de imobilização de polímero foram obtidos com temperaturas entre 80 e 120 °C.

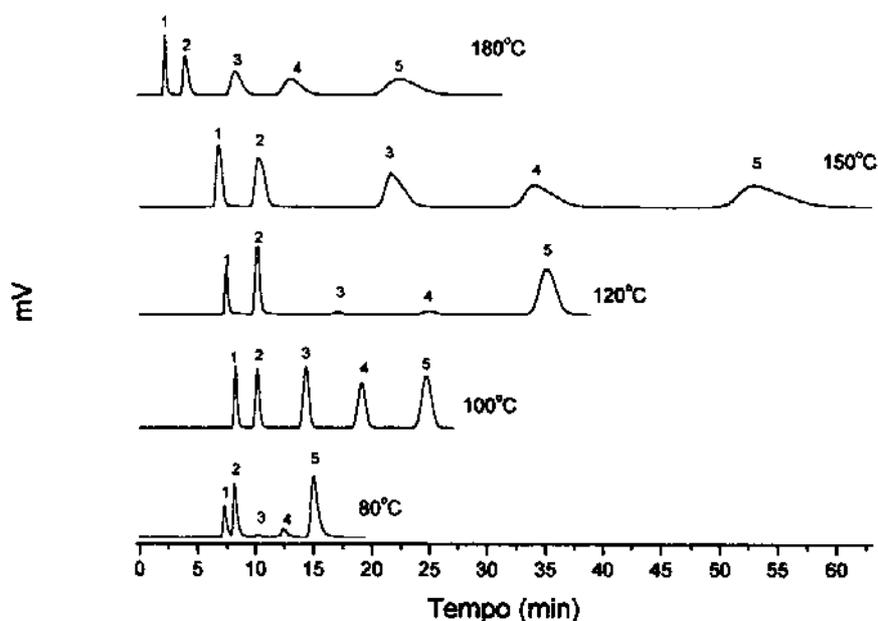


Figura 4.6: Cromatogramas obtidos com as FE preparadas com sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  e carga de 40 % de PMODS imobilizadas em diferentes temperaturas por 4 horas. Mistura teste 1 contendo: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm.

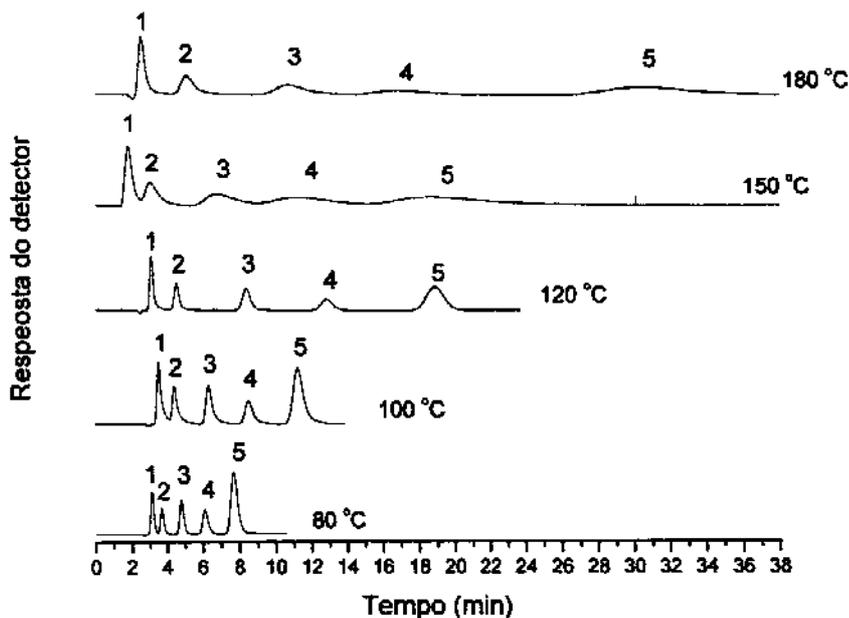


Figura 4.7: Cromatogramas obtidos com as FE preparadas com sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  e carga de 50 % de PMODS imobilizadas em diferentes temperaturas por 4 horas. Mistura teste 1 contendo: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm.

Comparando-se as FE em termos de fator de retenção,  $k$ , observou-se que este mantém valores de mesma magnitude nas duas porcentagens de carga estudadas, embora as colunas com excesso de polímero inicialmente (carga de 50 %) apresentassem sempre valores maiores. Este parâmetro indica que há uma maior interação da amostra com a FE, ficando o soluto retido mais tempo dentro da coluna e, portanto, melhorando a seletividade da separação analítica. No caso das FE imobilizadas a 150 e 180 °C, o valor de  $k$  praticamente dobrou, provavelmente devido à maior quantidade de FE imobilizada, indicando alta interação entre soluto e FE, aumentando o tempo de análise, sem, contudo, apresentar algum ganho significativo na separação da mistura em questão.

Por outro lado, independentemente da carga de PMODS (40 ou 50 %), ficou evidente que as temperaturas acima de 120 °C são extremamente prejudiciais para uma separação cromatográfica, embora a quantidade de polímero imobilizado não tenha sofrido grandes alterações em relação às FE imobilizadas a temperaturas inferiores. Em trabalhos desenvolvidos por Collins e colaboradores<sup>72</sup> este comportamento é relatado para FE com polímero PMOS imobilizado a altas temperaturas (150 – 180 °C) e está relacionado à formação de “bicamadas” de polímero sobre a superfície do suporte de sílica.

Por analogia, foram calculadas as espessuras de camada das FE preparadas com polímero PMODS imobilizado à diferentes temperaturas.

Os cálculos de espessura de camada foram feitos utilizando-se a expressão:

$$\tau = \left( \frac{\sqrt{d^2 - F \cdot d^2} - d}{2} \right) \quad (4.2)$$

A fração F representa a relação entre a quantidade de PMODS efetivamente presente nos poros do suporte de sílica e quantidade de PMODS para preenchê-los completamente e pode ser obtida através da equação:

$$F = \frac{\bar{m}_{\text{PMODS retido}}}{\bar{m}_{\text{PMODS poros cheios}}} \quad (4.3)$$

onde  $\bar{m}_{\text{PMODS retido}}$  é a massa específica e  $\bar{m}_{\text{PMODS poros cheios}}$  é obtida da equação 4.1.

Tabela 4.5: Espessura da camada, ( $\tau$ ), de polímero PMODS imobilizado em diferentes temperaturas para FE de sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  com carga inicial de PMODS de 50 %.

Temperatura °C	massa específica $\bar{m} = \%C / (73 - \%C)$	$\tau$ ( $\mu\text{m}$ )
80	0,376	1,4
100	0,396	1,5
120	0,518	2,3
150	0,615	3,1
180	0,660	3,8

Avaliando-se os resultados apresentados na Tabela 4.5, pode se concluir que temperaturas a partir de 120 °C produzem FE com camadas mais espessas, ou bi-camadas, porém, como não é possível garantir a uniformidade desta “espessura”, a FE passa a apresentar áreas de grande hidrofobicidade alternadas com regiões pouco recobertas de polímero. Isto explica o comportamento das separações cromatográficas observadas em FE imobilizadas a 150 °C e 180 °C (para cargas de 40 e 50 %), nas quais houve um aumento significativo no tempo de análise, apresentado picos largos e irregulares,

principalmente dos compostos mais hidrofóbicos como tolueno e naftaleno. Foram realizadas análises termogravimétricas em atmosfera inerte, apresentadas na Figura 4.8, para avaliar a estabilidade térmica das FE immobilizadas em temperaturas entre 80 e 180 °C.

Tabela 4.6: Perda de massa obtida das curvas de TGA para FE (com suporte de sílica Davisil 10 µm) immobilizadas em diferentes temperaturas.

Imobilização Térmica (°C)	Perda de massa (%) <sup>a</sup>
80	25,2
100	28,0
120	31,3
150	36,7
180	38,1

<sup>a</sup>: análise realizada em FE recuperada após enchimento da coluna

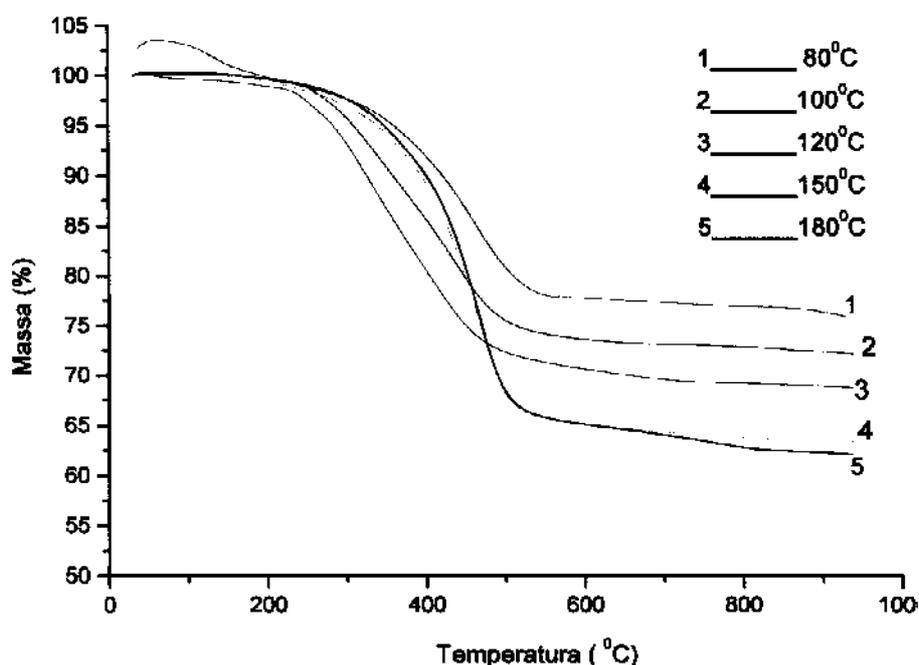


Figura 4.8: Termogramas (sob atmosfera inerte) de FE immobilizadas em diferentes temperaturas, preparadas a partir de sílica Davisil 10 µm com carga de 50 % de PMODS inicial, as amostras utilizadas foram as recuperadas após enchimento das colunas cromatográficas.

Sabe-se que a altas temperaturas sob atmosfera inerte os polissiloxanos lineares degradam em um processo que fornece uma mistura de voláteis, produtos de baixa massa molar, de mesma fórmula elementar do polímero original<sup>124</sup>. Portanto, as perdas de massa apresentadas na Tabela 4.6 correspondem à degradação do polímero PMODS. E, novamente, observa-se que a temperatura de imobilização é uma variável responsável pela quantidade de polímero sobre a superfície do suporte, pois, quanto maior a temperatura de imobilização, maior foi a perda de massa observada nos termogramas, principalmente nas FE imobilizadas a partir de 120 °C.

### 4.3.2 – Avaliações espectrométricas das fases estacionárias

Paralelamente à avaliação cromatográfica das FE imobilizadas em diversas temperaturas, foi investigada a constituição estrutural da FE (com carga inicial de 40 %) através de espectroscopia de RMN com CP/MAS de <sup>29</sup>Si e <sup>13</sup>C e espectrometria ao infravermelho.

A técnica de espectroscopia de RMN em estado sólido começou a ser utilizada para avaliar as FE de fase reversa baseadas em suportes de sílica a partir da década de 90. Esta técnica fornece informações valiosas sobre a variedade e quantidade de espécies formadas em reações de modificação de superfícies como as da sílica<sup>125</sup>. Atualmente, são muito conhecidas na literatura as caracterizações das FE através da técnica de RMN CP MAS avaliando-se átomos de <sup>29</sup>Si, <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H. Cada um deles é capaz de fornecer diferentes características da FE.

No caso dos espectros de <sup>29</sup>Si os elementos estruturais da sílica gel consistem basicamente de ligações do tipo silanóis ( $\equiv\text{Si-OH}$ ) e ligações do tipo siloxano ( $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$ ). Nos espectros, estas espécies são representadas por picos em aproximadamente -90 ppm, atribuídos aos silanóis geminais que recebem o nome de Q<sup>2</sup> e -100 ppm para os silanóis livres e vicinais (estas duas espécies não podem ser distinguidas entre si pela técnica de RMN) chamados Q<sup>3</sup>. As ligações tipo siloxano são representadas por um pico em -109 ppm chamado Q<sup>4</sup>. As estruturas químicas destas espécies estão apresentadas na Figura 4.9. É interessante observar que nesta notação os números superscritos nas letras Q indicam o número de ligações do tipo  $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$  das espécies. Complementando os espectros, são observados picos específicos dos modificadores quimicamente ligados à FE como silanos difuncionais ou espécies D<sup>2''</sup> e silanos trifuncionais, ou espécies T<sup>1</sup>, T<sup>2</sup> e T<sup>3</sup>, visualizados na Figura 4.10.

Os espectros de  $^{29}\text{Si}$  das FE de sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  com PMODS sem tratamento térmico (não imobilizado) apresenta um pico característico de silanol difuncional,  $\text{D}^{2''}$ , em  $-24$  ppm e picos em  $-91$ ,  $-101$  e  $-111$  ppm relativos às espécies  $\text{Q}^2$ ,  $\text{Q}^3$  e  $\text{Q}^4$ . O pico que representa a espécie D está relacionado à ressonância da cadeia do polissiloxano, (neste caso, o PMODS). A ocorrência de picos crescentes em deslocamentos diferentes do polímero puro observados a partir de  $120$   $^{\circ}\text{C}$ , indicam a formação de novas espécies de silício. Acredita-se que temperaturas maiores que  $120$   $^{\circ}\text{C}$  quebram as ligações  $\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$  para formação de novos grupos. Os alargamentos dos picos da espécie  $\text{D}^{2''}$  são considerados novos sinais que podem ser atribuídos a uma combinação de diferentes grupos adsorvidos ( $\text{D}^{2''}$ ) e ligados quimicamente ( $\text{D}^{2'}$ ). A estrutura destas espécies está representada na Figura 4.10.

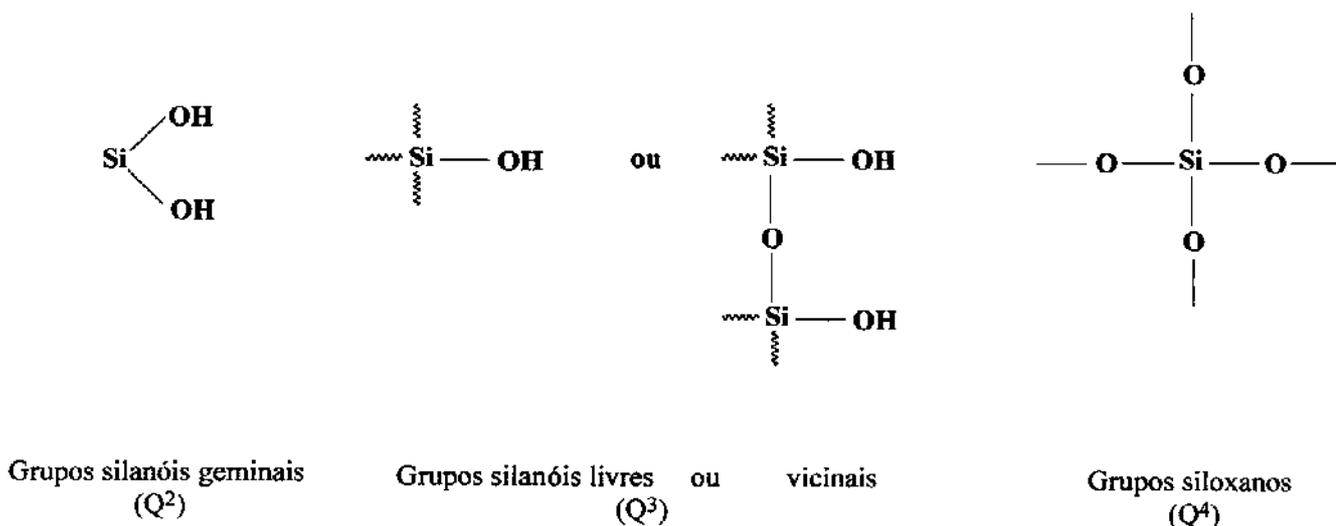


Figura 4.9: Estruturas das espécies  $\text{Q}^2$ ,  $\text{Q}^3$ ,  $\text{Q}^4$  presentes em espectros de RMN de  $\text{Si}^{29}$  referentes ao suporte cromatográfico.

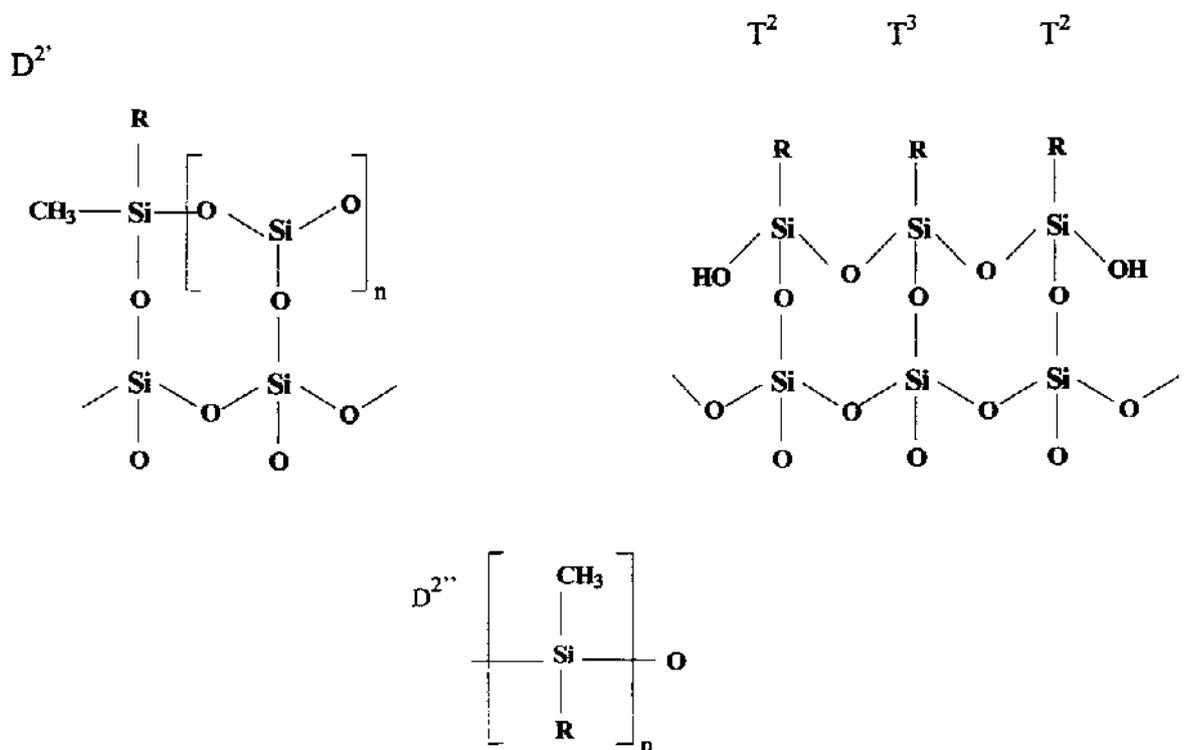


Figura 4.10: Estruturas das espécies  $D^{2'}$  e  $D^{2''}$ ,  $T^1$ ,  $T^2$ ,  $T^3$  presentes em espectros de RMN de  $^{29}\text{Si}$  relacionados aos modificadores da sílica

Embora esta técnica não seja quantitativa, fazendo-se uma comparação proporcional é possível afirmar que na FE sem imobilização a maioria dos silanóis presentes na FE são do tipo livres ou vicinais. O mesmo comportamento pode ser observado nas FE imobilizadas até 100 °C, com uma leve tendência na diminuição da área do pico relativo aos silanóis geminais,  $Q^2$ . Uma alternativa para explicar esta tendência é que parte dos silanóis geminais estão sofrendo alterações formando novas ligações do tipo siloxano. Deve-se ressaltar que estas alterações nas áreas dos picos  $Q^2$  e  $Q^4$  não são necessariamente proporcionais, apenas indicam que a estrutura interna da FE sofre estas prováveis modificações/quebras com o aumento da temperatura.

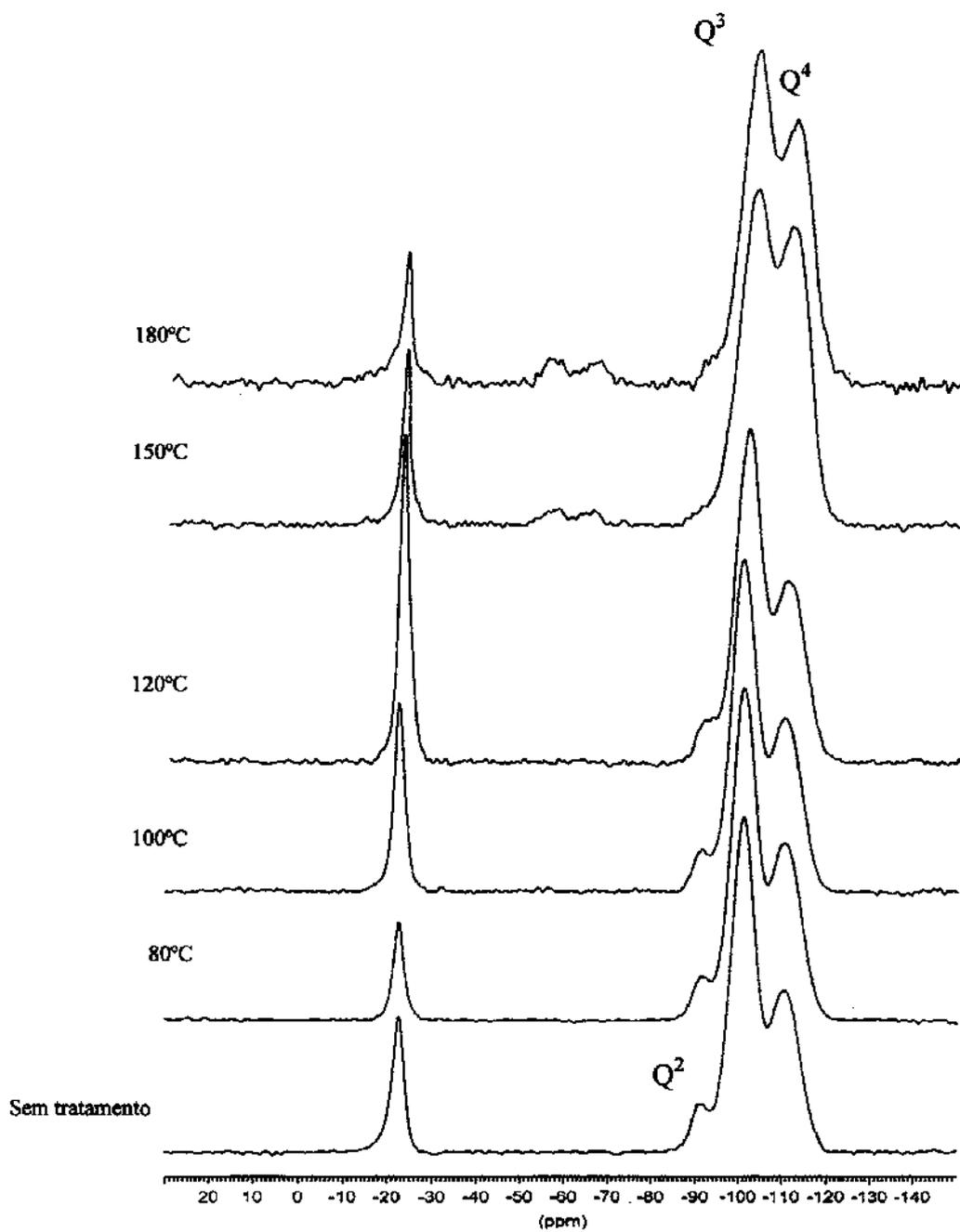


Figura 4.11: Espectroscopia de RMN  $^{29}\text{Si}$  de FE (suporte Davisil 10  $\mu\text{m}$  carga de 40 % de PMODS) sem tratamento térmico e imobilizadas a temperaturas de 80 a 180 °C.

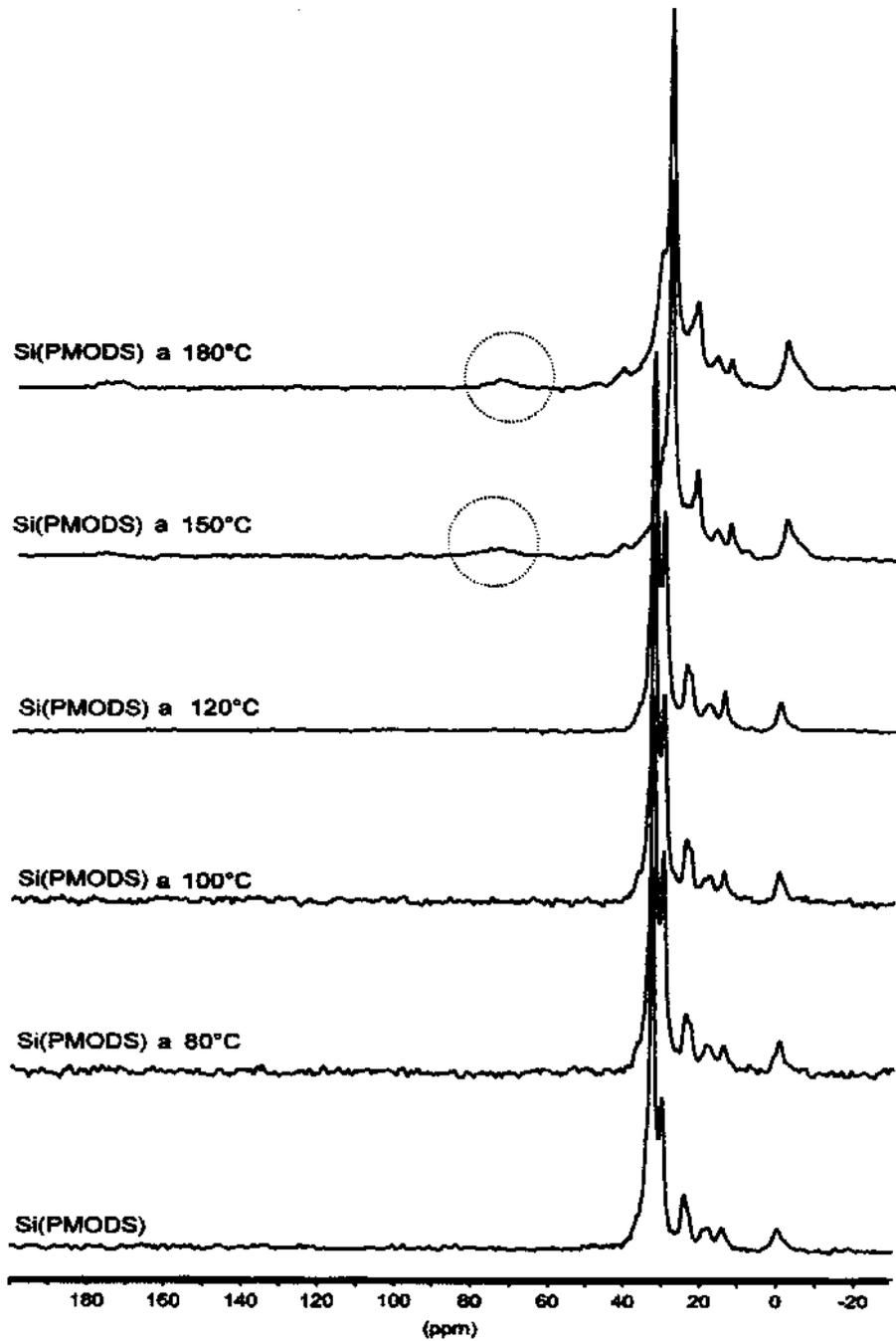


Figura 4.12: Espectroscopia de RMN  $^{13}\text{C}$  de FE (suporte Davisil 10  $\mu\text{m}$  carga de 40 % de PMODS) sem tratamento térmico e immobilizadas a temperaturas de 80 a 180 °C. Em destaque sinais em 60-80 ppm a partir da imobilização a 150 °C referentes à espécies T<sup>2</sup> e T<sup>3</sup>.

A temperatura de 120 °C parece ser o ponto limiar em que a FE apresenta características semelhantes ao polímero sem tratamento térmico pois o pico  $Q^2$  perde muita resolução, embora não se observe nenhuma alteração no padrão das ligações tipo siloxano, representadas pelo pico  $Q^4$ . A partir de 150 °C o pico  $Q^2$  desaparece completamente e, em contraposição, é possível visualizar picos (ainda com baixa resolução) típicos das espécies  $T^2$  e  $T^3$  em -60 ppm. Este resultado é muito interessante pois sugere a formação de siloxanos trifuncionais, o que só seria possível se houvesse uma quebra da cadeia polimérica e uma parte destes oligômeros conseguisse ligar-se aos silanóis livres ou vicinais do suporte de sílica. Esta suposição também encontra fundamentos na análise elementar, pois os resultados observados para todas as FE de sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  (com carga inicial de 40%) indicam que não houve alteração na quantidade total de polímero imobilizado entre as temperaturas de 120 a 180 °C, ou seja, a única possibilidade para este comportamento seria uma reorganização do polímero presente sobre a superfície da FE.

