



UNICAMP

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
INSTITUTO DE QUÍMICA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

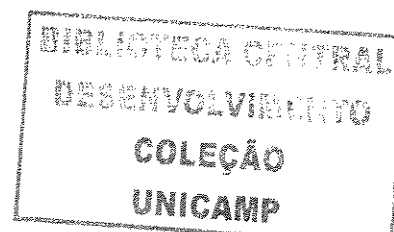
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**FASES ESTACIONÁRIAS DE POLI (METILOCTILSILOXANO)
SORVIDO E IMOBILIZADO POR TRATAMENTO TÉRMICO
SOBRE SÍLICAS DE DIFERENTES PUREZAS E COM
DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS**

Autora: Cristiane Lika Ogaya

Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

**Campinas
Novembro de 2004**



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	
	+UNICAMP
	Og1f
V	EX
TOMBO BC	53810
PROC.	16-86-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	18/10/05
Nº CPD	

ii

BIB ID - 366332

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Og1f

Ogaya, Cristiane Lika.

Fases estacionárias de poli(metiloctilsiloxano) sorvido e imobilizado por tratamento térmico sobre sílicas de diferentes purezas e com diferentes pré-tratamentos / Cristiane Lika Ogaya. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientadora: Carol Hollingworth Collins.

Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Cromatografia líquida. 2. Impurezas. 3. HPLC.
4. Ácido. I. Collins, Carol Hollingworth. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

“Dedico esta Dissertação ao meu pai
Massaru e à minha mãe Neusa, pois são
você os grandes responsáveis pela minha
educação, tanto profissionalmente
como da minha personalidade.
Se sou o que sou, é por causa de vocês.
Tenho a Fé em Deus de que ainda teremos
muitas realizações como esta na vida,
pois vocês me ensinaram a caminhar
com equilíbrio e sabedoria”

PRECE ÀS SETE DIREÇÕES GALÁCTICAS

Desde a Casa **Leste** da Luz
Que a sabedoria se abra em Aurora sobre nós
Para que vejamos as coisas com clareza

Desde a Casa **Norte** da Noite
Que a sabedoria amadureça entre nós
Para que conheçamos tudo desde dentro

Desde a Casa **Oeste** da Transformação
Que a Sabedoria se transforme em ação correta
Para que façamos o que tenha de ser feito

Desde a Casa **Sul** do Sol Eterno
Que a ação correta nos dê a colheita
Para que desfrutemos os frutos do ser Planetário

Desde a Casa **Superior** do Paraíso
Onde se reúnem a Gente das Estrelas e os Antepassados
Que suas bênçãos cheguem até nós agora

Desde a Casa **Interior** da TERRA
Que o pulsar do Coração de Cristal do Planeta
Nos abençoe com suas harmonias
Para que acabemos com as guerras

Desde a Fonte **Central** do GALÁXIA
Que está em todas as partes ao mesmo tempo
Que tudo se reconheça como
LUZ DE AMOR MÚTUO.

Salve a harmonia da mente e da natureza

A CULTURA GALÁCTICA VEM EM PAZ.

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente, à Deus, pela vida e o direcionamento.
- À minha Família e ao Ronaldo pelo amor, incentivo e apoio (de todos os tipos) para a realização deste trabalho, em todos os momentos.
- À Profa. Carol H. Collins, que esteve presente em cada linha deste trabalho, mas ao mesmo tempo, me deixando livre para a forma como desenvolvê-lo, possibilitando-me independência e segurança. O seu exemplo de convivência, competência, excelência, experiência, dinamismo, interesse, entusiasmo e simplicidade foram a base da minha formação profissional. Sinto-me honrada e privilegiada por ser sua aluna. Muito obrigada.
- Ao Prof. Kenneth e à Profa. Isabel pelas sugestões, colaboração e por estarem sempre abertos e dispostos a ajudar.
- Ao Daniel, pela amizade, as sugestões e as correções deste trabalho.
- Ao César, pela ajuda nos equipamentos e as sugestões extremamente relevantes.
- À Dania, por toda ajuda e acompanhamento no Laboratório.
- Aos amigos e colegas do LabCrom: Priscila, Nilva, Louise, Lais, Anízio, Marquinhos, Carla, Zahra, Josimara, Edivan, Lúcio Flávio, Karen, Allan, Leonardo, Marcelo, Joseane, Elias, Camila, Vanessa, Alessandra, Cintia e Mariza, pela agradável convivência no dia-a-dia.
- À Lúcia, pela amizade e as análises de NAA.
- Ao Prof. José Barone pelas análises de FAAS.
- Ao LNLS pela disponibilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.
- Ao Valtinho pela confecção das colunas.
- Aos funcionários do Instituto de Química, por todos os tipos de colaboração.
- À UNICAMP e ao Instituto de Química pela estrutura e as oportunidades de estudos e trabalhos.
- À CAPES e a FAPESP pelas Bolsas e o apoio financeiro.