O átomo de  $^{13}\text{C}$  pode ser usado em investigações sobre FE de maneira similar ao  $^{29}\text{Si}$ , pois o núcleo deste átomo pode apresentar uma faixa de deslocamento superior a 200 ppm, e os possíveis efeitos de alargamento dipolar podem ser reduzidos pelo ângulo mágico de rotação. Esta técnica permite várias observações com relação à mudança na estrutura da cadeia do modificador ligado à superfície de sílica e a ordem conformacional destes ligantes<sup>126</sup>. Os espectros são caracterizados por picos que representam espécies de ligações tipo Si-C (ligação entre o suporte de sílica e seu modificador), chamados de espécie A e ligações C-C presentes na cadeia do modificador. As espécies A sempre aparecem no espectro em deslocamentos próximos de zero, seguidas pelas espécies com ligações C-C em deslocamentos maiores. Nesta técnica, também é possível obter informações sobre a densidade de cobertura do modificador, porém apenas em casos de alta concentração ( $\geq 2,9 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ) e longas cadeias alquilas. Neste caso específico, os sinais próximos de 14 ppm podem ser atribuídos a cadeias com um ambiente mais rígido, enquanto sinais em 12 ppm são devidos a átomos de carbono com liberdade de deslocamento, mais próximos das extremidades da cadeia polimérica.

Ainda com relação aos espectros de  $^{13}\text{C}$ , apresentados na Figura 4.12, o polímero puro sem passar por um tratamento térmico apresenta um pico pronunciado típico da conformação estrutural *trans*, mais rígida, em aproximadamente 32 ppm e um pico de menor intensidade a 29 ppm indicativo da conformação do tipo *gauche*, de maior mobilidade da cadeia polimérica. A relação de intensidade entre estes dois picos vai sendo alterada conforme o aumento da temperatura de imobilização até que, a partir de 150 °C ocorre uma inversão, ficando aparente a predominância de cadeias mais móveis,

chamadas de *gauche*. Segundo a literatura<sup>127</sup>, cadeias alquílicas menores têm maior mobilidade em relação às maiores, portanto, o comportamento visualizado nos espectros, ou seja, uma inversão na intensidade dos picos tipo *trans* e *gauche* sugere que a cadeia polimérica sofre pequenas quebras com aumento de temperatura a partir de 150 °C. Os oligômeros gerados por estas quebras provavelmente ligam-se novamente à superfície da sílica ou entre si, pois é possível observar-se nos espectros de <sup>13</sup>C um pequeno ombro em -3 ppm, indicando a formação de novas ligações do tipo carbono-silício, que aumentam de intensidade com o aumento da temperatura. Também a partir de 150 °C, é possível observar pequenos sinais em 70-80 ppm, provavelmente devidos às reações entre as cadeias de PMODS. Estes fatores poderiam explicar a queda brusca de eficiência das colunas cromatográficas e alterações nos perfis dos picos na separação analítica.

Confirmando as suposições de quebra da cadeia polimérica principal e a conseqüente formação de espécies secundárias, os espectros de infravermelho destas mesmas FE (Figura 4.13) apresentam uma banda bastante pronunciada na região de 1700 cm<sup>-1</sup> a partir de 150 °C, representando os grupos carbonila. Esta banda apresenta um aumento de intensidade com o aumento da temperatura e a presença dos grupos carbonila sugere que ocorrem reações entre os oligômeros do PMODS gerados devido a alta temperatura e o oxigênio presente na estufa na qual foi feita a imobilização térmica. Portanto, tanto os espectros de RMN quanto os de infravermelho, apresentam evidências de alteração da estrutura da FE após aquecimento em temperaturas acima de 150 °C, causando uma queda brusca de eficiência e separações inadequadas<sup>73</sup>.

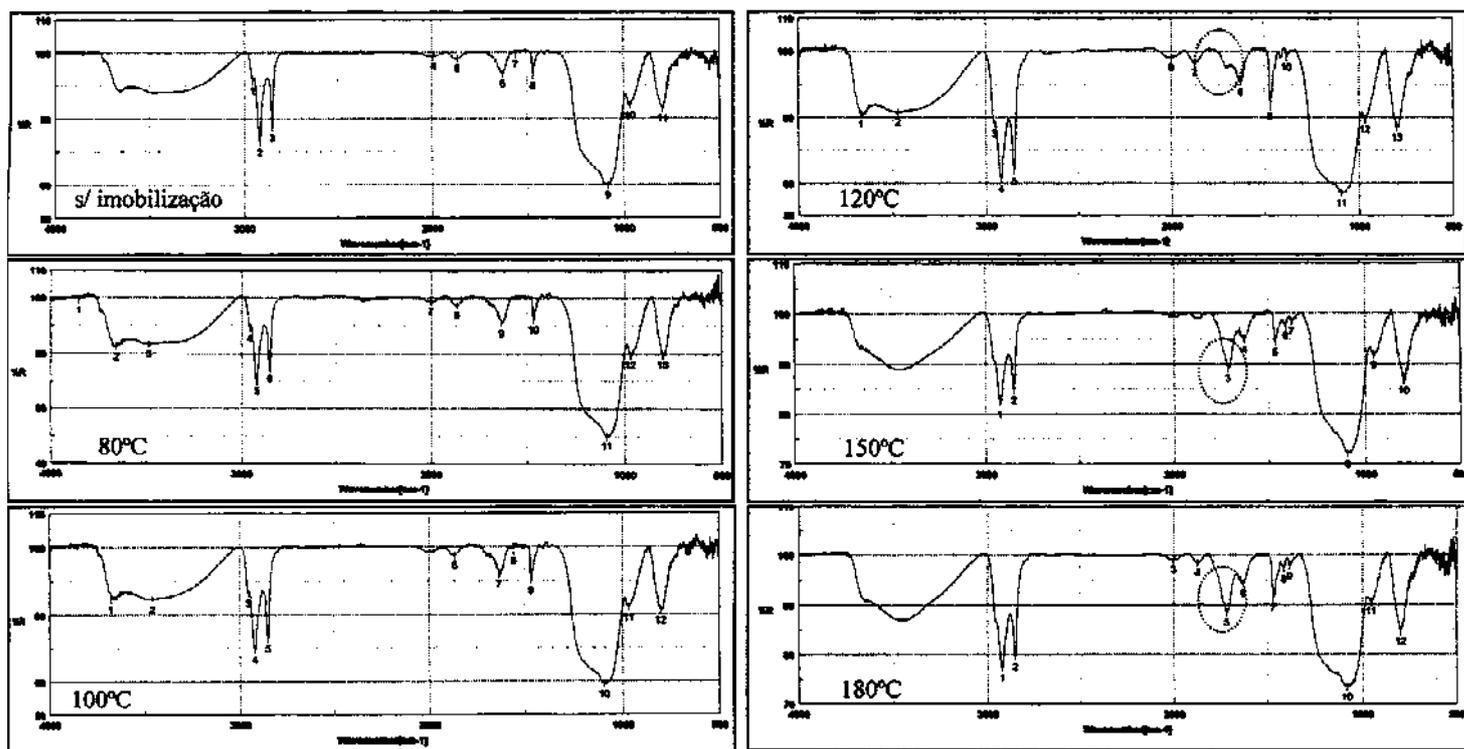


Figura 4.13: Espectros de absorção no IV das FE de sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  com carga de 40 %, apresentando as variações nas fases estacionárias após o aumento de temperatura de tratamento térmico. Em destaque as bandas na região de  $1700\text{ cm}^{-1}$  referentes à aos grupos carbonilas.

A partir destes resultados, definiu-se que os estudos posteriores seriam sempre efetuados fixando-se o parâmetro carga de polímero em 50 % e a faixa de temperatura para imobilização térmica do polímero PMODS sobre a superfície da sílica não poderia ultrapassar  $120\text{ }^\circ\text{C}$ , sendo que a melhor temperatura (temperatura “ótima”) foi fixada em  $100\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **4.3.3 – Segunda Etapa: Determinação do melhor tempo de imobilização térmica**

Com as FE preparadas até esta parte do trabalho foi possível definir dois parâmetros: a carga de polímero a ser imobilizado e a melhor temperatura a ser utilizada durante o tratamento térmico.

Era necessário também estudar o melhor tempo de imobilização. Desta forma, foram preparadas FE com sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$ , com o melhor carga inicial (de 50 %) de PMODS e a melhor condição de imobilização (tratamento térmico a 100 °C) durante 0 (controle), 2, 4, 8 e 16 horas. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.7 e os cromatogramas podem ser visualizados na Figura 4.14.

Tabela 4.7: Variação dos tempos de tratamento térmico a 100 °C em sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  (50 % de carga de PMODS).

Tratamento (horas)	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k	Rs <sup>b</sup>	% C
0 <sup>c</sup>	47800	1,3	0,9	2,2	8,9
2	44300	1,3	2,2	3,7	14,4
4	51300	1,2	2,7	4,2	15,7
8	55100	0,9	3,6	4,9	17,1
16	57800	0,8	4,4	5,3	18,0

<sup>a</sup> avaliada para o naftaleno

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

<sup>c</sup>: enchimento realizado 30 dias após a extração

Observa-se que, quanto maior for o tempo de imobilização a uma mesma temperatura, maior será a quantidade de polímero imobilizada, evidenciada pela análise elementar (% C). As eficiências das colunas também acompanham este comportamento, pois com uma quantidade maior de polímero há mais sítios de interação do soluto com a FE. Este fator permitirá que haja mais etapas de equilíbrio do soluto entre a FM e a FE durante o processo de transferência de massa. Os valores de fator de retenção,  $k$ , e resolução,  $Rs$ , demonstram que o caráter hidrofóbico da FE aumenta cerca de 4 vezes quando são comparadas as FE sem imobilização e as imobilizadas por 8 e 16 horas.

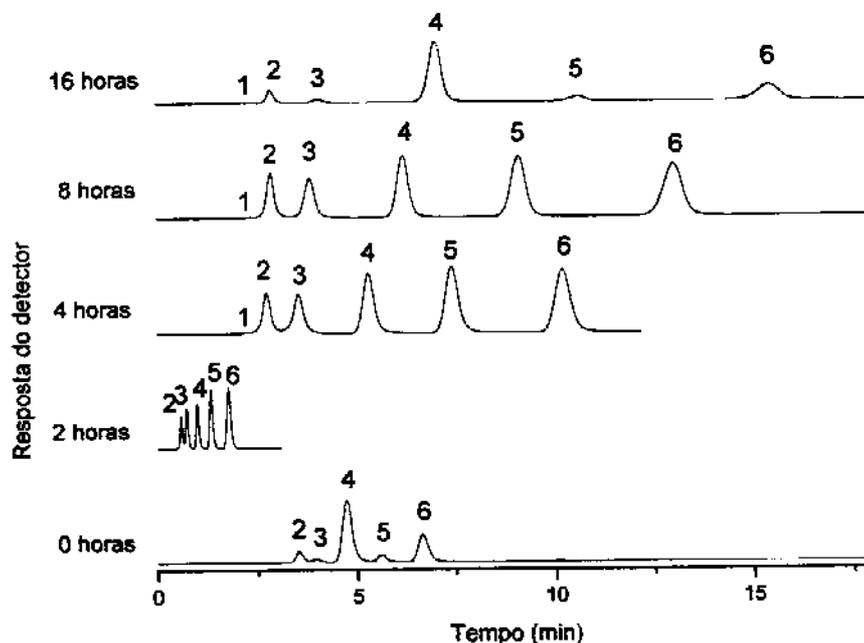


Figura 4.14: Cromatogramas obtidos com as FE imobilizadas sobre sílica Rainin 5µm (carga de 50%) durante 0 (controle), 2, 4 8 e 16 horas em estufa a 100 °C. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL.min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5 µL, detecção: UV, 254 nm.

Com relação aos resultados de % C é possível dizer que praticamente a metade dos poros da sílica estão preenchidos pelo polímero (utilizando-se a equação 3.1 para a sílica Rainin seria necessário 35 % C para ter os poros completos ou cheios). O aumento de tempo de imobilização térmica contribui para aumentar a cobertura das FE.

#### 4.3.4 – Avaliação da otimização de tempo de imobilização térmica através de RMN

Seguindo a etapa anterior, as FE submetidas à variação de tempo de imobilização foram avaliadas através da técnica de RMN.

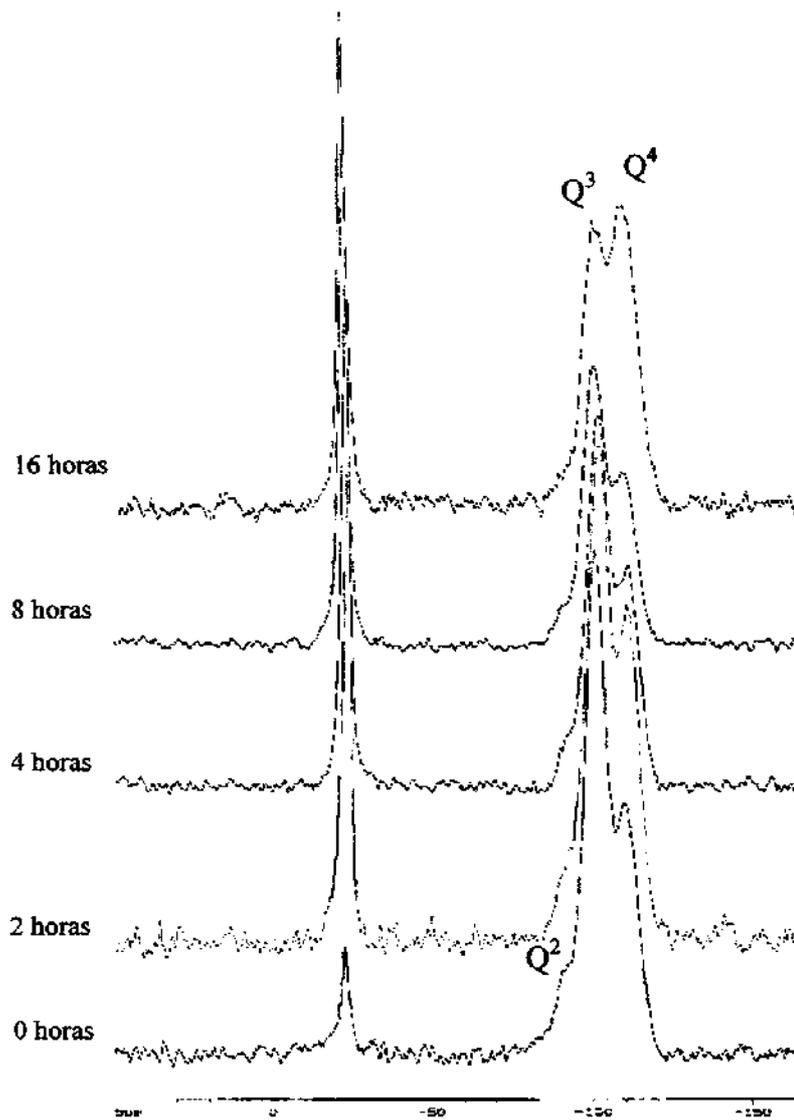


Figura 4.15: Espectros de RMN de  $^{29}\text{Si}$  de FE immobilizadas sobre sílica Rainin  $5\mu\text{m}$  a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  durante diferentes períodos de tempo.

A Figura 4.15 mostra os espectros de RMN de  $^{29}\text{Si}$  para as FE imobilizadas por diferentes períodos de tempo. O espectro da FE com PMODS sem tratamento térmico (não imobilizado) apresenta o pico característico de silanol difuncional, D, em aproximadamente  $-23$  ppm e picos em  $-100$  e  $-109$  ppm relativos às espécies  $\text{Q}^3$  (grupos silanóis livres e vicinais) e  $\text{Q}^4$  (grupos siloxanos). Assim, como observado na Figura 4.11, em  $-91$  ppm observa-se um pico muito pouco definido, devido provavelmente à presença de espécies do tipo  $\text{Q}^2$  (grupos silanóis geminais) que praticamente permanece inalterado durante a variação de tempos de imobilização. Embora a sílica utilizada neste experimento (sílica Rainin com 50% de carga inicial) seja diferente da utilizada na etapa anterior (na otimização de temperatura de imobilização utilizou-se sílica Davisil  $10\ \mu\text{m}$  com carga inicial de 40 % de PMODS), observa-se igualmente que a maioria dos silanóis presentes no suporte cromatográfico são do tipo livres ou vicinais. Mas, a partir de 8 horas de imobilização, o pico  $\text{Q}^4$  parece maior, sugerindo que o aumento de tempo de imobilização promove um aumento de cadeias poliméricas imobilizadas sobre a superfície da sílica. Com 16 horas de imobilização térmica, a presença de espécies siloxano ( $\text{Q}^4$ ) supera proporcionalmente a quantidade de silanóis livres presentes na superfície do suporte de sílica, ou seja, uma grande quantidade de polímero foi imobilizada utilizando os sítios ativos dos silanóis livres e vicinais. Este fato também é comprovado pelos dados de análise elementar (% C) que indicam um aumento na quantidade de polímero presente na FE.

Analisando-se o espectro de  $^{13}\text{C}$  destas mesmas FE apresentadas na Figura 4.16, observa-se que, após a imobilização térmica a  $100\ ^\circ\text{C}$ , independentemente do período de tempo de aquecimento, praticamente não há alteração na estrutura das cadeias poliméricas ligadas à superfície da sílica. Em todos os espectros há a predominância de picos em aproximadamente  $-32$  ppm, típicos de cadeias mais longas, também chamadas de conformação *tran*<sup>n</sup>, (de cadeias mais rígidas). Estas análises mostram que, a uma temperatura relativamente baixa, a estrutura conformacional do polímero permanece inalterada, mesmo que o tempo de exposição seja longo, neste caso, esta exposição foi de 2 a 16 horas. Outra observação importante a ser feita é a comprovação de que a temperatura de  $100\ ^\circ\text{C}$  parece, realmente, ser a mais adequada para imobilização térmica, uma vez que, apesar da grande variação de tempo de tratamento, não houve mudança na estrutura conformacional do PMODS.

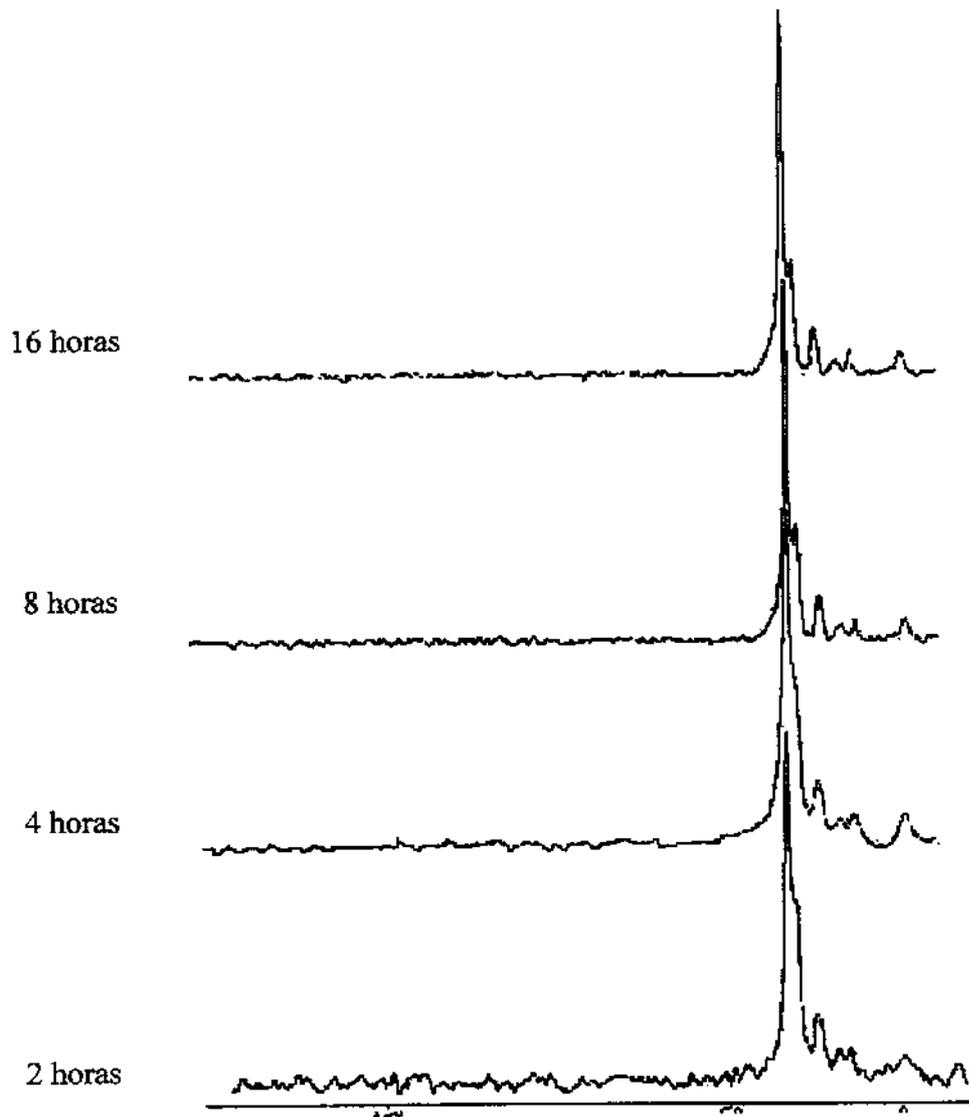


Figura 4.16: Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das FE imobilizadas sobre sílica Rainin  $5\mu\text{m}$  a  $100\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2, 4, 8 e 16 horas.

#### **4.3.5 – Efeito de um pré aquecimento imediatamente anterior à imobilização térmica**

O PMODS é um polímero que apresenta uma viscosidade elevada a ponto de se apresentar sólido a temperatura ambiente. Presumindo-se que a alta viscosidade do PMODS estaria influenciando e até restringindo a “entrada” do polímero dentro dos poros da sílica, além de não permitir uma boa

distribuição espacial das cadeias do polímero sobre a superfície do suporte, foi incluída uma etapa de pré-tratamento antes de se iniciar o tratamento térmico para a imobilização. Assim, antes da imobilização à temperatura de 100 °C, as FE (preparadas a partir de sílica Rainin 5 µm) passaram por um pré-aquecimento a 60 °C, por uma hora.

Com este procedimento esperava-se que, com a diminuição da viscosidade do polímero em uma temperatura superior à ambiente, o polímero apresentasse maior mobilidade para penetrar dentro dos poros da sílica, além de recobrir mais uniformemente a superfície do suporte. Os resultados, apresentados na Tabela 4.8, comprovaram esta teoria, apresentando fases com maior eficiência e boas assimetrias. A Figura 4.17 apresenta os cromatogramas destas FE.

Tabela 4.8: Avaliação de condição de pré-tratamento térmico a 60 °C (1 hora) antes do tratamento térmico a 100 °C por diferentes períodos de tempo para FE com sílica Rainin 5 µm.

Tratamento (horas)	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	% C
0	-	-			11,56
2	43700	1,3	1,9	3,3	14,3
4	73100	1,4	2,3	4,4	15,2
8	78200	1,1	2,5	4,8	14,3
16	74400	1,3	4,7	5,8	16,8

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

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

Comparando-se as Tabelas 4.7 e 4.8 em termos de quantidade de polímero fixada, observa-se que esta praticamente não se alterou, mas as eficiências apresentaram um aumento considerável (entre 20 e 30 %). Novamente, a diminuição da viscosidade pode explicar este comportamento pois, com maior mobilidade, o polímero foi capaz de se reorganizar na superfície da sílica e dentro de seus poros de maneira a tornar a transferência de massa entre soluto e fase móvel mais eficiente.

Para observar qual a influência da variável tempo de imobilização na especificidade destas FE, foi utilizada a mistura teste chamada mistura teste 2, proposta no Capítulo 3 deste trabalho. Os resultados cromatográficos podem ser observados na Tabela 4.9 e os cromatogramas visualizados na Figura 4.17.

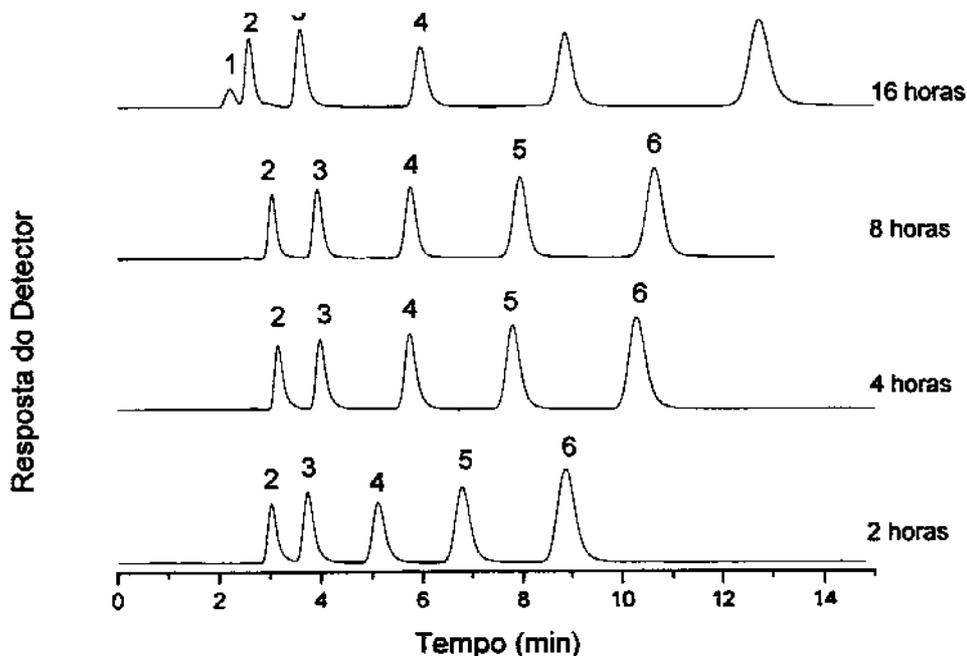


Figura 4.17: Cromatogramas obtidos com as FE (de sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  e 50 % PMODS) submetidas a tratamento térmico prévio a 60  $^{\circ}\text{C}$ , durante 1 hora e em seguida imobilizadas durante 2, 4, 8 e 16 horas em estufa a 100  $^{\circ}\text{C}$ . Mistura teste 1 contendo: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mLmin<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm.

Tabela 4.9: Parâmetros cromatográficos obtidos na separação da mistura II em FE de sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  e 50 % de PMODS com tratamento prévio de 60  $^{\circ}\text{C}$  e em seguida imobilizada por diferentes períodos de tempo.

Tempo Imobilização (horas)	Eficiência (N/m)		Assimetria <sup>a</sup>		Fator de retenção <sup>a</sup> (k)		Resolução <sup>a</sup>		$\alpha$ hidfb
	Naftaleno	Acenafteno	2	3	4	5	2/1	4/3	
0 horas	2800	60400	1,6	4,3	0,6	2,7	1,2	0,6	1,7
2 horas	25000	42200	1,7	-	2,4	5,3	1,7	0,8	2,2
4 horas	39700	87600	2,1	-	3,0	6,6	2,3	-	2,2
8 horas	72800	85000	2,0	3,7	3,0	6,5	2,3	1,6	2,2
16 horas	67800	84000	1,8	6,8	4,5	10,6	2,3	2,7	2,3

<sup>a</sup>: 2=fenol, 3=N,N-dimetilanilina, 4=naftaleno, 5=acenafteno

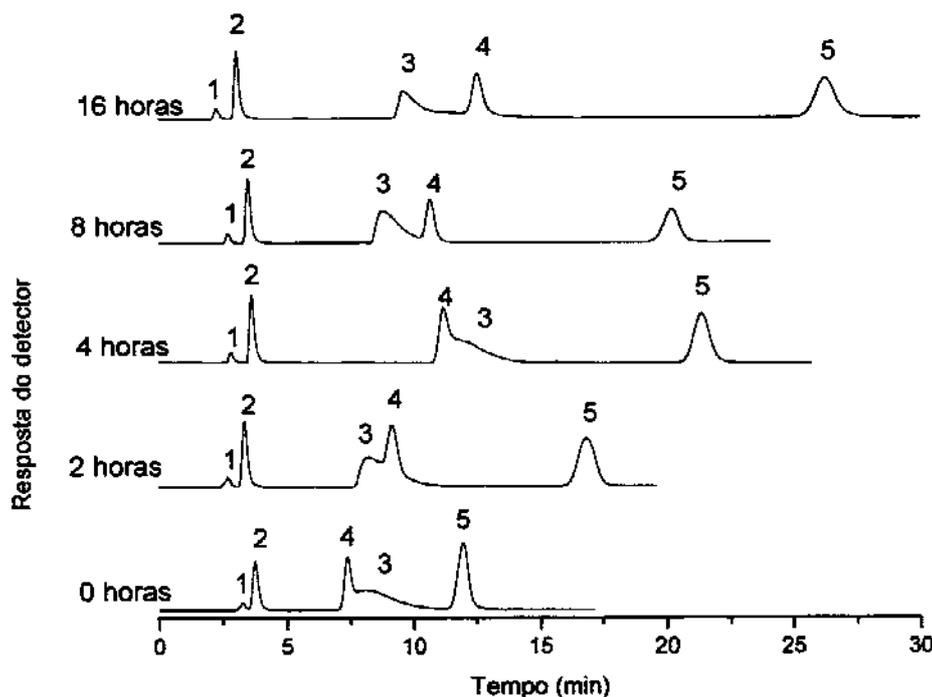


Figura 4.18: : Cromatogramas obtidos com as FE (de sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  e 50 % PMODS) submetidas a tratamento térmico prévio a 60  $^{\circ}\text{C}$ , durante 1 hora e em seguida imobilizadas durante 2, 4, 8 e 16 horas em estufa a 100  $^{\circ}\text{C}$ . Mistura teste 2 contendo: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mLmin<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm.

Os resultados dos fatores de retenção,  $k$ , dos compostos mais retidos, naftaleno e acenafteno, mostram que o aumento do tempo de imobilização é essencial para uma boa cobertura do PMODS sobre a superfície de sílica. É interessante observar também que houve uma inversão na ordem de eluição da N,N-dimetilanilina com o naftaleno na FE sem imobilização e na FE imobilizadas durante 4 horas. Segundo a literatura, este fato indica que a FE apresenta uma baixa hidrofobicidade, ou ainda, uma falta de uniformidade na distribuição do polímero (neste caso o PMODS) ao longo da superfície de sílica. Outro fator que chamou bastante atenção foi a eluição do composto básico N,N-dimetilanilina. Todas as FE apresentaram uma alta assimetria para este composto indicando que a superfície da sílica Rainin apresenta problemas quanto a presença de silanóis livres e, possivelmente, presença de metais, que tornariam os silanóis ainda mais ácidos, ou seja, sítios ativos propícios para interações polares. A imobilização em tempos maiores, com maior quantidade de polímero presente, melhorou um pouco a resolução entre N,N-dimetilanilina e naftaleno, mas não apresentou nenhum

efeito quanto à assimetria do pico do composto básico, confirmando a suposição de que o problema para estas FE é inerente ao suporte de sílica. Nestes casos, muitos cromatografistas e fabricantes de colunas defendem a utilização de fases móveis tamponadas em pH que permita que o composto básico esteja protonado, eliminando a possibilidade de interação polar com os silanóis livres do suporte de sílica. Em consequência, a eluição do composto será mais uniforme e, portanto, sem problemas de co-eluição com compostos de tempos de retenção próximos ou cauda no pico. Esta é uma medida que irá resolver o problema em algumas separações cromatográficas mas, também será responsável por diminuir o tempo de vida útil da coluna.

A sílica Kromasil também foi utilizada para se avaliar o efeito do pré-tratamento na distribuição do polímero sobre a superfície da sílica. Foram feitos ensaios utilizando-se as melhores condições de imobilização, 100 °C durante 8 e 16 horas e carga de 50 % . No caso da sílica Kromasil esta carga representa um excesso de 5 % com relação ao volume total de poros do suporte. Os resultados são apresentados na Tabela 4.10 e os perfis cromatográficos podem ser visualizados na Figura 4.19.

Os resultados de análise elementar de carbono indicam que há maior quantidade de polímero adsorvido sobre a superfície da sílica Kromasil em comparação à sílica Rainin devido justamente à sua maior área e maior volume de poro. As eficiências das melhores colunas ficaram próximas às da sílica Rainin com pré tratamento, porém com cauda frontal, indicando uma falta de uniformidade no leito cromatográfico dentro da coluna. Provavelmente devido às diferentes características físicas entre estas duas sílicas, o pré tratamento praticamente não modificou a quantidade total de polímero imobilizado no caso das FE preparadas a partir de sílica Kromasil.

Tabela 4.10: Avaliação cromatográfica das FE de PMODS sobre sílica Kromasil 5 µm, imobilizadas a 100 °C durante 8 e 16 horas com e sem pré tratamento (60 °C/1 h).

Tratamento térmico (horas)	Sem pré-tratamento térmico					Com pré-tratamento térmico				
	N/m	As	k	Rs	%C	N/m	As	k	Rs	%C
8	79600	0,9	3,2	5,6	22,8	78400	0,5	3,0	5,2	21,0
16	73100	0,5	3,8	5,4	22,3	71600	0,7	3,9	5,5	25,2

<sup>a</sup> calculado para o naftaleno

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

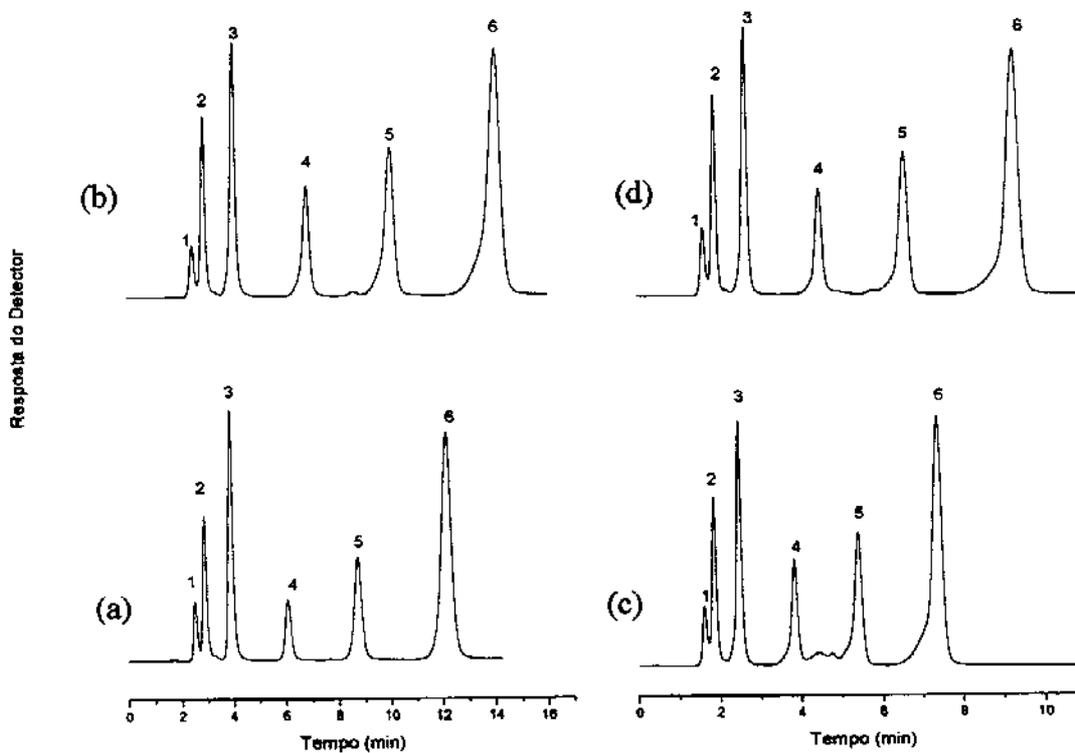


Figura 4.19: Perfil cromatográfico das FE a partir de sílica Kromasil (a) sem pré-tratamento, imobilizada durante 8 horas, a 100 °C, (b) sem pré-tratamento, imobilizada durante 16 horas a 100 °C, (c) com pré-tratamento, imobilizada durante 8 horas a 100 °C e (d) com pré-tratamento, imobilizada durante 16 horas a 100 °C. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5 µL, detecção: UV 254 nm.

Seguindo os estudos feitos com sílica Rainin, na Tabela 4.11 estão apresentados os parâmetros cromatográficos das FE preparadas a partir de sílica Kromasil avaliadas através da mistura 2.

Tabela 4.11: Parâmetros cromatográficos para mistura 2 das FE de PMODS sobre de sílica Kromasil 5

µm.

	Tempo	Eficiência (N/m) <sup>a</sup>		Assimetria <sup>a</sup>		Fator de retenção <sup>a</sup> (k)		Resolução <sup>a</sup>		α <sub>hidf</sub> <sup>a</sup>
		Naftaleno	Acenafteno	2	3	4	5	2/1	4/3	4/5
s/ pré- tratamento	16 horas	74900	76900	1,2	0,8	4,5	10,2	3,1	7,9	2,2
c/ pré- tratamento	8 horas	74200	79000	1,1	0,7	3,5	7,7	2,8	7,1	2,2
	16 horas	69800	71600	1,2	1,0	4,7	10,5	3,1	7,6	2,2

<sup>a</sup>: 2=fenol, 3=N,N-dimetilanilina,4=naftaleno,5=acenafteno

Ao contrário do que foi observado para as FE de sílica Rainin, o comportamento cromatográfico das FE de sílica Kromasil frente à mistura 2 foi considerado muito eficiente. Até mesmo a eluição do composto mais problemático, a N,N-dimetilanilina ocorreu de forma satisfatória, ou seja, com um valor de assimetria aceitável, com leve cauda frontal, comprovando que a qualidade do suporte de sílica influenciou muito no comportamento da coluna cromatográfica.

Uma das causas deste comportamento pode ser explicada através da quantidade de metais presentes no suporte de sílica. Cada sílica apresenta uma quantidade de metais característica, devida principalmente à sua metodologia ou rota de síntese. Os metais presentes na sílica tornam os silanóis residuais mais ácidos e, portanto, sítios mais disponíveis para a fixação do polímero além das interações polares com os analitos. A análise de absorção atômica apresentada na Tabela 4.12 mostrou uma quantidade muito grande de metais na sílica Rainin comparativamente à sílica Kromasil.

Tabela 4.12: Comparação de conteúdo de alguns elementos metálicos presentes na sílica Rainin e Kromasil, ambas de 5µm, obtidos por espectrometria de absorção atômica <sup>75</sup>

Metais	Rainin (µg g <sup>-1</sup> )	Kromasil (µg g <sup>-1</sup> )
Al	145	12
Fe	94	12
Sódio	144	20
Titânio	35	<2
Cálcio	20	-
Magnésio	5	16

Neste caso, mesmo apresentando maior área, a sílica Kromasil 5  $\mu\text{m}$  teria muito menos sítios ativos para uma possível interação com o PMODS do que a sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  e o pré tratamento não seria suficiente para promover alguma alteração na configuração química do suporte de sílica.

#### 4.3.6 – Efeito do tratamento ácido na superfície de sílica Rainin

A literatura descreve a presença de metais na superfície da sílica como um fator negativo na constituição da FE. Como foi visto na Tabela 4.12, a sílica Rainin apresenta uma quantidade elevada de metais em comparação com a sílica Kromasil. Com base nesta característica, foram feitos experimentos na tentativa de reduzir a quantidade de impurezas metálicas na superfície da sílica (Rainin), através de tratamento ácido sob refluxo. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4.13

Tabela 4.13: Resultados cromatográficos de FE preparada com sílica Rainin pré tratada e PMODS, imobilizada a 100 °C durante 8 e 16 horas.

Tempo de tratamento térmico (horas)	N/m <sup>2</sup>	As <sup>a</sup>	k	Rs	%C
8	87200	1,3	3,7	5,9	17,8
16	62850	1,4	4,2	5,1	20,4

<sup>a</sup>: calculado para o naftaleno

<sup>b</sup>: calculado para o par tolueno-naftaleno

Comparando-se estes resultados com os obtidos nas Tabelas 4.7 e 4.8 observa-se que a estratégia para diminuir a acidez dos silanóis livres (devido a presença de metais) foi bem sucedida, pois estes agora passaram a ser possíveis sítios de interação com o polímero, permitindo um aumento do recobrimento polimérico sobre o suporte de sílica. Este comportamento é evidenciado pelo aumento na % C obtida através de análise elementar. Os cromatogramas vistos na Figura 4.20 mostram que o fator de retenção e as eficiências das colunas cromatográficas aumentaram, justamente pela maior quantidade de polímero na FE fazendo com que haja mais etapas de equilíbrio no processo de transferência de massa do analito entre a FM e a FE.

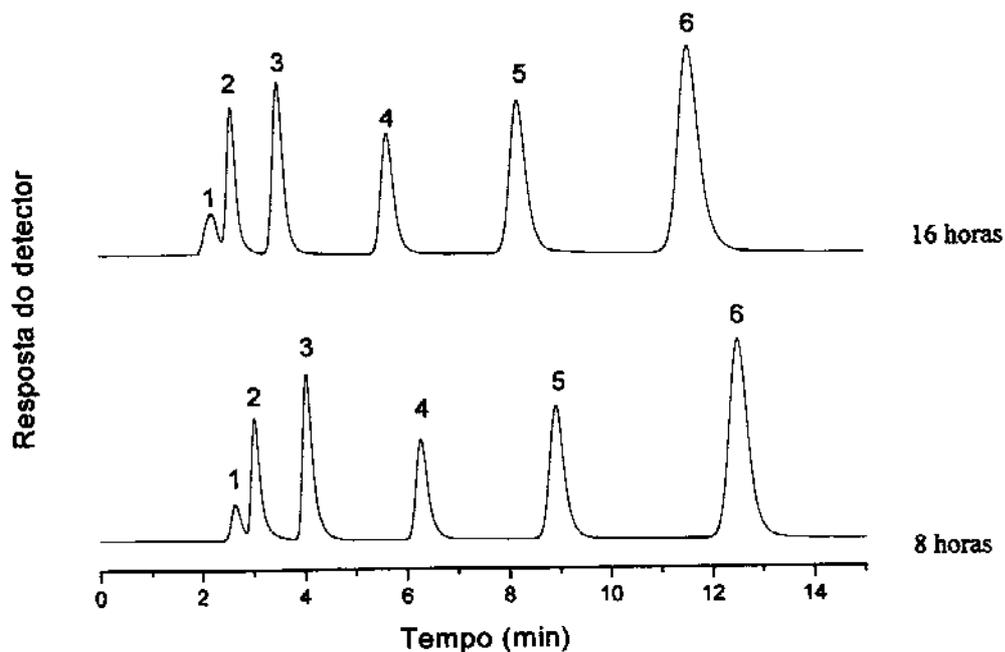


Figura 4.20: Cromatogramas de FE preparadas com sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  pré-tratada com ácido e PMODS (carga inicial de 50 %) e imobilizadas a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 e 16 horas. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno, (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL  $\text{min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm.

Para se avaliar se houve mudança na especificidade destas FE foi utilizada a mistura 2. Os resultados podem ser vistos na Tabela 4.14 e os cromatogramas estão apresentados na Figura 4.21.

Tabela 4.14: Parâmetros cromatográficos da mistura 2 utilizando FE preparada com sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  pré-tratada com ácido e PMODS (carga inicial 50 %), imobilizadas a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 e 16 horas.

Tempo de tratamento térmico (horas)	Eficiência (N/m) <sup>a</sup>		Assimetria <sup>a</sup>		Fator de retenção (k) <sup>a</sup>		Resolução <sup>a</sup>		$\alpha_{hidf}$ <sup>a</sup>
	Naftaleno	Acenafteno	2	3	4	5	2/1	4/3	4/5
8	65900	87700	1,1	1,8	3,0	6,7	1,4	2,8	2,2
16	57000	60500	1,3	6,9	6,4	15,1	1,6	3,5	2,3

<sup>a</sup>: 2=fenol, 3=N,N-dimetilanilina, 4=naftaleno, 5=acenafteno

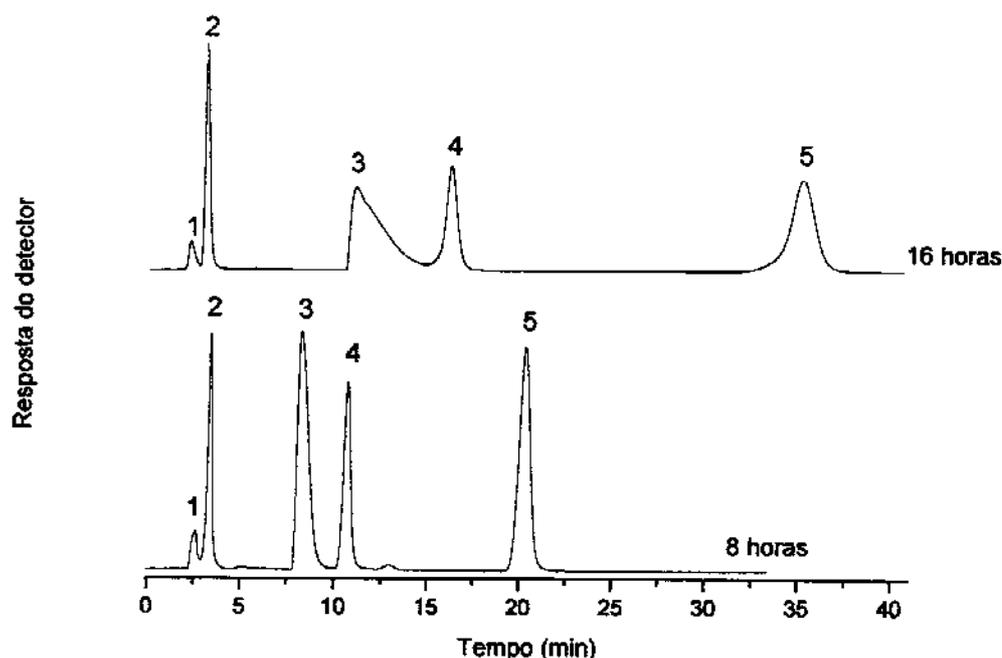


Figura 4.21: Cromatogramas obtidos com as FE preparadas com sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  pré-tratada com ácido e PMODS (carga inicial de 50 %), imobilizadas a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 e 16 horas utilizando a mistura 2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm.

Comparando-se estes mesmos parâmetros para a mistura 2 em FE de sílica Rainin sem pré-tratamento ácido (Tabela 4.9), observa-se que para a FE preparada com a sílica Rainin pré-tratada, com 8 horas de imobilização, houve uma grande melhora na resolução do par de compostos neutros avaliados, porém sem variação no fator de retenção,  $k$ . Isto indica que a FE manteve seu caráter hidrofóbico, mas o padrão de disposição e distribuição do PMODS sobre a sílica foi alterado propiciando uma melhor eficiência de separação. Além disto esta mesma FE exibiu uma eluição do composto básico com maior resolução entre o pico do naftaleno e a N,N-dimetilanilina, característica que nenhuma outra FE de sílica Rainin tinha exibido até o momento, sem contar uma assimetria muito mais próxima dos valores aceitos em cromatografia. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado na FE de sílica pré-tratada imobilizada durante 16 horas, que exibe uma eluição totalmente irregular do composto básico comprometendo a resolução entre este e o composto neutro naftaleno.

Uma justificativa para esta variação no comportamento das FE de sílica Rainin imobilizada por 16 horas, frente ao composto básico pode ser a concentração de metais presentes na sílica (vide

Tabela 4.12). Durante o trabalho experimental, a partir da mesma sílica Rainin, foi feito o pré-tratamento ácido em duas etapas, cada uma contendo 4 gramas de sílica. No caso das FE imobilizadas durante 8 horas, o pré-tratamento foi eficiente mas, ao realizar o mesmo processo para as FE que seriam imobilizadas durante 16 horas pode ter ocorrido um erro experimental, como por exemplo, preparo de solução de ácido nítrico de concentração mais baixa, que não foi “forte” o suficiente para eliminar impurezas metálicas.

Por outro lado, como observado em outras FE imobilizadas por 16 horas, o tempo de retenção (e o  $k$ ) do composto acenafteno aumentou significativamente com o maior tempo de tratamento térmico.

#### **4.3.7 – Efeito do tempo de armazenagem das FE imobilizadas e extraídas**

Até esta parte do trabalho todas as colunas tinham sido recheadas logo após o procedimento de extração e em seguida testadas cromatograficamente. Acreditava-se que o procedimento de extração seria capaz de retirar todo o excesso de polímero não imobilizado e, em conseqüência, a FE não sofreria mais alterações em sua configuração suporte-polímero. Entretanto, durante o trabalho de rotina de enchimento de colunas observou-se um comportamento inesperado das FE já imobilizadas e extraídas que foram mantidas em repouso por longos períodos de tempo. A Tabela 4.15 e a Figura 4.22 apresentam uma comparação cromatográfica entre as colunas recheadas com FE logo após sua imobilização e extração e FE recheadas após 6 meses do procedimento de imobilização e extração (sem pré-tratamento). Em todos os casos, as FE foram preparadas com sílica Rainin imobilizadas a 100 °C, durante 8 e 16 horas.

As FE mantidas em repouso por 180 dias após a extração de polímero em excesso, apresentaram resultados cromatográficos excelentes quando comparadas aos resultados obtidos anteriormente (com as colunas recheadas com FE recém extraídas) tendo, inclusive, eficiência semelhante às FE comerciais do tipo C18 quimicamente ligadas. Além da eficiência, o aspecto dos picos cromatográficos ou seja, sua simetria, apresentou grande melhora, sugerindo uma boa uniformidade do leito cromatográfico dentro da coluna. O fator de retenção alterou-se de forma pouco significativa, indicando que não houve mudança no caráter hidrofóbico da FE, mas, sim, uma melhora na homogeneização da FE sobre o suporte. É importante ressaltar que, todos os enchimentos foram

feitos de FE preparadas a partir de um mesmo lote. Portanto, esta diferença no padrão cromatográfico não poderia ser atribuída às variáveis (carga, tempo e temperatura) até aqui estudadas.

Tabela 4.15: Parâmetros cromatográficos de colunas recheadas com FE recém extraídas e FE extraídas e mantidas em repouso por 180 dias.

FE	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	% C
8 horas – 0 dias	55150	0,9	3,6	4,9	14,3
8h após 180dias	89700	1,1	3,8	6,1	13,9
16 horas – 0 dias	57800	0,8	4,4	5,3	16,8
16h após 180 dias	88700	1,4	4,9	6,4	16,2

<sup>a</sup>: calculado para o naftaleno

<sup>b</sup>: calculado para o par tolueno-naftaleno

Assim, este comportamento nos leva a considerar um possível rearranjo das cadeias do polímero sobre a superfície do suporte de sílica mesmo após a saída do polímero não imobilizado. Este fato explicaria a melhora no processo de transferência de massa e conseqüente aumento da eficiência, como também a melhora na simetria dos picos cromatográficos sem, contudo, alterar de forma drástica, o já conhecido padrão de separação da mistura de avaliação.

Entretanto, o fator tempo de preparo da FE deve ser levado em consideração, portanto, pode-se dizer, analisando se os parâmetros cromatográficos, que as FE pré-tratadas (ver Tabela 4.13 com separação de compostos neutros) “substituem” as FE mantidas em repouso, sem prejuízo para o desempenho e eficiência da separação analítica de qualquer mistura.

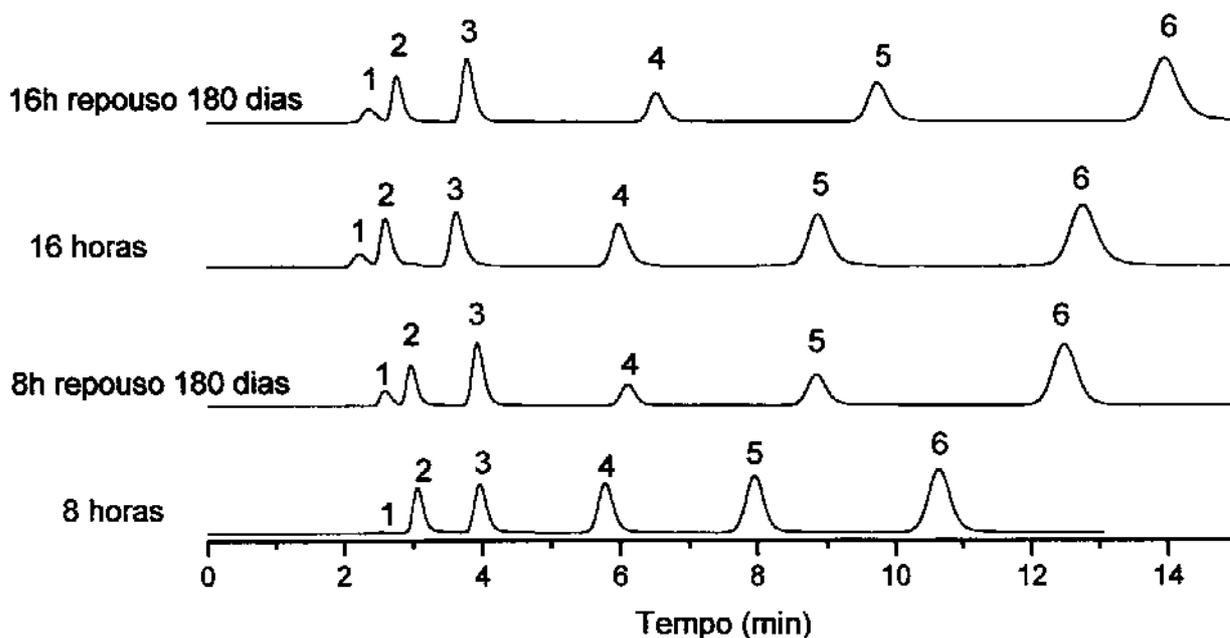


Figura 4.22: Comparação do comportamento cromatográfico entre colunas recheadas com FE de sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  imobilizadas termicamente a 100  $^{\circ}\text{C}$ , durante 8 e 16 horas, logo após seu preparo e colunas recheadas com FE do mesmo lote (com as mesmas condições) após 180 dias de sua extração. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV, 254 nm.

#### 4.3.8 – Estudo sobre diferentes técnicas de imobilização de PMODS sobre sílica

Outras técnicas de incorporação/imobilização de polímero foram testadas seguindo as várias tendências do LabCrom. Três metodologias diferenciadas foram testadas, mantendo-se as melhores variáveis (carga, tempo e temperatura) utilizadas até o momento.

##### 4.3.8.1 – Auto imobilização

Segundo os trabalhos de Bottoli<sup>74</sup>, o polímero PMOS apresenta a capacidade de se fixar sobre a superfície de sílica de forma espontânea, ou seja, sem a necessidade de algum agente imobilizante.

Esta técnica foi chamada de “auto-imobilização” e produziu FE com boa repetitividade e resultados cromatográficos próximos às FE imobilizadas por diferentes técnicas. Porém, os melhores resultados obtidos em seus trabalhos indicavam que quanto maior fosse o tempo em que a FE permanecesse neste processo, melhor seriam os respectivos desempenhos cromatográficos, o que muitas vezes significava um descanso de vários meses entre o preparo da FE e sua efetiva utilização. Para se avaliar a viabilidade desta metodologia também para as FE com polímero PMODS foi feita uma curva, apresentada na Figura 4.23, da quantidade de polímero presente após a extração *versus* tempo. Estes resultados foram obtidos a partir de um lote de FE (utilizando-se como suporte a sílica Davisil) preparada exclusivamente para este estudo. Em intervalos de tempos regulares uma pequena amostra deste material passava por uma extração com hexano e através da técnica de análise elementar era avaliada a quantidade de polímero que permanecia fixado à superfície de sílica.

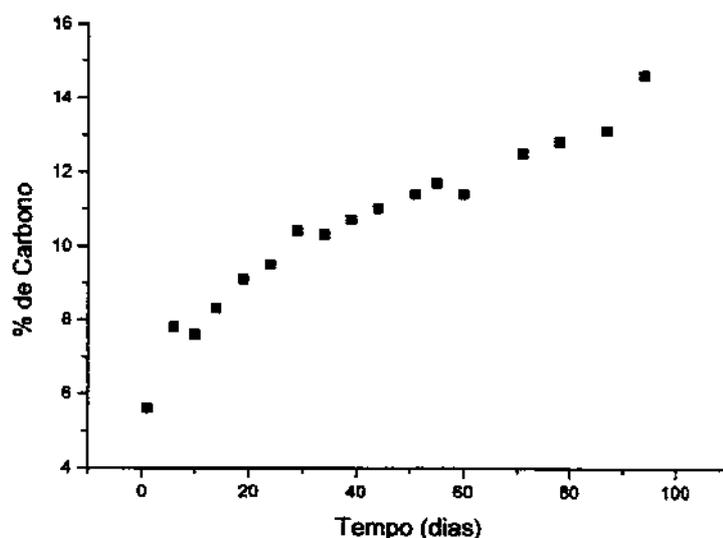


Figura 4.23: Imobilização do polímero PMODS após a passagem do tempo.

Os resultados mostraram que, após a passagem de tempo, realmente ocorre uma maior fixação do polímero sobre a superfície de sílica porém, após 60 dias, o aumento deixa de ser significativo, mostrando uma tendência de estabilização no processo de imobilização. O melhor resultado conseguido com a auto-imobilização foi após 95 dias, com aproximadamente 14,6 % D (conforme

Tabela 4.16), valor bem abaixo do observado em FE (em suporte Davisil, Tabela 4.4) imobilizadas termicamente. A partir destes resultados, concluiu-se que este tipo de metodologia não traria nenhuma vantagem pois além de se despender um tempo muito grande, a FE obtida após 3 meses de repouso apresentava resultados próximos ao encontrados nas FE imobilizadas termicamente.

Tabela 4.16: Quantidade de polímero PMODS (carga inicial de 50 %) auto-imobilizado na superfície de sílica Davisil 10  $\mu\text{m}$  com a passagem do tempo.

Tempo (dias)	% de carbono
1	5,6
5	7,8
10	7,6
15	8,3
20	9,1
25	9,5
30	10,4
35	10,3
40	10,7
45	11,0
50	11,4
55	11,7
60	11,4
70	12,5
78	12,8
87	13,1
95	14,6

### 4.3.8.2 – Imobilização térmica em atmosfera inerte (N<sub>2</sub>)

A segunda metodologia consistiu em se utilizar um forno com fluxo de nitrogênio, permitindo que o tratamento térmico fosse realizado com ausência do oxigênio. Neste caso foi utilizada a sílica Rainin nas melhores condições, 8 horas de tratamento térmico, a uma temperatura de 100 °C, sob fluxo constante de nitrogênio. Os parâmetros cromatográficos comparados aos das FE imobilizadas na presença de oxigênio (sem tratamento térmico prévio e sem pré-tratamento ácido da sílica) estão apresentados na Tabela 4.17 e o respectivo cromatograma na Figura 4.24.