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica:

Bacharelado em Química
Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP - Araraquara – SP, Brasil
Período: março/1997 a janeiro/2001

2. Estágio de Iniciação Científica

“Comportamento eletroquímico do nitroprussiato em eletrodo modificado com n-propilpiridínio silsesquioxano” - Laboratório de Eletroanalítica - Departamento de Química Analítica - Instituto de Química – UNESP - Araraquara – SP
Orientador: Prof. Dr. Nelson Ramos Stradiotto
Período: agosto/1999 a dezembro/2000

3. Cursos

“Análise Exploratória de Dados Químicos”
3º Escola de Verão em Quimiometria na PUC-Rio de Janeiro
Período: 02-06/fevereiro/2004. Duração: 10h

“Uso da calibração multivariada em Química”
3º Escola de Verão em Quimiometria na PUC-Rio de Janeiro
Período: 02-06/fevereiro/2004. Duração: 10h

“Meio ambiente e qualidade de vida: a busca da sustentabilidade”
12º Encontro Nacional de Química Analítica – São Luis – MA
Período: 14-17/outubro/2003. Duração: 8h

“Treinamento para operação do Microscópio Eletrônico de Varredura”
LNLS - Laboratório Nacional de Luz Síncroton – Campinas – SP
Período: 22/agosto/2003. Duração: 8h

“Construção e aplicação de biossensores”
Instituto de Química – UNESP - Araraquara – SP
Período: outubro/1999. Duração: 8h

“Caracterização de superfície de materiais por microscopia eletrônica”
Instituto de Química – UNESP - Araraquara – SP
Período: outubro/1999. Duração: 16h

RESUMO

FASES ESTACIONÁRIAS PARA CLAE DE POLI(METILOCTILSILOXANO) SORVIDO E IMOBILIZADO POR TRATAMENTO TÉRMICO SOBRE SÍLICAS DE DIFERENTES PUREZAS E COM DIFERENTES PRÉ-TRATAMENTOS

Autora: Cristiane Lika Ogaya

Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

Neste trabalho foram feitos estudos de otimização das condições de preparo de fases estacionárias para uso em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (CLAE-FR) de poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), tipo C-8, sorvido e imobilizado por tratamento térmico (em atmosfera inerte) na superfície das sílicas Kromasil e Rainin (esféricas, 5 μ m) sem pré-tratamentos ou pré-tratadas de diferentes maneiras: 1) tratadas com água em refluxo a 100 °C por 24 h, 2) tratadas em refluxo com HNO₃, NH₄OH, H₂SO₄, H₃PO₄, HCl, EDTA, 1-metil-piperidina, NaOH ou KOH em diferentes concentrações e tempos de reação ou 3) aquecidas entre 300 e 350 °C, seguido de tratamento com HNO₃, em refluxo. As fases estacionárias foram avaliadas por testes químicos, físicos, cromatográficos e de estabilidade em fases móveis em condições neutras ou agressivas. As melhores condições de preparo das fases estacionárias foram: quantidade suficiente de PMOS para encher os poros das sílicas mais um excesso de 10 %, 120 ou 140 °C por 8 h e 6 dias de repouso. Porém, as fases estacionárias preparadas com a sílica Rainin obtiveram fortes caudas para o pico do composto básico N,N-dimetilanilina, atribuído à maior quantidade de impurezas metálicas e grupos silanóis isolados mais ácidos, presentes na superfície dessa sílica. Por isso, os pré-tratamentos da sílica Rainin foram essenciais para reduzir a cauda no pico da N,N-dimetilanilina até valores aceitáveis mas, devido ao grande número de silanóis residuais ainda presentes nessas fases estacionárias, os parâmetros cromatográficos não foram repetíveis entre as corridas cromatográficas. O estudo da estabilidade das fases estacionárias mostrou que elas são estáveis à passagem de grande volume de fase móvel neutra e que as fases estacionárias preparadas com a sílica Rainin, mais impura e com a superfície mais ácida, são mais estáveis que as fases preparadas com a sílica Kromasil.

ABSTRACT

STATIONARY PHASES FOR HPLC OF THE POLI(METHYLOCTYLSILOXANE) SORBED AND IMMOBILIZED FOR THERMAL TREATMENT ON SILICAS OF DIFFERENT PURITIES AND WITH DIFFERENT PRE-TREATMENTS

Author: Cristiane Lika Ogaya

Supervisor: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

In this work the optimization of the conditions for preparation of stationary phases for use in reversed phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) were made using poli(methyloctylsiloxane) (PMOS), a C-8 type, sorbed and immobilized by thermal treatment (an inert atmosphere) onto the surface of the sílicas Kromasil and Rainin (spherical, 5µm) used without pre-treatments or pre-treated in different ways: 1) with water at 100 °C, for 24 h, 2) refluxing with HNO₃, NH₄OH, H₂SO₄, H₃PO₄, HCl, EDTA, 1-metil-piperidina, NaOH or KOH in different concentrations and times of treatment or 3) heating between 300 and 350 °C, an inert atmosphere, followed by treatment with refluxing HNO₃. The stationary phases were evaluated by chemical, physical, chromatographic and stability tests, using neutral or aggressive mobile phases. The results showed that the best preparation conditions for the stationary phases were: enough PMOS to fill the pores of the sílicas plus an excess of 10 %, with thermal treatment of 120 or 140 °C for 8 h. However, the stationary phases prepared with Rainin silica had significant tailing for the basic compound N,N-dimethylaniline, attributed the larger amount of metallic impurities in this silica and more acid isolated silanol groups on the surface of this silica. Therefore, the pre-treatments of the Rainin silica were essential to reduce the tailing of N,N-dimetilanilina to acceptable values. Due to the large number of residual silanols in these stationary phases, the chromatographic parameters did not show repetitivity between the chromatographic runs. The tests of stability of the stationary phases showed that they are stable to the passage large volumes of neutral mobile phase and that the stationary phases prepared with Rainin silica, more impure and with the more acid surface, were more stable than the stationary phases prepared with Kromasil silica.

LISTA DE ABREVIATURAS

As	Assimetria do pico
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-FR ou CLFR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
CLFN	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Normal
CP	Componente principal
CP / MAS / NMR	Técnica de polarização cruzada e rotação ao ângulo mágico em NMR
C-8	Fase estacionária com 8 carbonos em sua cadeia
C-18	Fase estacionária com 18 carbonos em sua cadeia
d	Diâmetro médio de poros
dp	Diâmetro médio de partículas
F	Fração de PMOS imobilizado sobre a sílica
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica por Chama
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
H	Altura do prato
IR	Espectroscopia no Infravermelho
k	Fator de retenção
L	Comprimento da coluna
LabCrom	Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida do Instituto de Química da UNICAMP
LNLS	Laboratório Nacional de Luz Síncrotron
$\overline{m}_{PMOS}$	Massa específica de PMOS ($g_{PMOS}/g_{sílica}$)
$\overline{m}_{PMOSretido}$	Massa específica de PMOS que ficou retido
MT1	Mistura teste um
MT2	Mistura teste dois
MT3	Mistura teste três

MT4	Mistura teste quatro
NAA	Análise por Ativação Neutrônica
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
N/m	Eficiência da coluna cromatográfica
PAH	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
PCA	Análise de componentes principais
pcz	Ponto de carga zero
PMOS	Poli(metiloctilsiloxano)
PMODS	Poli(metiloctadecilsiloxano)
Rs	Resolução
s	Desvio padrão experimental das respostas
s^2	Estimativa da variância para cada observação individual
s_p^2	Estimativa conjunta de variância
S_{efeito}	Desvio padrão de um efeito
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
T_f	Fator de alargamento de pico
TGA	Análise Termogravimétrica
t_M	Tempo de retenção de um composto não retido
t_R	Tempo de retenção do analito
Vc	Volumes de coluna
V_{efeito}	Variância de um efeito
vp	Volume específico de poros
$\bar{y}$	Média das respostas
$\bar{y}_+$	Média das respostas no nível (+)
$\bar{y}_-$	Média das respostas no nível (-)
$\alpha_{B/FpH\ 7,6}$	Fator capacidade de troca iônica em pH 7,6
$\alpha_{B/FpH\ 2,7}$	Fator capacidade de troca iônica em pH 2,7
$\alpha_{C/F}$	Fator da capacidade para formar ligação de hidrogênio
α_{CH2}	Fator de hidrofobicidade
$\alpha_{T/O}$	Fator de seletividade estérica

μ	Velocidade linear da FM
τ	Espessura da camada de polímero sobre a sílica
ν	Número de graus de liberdade
Δ	Aquecimento
% C	Porcentagem de carbono
% perda massa	Porcentagem de perda de massa
% PMOS inicial	Porcentagem de PMOS inicial (% PMOS / % sílica)