Tabela 4.17: Parâmetros cromatográficos obtidos de colunas recheadas com FE de sílica Rainin 5 µm e PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizadas a 100°C, durante 8 horas, sob fluxo ou não de nitrogênio

Tratamento térmico	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	%C
C/ fluxo de N <sub>2</sub>	34200	2,3	3,1	4,7	-
S/ fluxo de N <sub>2</sub>	55100	0,9	3,6	4,9	17,1

<sup>a</sup>: avaliada para o naftaleno

<sup>b</sup>: avaliada para o par tolueno-naftaleno

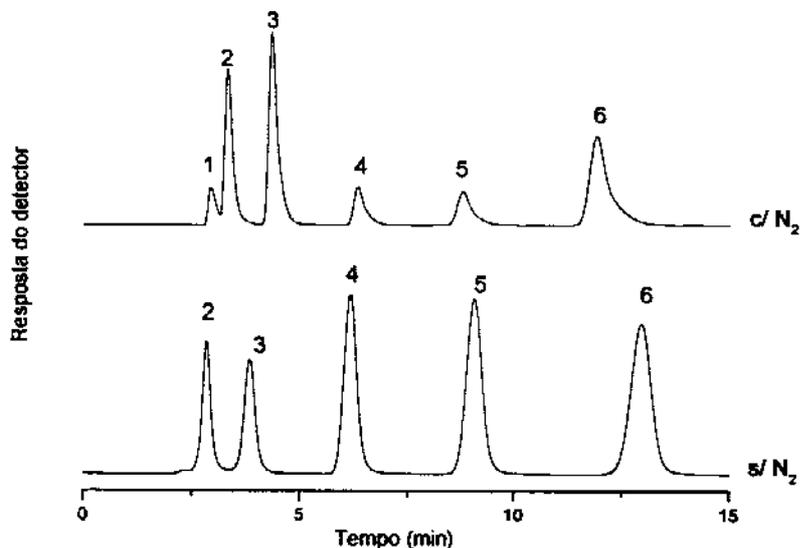


Figura 4.24: Cromatogramas obtidos com as colunas recheadas com FE imobilizadas em estufa a 100 °C durante 8 horas com e sem fluxo de nitrogênio. Mistura teste 1 contendo: (1) uracil (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão: 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5 µL, detecção: UV, 254 nm.

Os resultados cromatográficos mostraram que, embora as FE ao serem imobilizadas sem fluxo de N<sub>2</sub> estivessem muito bem “isoladas” (através de 3 camadas de papel alumínio) do ambiente da estufa, a mínima presença de oxigênio, foi benéfica à imobilização. Segundo a literatura, a degradação termo-oxidativa do polímero poli(dimetilsiloxano)<sup>124</sup> em ar envolve uma etapa de perda de massa extra que não ocorre quando o polímero é degradado em atmosfera inerte. Durante esta degradação termo-oxidativa o polímero torna-se insolúvel e a estrutura do resíduo muda através do decorrer da reação, aparentemente devido ao entrecruzamento formado por pontes de ligação Si-O-Si. Por analogia, presume-se que o mesmo processo esteja ocorrendo com o PMODS sobre a superfície da sílica Rainin. Este comportamento está de acordo com os resultados vistos nos espectros de RMN das FE de sílica Rainin, onde a partir de 8 horas de mobilização térmica o pico referente às ligações siloxano aumenta consideravelmente.

#### **4.3.8.3 – Técnica de incorporação/imobilização de PMODS através de um sistema de refluxo**

Uma outra tentativa foi feita utilizando-se a técnica de incorporação do polímero através de refluxo, no qual o suporte de sílica foi mantido em suspensão em uma solução de tolueno e PMODS. A técnica de refluxo em tolueno é usada para a modificação química no suporte de sílica no caso das FE quimicamente ligadas com outros reagentes de silanização, criando as chamadas FE monoméricas e poliméricas (neste último caso o processo é feito na presença de água).

Como a temperatura de ebulição do tolueno (96 °C) é muito próxima da “temperatura ótima” de imobilização (neste trabalho foi de 100 °C), manteve-se o melhor resultado para a variável tempo de imobilização, de 8 horas, utilizando-se sílica Kromasil 5 µm. Os resultados em comparação à FE imobilizada termicamente (também de sílica Kromasil), podem ser vistos na Tabela 4.18 e os cromatogramas estão apresentados na Figura 4.25.

Esperava-se que o sistema de refluxo, a princípio, aliasse a alta temperatura (base da imobilização térmica) com agitação (incorporação mais eficiente do polímero sobre a superfície da sílica), mas o resultado em termos cromatográficos foi desanimador. A incorporação do PMODS sobre a superfície de sílica foi ineficiente, a ponto de ser necessária, para uma corrida cromatográfica razoável, uma mudança na FM. Foi preciso utilizar uma “fase móvel mais fraca”, ou seja, de polaridade

maior, como metanol:água 50:50 v/v, para que fosse possível uma separação entre os componentes da mistura teste. Através destes resultados fica claro que a técnica de refluxo necessita de várias otimizações à parte, além das já avaliadas até aqui, como por exemplo, tempo de refluxo, alteração do solvente, tipo de agitação, etc., configurando-se em um trabalho paralelo a ser feito, com perspectiva de se criar uma nova metodologia de preparo de FE.

Tabela 4.18: Parâmetros cromatográficos obtidos com colunas recheadas com FE de sílica Kromasil e PMODS (50 % de carga inicial) com 2 metodologias de imobilização de PMODS: térmica e por refluxo

FE	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	%C
Imobilização térmica	79600	0,9	3,2	5,6	22,8
Por refluxo	48500	1,8	1,0	3,7	

<sup>a</sup>: avaliada para o naftaleno

<sup>b</sup>: avaliada para o par tolueno-naftaleno

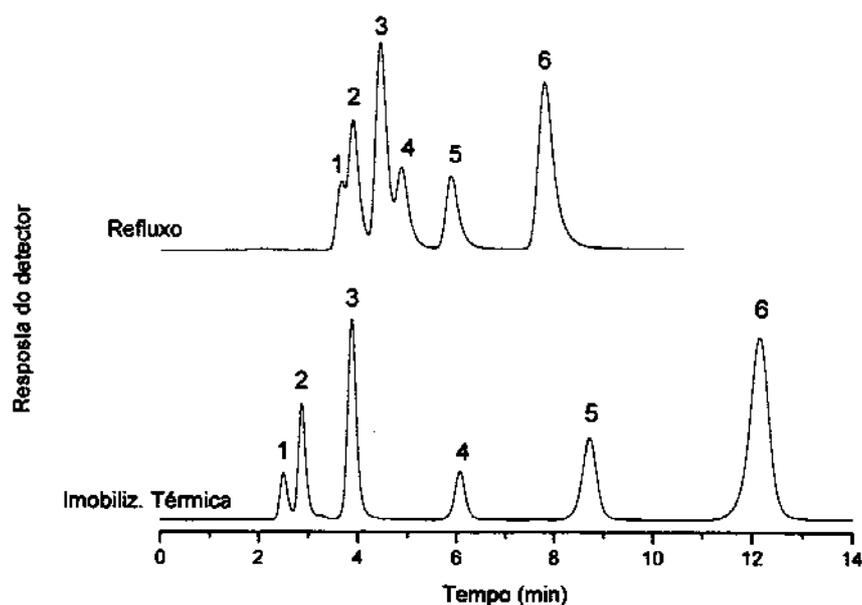


Figura 4.25: Cromatogramas obtidos com colunas recheadas com FE de sílica Kromasil e PMODS (50 % de carga inicial) utilizando 2 procedimentos de imobilização de PMODS: térmica e por refluxo. Mistura teste 1 contendo: (1) uracil (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: utilizou-se fases móveis distintas para cada cromatograma: para FE imobilizada termicamente metanol:água 70:30 v/v e para FE por refluxo metanol:água 50:50 v/v, vazão: 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção: 5 µL, detecção: UV 254 nm.

### 4.3.9 – Comparação entre FE preparadas a partir de uma mesma metodologia

A Tabela 4.19 reúne os resultados cromatográficos das FE preparadas a partir das variáveis otimizadas e compara as colunas de diferentes tamanhos de partículas, utilizando a mistura teste 1 composta por uracil, acetonitrila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno. Com exceção da sílica Davisil, 10  $\mu\text{m}$ , que foi imobilizada a 100 °C, por 4 horas, todas as variáveis de preparo foram as mesmas: agitação magnética por três horas seguida de evaporação de solvente e imobilização térmica a 100 °C durante 8 horas.

Tabela 4.19: Comparação dos parâmetros cromatográficos de três suportes de sílica: Davisil 10  $\mu\text{m}$ , Rainin 5  $\mu\text{m}$  e Kromasil 5 $\mu\text{m}$ .

Suporte	N/L <sup>a</sup>	h <sup>a,b</sup>	As <sup>a</sup>	% C
Davisil <sup>c</sup>	38100	2,6	1,5	26,1
Rainin	73100	2,7	1,4	15,2
Rainin pré-tratada	87200	2,3	1,3	17,8
Kromasil	79600	2,5	0,9	22,8

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

<sup>b</sup> Calculado:  $h=L/(Nxd_p)$

<sup>c</sup> Sem tratamento prévio a 60°C durante 1 hora

Observa-se que, devido às características físicas diferenciadas dos suportes de sílica, uma única metodologia de preparo de FE produz recobrimentos diferenciados, sem prejuízo de seu desempenho ou de sua eficiência frente à uma mesma mistura de compostos neutros e fracamente polares.

Vale ressaltar que a eficiência da FE preparada a partir da sílica Davisil não pode ser comparada em seu valor de eficiência absoluto, pois o tamanho de sua partícula é de 10  $\mu\text{m}$ , o dobro das outras duas sílicas. Mas, utilizando-se o parâmetro h, prato reduzido, que considera no cálculo da eficiência o tamanho da partícula do suporte, é possível afirmar que a metodologia proposta neste trabalho, com as variáveis otimizadas, é viável para produzir FE com boas eficiências independentemente do suporte de sílica utilizado.

Entretanto, a mistura de compostos utilizada para comparar as colunas não consegue avaliar determinadas especificidades das FE, como a sua capacidade de interação e separação de compostos básicos, o grau de hidrofobicidade e a capacidade de formar ligações de hidrogênio. Assim, utilizou-se

a mistura teste 2, proposta no Capítulo II, composta de uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno, para se comparar as FE preparadas a partir de uma mesma metodologia com diferentes suportes de sílica. A Tabela 4.20 apresenta os resultados cromatográficos obtidos.

Tabela 4.20: Parâmetros cromatográficos obtidos com as FE preparadas a partir de três suportes de sílica diferentes e PMODS (carga inicial de 50 %) utilizando a mistura teste 2

FE preparada a partir de sílica	%C	$h^a$	As N,N-dimetilanilina	As fenol	$\alpha_{hidfb}$
Davisil	26,1	2,3	1,5	1,3	2,1
Rainin	17,1	2,5	3,4	1,6	2,3
Rainin pré-tratada	17,8	2,3	1,8	1,1	2,2
Kromasil	22,8	2,5	0,7	1,1	2,2

<sup>a</sup>: calculado para o acenafteno

<sup>b</sup>: calculado para o par naftaleno/acenafteno

Através destas comparações é possível determinar a utilidade de cada uma das colunas cromatográficas. Por exemplo, pode-se afirmar que todas estas FE podem ser aplicadas em separações de misturas de compostos neutros de diferentes características hidrofóbicas e compostos ácidos que apresentem cadeias alifáticas de diversos tamanhos com eficiências comparáveis às colunas encontradas comercialmente tipo, C18, de fase quimicamente ligada. Porém, se a aplicação das colunas cromatográficas for destinada à separação de compostos básicos, as FE de sílica Kromasil 5  $\mu\text{m}$  e Davisil 10  $\mu\text{m}$  serão eficientes sem a necessidade de se utilizar fases móveis tamponadas e de pH diferenciados. A FE preparada a partir de sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  pré-tratada pode também servir a este propósito desde que se tenha confiabilidade no baixo teor de metais desta sílica quando purificada.

#### 4.3.10 – Exemplos de aplicações práticas das FE preparadas

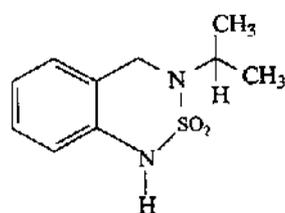
Ao final de todos os ensaios, a FE que apresentou os melhores parâmetros cromatográficos foi utilizada para recheiar uma coluna nos moldes das encontradas comercialmente, ou seja, de 150 mm com diâmetro interno de 3,9 mm. Foi escolhida a FE preparada com sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  pré-tratada e

PMODS (50 % de carga inicial) imobilizada a 100 °C durante 8 horas para avaliar dois exemplos práticos de aplicação das novas FE preparadas neste trabalho.

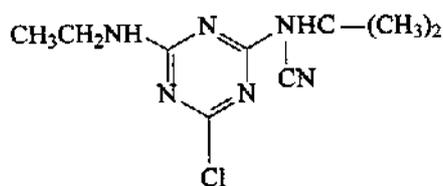
#### 4.3.10.1 – Separação de uma mistura de herbicidas

Segundo fontes do Ministério da Agricultura<sup>128</sup> o Brasil gastou em 2003 cerca de 3,1 milhões de dólares em agrotóxicos, cerca de um terço deste valor apenas com a classe dos herbicidas, fazendo com que o país ocupe o primeiro lugar em uso de agrotóxicos na América Latina. A partir destes dados, fica evidente a necessidade de se criar mecanismos de avaliação do possível uso indiscriminado, bem como, técnicas que permitam o controle e a fiscalização de sua presença no meio ambiente. Neste sentido, a CLAE tem-se firmado como uma técnica analítica de destaque na análise de matrizes ambientais, como água e solos, para determinação de contaminantes orgânicos, principalmente os herbicidas.

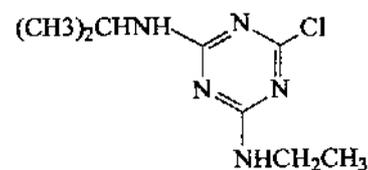
O experimento realizado neste trabalho consistiu na separação de alguns herbicidas em uma mistura sintética composta de: cinazina, simazina, atrazina, ametrina, diurom e linurom, apresentados na Figura 4.26. Todos os pesticidas podem ser encontrados em amostras ambientais de água e solo.



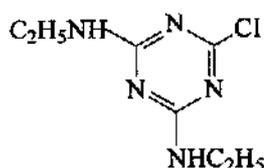
**Bentazona**



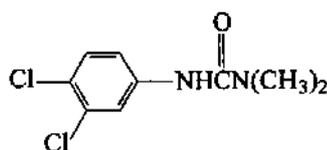
**Cianazina**



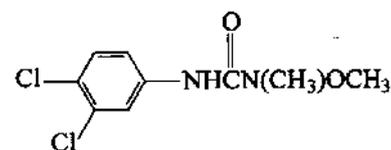
**Simazina**



**Atrazina**



**Diurom**



**Linurom**

Figura 4.26: Estrutura química dos herbicidas estudados

A Figura 4.27 apresenta a separação cromatográfica da mistura de herbicidas e a Tabela 4.21 apresenta os parâmetros cromatográficos avaliados nesta separação. A separação desta mesma mistura já foi relatada na literatura<sup>73</sup>, utilizando uma coluna comercial com FE quimicamente ligada Novapack C18, apresentada na Figura 4.28. Ao se comparar as duas separações é possível dizer que a FE imobilizada apresenta um padrão de separação destes herbicidas semelhante a FE quimicamente ligada. Isto indica a viabilidade do uso da FE imobilizada preparada neste trabalho na aplicação de separações de amostras reais e em trabalhos de controle de qualidade rotineiros.

Tabela 4.21: Parâmetros cromatográficos da separação de misturas de herbicidas em coluna recheada com FE com sílica Rainin (pré-tratada) e PMODS imobilizada durante 8 horas a 100 °C.

composto	t <sub>R</sub>	k <sup>a</sup>	Rs	As <sup>a</sup>
Bentazona	2,1	0,7	-	1,2
Cianazina	3,7	1,9	3,7	1,0
Simazina	5,4	3,3	3,1	1,1
Atrazina	8,4	5,7	4,8	1,1
Diurom	13,7	9,9	6,0	1,0
Linurom	18,0	13,3	4,0	1,1

<sup>a</sup> calculado para o linuron

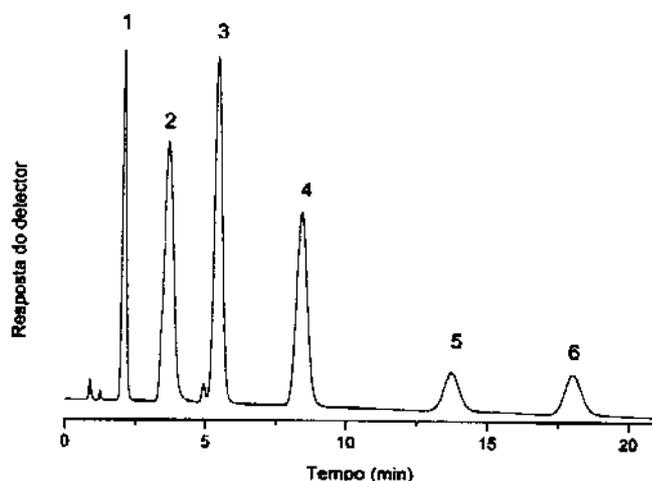


Figura 4.27: Cromatograma da separação da mistura de herbicidas: (1) bentazona, (2) cianazina, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron e (6) linuron. Condições cromatográficas: Coluna 150 x 3,9 mm. FE preparada com sílica Rainin 5 µm pré-tratada com ácido e PMODS (50 % carga inicial) imobilizada a 100 °C, durante 8 horas. Fase móvel metanol/água 50:50 (v/v), pH 3,75 e vazão: 1,0 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV em 230 nm, volume de injeção 5 µL.

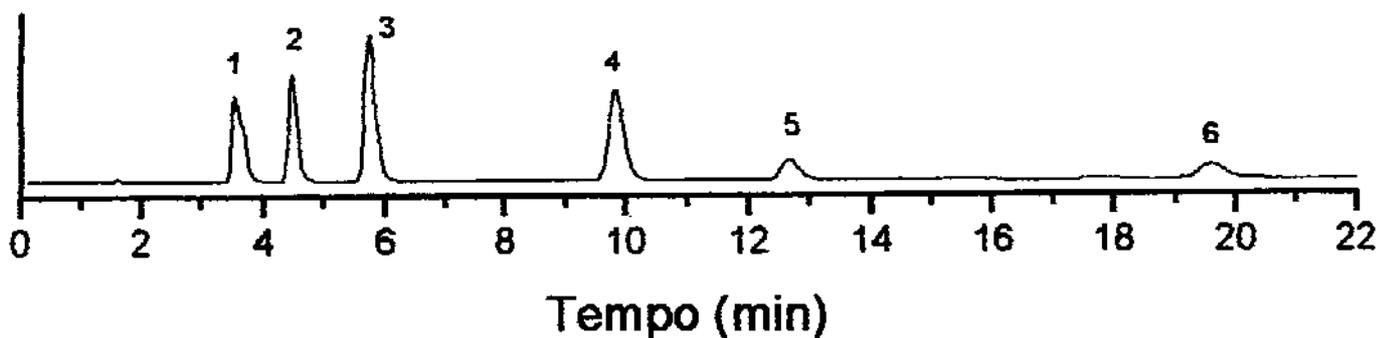


Figura 4.28: Cromatograma da separação da mistura de herbicidas relatadas na literatura<sup>73</sup>: (1) bentazona, (2) cianazina, (3) simazina, (4) atrazina, (5) diuron e (6) linuron. Condições cromatográficas: Coluna 150 x 3,9 mm Novapak C18 4 $\mu$ m (Waters). Fase móvel metanol/água 50:50 (v/v), pH 3,75, vazão: 0,8 mL min<sup>-1</sup>, detecção UV em 230 nm, volume de injeção 5  $\mu$ L.

#### 4.3.10.2 – Separação dos princípios ativos do fármaco comercial Alginac.

Atualmente no Brasil a ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabeleceu rigorosas normas de controle de qualidade de fármacos fabricados e/ou comercializados no país. A grande maioria das metodologias utiliza a CLAE como ferramenta analítica, tanto para o controle de qualidade durante a produção como para o produto acabado.

Neste trabalho foi feita a separação dos princípios ativos do fármaco comercial Alginac (amostra 1) e de uma mistura preparada em farmácia de manipulação (amostra 2)<sup>129</sup> constituídas de Diclofenaco (DCF), Tiamina (vitamina B1) e pirodoxina (vitamina B6), cujas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 4.28.

O diclofenaco (DCF) é uma droga anti-inflamatória não-esteroidal, usada em tratamentos de doenças reumáticas. As vitaminas B1 e B6 são utilizadas em conjunto com o diclofenaco por sua contribuição na redução de dosagem diária de diclofenaco, além de potencializarem os efeitos analgésicos do DCF.

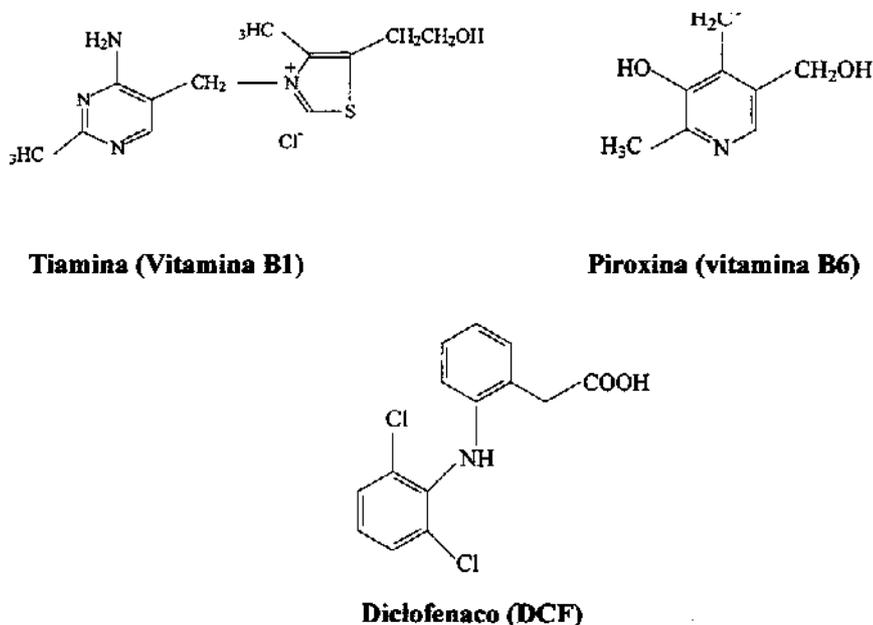


Figura 4.29: Estrutura dos fármacos estudados.

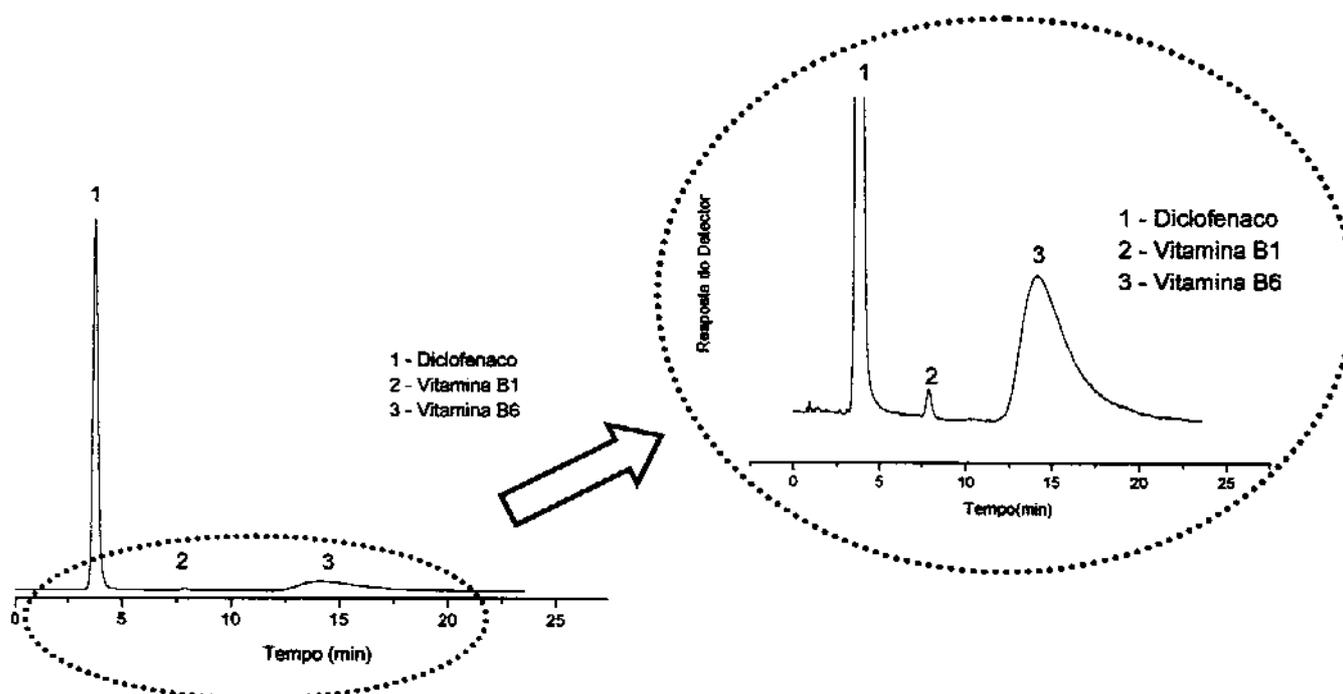


Figura 4.30: Cromatograma da separação dos princípios ativos diclofenaco, vitamina B1 e vitamina B6 presentes no fármaco comercial Alginac (amostra 1). No detalhe, foi feito um ajuste de escala para melhor visualização. Coluna 150 x 3,9 mm recheada com FE de sílica Rainin 5  $\mu\text{m}$  pré-tratada com ácido e PMODS (50 % carga inicial) imobilizada a 100  $^{\circ}\text{C}$ , durante 8 horas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 v/v, ajustada a pH 3,8 com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , vazão: 1,0  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção: 5  $\mu\text{L}$ , detecção: UV 275 nm.

A Tabela 4.22 apresenta os parâmetros cromatográficos avaliados na separação cromatográfica em uma das amostras (amostra 1). É importante ressaltar que foi utilizada uma metodologia de separação cromatográfica descrita na farmacopéia americana, por isto a utilização de uma FM ácida neste exemplo. Conforme se observa no cromatograma, o componente ativo de maior concentração, o DCF, tem pouca interação com a FE e apresenta uma assimetria dentro dos padrões aceitáveis. O mesmo não acontece com as vitaminas B1 e B6. Como o objetivo deste trabalho era a determinação/quantificação de DCF nas amostras comparada à uma determinação espectrofotométrica, não houve uma preocupação quanto a melhor separação cromatográfica dos picos dos compostos vitaminas B1 e B6.

Tabela 4.22: Parâmetros cromatográficos da separação de DCF, Vitmainas B1 e B6, usando FE preparada com sílica Rainin 5 µm pré-tratada com ácido e PMODS (50 % carga inicial) imobilizada a 100 °C, durante 8 horas.

Composto	<i>k</i>	As	Resolução ( <i>R<sub>s</sub></i> )
Diclofenaco	1,9	1,3	
Vitamina B1	5,3	0,4	8,2
Vitamina B6	10,2	2,8	2,3

Após a separação cromatográfica, apresentada na Figura 4.30, a quantificação do diclofenaco nas duas amostras foi determinada através de uma curva analítica a partir de soluções padrão em 5 concentrações diferentes, ou seja, pela técnica de padronização externa. A Figura 4.31 apresenta a curva analítica, na qual o coeficiente de correlação determinado foi de 0,99993. Em seguida, os resultados, obtidos cromatograficamente, foram comparados com os resultados de uma determinação espectrofotométrica, aliada a um método quimiométrico utilizando calibração multivariada (PLS).

A Tabela 4.23 apresenta a quantificação de DCF determinada a partir da curva analítica e a comparação com os resultados obtidos espectrofotometricamente. Os resultados para a determinação de diclofenaco nas duas amostras mostraram que a coluna utilizada produz boas separações com resultados reprodutíveis. Acredita-se que este os desvios são devidos a problemas de homogeneidade na amostra manipulada, uma vez que as soluções foram preparadas a partir de cápsulas que eram desmembradas manualmente e em seguida trituradas.

Tabela 4.23: Comparação da determinação de analítica de DCF através de métodos cromatográficos e espectrofotométrico.