SUMÁRIO

SUMÁRIO	xxi
LISTA DE FIGURAS.....	xxvii
LISTA DE TABELAS.....	xxxix
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	1
1.2 - A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) ..	2
1.3 - A sílica.....	3
1.4 - A natureza da superfície da sílica	6
1.4.1 - O modelo físico-químico de Zhuravlev.....	7
1.4.2 - O modelo físico-químico da superfície da sílica amorfa: principais estágios [6]	7
1.5 - Atividade dos silanóis.....	13
1.6 - Acidez e impurezas metálicas.....	14
1.6.1 - Técnicas de reidroxilação e purificação da superfície da sílica.....	16
1.7 - Fases estacionárias quimicamente ligadas.....	17
1.8 - Estabilidade das fases estacionárias quimicamente ligadas.....	19
1.9 - Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados.....	20
1.9.1 - Distribuição do polímero sobre a sílica	24
1.10 - Avaliação de colunas cromatográficas.....	26
1.10.1 - A cauda nos picos e o fator de assimetria.....	30
1.10.2 - Avaliação cromatográfica das colunas.....	33
1.10.3 - O método de Tanaka para caracterização cromatográfica	37
1.10.4 - O uso da análise de componentes principais (PCA) como uma ferramenta para classificação de colunas cromatográficas [62]	39
1.11 - Colunas cromatográficas	41
1.12 - O enchimento de colunas cromatográficas	43
1.13 - Planejamento fatorial.....	45
1.13.1 - A análise da variância e o teste de hipóteses	47
1.13.2 - Planejamento fatorial fracionário	49

1.13.3 - Metodologia da superfície de resposta	50
2 - OBJETIVOS	51
3 - PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1 - Materiais	52
3.1.1 - Reagentes	52
3.1.2 - Equipamentos	53
3.1.3 - Vidraria	54
3.1.4 - Gás	54
3.1.5 - Suportes cromatográficos	54
3.1.6 - Fase estacionária líquida	55
3.2 - Procedimentos de pré-tratamentos das sílicas	55
3.3 - Preparo das fases estacionárias	56
3.4 - Otimização das condições de preparo das fases estacionárias	57
3.5 - Extração dos excessos de PMOS	59
3.6 - Colunas cromatográficas	60
3.7 - Polimento das colunas	61
3.8 - Preparo da suspensão de fase estacionária para o enchimento das colunas cromatográficas	62
3.9 - Procedimento de recheio das colunas cromatográfica com a fase estacionária	63
3.10 - A repetitividade de enchimento cromatográfico	65
3.11 - Condicionamento das colunas cromatográficas	67
3.12 - Preparo da fase móvel	67
3.13 - Avaliações cromatográficas das colunas	68
3.13.1 - Os parâmetros cromatográficos avaliados	69
3.14 - Estudo da estabilidade das fases estacionárias	70
3.15 - Caracterização química e física das sílicas e das FE preparadas	70
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1 - O poli(metiloctilsiloxano) (PMOS)	73
4.2 - Caracterizações química e física das sílicas Kromasil e Rainin	74

4.3 – Otimização das condições de preparo das fases estacionárias com a sílica Kromasil	84
4.3.1 – Planejamento Fatorial	84
4.3.2 - Efeito do tempo de repouso da FE após seu preparo	89
4.3.3 - Curva de van Deemter: otimização da velocidade linear da FM	90
4.3.4 - Cálculo dos efeitos	91
4.3.5 - Aperfeiçoamento das condições de preparo das fases estacionárias	93
4.4 – Otimização das condições de preparo das fases estacionárias com a sílica Rainin	95
4.4.1 – Planejamento Fatorial	95
4.4.2 - Curva de van Deemter: otimização da velocidade linear da FM	101
4.4.3 – Cálculo dos efeitos	102
4.5 – Caracterizações física e química das fases estacionárias	105
4.5.1 – Caracterização das fases estacionárias por análise elementar de carbono e análise termogravimétrica (TGA)	105
4.5.2 – Caracterização das fases estacionárias por Espectroscopia no Infravermelho (IR)	108
4.5.3 – Caracterização das fases estacionárias por CP / MAS ^{29}Si NMR	111
4.6 – Conclusões da Parte I	113
4.7 – Fases estacionárias preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratadas com água, ácido ou base	115
4.7.1 - Caracterização por CP / MAS ^{29}Si NMR das sílicas Kromasil após pré-tratamento com água, ácido ou base	115
4.7.2 - Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho (IR) das sílicas Kromasil pré-tratadas com água, ácido ou base	117
4.8 – Preparo de fases estacionárias com as sílicas Kromasil pré-tratadas com água, ácido ou base	118
4.8.1 – Fases estacionárias preparadas com 44 % PMOS inicial	118
4.8.2 – Fases estacionárias preparadas com 50 % PMOS inicial	120
4.8.3 – Fases estacionárias preparadas com 55 % PMOS inicial	122

4.8.4 – Caracterização física e química das fases estacionárias preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratadas com água, ácido ou base	125
4.9 - Otimização das condições de pré-tratamento da sílica Kromasil com HNO_3 , variando a concentração do ácido e o tempo de reação.....	127
4.9.1 –Planejamento fatorial.....	127
4.9.2 – Caracterização das fases estacionárias preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com HNO_3 em diferentes concentrações e tempos de reação	131
4.10 – Preparo de fases estacionárias com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento ácido.....	134
4.10.1 – Planejamento fatorial.....	134
4.10.2 – Caracterização por CP / MAS ^{29}Si NMR das sílicas Kromasil pré-tratadas com aquecimento seguido de tratamento com HNO_3	138
4.10.3 – Caracterização física e química das fases estacionárias preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento com HNO_3	140
4.11 – Relação entre a espessura da camada de polímero e o comportamento cromatográfico das fases estacionárias medida com as MT1 e MT2.....	142
4.12 – Preparo das fases estacionárias com a sílica Rainin pré-tratada com água, ácido ou base.....	147
4.12.1 – Caracterização cromatográfica com a MT1.....	149
4.12.2 – Cálculos da variância e a estimativa do desvio padrão experimental ...	156
4.12.3 – Caracterização cromatográfica com a MT2.....	157
4.12.3.1 - Fase estacionária preparada com a sílica Rainin pré-tratada com H_2O em refluxo por 24 h.....	157
4.12.3.2 – Fase estacionária preparada com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em refluxo por 8 h.....	159
4.12.3.3 – Fase estacionária preparada com a sílica Rainin pré-tratada com a base fraca 1-metil-piperidina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em refluxo por 8 h.....	160
4.12.4 - Resultados cromatográficos com a MT2 das FE recheadas seis meses após seu preparo.	164
4.13 – Considerações sobre os pré-tratamentos	170

4.14 – Caracterização cromatográfica com as MT3 e MT4.....	171
4.15 – Caracterizações físicas e químicas das sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácidos ou bases	181
4.15.1 – Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho (IR)	181
4.15.2 – Caracterização por CP / MAS ^{29}Si NMR	183
4.16 – Caracterizações física e química das fases estacionárias preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácidos ou bases.....	186
4.17 – Estudo da estabilidade das fases estacionárias.....	190
4.18 – Conclusões da Parte II	195
5 – CONCLUSÕES FINAIS.....	197
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	200

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica [6]...	6
Figura 2: Transição do estágio 1 para o estágio 2 ($T_1 = 25\text{ °C}$, sob vácuo) [6].	8
Figura 3: Energia de ativação para dessorção da água da superfície da sílica (E_d), como função da temperatura de pré-tratamento da sílica, sob vácuo: (a) região I, desidratação; (b) regiões IIa e IIb, desidroxilação [6].	9
Figura 4: Transição do estágio 2 para o estágio 3 ($T_2 = 190\text{ °C}$, sob vácuo) [6].	9
Figura 5: Transição do estágio 3 para 4 ($T_3 = 400\text{ °C}$, sob vácuo) [6].	10
Figura 6: Transição do estágio 4 para 5 ($T_4 \approx 900\text{ °C}$) [6].	11
Figura 7: Transição do estágio 5 para 6 ($T_5 \approx 1200\text{ °C}$) [6].	12
Figura 8: Concentração dos diferentes grupos silanóis na superfície da sílica em função da temperatura de pré-tratamento sob vácuo. 1: média da concentração total de grupos silanóis, 2: média da concentração de grupos silanóis isolados, 3: média da concentração de silanóis vicinais e 4: média da concentração de grupos silanóis geminais [6].	13
Figura 9: Esquema representativo de uma impureza metálica contida na matriz de sílica [2].	15
Figura 10: Massa específica de PMOS sobre a sílica Davisil, $\overline{M}_{\text{PMOS}}$ (massa de PMOS por grama de sílica), em relação à extração do excesso PMOS com solventes e a temperatura de imobilização térmica. A: sem extração, B: extração após a imobilização térmica e C,D: extração antes da imobilização térmica [35,41].	24
Figura 11: Representação esquemática de um polímero adsorvido em uma interface plana, mostrando a presença de "trains", "loops" e "tails" [57].	25
Figura 12: Modelo de adsorção no processo de auto-imobilização e imobilização de polímero sobre sílica [35].	26
Figura 13: Cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes [1].	26