Amostra	Esperado (mg)	Método cromatográfico (mg) <sup>a</sup>	Método espectrofotométrico (mg) <sup>a</sup>
1 (comercial)	50	51 ± 1	52 ± 2
2 (manipulado)	50	47 ± 4	48 ± 1

<sup>a</sup>: média e desvio padrão de três determinações

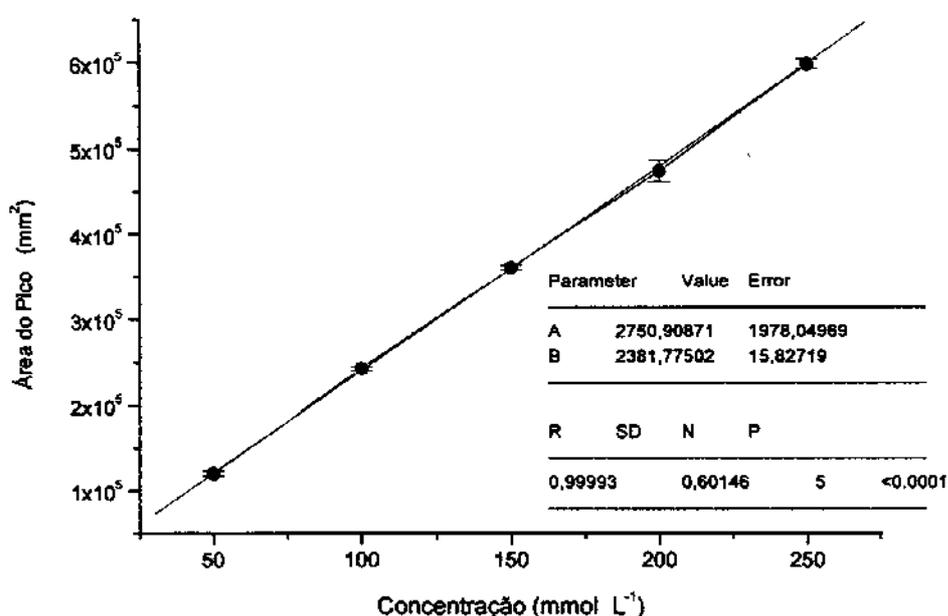


Figura 4.31: Curva analítica para determinação da concentração de DCF

Esta aplicação comprovou a viabilidade prática destas FE preparadas com sílica e PMODS imobilizados sobre sua superfície. Obviamente, são necessários ajustes de condições cromatográficas quando são aplicados métodos analíticos inicialmente desenvolvidos para FE quimicamente ligadas, uma vez que estas apresentam um “ambiente” químico muito diferente na superfície de seus suportes.

#### **4.4. Considerações Gerais sobre sílicas de 10 nm**

Neste capítulo foram estudadas 3 variáveis - carga de PMODS, temperatura de imobilização e tempo de imobilização - envolvidas no preparo de FE de PMODS imobilizado sobre a superfície de três tipos de sílica de 10 nm.

Embora tenham sido utilizadas sílicas de áreas superficiais completamente diferentes entre si, foi possível observar que as melhores condições de preparo e imobilização do PMODS independem do suporte escolhido. A seguir estão apresentadas as melhores condições de cada uma das variáveis e que podem ser aplicadas por extensão a qualquer suporte de sílica.

Carga de Polímero: Os resultados mostraram que um excesso de PMODS no início da incorporação do polímero é necessário, garantindo que toda a superfície do suporte seja recoberta. O processo de extração com clorofórmio seguido de metanol é muito eficiente na retirada de PMODS excedente (que não foi imobilizado). Neste sentido, a carga inicial recomendada para trabalho é de, no mínimo, 50% de PMODS na FE.

Temperatura de Imobilização: Embora o aumento de temperatura contribua para aumentar a espessura (e quantidade) de PMODS imobilizado sobre a superfície de sílica, a influência da temperatura também está relacionada ao polímero, ou seja, a integridade das cadeias poliméricas depende da temperatura. Esta, não pode ser superior a 120 °C, a partir da qual, as cadeias poliméricas sofrem quebras, resultando em entrecruzamentos entre as cadeias intactas e os oligômeros gerados. Para as sílicas estudadas neste capítulo, a temperatura de 100 °C promoveu os melhores resultados cromatográficos.

Tempo de Imobilização: A partir das % C provou-se que o tempo de tratamento térmico é responsável pela quantidade de polímero imobilizado sobre a superfície de sílica. Quanto maior o tempo, maior a quantidade de PMODS sobre a superfície da sílica. Mas há uma limitação: se o tempo de tratamento térmico for muito extenso, o excesso de polímero será prejudicial ao fenômeno de transferência de massa e, em consequência, a resposta cromatográfica não será satisfatória. Para sílicas de tamanho de poro de 10 nm o melhor tempo de imobilização de PMODS foi de 8 horas.

Distribuição do Polímero dentro dos poros da sílica: Este fator mostrou-se essencial para a obtenção de uma FE de alta eficiência na separação cromatográfica, especialmente em sílicas de área superficial menor, como foi o caso da sílica Rainin. A melhor (e mais eficiente) distribuição das cadeias do polímero pode ser alcançada de duas maneiras distintas, uma utilizando a FE já imobilizada

e a outra inserindo uma etapa antes da imobilização . O primeiro método consiste no simples repouso da FE após a sua imobilização térmica (nas condições mais adequadas) e sua extração. O período de repouso estudado neste trabalho com sílica Rainin foi de 180 dias. Na segunda técnica, obteve-se a mesma eficiência da FE sob longo repouso, utilizando-se uma rampa de aquecimento, ou melhor, um pré-aquecimento antes da imobilização propriamente dita. Acredita-se que este pré-aquecimento diminua a viscosidade do polímero de maneira que este esteja mais disponível para entrar nos poros de sílicas de baixa área superficial. Neste trabalho, foi feito um pré aquecimento de 60 °C, durante 1 hora, antes da imobilização (esta foi realizada a 100 °C durante 8 horas). É interessante observar que em nenhuma das técnicas houve um ganho significativo da % de C nas FE, comprovando que, mesmo sem alterar a quantidade final de polímero imobilizado, é possível aumentar a eficiência da FE.

Os melhores parâmetros de temperatura e tempo de imobilização obtidos neste capítulo, para sílica de poros de 10 nm, serão utilizados como ponto de partida para o preparo de FE de sílica de poros maiores, de 30 nm, apresentados e discutidos no Capítulo V.

# *Capítulo V - SÍLICAS DE 30 nm*

## **V. INTRODUÇÃO**

Com foi discutido no capítulo anterior, a sílica deve seu enorme sucesso como suporte de FE em CLAE às suas características físicas, entre outras, como variabilidade de tamanhos, formas, etc. Mas, a característica que a torna viável para aplicações em separações de moléculas pequenas até macromoléculas é justamente a conformação de sua porosidade ou seja, a distribuição e tamanho de seus poros.

Os suportes de sílicas com poros grandes, acima de 10 nm, têm sido utilizados na preparação de FE específicas para a separações de moléculas grandes, como proteínas, polipeptídeos<sup>130</sup>, e outras biomoléculas. Considerando-se que as interações do soluto com a FE ocorrem dentro dos poros da sílica, espera-se que os poros grandes da sílica permitam a “entrada”<sup>131</sup> de moléculas grandes, fazendo com que o processo de transferência de massa seja mais eficiente. Além disto, o efeito de exclusão por tamanho será reduzido, aumentando a resolução e a eficiência das separações.

Mas, se por um lado a sílica com poros grandes favorece as separações de macromoléculas, ela também terá uma característica que não é desejável para a modificação de sua superfície: este tipo de sílica apresenta uma menor área superficial, ou seja, ela possui menor capacidade de carga de polímero sobre sua superfície.

Assim, algumas considerações a respeito dos modificadores devem ser feitas quando suportes de poros grandes são utilizados. Primeiro, deve-se utilizar um modificador que possua um “diâmetro” menor que os poros da sílica, para que haja possibilidade de recobrimento das paredes dos poros. Segundo, quando se utiliza modificadores de cadeia longa, como C18, por exemplo, sua distribuição na superfície e nos poros será diferente da observada em sílicas de poros menores. Portanto, as separações podem apresentar mecanismos de retenção mistos como adsorção acompanhada de partição, exigindo um pouco mais de cuidado nas condições cromatográficas empregadas.

## **5.2. Parte Experimental**

### **5.2.1 – Equipamentos e Reagentes**

- Cromatógrafo a líquido, modelo compacto Shimadzu constituído de uma bomba de alta pressão, modelo LC 10AD, um detector espectrofotométrico UV/VIS com comprimento de onda variável, modelo SPD 10AV, e injetor da Rheodyne, modelo 8125-095, com alça de injeção de 5 µL. O equipamento está acoplado a um microcomputador 200 MHz , e o processamento dos dados cromatográficos é realizado através do software ChromPerfect e Report Write-Plus da Justice Innovations.

- Sistema de extração em fluxo contínuo, constituído de bomba de alta pressão, Waters modelo 510, e um forno de coluna Eldex modelo CH-150.

- Bomba de enchimento de colunas, Haskel, com faixa de pressão disponível até 340 MPa (50000 Psi), modelo 51769.

- Banho Ultra-Som, Thorton T14.
- Agitador Roto Torque, cole-Palmer modelo 7637-01.
- Agitadores magnéticos, Modelo Fisatom modelo 753 A e Corning modelo PC-351.
- Balança analítica Fischer Scientific modelo A-250.
- Sistema Milli-Q Plus, Millipore.
- Estufa a vácuo, Yamoto modelo ADP-21.
- Ácido nítrico, p.a., Synth e Nuclear
- Água deionizada, Sistema Milli-Q plus
- Clorofórmio, p.a., Merck
- Hexano grau HPLC, Mallinckrodt e p.a. Tedia
- Isopropanol grau p.a. Tedia
- Metanol grau HPLC, Mallinckrodt

### **5.2.2 - Sílicas utilizadas na confecção da FE**

As sílicas utilizadas como suporte cromatográfico nesta etapa do trabalho são provenientes de diversos fabricantes, com características diferenciadas entre si como diâmetro do poro, tamanho da

partícula e volume de poro. A Tabela 5.1 apresenta os diferentes suportes de sílica e suas características principais.

Tabela 5.1: Suportes de sílica estudados e suas características físicas

Marca	Diâmetro de Poro <sup>a</sup> (nm)	Tamanho de partícula <sup>a</sup> ( $\mu\text{m}$ )	Volume de poro <sup>a</sup> ( $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$ )	Area <sup>a</sup> ( $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ )
Astrosil® (Stellar Phases Corp.)	30	5	0,90	100
Rainin® (Rainin Co.)	30	3	0,75	71,3
Nucleosil® (Macherey-Nagel)	30	7	0,80	84,6

<sup>a</sup>: dados do fabricante

### 5.2.2 – Preparo das FE de sílica de poros grandes

Toda a metodologia de preparo das FE seguiu rigorosamente os procedimentos descritos no Capítulo IV itens 4.2.3.2, 4.2.5, 4.2.7 e 4.2.8, incluindo-se o pré-tratamento ácido da sílica e extração com clorofórmio, seguido de metanol, após a imobilização do PMODS sobre o suporte.

### 5.2.3 - Procedimentos de Imobilização do PMODS sobre o suporte de sílica

Foram estudadas diversas metodologias de imobilização do PMODS em cada um dos tipos de sílica utilizando-se o tratamento térmico. As variáveis estudadas e as faixas utilizadas estão apresentadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Variáveis utilizadas durante a imobilização de PMODS sobre suporte de sílica

Variável	Faixa
quantidade (carga) de polímero no suporte	50 % e 70 % (Astrosil)
temperatura de imobilização	80 °C (Astrosil), 100°C (todas) e 120 °C (Astrosil)
tempo de tratamento	8 e 16 horas (todas)

## **5.2.4 - Caracterização das Fases Estacionárias Preparadas**

### **5.2.4.2 - Análise Termogravimétrica**

Os termogramas foram obtidos utilizando 10 mg de amostra e velocidade de aquecimento de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , no intervalo de 25 a  $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em um equipamento da TA Instruments, modelo TGA 2050. Algumas análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio ou argônio (atmosfera inerte) e outras sob ar (atmosfera oxidante).

### **5.2.4.3 - Análise Elementar**

As análises foram realizadas utilizando-se 1 mg de amostra (FE) adicionada a 1 mg de mistura oxidante composta de  $\text{Pb}_2\text{O}_4$  e NaF na proporção de 1:1. O procedimento foi realizado em duplicata, em um aparelho Perkin Elmer modelo 2400. Caso houvesse uma divergência maior que 0,4% era feita uma nova análise. O resultado final era obtido a partir da média de todas as análises.

### **5.2.4.4 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Foram feitas microfotografias eletrônicas de varredura no equipamento JEOL, modelo JSM-T300 para cada um dos suportes de sílica utilizados na preparação das FE. As amostras foram

colocadas em um porta-amostra (com fita adesiva de carbono para fixar as partículas de FE) e recobertas por uma fina camada de ouro. Foram avaliadas as sílicas puras e amostras da FE estacionária depois de passar pelo processo de enchimento de coluna no sistema Haskel a alta pressão (34,5 MPa). No caso da sílica Astrosil também foram feitas avaliações das FE que passaram por uma pressão menor durante o enchimento (27 MPa).

### **5.2.5 - Enchimento de colunas cromatográficas**

As colunas utilizadas para enchimento foram as mesmas descritas no item 4.10 do Capítulo 4, com dimensões de 60 x 3,9 mm.

O processo de enchimento passou pela etapa de preparo de uma suspensão descrita no item 4.3.10.

O sistema utilizado para o enchimento foi o mesmo utilizado para as sílicas de 10 nm, consistindo de uma bomba Haskel acoplada a um reservatório (destinado a receber o material de recheio) por onde o solvente de propulsão, metanol, é bombeado a uma pressão de 34,5 MPa (5000 psi).

Durante o trabalho experimental, foram feitos alguns testes variando-se a pressão de enchimento para 27 MPa (3000 psi) especificamente para as FE de sílica Astrosil, com dois diferentes tempos de imobilização, 8 e 16 horas.

Após o processo de enchimento, independentemente da pressão utilizada, todas as colunas passaram pelo procedimento de condicionamento descrito no item 4.2.11.

### **5.2.6 - Avaliação Cromatográfica das colunas recheadas**

Para avaliação dos parâmetros cromatográficos como eficiência,  $N/m$  (número de pratos por metro), resolução,  $R_s$ , assimetria,  $A_s$  (a 10%), e fator de retenção,  $k$ , utilizaram-se duas mistura testes: a mistura teste 1 constituída de uracil (para o cálculo do  $t_M$ ), acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno; a segunda é a mistura 2, descrita no Capítulo 3, constituída por uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafeno. As separações foram realizadas utilizando-se a fase móvel metanol:água na proporção 70:30 v/v à vazão ótima de cada coluna, determinada através da curva  $\alpha$ :

van Deemter, em comprimento de onda de 254 nm. Em alguns casos, devido à pobre resolução dos picos, a fase móvel foi ajustada para metanol:água 50:50 v/v. O volume de amostra injetado foi sempre de 5 µL.

Os solventes no sistema CLAE foram filtrados em uma membrana de 0,45 µm e antes de serem utilizados foram desgaseificados no ultra-som por aproximadamente 30 minutos.

### **5.3. Resultados e Discussão**

#### **5.3.1. Estudos com a sílica Astrosil com poros de 30 nm**

A força das interações entre soluto e FE é influenciada principalmente pelo tipo de acesso que este soluto tem até a FE que, por sua vez, é controlado pelo tamanho de poro. Acredita-se que mais de 90% da superfície disponível para estas interações está dentro dos poros da sílica<sup>132</sup>. Neste caso, com diâmetro de poro maior, estes podem vir a acomodar uma conformação diferenciada das moléculas de polímero de cadeia mais longa, como é o caso do PMODS.

Portanto, à exemplo dos estudos de variáveis envolvidas no preparo e imobilização da FE inicialmente realizada com partículas de 10 nm, foi feita uma nova investigação, considerando-se as variáveis tempo de imobilização térmica e carga (ou % de carga).

Utilizando as informações obtidas a respeito do comportamento do polímero frente às variações de temperatura nos espectros de RMN (discutidos no capítulo IV), foi decidido que a otimização da faixa de temperatura de imobilização térmica a ser investigada, para FE de partículas de 30 nm, seria limitada entre 80 °C a 120 °C. Foi exatamente nesta faixa que se observou uma menor variação da estrutura conformacional do polímero.

A pouca disponibilidade de material não permitiu que fosse feita uma investigação quanto a influência da imobilização em duas etapas de aquecimento. Entretanto, devido aos ganhos na eficiência observados nas FE preparadas com sílica pré tratada com ácido (para a sílica Rainin de 5 µm e poros de 10 nm descrita no capítulo IV), este procedimento foi mantido durante todos os trabalhos feitos com as sílicas de 30 nm.

No caso do parâmetro porcentagem de PMODS, o diâmetro de poro poderia influenciar diretamente na quantidade de polímero retido/imobilizado, portanto, a faixa escolhida para o estudo de

carregamento (carga) de polímero foi fixada em 50 % e 70 %. Como representante deste grupo de sílicas, para esta otimização, foi utilizada a sílica Astrosil de 5 µm e 30 nm de diâmetro de poro. Na Tabela 5.3 estão apresentados os resultados para as FE com carga de 50 % de PMODS e a Tabela 5.4 apresenta os parâmetros cromatográficos das FE com carga de 70 % de PMODS.

Tabela 5.3: Parâmetros cromatográficos para a FE com carga de 50 % de PMODS sobre sílica Astrosil 5 µm, 30 nm de diâmetro de poro, imobilizada em diferentes temperaturas.

Tratamento térmico (°C)	8 horas					16 horas				
	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	C%	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	%C
80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,7	33400	1,7	n.d.	1,3	5,5
100	36100	2,7	0,8	2,1	8,4	51300	1,6	1,4	3,4	11,2
120	39000	1,6	2,7	4,2	18,2	9600	n.d.	n.d.	n.d.	22,5

<sup>a</sup>: calculado para o naftaleno

<sup>b</sup>: calculado para o par tolueno/naftaleno

Tabela 5.4: Parâmetros cromatográficos para a FE com carga de 70% de PMODS sobre sílica Astrosil 5 µm, 30 nm de diâmetro de poro, imobilizada em diferentes temperaturas

Tratamento térmico (°C)	8 horas					16 horas				
	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	%C	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	%C
80	37000	2,2	1,0	3,2	4,0	36000	3,5	1,4	4,0	6,0
100	36500	2,6	0,6	1,8	6,0	53300	3,6	4,6	7,7	9,3
120	43200	3,9	2,5	4,6	12,1	16600	2,0	3,3	3,3	18,4

<sup>a</sup>: calculado para o naftaleno

<sup>b</sup>: calculado para o par tolueno/naftaleno

A partir dos resultados das Tabelas 5.3 e 5.4 ficou evidente a importância das duas variáveis, tempo e temperatura, com relação à quantidade de polímero imobilizada sobre a superfície de sílica como indicam as % C das FE. É interessante observar-se que o aumento de temperatura de 100 °C para 120 °C praticamente dobra a quantidade de PMODS imobilizado, independentemente do carregamento inicial de polímero. Para se avaliar estes dados de quantidade de polímero em termos de “camadas” sobre a superfície de sílica, a Tabela 5.5 apresenta as espessuras aproximadas das FE preparada com carga de 50 % e 70 % de PMODS imobilizado em diversas temperaturas.

Tabela 5.5: Espessura, ( $\tau$ ), da camada de polímero PMODS imobilizado em diferentes temperaturas durante 8 e 16 horas para FE com carregamento de 50% e 70%.

Carga de PMODS (%)	Temperatura °C	massa específica		$\tau$ (nm)	
		$\bar{m} = \%C / (73 - \%C)$		8 horas	16 horas
50	80	0,05	0,08	0,5	0,8
	100	0,13	0,18	1,3	1,8
	120	0,33	0,44	3,5	5,0
70	80	0,06	0,09	0,6	0,9
	100	0,09	0,15	0,9	1,4
	120	0,20	0,34	2,0	3,6

Os dados de espessura indicam que um excesso do polímero PMODS não alterou a quantidade máxima que o suporte de sílica Astrosil pode adsorver. Entretanto, acredita-se que a carga de 50 % de PMODS produza FE com uma distribuição do polímero sobre a sílica mais uniforme do que a carga de 70 %, pois as assimetrias dos picos nestas últimas, de um modo geral, são mais elevadas. A alta assimetria também impede que seja feita uma avaliação comparativa confiável entre as duas FE no

parâmetro eficiência. Portanto, também se fixou em 50 % o melhor carregamento para as FE de sílica de 30 nm.

Outra observação a ser feita é que, à exemplo do ocorrido com as FE de sílica de 10 nm, as colunas de melhores eficiências são exatamente as que apresentam espessura próxima da faixa 1,5 - 2,0 nm. Espessuras acima desta faixa produzirão FE recobertas com PMODS em uma organização espacial menos eficiente para o processo de transferência de massa, com conseqüente queda da eficiência.

Este estudo também permitiu algumas considerações a respeito dos efeitos de tempo e temperatura sobre a imobilização do polímero. A temperatura é uma variável que afeta drasticamente a quantidade de PMODS imobilizado, ou seja, em um mesmo período de tempo a variação de 20 °C levou ao aumento da espessura da camada polimérica entre 120% a 170% em quase todas as FE preparadas, com exceção às FE com carga de 70 % na faixa de 80 °C a 100 °C, na qual a variação foi em torno de 60 %.

Já o período de tempo de imobilização (de 8 ou 16 horas) tem um efeito de menor impacto em termos de quantidade de modificador imobilizado, pois o aumento na espessura do recobrimento não ultrapassa a taxa de 60 %. Desta forma, é possível utilizar a variável tempo de imobilização como uma “sintonia fina”, ou seja, ajustar o tempo de imobilização de forma a atingir uma espessura ideal de PMODS sobre a sílica para conseguir a melhor eficiência possível da FE.

Com relação aos parâmetros cromatográficos das FE com carga de PMODS de 50 % e 70 %, os resultados, à exemplo das FE de sílica de 10 nm, apontaram novamente a temperatura de 100 °C como a mais apropriada, justamente na qual a espessura do PMODS sobre a sílica não chegou a ter 2,0 nm. Porém, o tempo de tratamento térmico de 8 horas a 100 °C mostrou-se insuficiente para alcançar um recobrimento de PMODS que fosse capaz de separar com boa resolução uma mistura simples de compostos neutros (mistura 1) como a que foi utilizada nas separações apresentadas nas Figuras 5.1 a 5.3. Portanto, para FE de sílica de poros grandes o tempo de imobilização mais adequado foi fixado em 16 horas.

No entanto, se os resultados dos parâmetros cromatográficos estavam condizentes com os esperados para sílicas de poros grandes, que apresentam uma eficiência menor do que as FE de sílica de 10 nm, a forma dos picos nos cromatogramas e, portanto, suas assimetrias, indicavam problemas no processo de enchimento da coluna e/ou na uniformidade do recheio dentro da coluna.

Todas as colunas destas FE foram recheadas quatro vezes para se eliminar qualquer possibilidade de erro durante o processo de enchimento. Em todos os casos, as separações

apresentavam caudas ao final de cada pico que se repetiam em todos os compostos. Portanto, ficou claro que havia algum problema específico no leito da coluna cromatográfica após o enchimento.

Para avaliar o que poderia estar ocorrendo com as partículas da FE após o enchimento, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 5.7, apresenta as amostras de sílica Astrosil pura, antes dos procedimentos de preparo de FE, onde pode ser observado que o diâmetro da partícula tem uma variação relativamente grande. As Figuras 5.8 e 5.9 representam as FE immobilizadas a 100°C durante 8 e 16 horas, respectivamente.

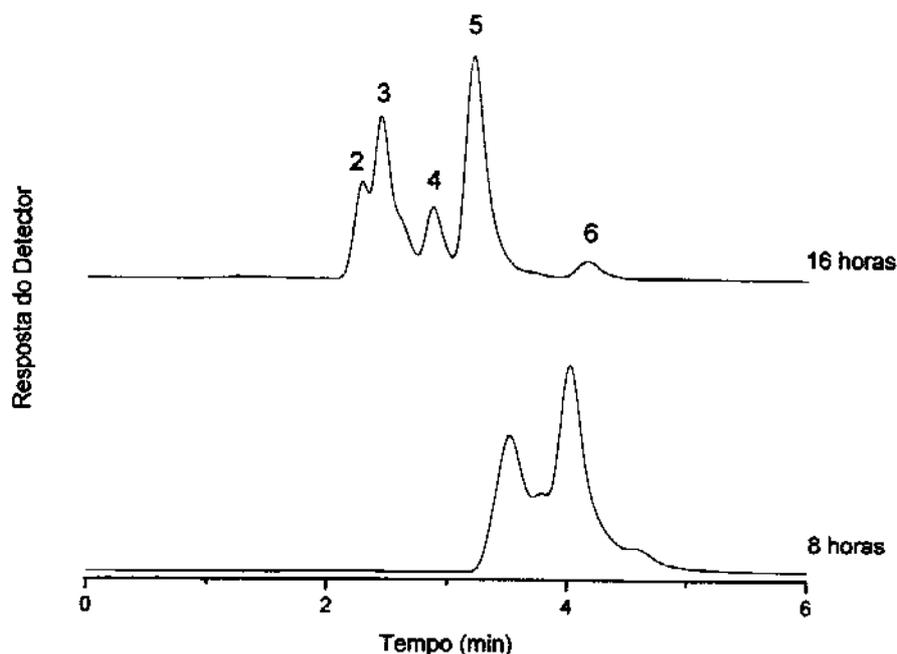


Figura 5.1: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS immobilizadas termicamente a 80 °C durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 50 %. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.

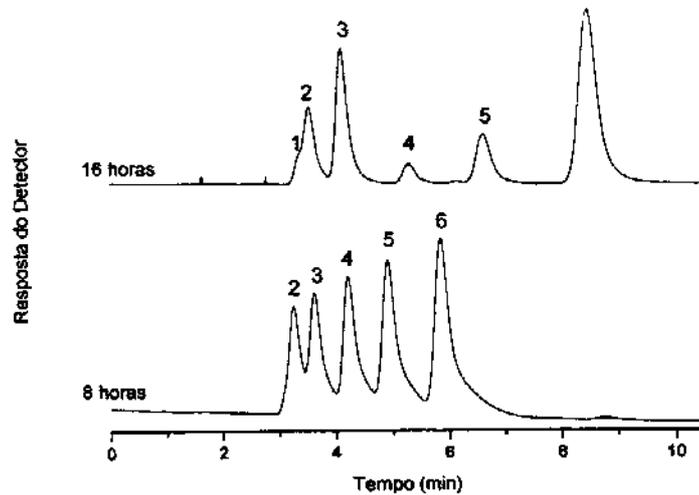


Figura 5.2: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS imobilizadas termicamente a 100 °C durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 50 %. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.

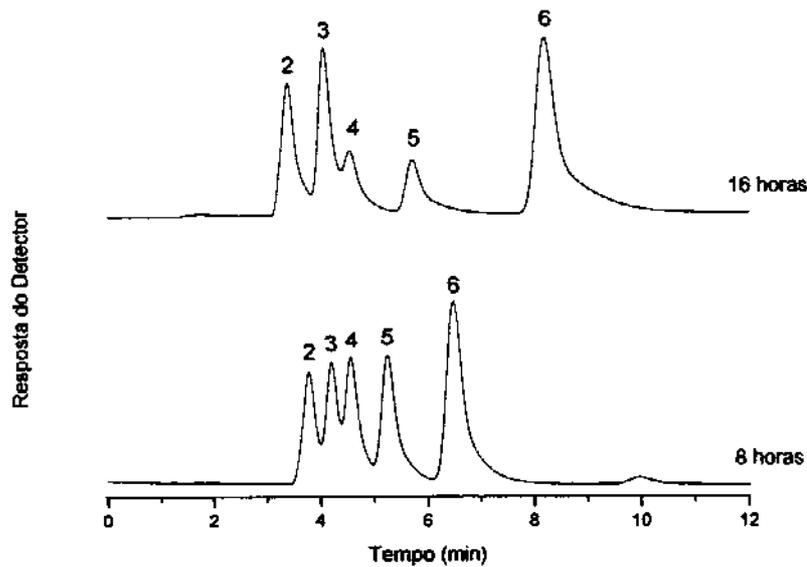


Figura 5.3: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS imobilizadas termicamente a 120 °C durante 8 e 16 horas. O carregamento de polímero foi de 50 %. Mistura teste I: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.

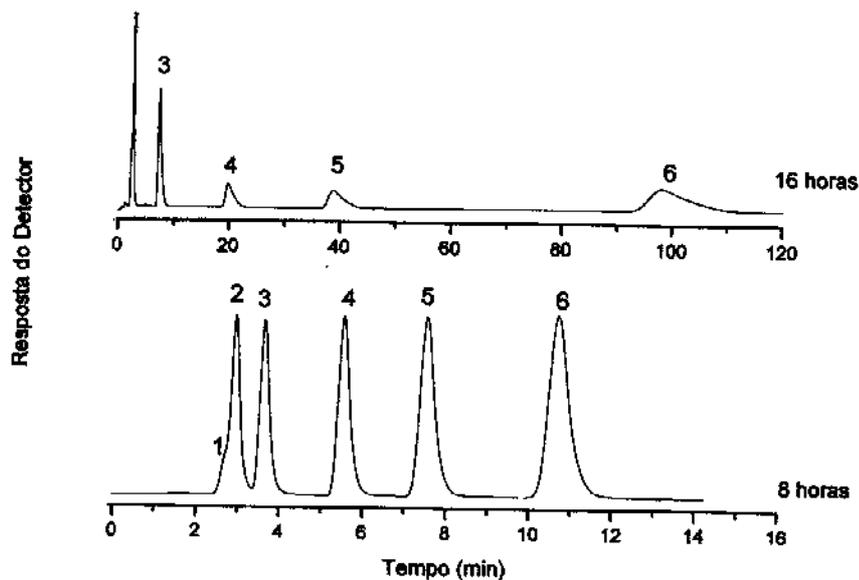


Figura 5.4: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS immobilizadas termicamente a 80 °C durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 70 %. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 50:50 v/v , vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.