Figura 14: Hipotética curva de van Deemter mostrando a relação entre eficiência e a velocidade linear média da FM [59].....	29
Figura 15: Exemplo de um pico cromatográfico [61].	30
Figura 16: Exemplos de picos com diferentes graus de assimetria (Figura modificada da referência 60).	31
Figura 17: Relações entre os componentes da coluna e o desempenho cromatográficos das FE [76].....	42
Figura 18: Forno vertical de aquecimento a altas temperaturas sob fluxo de nitrogênio.....	56
Figura 19: Sistema de extração dos excessos de PMOS da FE.....	60
Figura 20: Peças da coluna cromatográfica.....	61
Figura 21: Configuração do sistema utilizado no polimento das colunas cromatográficas [84].....	61
Figura 22: Sistema de enchimento de colunas.	63
Figura 23: Representação esquemática do sistema de enchimento de colunas cromatográficas.....	64
Figura 24: Estrutura molecular do poli(metiloctilsiloxano) (PMOS)	73
Figura 25: Espectro de IR do PMOS.	74
Figura 26: Espectros de IR das sílicas Kromasil e Rainin.	78
Figura 27: A) Espectro de CP-MAS ²⁹ Si NMR das sílicas Kromasil e Rainin. B) Espectro deconvoluído da sílica Kromasil.	80
Figura 28: Micrografia eletrônica da sílica Kromasil com aumento de 1000 vezes.	81
Figura 29: Micrografia eletrônica da sílica Rainin com aumento de 1000 vezes... ..	81
Figura 30: Micrografias eletrônicas da sílica Kromasil com aumento da ordem de 5000 vezes.....	82
Figura 31: Micrografias eletrônicas da sílica Rainin com aumento da ordem de 5000 vezes.....	83
Figura 32: Cromatogramas da MT1 (A) e da MT2 (B) obtidos dos ensaios do planejamento fatorial 2 ³ com a sílica Kromasil. O número nos cromatogramas corresponde ao número do ensaio do planejamento (Tabela 12). Condições	

cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v, F: 0,3 mL min ⁻¹ . MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.....	88
Figura 33: Cromatogramas da MT1 (A) e da MT2 (B) obtidos do ensaio número 5 do planejamento fatorial 2 ³ (Tabela 12) (a) logo após preparo da FE e (b) depois de 5 meses. Condições cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v (logo após preparo) e 70:30 v/v (depois de 5 meses), F: 0,3 mL min ⁻¹ . MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.....	90
Figura 34: Curva de van Deemter mostrando a relação entre a eficiência e a velocidade linear média da FM.....	91
Figura 35: Cromatogramas da MT1 (A) e da MT2 (B) obtidos dos ensaios de aperfeiçoamento das condições de preparo de FE com a sílica Kromasil. a) 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e b) 55 % PMOS inicial, 140 °C / 16 h. Condições cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v (a) e 70:30 v/v (b), F: 0,3 mL min ⁻¹ . MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.	95
Figura 36: Cromatogramas das MT1 (A) e MT2 (B) obtidas da FE preparada pelos ensaios do planejamento fatorial 2 ⁴⁻¹ com a sílica Rainin. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min ⁻¹ e 0,4 mL min ⁻¹ (ensaio nº 7). MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.	99
Figura 37: Curva de van Deemter construída com a FE preparada pelo ensaio nº 7 do planejamento fatorial 2 ⁴⁻¹	102
Figura 38: Espectros de IR da sílica Kromasil (a) e das FE preparadas com a sílica Kromasil pelos ensaios número 1, 3 e 8 (espectros b, c, e d respectivamente)	

do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 13) e de aperfeiçoamento: 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h (e).	108
Figura 39: Espectros no IR da sílica Rainin (a) e das FE preparadas com a sílica Rainin pelos ensaios número 3 (b), 4 (c) e 7 (d) do planejamento fatorial 2^{4-1} (Tabela 20).	110
Figura 40: A) Espectro de CP / MAS ^{29}Si NMR da FE preparada com a sílica Kromasil nas condições de 55 % carga inicial de PMOS, 140 °C / 16 h. B) Espectro de CP / MAS NMR de ^{29}Si da FE preparada com a sílica Rainin nas condições de 44 % PMOS inicial, 140 °C / 16 h e 4 dias de repouso.	111
Figura 41: Estrutura das espécies D^{2a} ($\text{D}^{2a'}$, $\text{D}^{2a''}$) e D'' e os deslocamentos químicos dos CP-MAS ^{29}Si NMR das FE contendo o PMOS sorvido e imobilizado nas paredes dos poros da sílica [35,37,41].	112
Figura 42: CP / MAS ^{29}Si NMR da sílica Kromasil pré-tratada com NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h.	115
Figura 43: Espectros de IR da sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratadas. A) Kromasil sem pré-tratamento, B) com H_2O / 24 h, C) HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h e D) NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h.	117
Figura 44: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratadas com: a: H_2O / 24 h, b: HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h e c: NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h. As condições de preparo das FE foram: 44 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min^{-1} . MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.	119
Figura 45: Cromatogramas da MT1 com as FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com: a: H_2O / 24 h e b: HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h. As condições de preparo das FE foram: 50 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min^{-1} . MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.	121

- Figura 46: Três primeiras corridas cromatográficas da MT2 obtida da FE preparada com a sílica Kromasil pré-tratada com a: H₂O / 24 h e b: HNO₃ 2,0 mol L⁻¹ / 15 h. Condições de preparo da FE: 50 % PMOS inicial 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno..... 121
- Figura 47: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratada com: a: H₂O / 24 h, b: HNO₃ 2,0 mol L⁻¹ / 15 h e c: NH₄OH 0,01 mol L⁻¹ / 4 h e d: NH₄OH 0,01 mol L⁻¹ / 8 h. As condições de preparo das FE foram: 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 124
- Figura 48: Caracterização por IR das FE preparadas com 55 % inicial, 120 °C / 16 h sobre a sílica Kromasil pré-tratada com A) H₂O / 24 h, B) HNO₃ 2,0 mol L⁻¹ / 15 h e C) NH₄OH 0,01 mol L⁻¹ / 4 h. 126
- Figura 49: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com HNO₃. Os cromatogramas a e b correspondem aos ensaios número 3 e 7, respectivamente, do planejamento fatorial 2² com ponto central. As condições de preparo das FE foram: 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 129
- Figura 50: Superfície de resposta do planejamento fatorial 2² com ponto central, construída a partir dos dados de eficiência do naftaleno. Os gráficos são os mesmos, apenas vistos de ângulos diferentes. 130
- Figura 51: Caracterização por IR das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com HNO₃ em diferentes concentrações de tempos de reação. O

- número no espectro corresponde ao número do ensaio do planejamento fatorial 2^2 com ponto central..... 133
- Figura 52: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas pelos ensaios do planejamento fatorial saturado. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno..... 136
- Figura 53: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas com as FE preparadas com 55 % PMOS inicial, 120 °C/ 20 h com a sílica sem pré-tratamento (a) e a sílica pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento hidrotérmico (ensaio nº 2 do planejamento fatorial saturado) (b). Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno..... 137
- Figura 54: CP / MAS ²⁹Si NMR da sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento hidrotérmico ácido (ensaio número 6 do planejamento fatorial saturado). 138
- Figura 55: A) Espectros de CP / MAS ²⁹Si NMR da FE preparada com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento hidrotérmico ácido (ensaio nº 6 do planejamento fatorial saturado)..... 141
- Figura 56: Comportamento cromatográfico da MT1 com FE preparadas com o PMOS sorvido e imobilizado por tratamento térmico por 4 h em diferentes temperaturas nos poros da sílica Davisil (partículas irregulares de 13 µm de tamanho de partículas). MT1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno [42]..... 145
- Figura 57: Comportamento cromatográfico da MT1 com FE preparadas com o PMODS (polimetiloctadecilsiloxano, tipo C-18) sorvido e imobilizado por tratamento térmico por 4 h em diferentes temperaturas nos poros da sílica Davisil (partículas irregulares de 13 µm de tamanho de partículas). MT1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno [42]..... 146

- Figura 58: Comportamento cromatográfico da MT1 com FE preparadas com o PMOS sorvido e imobilizado por tratamento térmico por 4 h em diferentes temperaturas nos poros da sílica Kromasil modificada com óxido de titânio. MT1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno [53,95]. 147
- Figura 59: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H₂O / 24 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. 151
- Figura 60: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. 151
- Figura 61: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com HCl 0,01 mol L⁻¹ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. 152
- Figura 62: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com HNO₃ 0,01 mol L⁻¹ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. 152
- Figura 63: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H₃PO₄ 0,01 mol L⁻¹ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno; 153

- Figura 64: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. 153
- Figura 65: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com EDTA $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. 154
- Figura 66: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com 1-metil-piperidina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. 154
- Figura 67: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. 155
- Figura 68: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com KOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno. 155
- Figura 69: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2O / 24 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno..... 158

- Figura 70: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 160
- Figura 71: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com 1-metil-piperidina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h (coluna 1). Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 161
- Figura 72: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 163
- Figura 73: FE preparada com a sílica Rainin pré-tratada com H_2O $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 166
- Figura 74: FE preparada com a sílica Rainin pré-tratada com HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 167
- Figura 75: FE preparada com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 168