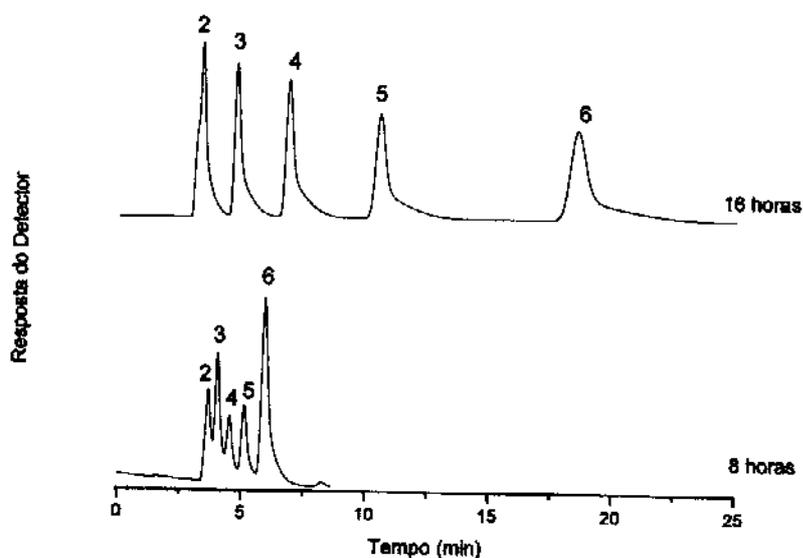


Figura 5.5: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil e PMODS immobilizadas termicamente a 100 °C durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 70 %. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.

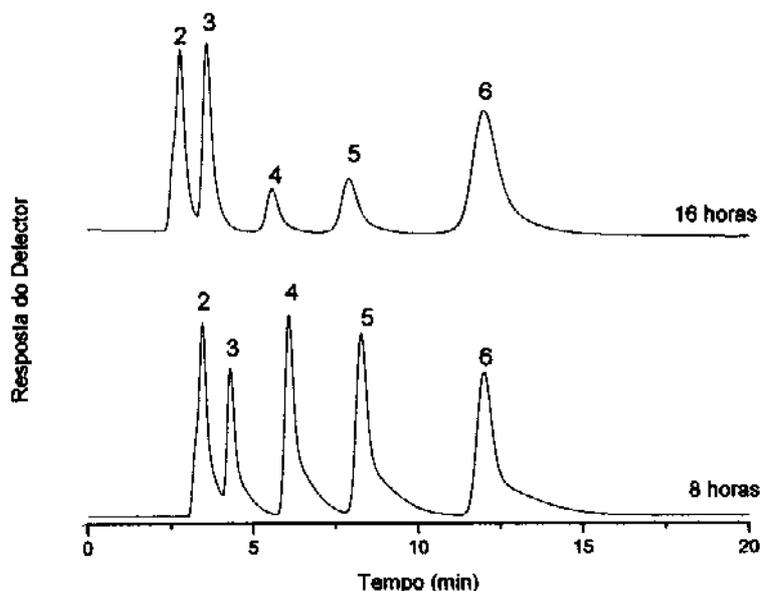


Figura 5.6: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Astrosil 5  $\mu\text{m}$  e PMODS imobilizadas termicamente a 120  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 e 16 horas. A carga inicial de polímero foi de 70 %. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL  $\text{min}^{-1}$ , volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ , detecção em UV, 254 nm.

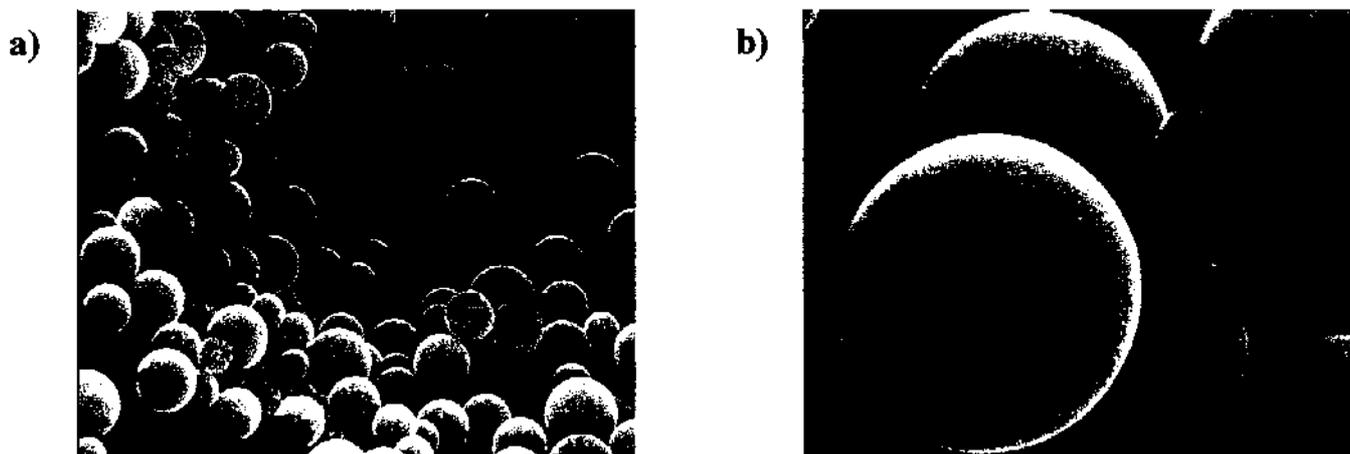


Figura 5.7: Microfotografias de partículas de sílica Astrosil 5  $\mu\text{m}$  pura, antes do preparo de FE. a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 15000 vezes.

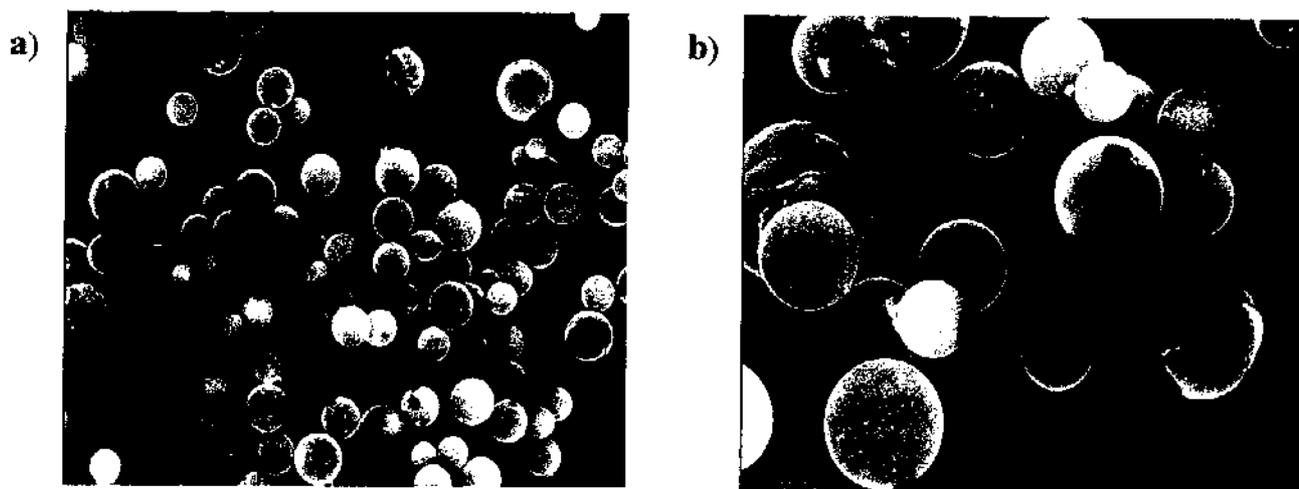


Figura 5.8: Microfotografias de FE de sílica Astrosil 5  $\mu\text{m}$  com polímero PMODS imobilizado durante 8 horas a 100°C a) aumento de 1500 vezes e b) detalhe das partículas com aumento de 10000 vezes.

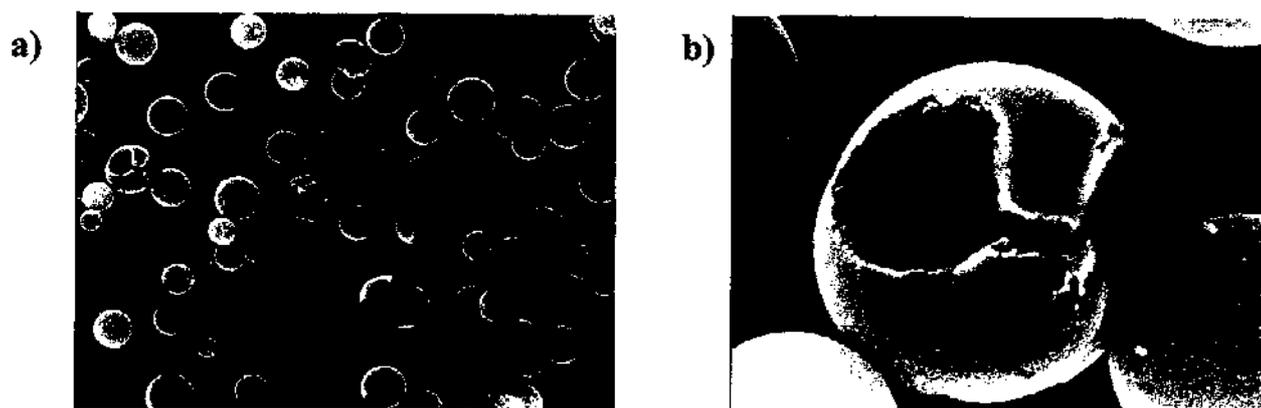


Figura 5.9: MEV de FE de sílica Astrosil 5  $\mu\text{m}$  com polímero PMODS imobilizado durante 16 horas a 100°C a) aumento de 1500 vezes e b) detalhe da partícula com aumento de 15000 vezes.

Observa-se nas amostras de FE (retiradas da coluna após o uso) uma grande fragmentação das partículas de sílica. Nas microfotografias que apresentam a partícula em um aumento de 10.000 a 15.000 vezes (detalhes das Figuras 5.8 e 5.9) observa-se deformações decorrentes de pressão direcionadas de fora para dentro indicando que a sílica Astrosil não suporta a alta pressão de enchimento. No momento de enchimento, estes pequenos fragmentos de FE são empurrados para o final da coluna, obstruindo os poros do filtro e causando a dispersão de sinal no detector de UV. Esta é a causa da cauda pronunciada ao final de cada pico no cromatograma.

Na tentativa de melhorar o desempenho e diminuir o efeito da pressão sobre as partículas de sílica no momento de enchimento, foi feito um teste preliminar alterando-se a pressão de enchimento da coluna para 27 MPa (3000 psi), lembrando-se que todos os enchimentos realizados até esta parte do trabalho foram realizados a 34,5 MPa (5000 psi). Os resultados cromatográficos estão apresentados na Tabela 5.6 e os respectivos cromatogramas podem ser vistos na Figura 5.10.

Tabela 5.6: Parâmetros cromatográficos para a FE (Astrosil-PMODS 50 %, imobilizada a 100°C durante 16 horas). As colunas foram recheadas com pressão de 27 MPa

Tratamento térmico (horas)	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>
8	56500	3,2	2,7	6,2
16	57000	2,7	4,4	7,2

<sup>a</sup>: calculado para o naftaleno

<sup>b</sup>: calculado para o par tolueno/naftaleno

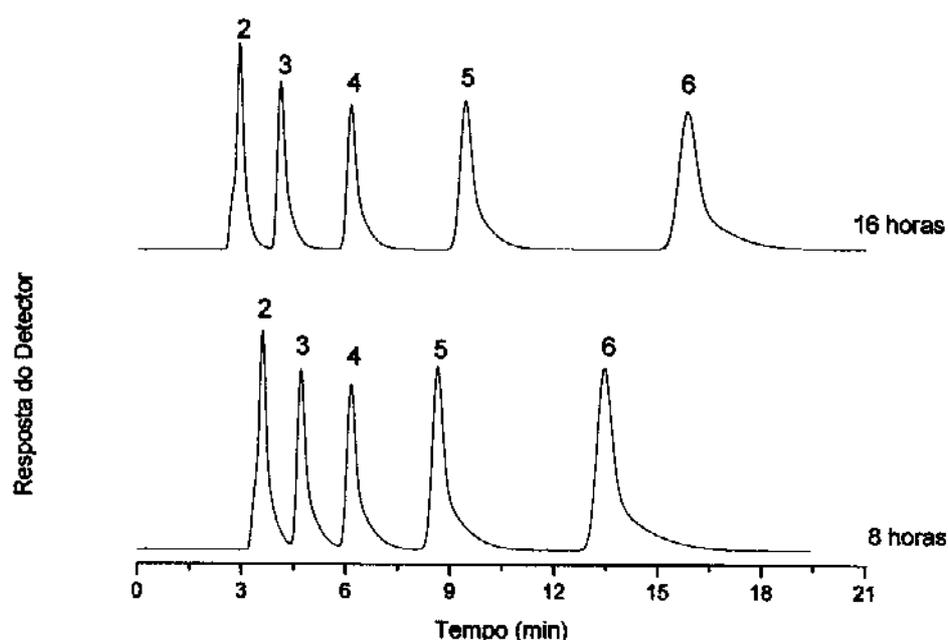


Figura 5.10: Cromatogramas das FE de sílica Astrosil 5 µm com 50 % de carga inicial de PMODS imobilizado a 100 °C durante 8 e 16 horas. O enchimento da coluna cromatográfica foi feito sob uma pressão de 27 MPa. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel para o cromatograma de 8 horas foi metanol:água 50:50 v/v, FM para 16 horas foi metanol:água 70:30 v/v, vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.

Pelos resultados cromatográficos houve uma melhora considerável na eficiência das colunas, inclusive no fator de retenção dos compostos que passaram a apresentar resolução na linha de base, mas todos os picos continuaram a apresentar cauda.

Após remover as FE das colunas recheadas à uma pressão menor, de 27 MPa, algumas amostras das FE imobilizadas durante 8 e 16 horas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. As microfotografias apresentadas nas Figuras 5.11 e 5.12, revelaram um padrão de quebra das partículas menos pronunciado, o que explica a melhora das eficiências das colunas cromatográficas. Entretanto, as partículas que se fragmentaram, produziram pedaços ainda menores do que os vistos anteriormente, também chamados de “finos” que, por sua vez, foram responsáveis por também obstruir os poros do filtro da coluna, produzindo picos com uma alta assimetria.

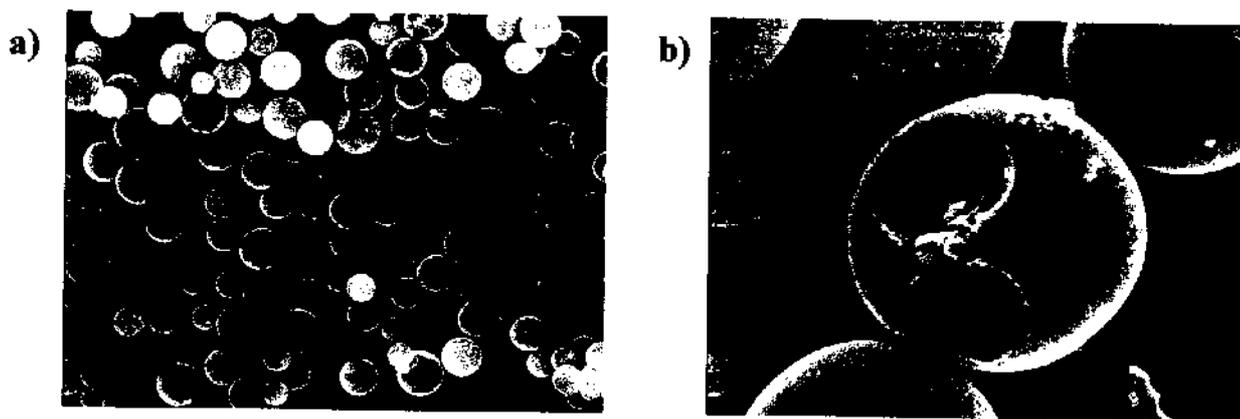


Figura 5.11: Microfotografias de FE de sílica Astrosil 5 µm com polímero PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizado durante 8 horas a 100 °C e recheada sob pressão de 27 MP. a) aumento de 1500 vezes e b) detalhe das partículas com aumento de 15000 vezes.

Independentemente da pressão utilizada, as particularidades dos danos nas partículas de sílica Astrosil sugerem que a distribuição e profundidade de seus poros tornam suas paredes muito “finas”, conferindo-lhes as características de esferas “ocas”, como pode ser visto nas Figuras 5.8 a 5.12, com destaque para a Figura 5.9.

Para partículas pequenas, como as da sílica Astrosil, de 5 µm, diminuir ainda mais a pressão de enchimento seria arriscado, pois poderia comprometer ainda mais a uniformidade de distribuição do

recheio dentro da coluna cromatográfica. Portanto, para este tipo de sistema de enchimento a partícula de sílica Astrosil com polímero adsorvido não é indicada.

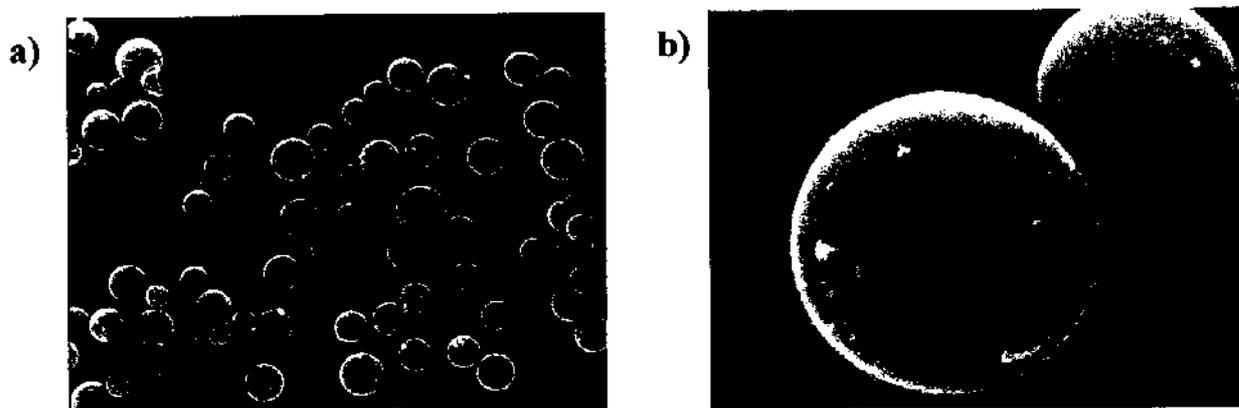


Figura 5.12: Microfotografias de FE de sílica Astrosil 5 µm com polímero PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizado durante 16 horas a 100°C e recheada sob pressão de 27 MP. a) aumento de 1500 vezes e b) detalhe das partículas com aumento de 15000 vezes.

### **5.3.2 - Utilização de outras sílicas de 30 nm para o preparo de FE**

A partir dos resultados obtidos até aqui, constatou-se que a sílica Astrosil com poros de 30 nm não se apresentou como um bom suporte para FE com polímero imobilizado, pois foi incapaz de suportar a alta pressão utilizada durante o processo de enchimento de colunas cromatográficas. Foram utilizados então, dois outros suportes de sílica, também de 30 nm, para se avaliar a metodologia de preparo de FE com sílicas de poros grandes. Apesar dos problemas causados pela fragilidade mecânica da sílica Astrosil, as variáveis otimizadas de carga de PMODS e temperatura de imobilização foram mantidas para os novos suportes, as sílicas Rainin e Nucleosil (ver Tabela 5.1). Considerando-se que o tempo de tratamento térmico (imobilização) pode levar à uma melhor acomodação do polímero sobre o suporte, manteve-se o estudo sobre os dois níveis da variável tempo de imobilização, ou seja, 8 e 16 horas, para cada um dos novos suportes de sílica.

### 5.3.2.1 - Sílica Rainin com poros de 30 nm

A partir da sílica Rainin previamente tratada com ácido nítrico 0,01 mol L<sup>-1</sup>, foram preparadas duas FE: uma imobilizada a 100 °C durante 8 horas e outra imobilizada durante 16 horas. Os parâmetros cromatográficos destas FE estão apresentados na Tabela 5.7 e os respectivos cromatogramas podem ser vistos na Figura 5.13.

Tabela 5.7: Parâmetros cromatográficos das FE preparadas com sílica Rainin 3 µm e PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizadas a 100 °C durante diferentes tempos.

Imobilização	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	%C
8h	57600	2,4	1,0	3,0	8,6
16h	58800	1,7	1,2	3,4	11,6

<sup>a</sup>: calculado para o naftaleno

<sup>b</sup>: calculado para o par tolueno/naftaleno

Como foi visto nas FE de sílica Astrosil, a imobilização térmica durante 16 horas é responsável por produzir um material com maior quantidade de polímero PMODS adsorvido ao suporte. Provavelmente, no período de 8 horas o polímero adsorvido esteja concentrado na superfície da sílica, muitas vezes sem atingir o interior dos poros.

Acredita-se que, no caso de sílicas de poros grandes, um período maior de tempo permitiria uma melhor acomodação do polímero dentro dos poros, pois um “aglomerado” de cadeias do polímero, poderia até aumentar a espessura da FE, mas não seria eficiente durante o processo de transferência de massa durante a separação cromatográfica. Esta tendência é confirmada pela análise elementar, que indica um aumento de % de carbono tanto nas FE de sílica Rainin quanto de sílica Astrosil após 16 horas de imobilização.

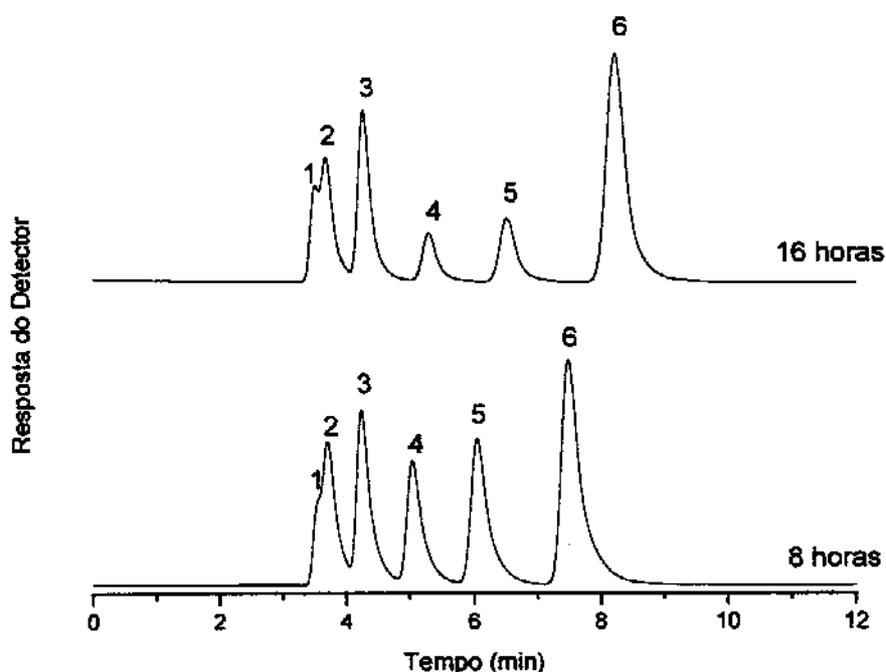


Figura 5.13: Cromatogramas das FE preparadas com sílica Rainin 3  $\mu\text{m}$  e PMODS com carga inicial de 50 % imobilizadas a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 e 16 horas. Mistura teste 1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2  $\text{mL min}^{-1}$ , volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ , detecção em UV, 254 nm.

O perfil cromatográfico para a FE de sílica Rainin imobilizada por 8 horas apresentou também alta assimetria como visto nas FE de sílica Astrosil. Novamente, o melhor resultado deste parâmetro foi observado para a FE imobilizada por 16 horas. A eficiência ficou abaixo do esperado, uma vez que as partículas de sílica Rainin são menores que a sílica Astrosil. As microfotografias apresentadas nas Figuras 5.14 a 5.16 explicam estes resultados. Pode-se observar que a FE de sílica Rainin imobilizada por menos tempo também apresenta algumas partículas quebradas, embora seja um fator pontual em relação ao comportamento das FE de sílica Astrosil.

Também é possível observar-se nas microfotografias uma dispersão no tamanho das partículas de sílica Rainin que, nominalmente apresenta um tamanho de 3  $\mu\text{m}$ . Se na média as partículas

apresentarem um tamanho relativamente maior do que o mencionado pelo fabricante, a tendência será uma diminuição no valor da eficiência.

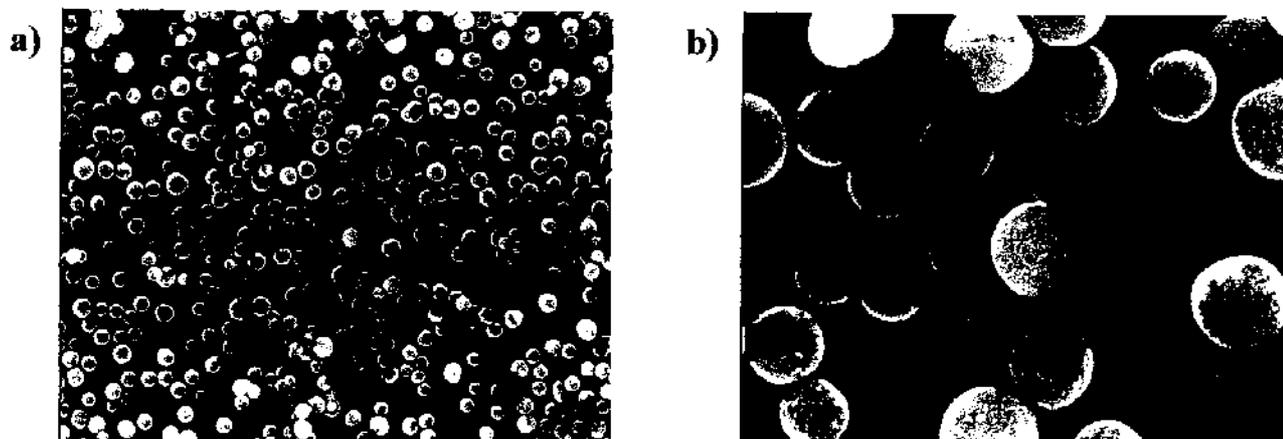


Figura 5.14: Microfotografias de sílica Rainin 3  $\mu\text{m}$  (30 nm) pura, antes do preparo de FE. a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes.

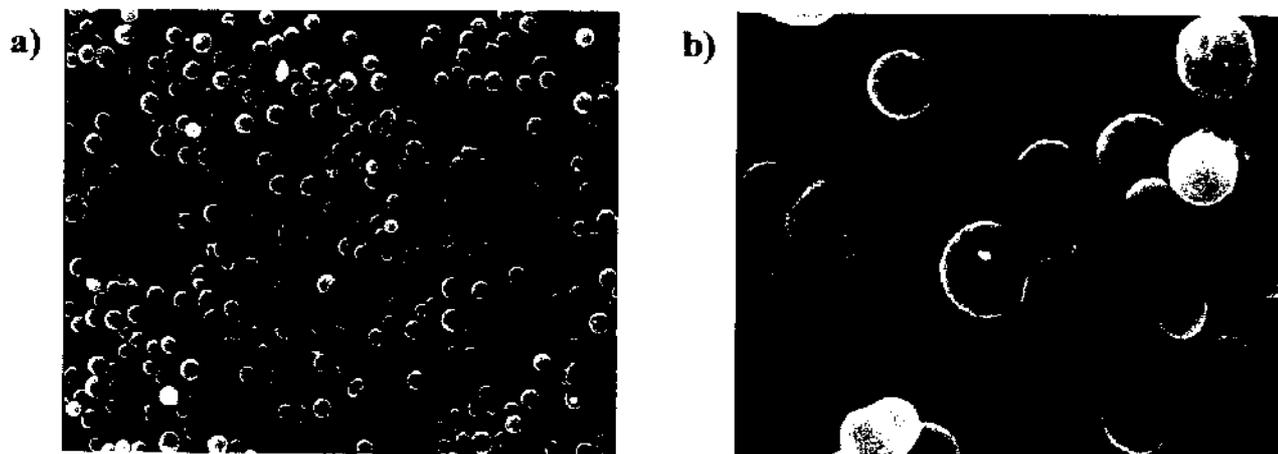


Figura 5.15: Microfotografias das FE preparada com sílica Rainin 3  $\mu\text{m}$  (30 nm) e PMODS com carga inicial de 50 %, immobilizadas a 100°C, durante 8 horas a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes.

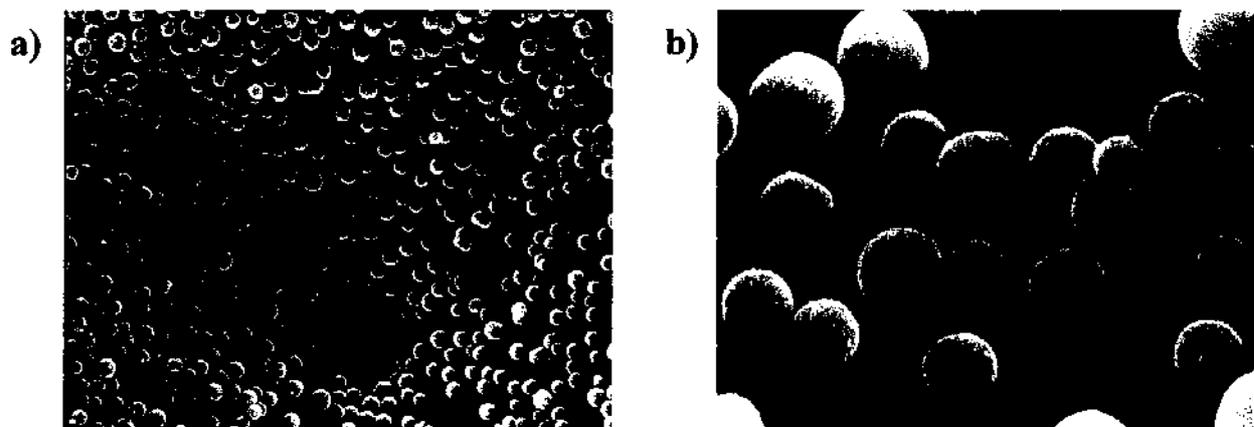


Figura 5.16: Microfotografias da FE preparada com sílica Rainin 3  $\mu\text{m}$  (30 nm) e PMODS com carga inicial de 50 %, imobilizada a 100 °C durante 16 horas a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes.

Os cromatogramas das FE de sílica Rainin (com tamanho de poro de 30 nm) apresentam o mesmo comportamento visto nas FE de sílica Astrosil: não é possível observar uma separação entre a uracil e a acetona. Além disto, a FE imobilizada por 8 horas não apresenta separação na linha de base para nenhum dos componentes da mistura 1 Isto indica que a FE tem baixa hidrofobicidade, ou seja, nem 16 horas de tratamento térmico foram suficientes para imobilizar uma quantidade de PMODS que garantisse uma boa separação entre compostos neutros com diferentes graus de hidrofobicidade.

#### **5.3.2.2 - Sílica Nucleosil com poros de 30 nm**

Seguindo o exemplo da sílica Rainin, foram preparadas duas FE de sílica Nucleosil, pré-tratada em solução de ácido nítrico 0,01 mol L<sup>-1</sup>, com imobilização a 100 °C durante 8 e 16 horas. Entre os suportes de sílica de poros grandes utilizados neste trabalho, a sílica Nucleosil é a que apresenta o maior tamanho de partícula. Este fato traz uma pequena desvantagem quando a sua eficiência é comparada às outras duas sílicas estudadas. Entretanto, os resultados cromatográficos apresentados na Tabela 5.8 apontam a FE imobilizada por 16 horas como sendo a mais eficiente e, se for considerado o tamanho da partícula, esta é a FE que apresentou os melhores resultados obtidos entre as sílicas de poros grandes.

Tabela 5.8: Parâmetros cromatográficos de FE preparadas com sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  e PMODS (50 % de carga) imobilizadas a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante diferentes tempos.

Imobilização Térmica (horas)	N/m <sup>a</sup>	As <sup>a</sup>	k <sup>a</sup>	Rs <sup>b</sup>	%C
8	46480	1,9	1,1	2,8	11,5
16	54870	1,6	1,3	3,1	12,4

<sup>a</sup>: calculado para o naftaleno

<sup>b</sup>: calculado para o par tolueno/naftaleno

Observa-se na Figura 5.17, que a sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  pura apresenta uma menor dispersão do tamanho das partículas do que a observada na sílica Rainin 3  $\mu\text{m}$  (Figura 5.14) pura. As Figuras 5.18 e 5.19 apresentam as microfotografias das FE imobilizada por 8 e 16 horas, respectivamente. Embora muitas partículas não apresentem o formato exatamente esférico, a pouca variação no tamanho contribui para uma maior uniformidade do enchimento dentro da coluna levando à uma maior eficiência na separação de uma mistura de compostos.

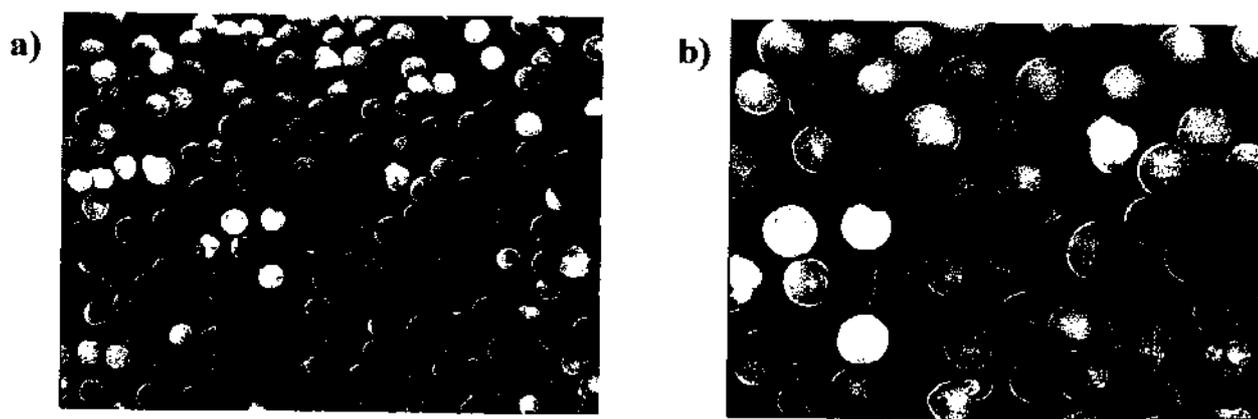


Figura 5.17: Microfotografias da sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  pura, antes do preparo de FE a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 2000 vezes.

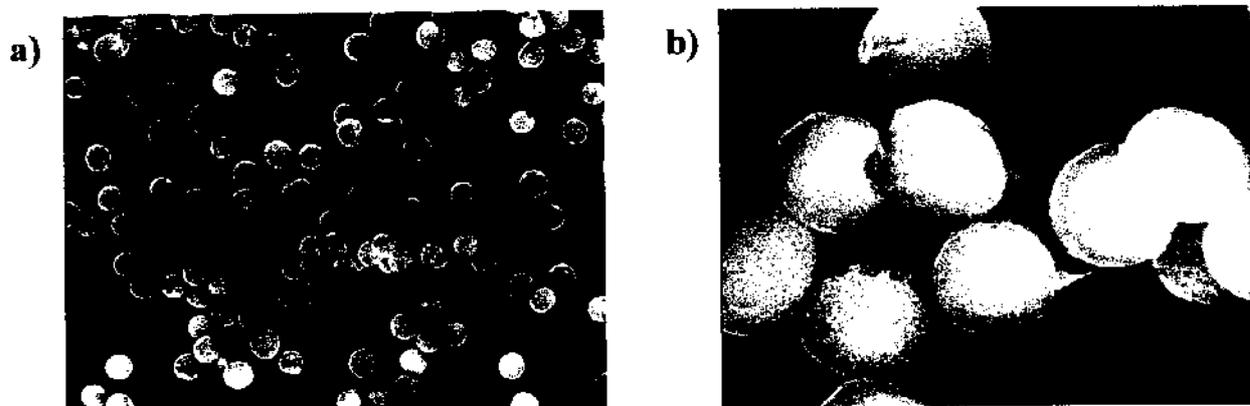


Figura 5.18: Microfotografias da FE preparada com sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  e PMODS (50 % de carga inicial) immobilizada a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 horas a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes.

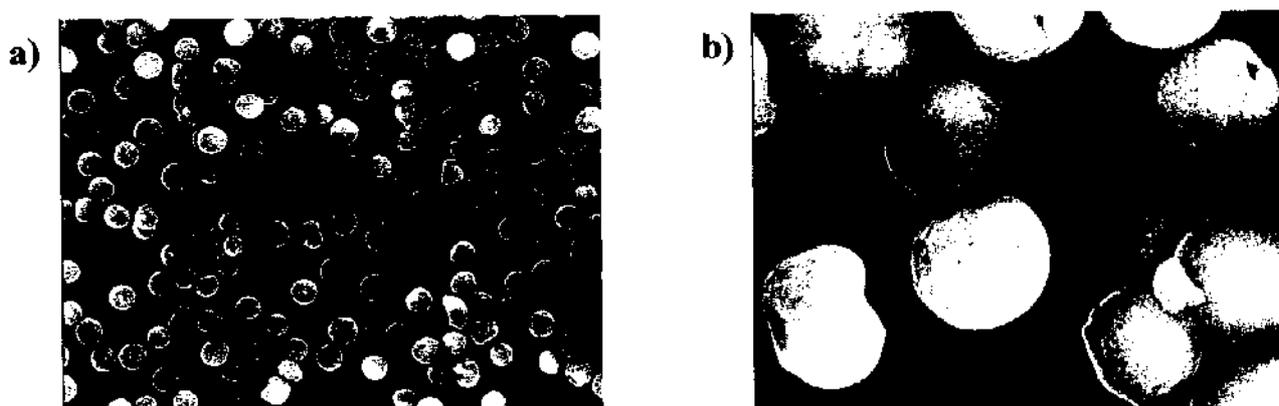


Figura 5.19: Microfotografias da FE preparada com sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  e PMODS (50 % de carga inicial) immobilizada a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas a) aumento de 1000 vezes e b) aumento de 5000 vezes.

As microfotografias da sílica Nucleosil mostram poucas indicações de quebra de partículas, tornando-a o suporte com a melhor resistência mecânica entre os três até agora utilizados.

O cromatograma da FE de sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  na separação de compostos neutros, Figura 5.20, apresentou os melhores resultados entre os três suportes avaliados. Embora a FE immobilizada por 8 horas não tenha uma eficiência tão boa quanto a fase de 16 horas, é possível observar uma separação

na linha de base para todos os compostos neutros. Como nas FE de outras sílicas, somente a acetona não está bem resolvida com a uracil.

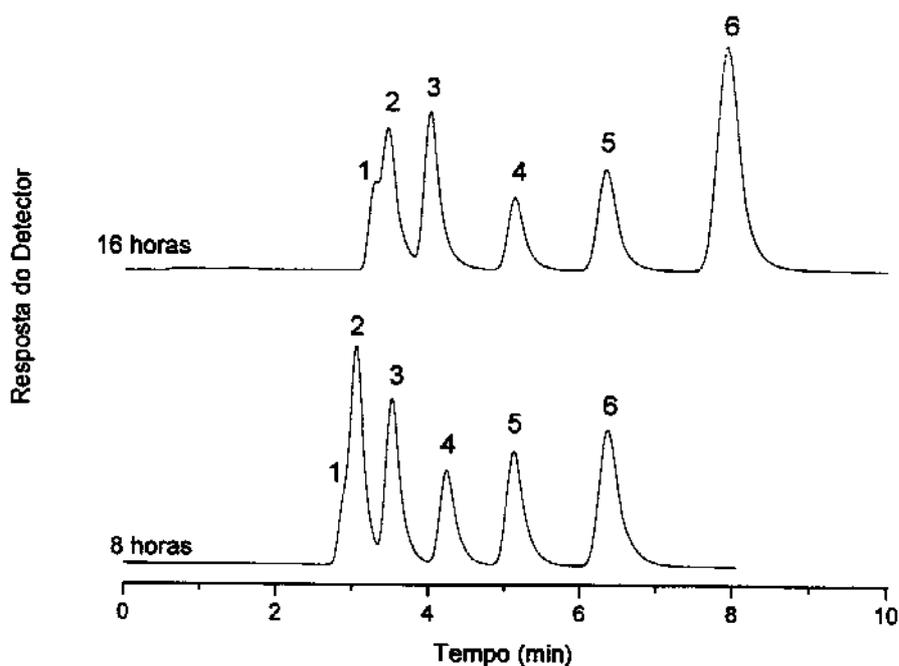


Figura 5.20: Cromatogramas de FE de sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  e PMODS (carga inicial de 50 %) imobilizadas a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 8 e 16 horas. Mistura teste I: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL  $\text{min}^{-1}$ , volume de injeção 5  $\mu\text{L}$ , detecção em UV, 254 nm.

Em todas as sílicas de poros grandes estudadas o tempo de 16 horas de imobilização produziu FE com os melhores resultados, não só em termos de eficiência como também em relação à assimetria dos picos cromatográficos. No caso das FE imobilizadas durante 8 horas, todos os cromatogramas apresentavam, ao final dos picos, uma cauda acentuada, típica de problemas no recheio da coluna cromatográfica. Devido à este fato, foi feita uma análise comparando-se as microfotografias de todas FE imobilizadas durante 8 e 16 horas. O que se observou foi uma tendência, entre as FE imobilizadas

durante 8 horas, de formarem pequenos “aglomerados”, que não aparecem com tanta evidência nas FE imobilizadas durante 16 horas.

Quando a FE apresenta este tipo de aglomerados, o processo de enchimento é seriamente prejudicado. Segundo a equação de van Deemter (equação 3.9 apresentada no Capítulo III), um empacotamento das partículas de FE deficiente dentro da coluna causa uma maior dispersão no caminho que o soluto tem a percorrer. A Figura 5.21 ilustra esta situação.

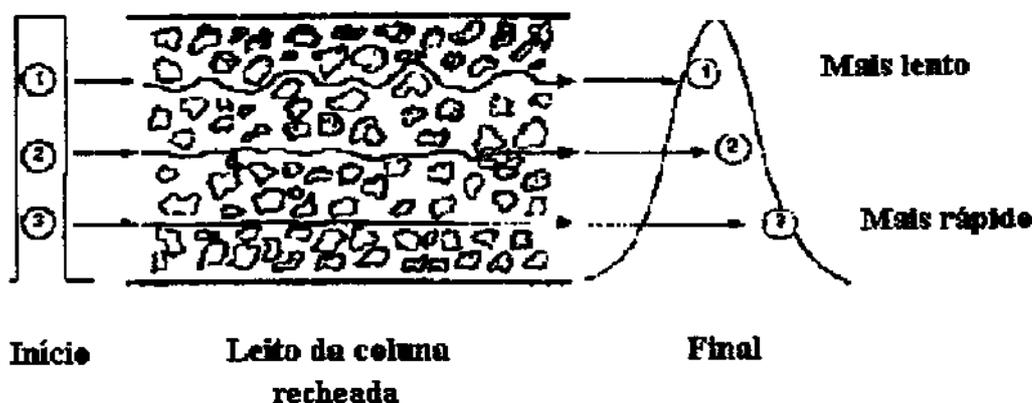


Figura 5.21: Efeito dos caminhos múltiplos percorridos pelo soluto na FE.

A formação destes aglomerados pode ser devida ao PMODS adsorvido apenas na superfície das partículas de sílica de forma irregular, fazendo com que haja regiões muito recobertas e outras praticamente sem polímero. Considerando-se que as cadeias dos polissiloxanos também apresentam um grau de afinidade entre si, esta irregularidade no recobrimento da superfície pode criar áreas de maior interação entre partículas, formando os aglomerados.

Diante do comportamento de todos os suportes avaliados, pode-se dizer que as variáveis otimizadas para a metodologia de preparo de FE de sílica de poros grandes, estudados neste trabalho, com PMODS imobilizado são: carga de 50 % inicial de PMODS em suportes de sílica pré-tratada, temperatura de imobilização de 100 °C durante 16 horas.

### 5.3.3 - Comparação entre FE preparadas a partir de uma mesma metodologia

Com todas as variáveis de preparação de FE de sílicas de poros grandes fixadas, foi feita uma comparação entre os três suportes de sílica de 30 nm. Nesta comparação, apresentada na Tabela 5.9, todas as sílicas foram pré-tratadas e a imobilização das FE com carga inicial de 50 % de PMODS foi feita a 100 °C, durante 16 horas. Em seguida, todas as FE foram extraídas com metanol e clorofórmio, antes do enchimento das colunas. O processo de enchimento foi feito logo após a extração da FE.

Tabela 5.9: Parâmetros cromatográficos obtidos com as FE preparadas com PMODS sobre os três suportes de sílica de 30 nm com carga inicial de 50% e imobilização a 100 °C por 16 horas.

Suporte	N/L <sup>a</sup>	h <sup>a,b</sup>	As <sup>a</sup>	%C
Astrosil <sup>c</sup>	51300	3,9	1,6	11,2
Rainin	58800	5,7	1,7	11,6
Nucleosil	54900	2,6	1,6	12,4

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

<sup>b</sup> Calculado:  $h=L/(N \times d_p)$ , utilizando o diâmetro de partícula ( $d_p$ ) nominal do fabricante

<sup>c</sup> FE com enchimento realizado a uma pressão de 34,5 MPa

Os resultados cromatográficos da FE preparada a partir da sílica Rainin ficaram um pouco abaixo da eficiência esperada, provavelmente devido à dispersão no tamanho médio das partículas que, nominalmente, é descrito pelo fabricante como sendo de 3 µm. Os melhores resultados em termos de carga de PMODS foram apresentados pela FE de sílica Nucleosil 7 µm, embora esta apresente um diâmetro de partícula maior e um volume de poro intermediário entre as outras duas sílicas.

Na Tabela 5.10 está apresentada uma outra comparação entre as FE das três sílicas feita utilizando-se a mistura teste 2 (proposta no Capítulo III) para se avaliar a especificidades destas colunas frente à compostos neutros, de caráter ácido e básico. A Figura 5.22 apresenta os cromatogramas resultantes desta avaliação.

Tabela 5.10: Parâmetros cromatográficos obtidos das FE preparadas com PMODS sobre os três suportes de sílica de 30 nm, com carga inicial de 50% e imobilização a 100 °C por 16 horas, utilizando-se a mistura teste 2.

FE de sílica	AS <i>N,N</i> -dimetilanilina	AS fenol	$\alpha_{hidfb.}$	%C
Astrosil	1,8	1,8	2,2	11,2
Rainin	2,3	1,9	2,2	11,6
Nucleosil	1,7	2,0	2,2	12,4

A assimetria para o composto *N,N*-dimetilanilina em todas FE está muito próxima dos valores aceitos para assimetria de compostos básicos (silanofilicidade), em colunas cromatográficas que está na faixa de 0,9 a 1,6<sup>102</sup>. Isto indica que a metodologia utilizada conseguiu recobrir a superfície de sílica com PMODS de maneira satisfatória, ou seja, o acesso do composto básico para interagir com os silanóis livre do suporte é restrito. Além disto a seletividade hidrofóbica, observada pelo fator de separação entre os compostos neutros,  $\alpha_{hidfb.}$  mostra que as FE preparadas através da metodologia proposta apresentam uniformidade quanto ao caráter apolar independentemente das características do suporte de sílica e de quantidade de polímero fixada. O composto fenol apresenta também altos valores de assimetria em parte porque o par uracil/fenol não apresenta uma boa resolução. Outro fator que pode estar elevando a assimetria do fenol é possibilidade deste composto estar interagindo com a FE através de ligações de hidrogênio.

Foram feitas também análises termogravimétricas para avaliar todas as FE de 30 nm imobilizadas durante 8 e 16 horas. As curvas termogravimétricas, apresentadas na Figura 5.23, mostram que as FE tiveram uma perda de massa acentuada entre 290 e 550 °C, que está relacionada com a degradação térmica do PMODS. A estabilidade térmica das FE é semelhante mas o padrão de perda de massa, apresentado na Tabela 5.11, confirma as singularidades de cada suporte de sílica.

Tabela 5.11: Perda de massa durante a análise termogravimétrica de FE de diferentes sílicas de 30 nm com PMODS imobilizado durante 8 e 16 horas.

	Perda de Massa (%)	
	8 horas	16 horas
Astrosil 5 $\mu$ m	10,5	14,4
Rainin 3 $\mu$ m	8,4	10,9
Nucleosil 7 $\mu$ m	9,5	12,3

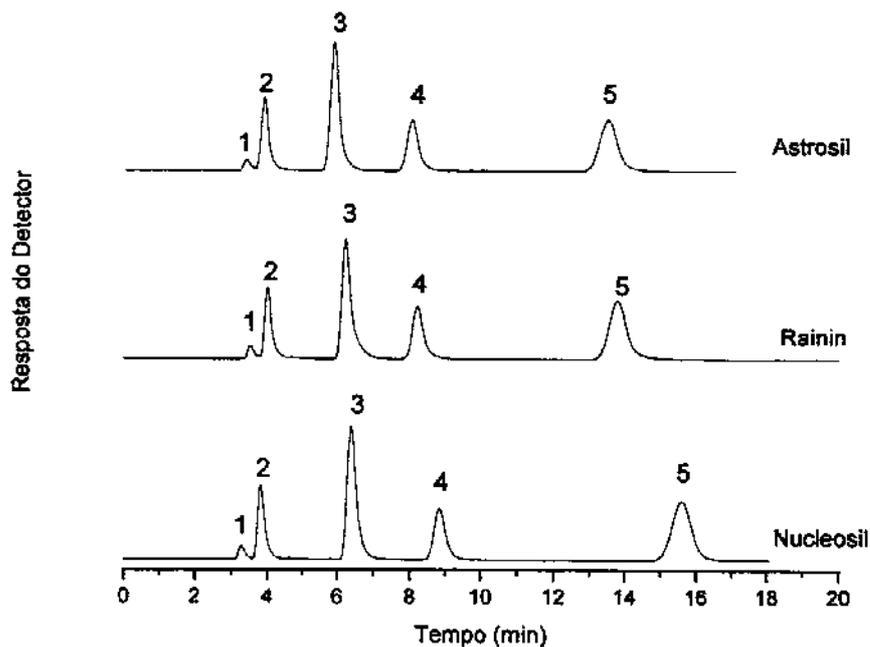


Figura 5.22: Cromatogramas das separações da mistura 2 utilizando as FE preparadas com PMODS sobre os três suportes de sílica de 30 nm com carga de 50% e imobilização a 100 °C por 16 horas. (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteño. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão 0,2 mL min<sup>-1</sup>, volume de injeção 5 µL, detecção em UV, 254 nm.

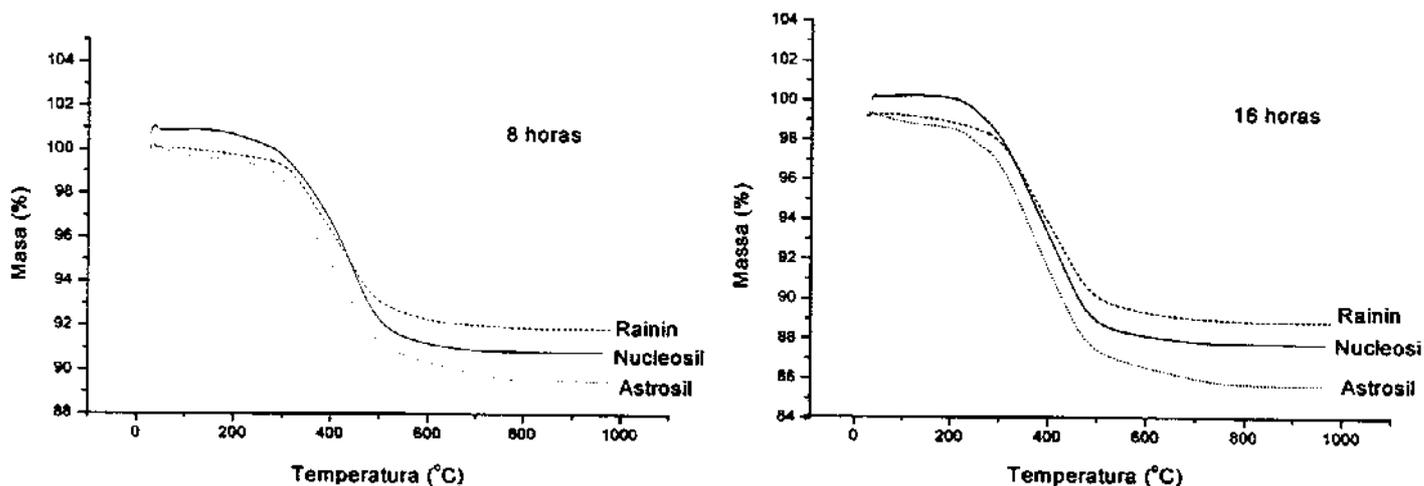


Figura 5.23: Termogramas (sob atmosfera inerte) de FE preparadas com sílicas de poros grandes imobilizadas durante 8 e 16 horas. A carga foi de 50 % de PMODS inicial, as amostras utilizadas foram as recuperadas após enchimento das colunas cromatográficas.

Tanto para as FE imobilizadas durante 8 horas quanto para as de 16 horas, o padrão de perda de massa seguiu as características físicas de cada suporte, ou seja, o suporte de maior área superficial, a sílica Astrosil, apresentou a maior perda de massa. Na seqüência, a sílica Nucleosil 7 µm apresentou maior perda de massa que a sílica Rainin 3 µm.

Nesta comparação também ficou claro que 16 horas de imobilização do polímero é o ideal para preparar FE de sílicas de poros grandes. Isto porque a quantidade de polímero PMODS e a qualidade de sua distribuição no suporte, seja na superfície ou no interior dos poros, é dependente também do tempo de aquecimento e não apenas das características físicas da sílica, como o volume de poros e a área específica.

#### **5.3.4 - Exemplo de aplicação prática de uma FE com sílica de poros grandes imobilizada termicamente**

A partir da comparação entre as FE preparadas nesta parte do trabalho, preparou-se uma coluna cromatográfica de 150 x 3,9 mm contendo a FE Nucleosil, 7 µm com PMODS (carga inicial de 50 %), imobilizada a 100 °C durante 16 horas, para apresentar um exemplo prático de sua aplicação.

##### **5.3.4.1 - Separação de carotenóides**

Carotenóides são tetraterpenos encontrados em várias formas no reino vegetal, são hidrocarbonetos apolares mas também se apresentam na forma polar quando estas moléculas estão oxigenadas, além de se apresentarem junto à suas formas isoméricas *cis* e *trans*. Para o estudo da variedade de suas propriedades bioquímicas, são necessários a separação e isolamento dos carotenos individualmente. Estas separações são atualmente feitas a partir de CLAE, com muitas variáveis a serem investigadas, como tipo de FE, fase móvel, temperatura e o modo cromatográfico (normalmente são realizadas separações em gradiente).

As folhas de vegetais estão entre as fontes mais ricas em carotenóides, mundialmente conhecidos. Entre elas as espécies de alface são as únicas que também apresentam um carotenóide específico: a lactucaxantina. A separação dos carotenóides da folha de alface é descrita na literatura e apresenta, uma metodologia cromatográfica específica já comprovada<sup>133</sup>. A Figura 5.24 apresenta a comparação de uma separação de carotenóides presentes em folhas de alface realizada em uma coluna

com a FE imobilizada e em coluna comercial de FE quimicamente ligada tipo C18. A separação foi feita segundo uma metodologia de separação por gradiente já desenvolvida para colunas comerciais tipo C18 no Laboratório de Carotenóides do Departamento de Ciência dos Alimentos da Engenharia de Alimentos - Unicamp.

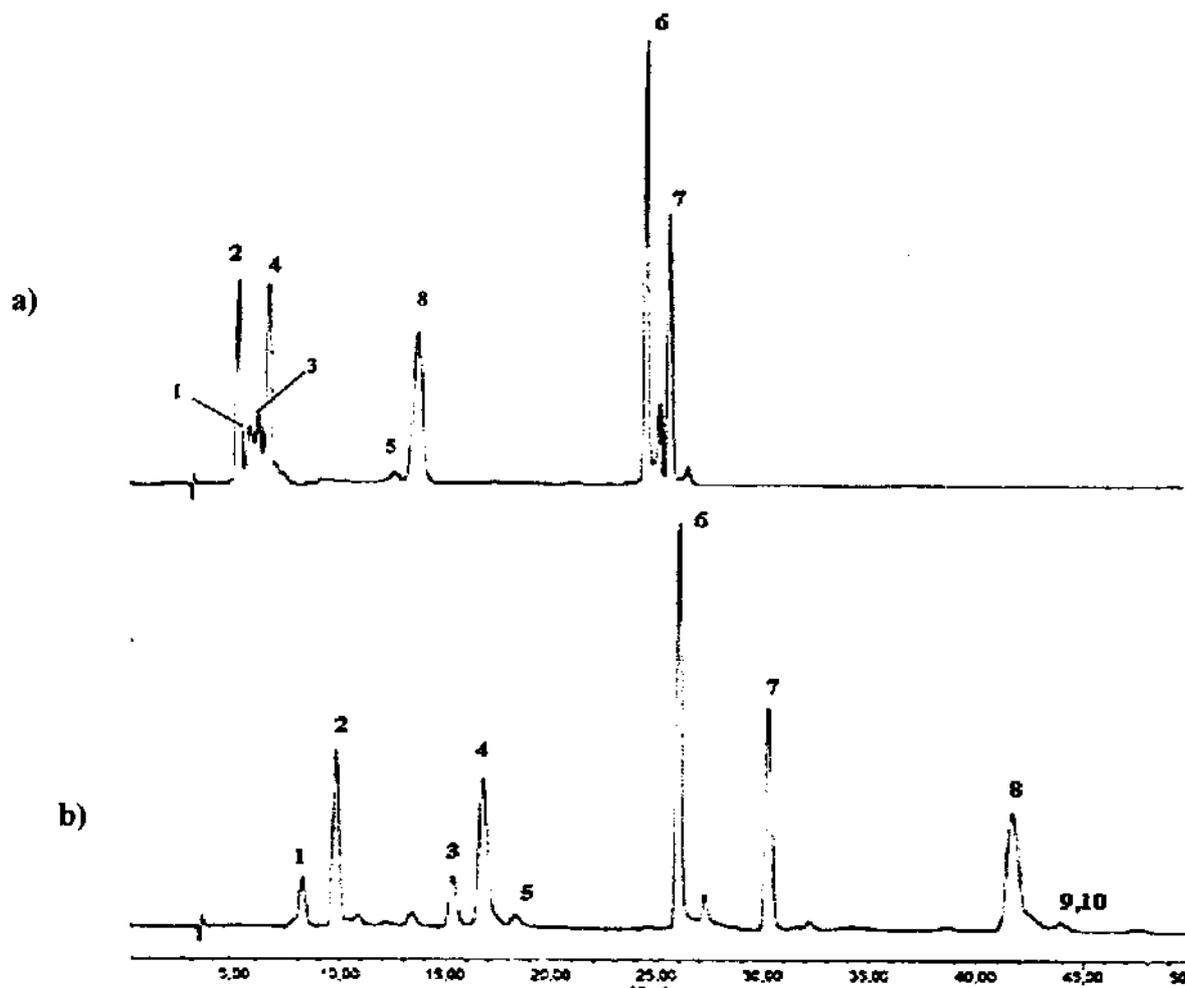


Figura 5.24: Cromatograma da separação de carotenóides presentes em folhas de alface utilizando a) coluna com FE preparada com sílica Nucleosil 7  $\mu\text{m}$  e PMODS (carga de 50 %) imobilizada a 100  $^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas de dimensões 150 x 3,9 mm e b) coluna com FE quimicamente ligada, Spherisorb ODS2, 3  $\mu\text{m}$  de dimensões 150 x 4,6 mm. (1) neoxantina, (2) violaxantina, (3) lactucaxantina, (4) luteína, (5) zeaxantina, (6) e (7) clorofilas, (8) trans- $\beta$ -caroteno, (9) e (10) cis- $\beta$ -caroteno. Condições cromatográficas: fase móvel trifásica contendo acetonitrila, metanol e acetato de etila (contendo 0,05 % de trietilamina). Gradiente de 95:5:0 a 60:20:20 com vazão de 0,5 mL min $^{-1}$ . Detecção com arranjo de diodos no  $\lambda$  max de cada composto.

Nesta comparação observa-se que, embora não haja resolução dos picos na linha de base quando se utilizou uma coluna de FE imobilizada, apenas três compostos não foram observados em comparação à separação feita em coluna comercial. Na FE imobilizada, o último composto que possui maior interação com a FE, *cis*- $\beta$ -caroteno, provavelmente ficou retido dentro da coluna pois não houve tempo suficiente para sua eluição dentro da programação pré-estabelecida do gradiente.

Este comportamento comprova que a FE imobilizada é capaz de separar os constituintes desta amostra porém, são necessários ajustes na metodologia empregada para que a separação cromatográfica seja mais eficiente e apresente resolução em todos os picos até a linha de base.

A partir destes resultados, pode-se dizer que a metodologia de preparo das FE com suportes de sílica de poros grandes proposta neste trabalho produz colunas cromatográficas com condições de serem aplicadas em amostras reais. Porém, as FE imobilizadas podem necessitar de ajustes das condições cromatográficas em relação aos métodos criados para colunas comerciais quimicamente ligadas.

#### **5.4. Considerações Gerais sobre sílicas de 30 nm**

Neste capítulo foram estudadas 3 variáveis - carga de PMODS, temperatura de imobilização e tempo de imobilização - envolvidas no preparo de FE de PMODS imobilizado sobre a superfície de três tipos de sílica de 30 nm.

Embora tenham sido utilizadas sílicas de áreas superficiais diferentes entre si, a exemplo das sílicas de 10 nm, também foi possível observar que as melhores condições de preparo e imobilização do PMODS independem do suporte escolhido. A seguir estão apresentadas as melhores condições de cada uma das variáveis e que podem ser aplicadas por extensão a qualquer suporte de sílica.

Carga de Polímero: Os resultados mostraram que o excesso de PMODS no início da incorporação do polímero foi extremamente prejudicial ao desempenho cromatográfico. Neste sentido, a carga inicial recomendada para trabalho é de, no máximo, 50% de PMODS na FE, podendo ser interessante uma avaliação com cargas de 30 e 40%.

Temperatura de Imobilização: Temperaturas inferiores a 100 °C provavelmente garantem maior integridade do polímero, porém não permitem que haja uma cobertura ideal de PMODS sobre a superfície da sílica que garantiria uma boa separação cromatográfica. Como foi visto no Capítulo IV, a

temperatura de 100 °C promoveu os melhores resultados cromatográficos para FE de sílica de poros de 30 nm.

Tempo de Imobilização: Por apresentar características superficiais muito diferentes, as sílicas de poros grandes, como as de 30 nm, necessitam de maior tempo de imobilização que permitirá uma boa distribuição do polímero sobre a superfície de sílica. Neste caso, o melhor tempo de imobilização de PMODS foi de 16 horas.

## *Capítulo VI – CONCLUSÕES*

Neste trabalho sobre preparo de FE estudaram-se dois tipos de suporte de sílica, diferentes de acordo com as características relativas ao tamanho de seus poros. Esta propriedade da sílica influencia diretamente na quantidade e estrutura de distribuição do modificador, neste caso o poli(metiloctadecilssiloxano) (PMODS), sobre a sua superfície.

Inicialmente, para se avaliar as FE, foi proposta uma mistura teste contendo compostos que pudessem caracterizar o comportamento das FE frente à analitos ácidos, básicos e neutros. Entre as vantagens desta mistura teste em relação às várias listadas na literatura estão: a possibilidade de se observar as propriedades da FE em apenas uma corrida cromatográfica, o fato de ser constituída de compostos estáveis e de fácil obtenção, além de não exigir fases móveis complexas ou agressivas.

Os resultados cromatográficos mostraram que a característica física não é o primeiro parâmetro a ser considerado na escolha de um suporte de sílica. Independentemente da metodologia de preparo, dos seis suportes de sílica utilizados neste trabalho, as FE preparadas com as sílicas Rainin, de 10 e de 30 nm, foram as que apresentaram os piores resultados cromatográficos na separação de compostos básicos. Análises de absorção atômica revelaram que a sílica Rainin apresentava altos teores de metais como sódio, ferro e alumínio. Estes contaminantes são responsáveis pelos silanóis livres atuarem como sítios de interações polares, impossibilitando separação de compostos básicos dentro dos valores aceitos na literatura.

Um tratamento feito em meio ácido, com o suporte de sílica Rainin, antes do preparo da FE, resultou em fases com um grande aumento de sua eficiência além de uma melhora considerável na simetria do pico de um composto básico, neste caso específico, a N,N-dimetilanilina. A queda na acidez dos silanóis livres também permitiu que mais sítios estivessem disponíveis para interações com a cadeia do PMODS, resultando em maior recobrimento da FE e um aumento de sua eficiência. Este comportamento cromatográfico confirmou que o tratamento ácido é eficiente na “limpeza” dos contaminantes metálicos das sílicas. Assim, pode-se afirmar que, o primeiro passo na escolha de um suporte de sílica para o preparo de FE deve contemplar, antes de qualquer procedimento, a avaliação da presença de metais.

Mesmo entre suportes de características físicas semelhantes ou próximas, foram encontradas diferenças na forma como o PMODS interagiu com as sílicas. Nas sílicas de 10 nm, o tamanho do poro pode limitar a entrada do PMODS. No caso da sílica Rainin, um pré-aquecimento do compósito polímero-sílica antes da imobilização contribuiu na distribuição do polímero dentro de seus poros, representando um aumento superior a 30% na eficiência cromatográfica das colunas. Mas, o mesmo procedimento aplicado à sílica Kromasil não trouxe nenhuma modificação nos parâmetros cromatográficos, indicando que o volume e a distribuição de poros característicos de cada suporte serão os principais responsáveis pela maneira como o PMODS se distribui na sílica e, portanto, na eficiência cromatográfica das colunas.

Neste sentido, a FE preparada com sílica Rainin de 10 nm, já imobilizada e sem excesso de polímero apresentou ainda um comportamento inesperado: amostras de FE que permaneceram em repouso por 180 dias exibiram um comportamento cromatográfico bem melhor em comparação ao mesmo lote utilizado para recheiar colunas logo após o seu preparo. Estes dados mostram que, mesmo após a imobilização, as moléculas de PMODS mantêm um certo grau de mobilidade, adotando conformações mais estáveis que favorecem o processo de transferência de massa durante a separação cromatográfica.

O grupo de sílicas de poros grandes também mostraram variações quanto a distribuição do PMODS sobre sua superfície, evidenciadas pelas eficiências das colunas cromatográficas. As eficiências foram menores do que as do grupo de sílicas com poros menores, justamente por apresentarem menor área superficial e, portanto, menor quantidade de PMODS imobilizado. Neste grupo, a sílica Astrosil de 30 nm, em particular, apresentou uma fragilidade mecânica muito acentuada, que resultou na quebra de suas partículas após o procedimento de enchimento visualizadas a partir de microscopia eletrônica de varredura. Entretanto, o mesmo não foi observado nas sílica Nucleosil e Rainin. Acredita-se que a profundidade e distribuição dos poros da sílica Astrosil contribuam para que as suas partículas, quando submetidas à altas pressões (no enchimento de colunas chega-se a 34,5 MPa), apresentem características de esferas “ocas”.

O tratamento térmico como procedimento para imobilização de polímero sobre a superfície da sílica mostrou-se eficiente, independentemente do tamanho dos poros do suporte, sendo possível repetir os resultados entre os mesmo lotes de FE. Observou-se que as variáveis tempo e temperatura de tratamento térmico são essenciais na distribuição do PMODS sobre a superfície de sílica. Os melhores

resultados foram observados para temperaturas até 120 °C, na qual o PMODS se distribui na forma de uma monocamada sobre a superfície da sílica.

Os melhores parâmetros das variáveis de preparo de FE para sílicas de poros menores foram imobilização a 100 °C durante 8 horas. Comparando-se as FE resultantes deste grupo de sílicas, em termos de eficiência (calculada através de prato reduzido,  $h$ ), todas apresentaram valores muito próximos. No caso das sílicas de poros grandes, os melhores resultados foram obtidos a esta mesma temperatura, 100 °C, mas, talvez devido à suas menores áreas superficiais, foram necessárias 16 horas para uma boa imobilização do PMODS.

A FE de sílica Rainin de 10 nm pré-tratada quando utilizada na separação de amostras reais, como pesticidas e fármacos, mostrou desempenho similar às FE comerciais nas mesmas condições cromatográficas. A FE de sílica Nucleosil de 30 nm também foi utilizada na separação de carotenóides presentes na alface. Embora esta FE não tenha atingido o mesmo desempenho de separação de uma coluna comercial nas mesmas condições cromatográficas, a separação mostrou que o aprimoramento das condições de um método analítico seria suficiente para atingir este objetivo.

Finalmente, pode-se considerar que o tratamento térmico, sem agentes radicalares, é um processo simples, repetível, de relativo baixo custo e com grande viabilidade na imobilização de polímeros em sílicas cromatográficas para obtenção de FE de alta eficiência em CLAE de fase reversa.

## *Capítulo VII – BIBLIOGRAFIA*

- [01]. Ettre, L. S., LC-GC N. Am., 21 (2003), 458-467.
- [02]. Collins, C. H., Braga, G. L., Bonato, P. S., "Introdução à Métodos Cromatográficos", 7 ed., Editora da Unicamp, Campinas-SP (1997).
- [03]. Majors, R. E., LC-GC Special on Current Issues in HPLC Technology, (May 1997), S8.
- [04]. Snyder, L. R., Kirikland, J.J., Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2 ed., Wiley, New York (1979).
- [05]. Buszewski, B., Jezierska, M., Wlniak, M. Berek, D., J. High Resolut. Chromatogr., 21 (1998), 267-281.
- [06]. Scott, R. P. W., Sílica Gel and Bonded Phases. Their Production, Properties and Uses in LC, Wiley, New York (1993).
- [07]. Grob, K., Grob, G., J. Chromatogr., 211 (1981) 243-246.
- [08]. Schomburg, G., Decke, A., Köhler, J., Bien-Vogelsang, U., J. Chromatogr., 282 (1983) 27-39.
- [09]. Anazawa, T. A., Jardim, I. C. S. F., J. Liq. Chromatogr., 17 (1994) 1265-1279.
- [10]. Anazawa, T. A., Carraro, F., Collins, K. E., Jardim, I. C. S. F., J. Chromatogr. 697 (1995) 159-164.
- [11]. Anazawa, T. A., Jardim, I. C. S. F., J. Liq Chromatogr. Rel. Technol., 21 (1998) 645-655.
- [12]. Collins, K. E., Granja, M. L. M., Pereira Filho, R. G., Anazawa, T. A., Jardim, I. C. S. F., Chromatographia, 45 (1997) 99-103.
- [13]. Bien-Vogelsang, U., Deege, G., Figge, H., Köhler, J., Schomburg, G., Chromatographia, 19 (1984) 170-179.
- [14]. Figge, H., Köhler, J., Schomburg, G., J. Chromatogr., 351 (1986) 393-408.
- [15]. Silva, M. C. H., Jardim, I. C. S. F., J. Chromatogr. Technol., 21 (1998) 2447-2458.
- [16]. Silva, R. B., Collins, C. H., J. Chromatogr. A, 845 (1999) 417-422.
- [17]. Silva, R. B., Collins, K. E., Collins, C. H., J. Chromatogr. A, 869 (2000) 136.
- [18]. Melo, L. F. C., Jardim, I. C. S. F., J. Chromatogr. A, 845 (1999) 423-431.

- [19]. Melo, L. F. C., Collins, C. H., Collins K. E., Jardim, I. C. S. F., *J. Chromatogr. A*, 869 (2000) 129-135.
- [20]. Nawrocki, J., *J. Chromatogr. A*, 779 (1997) 29-71.
- [21]. Dorsey, J. G., Cooper, W. T., *Anal. Chem.*, 66 (1994) 857-867.
- [22]. Meyer, Veronika R. , "Practical High-Performance Liquid Chromatography", Wiley, 1 ed. New York (1994).
- [23]. Unger, K. K., *Packings and Stationary Phases in Chromatography*, Marcel Dekker, New York v. 47 (1990).
- [24]. Cheng, Y. F. *LC-GC N. Am.*, 18 (2000) 1162-1172.
- [25]. Kirkland, J.J., *J. Chromatogr. Sci.*, 34 (1996) 309-313.
- [26]. Kirkland, J.J., Straten, M. A., Claessens, H. A., *J. Chromatogr. A*, 797 (1998) 111-120.
- [27]. Kirkland, J. J., Henderson, J. W., DeStefano, J. J., Straten, M. A., Claessens, J. *Chromatogr. A*, 762 (1997) 97-112.
- [28]. Stella, C., Rudaz, S., Veuthey, J. L., Tchaplá, A., *Chromatographia*, 53 (2001) S-113 --S-131.
- [29]. Neue, U. D., "HPLC Columns, Theory, Technology and Practice", Wiley-VCH, New York (1997).
- [30]. Haky, J. E., Vemulapalli, S., *J. Liq. Chromatogr.*, 13 (1990) 3111-3131.
- [31]. Cserhati, C., Forgacs, E., Frenesius *J. Anal. Chem.*, 358 (1997) 558-560.
- [32]. Nawrocki, J., Rigney, M. P., Mc Cormick, A., Carr, P. W., *J. Chromatogr. A*, 657 (1993) 229-282.
- [33]. Tonhi, E. Collins, K. E., Jardim, I. C. S. F., Collins, C. H., *Quim. Nova*, 25 (2002) 616-623.
- [34]. Li, J., Carr, P. W., *Anal. Chem.*, 68 (1996) 2857-2868.
- [35]. Winkler, J., Marmé S., *J. Chromatogr. A*, 888 (2000) 51-62.
- [36]. Silva, R. B., *Preparação de fases estacionárias para CLAE a partir de poli(metiloctilsiloxano) sobre sílica titanizada*, Tese de Doutorado, IQ-Unicamp, Campinas (2001).
- [37]. Fonseca. D. A., *Fases estacionárias reversas baseadas em sílica titanizada, com poli(metiloctilsiloxano) imobilizado por diferentes tratamentos*, Tese de Doutorado, IQ-Unicamp, Campinas (2003).
- [38] Silva, C. R., Airoidi, C., Collins, K. E., Collins, C. H., *LC-GC N. Am.*, 22 (2004) 96-102.
- [39]. Nobuhara, K., Kato, M., Nakamura, M., Takami, M., Kaneko, S., *J. Chromatogr. A*, 704 (1995) 45-53.

- [40]. Kubota, L. T., Gushikem, Y., de Castro, S., Moreira, J. C., *Colloids Surf.*, 57 (1991) 11-15.
- [41]. Castillo, R., Koch, B., Ruiz, P., Delmos, B., *J. Mater. Chem.*, 4 (1994) 903-906.
- [42]. Retuert, J., Quijada, R. Fuenzalida, V. M., *J. Mater. Chem.*, 10 (2000) 2818-2822.
- [43]. Viron, C., André, P., Dreux, M., Lafosse, M., *Chromatographia*, 49(1999) 137-141.
- [44]. Kriz, J., Adamcova, E., Knox, J. H., Hora, J. J., *J. Chromatogr. A*, 663 (1994) 151-161.
- [45]. Neue, U. D., Walter, T. H., Alden, B. A., Jiang, Z., Fisk, R. P., Cook, J. T., Glose, K. H., Carmody, J. L., Grassi, J. M., Cheng, Y. F., Lu, Z., Crowley, R. J., *Am. Lab.*, 31 (1999) 36.
- [46]. Cheng, Y.F., Walter, T. H., Lu, Z., Iraneta, P., Alden, B. A., Gendreau, C., Grassi, J. M., Carmody, J. L., O’Gara, J. E., Fisk, R. P., *LC-GC*, 18 (2000) 1162.
- [47]. Stevenson, R., *Am. Lab.*, 34 (2002) 4-8.
- [48]. Majors, R. E., *LC-GC*, 18 (2000) 1214-1227.
- [49]. Kirkland, J. J., *J. Chromatogr. Sci.*, 9 (1971) 206-214.
- [50]. Van der voort, P., Vansant, E. F., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 19 (1996) 2723-2752.
- [51]. Unger, K. K., Becker, N., Roumeliotis, P., *J. Chromatogr.*, 125 (1976) 115-127.
- [52]. Sander, L. c., Wise, S. A., *Anal. Chem.*, 56 (1984) 504-510.
- [53]. Young, C. S., Raymond, J. W., *LC-GC N. Am.*, 20, 5 (2002) 466-473.
- [54]. Majors, R. E., *LC-GC N. Am.*, 12 (1994) 508.
- [55]. Wirth, M. J., Fatunmbi, H. O., *Anal. Chem.*, 64 (1992) 2783-2786.
- [56]. Kirikland, J. J., Dilks Jr., C. H., Henderson, J. E., *LC-GC N. Am.*, 11 (1993) 290-297.
- [57]. Kirikland, J. J., Adams Jr. J. B., van Straten, M. A., Claessens, H. A., *Anal. Chem.* 70 (1998) 4344-4352.
- [58]. Buszewski, B. J., *J. Chromatogr.*, 538 (1991) 293-301
- [59]. Kobayashi, S., Tanaka, I., Shirota, O., Kanda, T., Ohtsu, Y., *J. Chromatogr. A*, 828 (1998) 75-81.
- [60]. Buszewski, B., Jaroniec, M., Giplin, R. K., *J. Chromatogr. A*, 668 (1994) 293-299.
- [61]. Ascah, T., Kallury, K. M. R., Szafranski, C. A., Corman, S. D., Liu, F., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 19 (1996) 3049-3073.
- [62]. O’Gara, J. E., Walsh, D. P., Alden, B. A., Casellini, P., Walter, T. H., *Anal. Chem.*, 71 (1999) 992-2997.
- [63]. Silva, C. R., Jardim, I. C. S. F., Airoidi, C., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 22 (1999) 103-108.
- [64]. Silva, C. R., “Novos agentes sililantes e suas aplicações na modificação da sílica gel cromatográfica”, Tese de Doutorado, IQ-Unicamp, Campinas (2002).

- [65]. Yu, X., Zhao, R., Liu, G. Q., *Chromatographia*, 52 (2000) 517-519.
- [66]. O'Gara, J. E., Alden, B. A., Walter, T. H., Petersen, J. S., Niederlander, C. L., Neue, U. D., *Anal. Chem.*, 67 (1995) 3809-3813.
- [67]. Wirth, H. J., Eriksson, K. O., Holt, P., Aguilar, M., Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr. A*, 646 (1993) 129-141.
- [68]. Kurganov, A., Davankov, V., Isajeva, T., Unger, K. K., Eisenbeiss, F., *J. Chromatogr. A*, 660 (1994) 97-111.
- [69]. Tani, K., Suzuki, Y., *J. Chromatogr. A*, 722 (1996) 129-134
- [70]. Pesek, J. J., Matyska, M. T., Ramakrishnan, J., *Chromatographia*, 44 (1997) 538-544.
- [71]. Petro, M., Berek, D., *Chromatographia*, 37, 9/10 (1993) 549-562.
- [72]. Bottoli, C. B. G., Chaudhry, Z. F., Fonseca, D. A., Collins, K. E., Collins, C. H., *J. Chromatogr. A*, 948 (2002) 121-128.
- [73]. Tonhi, E. "Preparação de colunas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência recheadas com polissiloxanos (C1, C8 e C14) imobilizados sobre partículas de sílica porosa de 5 µm.", Tese de Doutorado, IQ-Unicamp (2004).
- [74]. Bottoli, C. B. G., "Sorção, imobilização e extração de polissiloxanos em sílicas porosas para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Tese de Doutorado, IQ-Unicamp (2002).
- [75]. Lopes, N. P., "Fases estacionárias de sílica e polibutadieno para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, IQ-Unicamp (2004).
- [76]. Reeder, D. H., Li, J., Carr, P. W., Flickinger, M. C., McCormick, A., *J. Chromatogr. A*, 760 (1997) 71-79.
- [77]. Hanson, M., Eray, B., Unger, K., Neimak, A. V., Schmid, J., Albert, K., Bayer, E., *Chromatographia*, 35 (1993) 403-409.
- [78]. Okamoto, Y., Honda, S., Okamoto, I., Yuki, H., Murata, S., Noyori, R., Takaya, H., *J. Am. Chem. Soc.*, 103 (1981) 6971-6973.
- [79]. Engelhardt, H., Löw, H., Eberhardt, W., Maub, M., *Chromatographia*, 27, (1989), 535-543.
- [80]. Kurganov, A., Davankov, V., Isajeva, T., Unger, K., Eisenbeiss, F., *J. Chromatogr. A*, 660 (1994) 97-111.
- [81]. Zhao, J. Carr, P. W., *Anal. Chem.*, 72 (2000) 302-309.
- [82]. Pearson, D., Regnier, F. E., *J. Chromatogr.*, 225 (1983) 137-149.

- [83]. Anazawa, T. A., "Preparação, caracterização e avaliação de diferentes fases estacionárias reversas, tipo C8, para CLAE", Tese de Doutorado, IQ-Unicamp (1996).
- [84]. Schomburg, G., Köhler, J., Figge, H., Deege, A., Bien-Vogelsang, U., *Chromatographia*, 18 (1984) 265-274.
- [85]. Rigney, M. P., Funkenbusch, E. F., Carr, P. W., *J. Chromatogr.*, 499 (1990) 291-304.
- [86]. Li, J., Reeder, D. H., McCormick, A. V., Carr, P. W., *J. Chromatogr. A*, 791 (1997) 45-52.
- [87]. Rigney, M. P., Weber, T. P., Carr, P. W., *J. Chromatogr. A*, 484 (1989) 273-291.
- [88]. Cresswell, S. L., Haswell, S. J., *J. Chem. Educ.*, 78 (2001) 900-904.
- [89]. Bachmann, S., Melo, L. F. C., Silva, R. B., Anazawa, T. A., Jardim, I. C. S. F., Collins, K. E., Collins, C. H., Albert, K., *J. Chromatogr. A*, 1029 (2004) 43-48.
- [90]. Kapor, M. A., "Preparação de Fases Estacionárias SiO<sub>2</sub> (PMOS), Sorvidas e Imobilizadas por Microondas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Dissertação de Mestrado, IQ-Unicamp (2001).
- [91]. Morais, L. S. R., "Preparação de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a partir da Sílica Titanizada e Polibutadieno", Dissertação de Mestrado, IQ-Unicamp (2003).
- [92]. Schomburg, G., Husmann, H., Ruthe, S., Herrazi, M., *Chromatographia*, v. 15, 9 (1982) 599-615.
- [93]. Que, W. A.; Hastings, C. R.; Kapila, S., *J. Chromatogr.*, 77 (1973) 200-307.
- [94]. Lai, G.; Muhleck, U.; Nicholson, G. J.; Schmid, J.; Bayer, E., *Chromatographia*, 32 (1991) 241-247.
- [95]. Petsev, N. D.; Pekov, G. I.; Alexandrova, M. D.; Dimitrov, C., *Chromatographia*, 20 (1985) 228-230.
- [96]. Ohmacht, R., Kele, M., Matus, Z., *Chromatographia*, 28 (1989) 19-23.
- [97]. Collins, K. E., Sá, A., L. A., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., *Chromatographia*, 53 (2001) 661-664.
- [98]. Engelhardt, H. Arangio, M., Lobert, T., *LC-GC N. Am.*, 15 (1997) 856-866.
- [99]. Engelhardt, H., Jungheim, M., *Chromatographia*, 29 (1990) 59-68
- [100]. Steffek, R.J., Woo, S. L., Weigand, R. J., Anderson, J. M., *LC-GC N. Am.*, 13 (1995) 720-726.
- [101]. Goldberg, A P., *Anal. Chem.*, 54 (1982) 342-345.
- [102]. Walters, M. J., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 70 (1987) 465-469.
- [103]. Wise, S. A., Sander, L. C., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 8 (1985) 248-255.

- [104]. Kimata, K., Iwaguchi, K., Orishi, S., Jinno, K., Eksteen, R., Hosoya, K., Araki, M., Tanaka, N., J. Chromatogr. Sci., 27 (1989) 721-728.
- [105]. Neue, U. D., Serowik, E., Iraneta, P., Alden, B. A., Walter, T. H., J. Chromatogr. A, 849 (1999) 87-100.
- [106]. Neue, U. D., Alden, B. A., Walter, T. H., J. Chromatogr. A, 849 (1999) 101-116.
- [107]. Euerby, M. R., Petersson, P., LC-GC Europe, v.13 (2000), 665-677.
- [108]. Mc Calley, J. Chromatogr., 828 (1998) 407-420.
- [109]. J. Jiskra, Cramers, C. A., Byelik, M., Claessens, H. A., J. Chromatogr. A, 862 (1999) 121-135.
- [110]. Claessens, H. A., Straten, M. A., Cramers, C. A., Jezierska, M., Buszewski, B., J. Chromatogr. A, 826 (1998) 135-156.
- [111]. Galusko, S. V., Chromatographia, 36 (1993) 39-42.
- [112]. Sander, L.C., Wise, S. A., Anal. Chem., 67 (1995) 3284-3292.
- [113]. Lanças, F. M., "Cromatografia em Fase Gasosa", Editora Acta, 1 ed., São Carlos (1993).
- [114]. Lough, W. J., Wainer, I., "High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice" Lough, W. J.; Wainer, I., Blackie, London (1996).
- [115]. Poole, C. F., Poole, S. K., - "Chromatography Today", Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1991).
- [116]. Snyder, L. R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., "Practical HPLC Method Development", 2 ed., Wiley, New York (1997).
- [117]. Nahum, A.; Horváth, C., J. Chromatogr., 203 (1981) 53-63.
- [118]. Braithwaite, A., Smith, F.J., "Chromatographic Methods", 4 ed., Chapman and Hall, London (1985).
- [119]. Rogers, S. D., Dorsey, J. G., J Chromatogr. A 892 (2000) 57-65.
- [120]. Boudreau, S. P., Cooper, W. T., Anal Chem., 61 (1989) 41-47.
- [121]. Zeigler, J. M., Fearon, F. W., "Silicon-Based Polymer Science", American Chemical Society, Washington, D. C. (1990).
- [122]. Vervoot, R. J. M., Debets, A. J. J., Claessens, H. A., Cramers, C. A., Jong, G. J., J. Chromatogr. A, 897 (2000) 1-22.
- [123]. Collins, K. E., Franchon, A. C., Jardim, I. C. S. F., Radovanovic, E., Gonçalves, M. C., LC-GC, 18 (2000) 106.

- [124]. Dvornic, P. R., Lenz, R. W., "High Temperature Siloxane Elastomers", Hütthig, Basel (1990).
- [125]. Albert, K., *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 215-224.
- [126]. Pursch, M., Sander, L.C., Albert K., *Anal. Chem. News and Features* (1999).
- [127]. Albert, K., Bachmann, S., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 39 (2000), 3486-3489.
- [128]. Brasil: Vendas em defensivos agrícolas de 1992 a 2003, Ministério da Agricultura; Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA\\_EM\\_NUMEROS\\_2003/4.3.XLS](http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA_EM_NUMEROS_2003/4.3.XLS)>. Acesso em 01/05/2005.
- [129]. Sena, M.M., Chaudhry, Z.F., Collins, C.H., Poppi, R.J., *J. Pharmaceutical Biomed. Anal.*, 36 (2004) 743-749.
- [130]. Tanaka N, Kimata K, Mikawa Y, Hosoya K, Araki T, Ohtsu Y, Shiojima Y, Tsuboi R, Tsuchiya H., *J Chromatogr. A*, 535 (1990) 13-31.
- [131]. Staroverov, S. M., Fadev, A. Y., *J. Chromatogr.*, 544 (1991) 77-98.
- [132]. Henry, R. A., *Am. Lab.*, v.34, n. 12 (2002) 25-31.
- [133]. Kimura, M., Rodriguez-Amaya, D. B., *Food Chem.*, 78 (2002) 389-398.