- Figura 76: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_3PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. 169
- Figura 77: Cromatogramas das MT3. FE preparadas com as sílicas Kromasil, a: sem pré-tratamento, b: pré-tratada com HNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (55 % PMOS inicial, 120°C / 16 h) e c: Δ - seguido de HNO_3 (ensaio 2, Tabela 33). FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento, d: ensaio 3, Tabela 19 e e: ensaio 7, Tabela 19. (1) uracil, (2) fenol e (3) cafeína em FM metanol / água 30:70 v/v. 173
- Figura 78: B) Cromatogramas da MT4. FE preparadas com as sílicas Kromasil, a: sem pré-tratamento, b: pré-tratada com HNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (55 % PMOS inicial, 120°C / 16 h) e c: Δ - seguido de HNO_3 (ensaio 2, Tabela 33). FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento, d: ensaio 3, Tabela 19 e e: ensaio 7, Tabela 19. (1) uracil, (2) fenol e (3) benzilamina em FM 30:70 v/v metanol / tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,7. 174
- Figura 79: Cromatogramas da MT4. FE preparadas com as sílicas Kromasil, a: sem pré-tratamento, b: pré-tratada com HNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (55 % PMOS inicial, 120°C / 16 h) e c: Δ - seguido de HNO_3 (ensaio 2, Tabela 33). FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento, d: ensaio 3, Tabela 19 e e: ensaio 7, Tabela 19. (1) uracil, (2) fenol e (3) benzilamina em FM 30:70 v/v metanol / tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,6. 175
- Figura 80: Espectros de IR das sílicas Rainin sem pré-tratamento e pré-tratadas com água, ácidos e bases. A sílica Rainin foi refluxada a 100°C por 24 h com água e por 8 h com os ácidos e as bases nas concentrações de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ 182
- Figura 81: Relação entre a quantidade relativa de silanóis isolados (ou vicinais) na superfície das sílicas e a % C contida na FE. 185

Figura 82: Caracterização por IR das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratadas com ácido e bases.	188
Figura 83: Espectros de CP-MAS ^{29}Si NMR das FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas com A) H_2O / 24 h, B) HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h e C) NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h em refluxo a 100°C	190
Figura 84: Avaliação da estabilidade da FE preparada com a sílica Kromasil sem pré-tratamento (55 % PMOS inicial, 140°C / 16 h) em FM neutra metanol / água 70:30 v/v em função dos parâmetros cromatográficos de eficiência, assimetria e fator de retenção do naftaleno.	192
Figura 85: Avaliação da estabilidade das FE preparada com a sílica Kromasil pré-tratada com HNO_3 (55 % PMOS inicial, 120°C / 16 h) e com aquecimento seguido de tratamento com HNO_3 e a sílica Rainin sem pré-tratamento (ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1} , Tabela 19), em condições agressivas, em função dos parâmetros cromatográficos de eficiência, assimetria e fator de retenção do naftaleno.	194

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físicas da sílica Nucleosil [5].....	5
Tabela 2: Influência do pH da FM na estabilidade das FE quimicamente ligadas baseadas em sílica [11].....	20
Tabela 3: Valores dos fatores de assimetria (A_s) e alargamento dos pico (T_r) [60]32	
Tabela 4: Relações de sinais para um planejamento fatorial 2^3 [83].....	46
Tabela 5: Relação entre as colunas de sinais.....	50
Tabela 6: Conversão da porcentagem de PMOS em massa específica de PMOS contido nas FE preparadas com a sílica Kromasil.....	58
Tabela 7: Volume dos poros e massa específica de PMOS necessária para encher os poros das sílicas.....	59
Tabela 8: Medidas de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros das sílicas.....	75
Tabela 9: Conteúdo de impurezas metálicas contidas nas sílicas Kromasil e Rainin feitas por FAAS ($\mu\text{g} / \text{g}$).....	75
Tabela 10: Conteúdo de impurezas metálicas contidas nas sílicas Kromasil e Rainin feitas por NAA ($\mu\text{g} / \text{g}$).....	76
Tabela 11: Níveis para o planejamento fatorial 2^3 para otimização das condições de preparo das FE com a sílica Kromasil.....	85
Tabela 12: Ensaios do planejamento fatorial 2^3	86
Tabela 13: Resultados cromatográficos calculados das MT1 e MT2 obtidos das FE preparadas pelo planejamento fatorial 2^3 . Condições cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$	86
Tabela 14: Parâmetros cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 com a coluna nº 5 do planejamento fatorial 2^3 logo após o preparo e depois de 5 meses. Condições cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v (logo após preparo) e 70:30 v/v (depois de 5 meses), F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$	89
Tabela 15: Efeitos calculados a partir da eficiência do naftaleno (dados referentes à Tabela 13).....	92

Tabela 16: Efeitos calculados a partir da eficiência da N,N-dimetilanilina (dados referente à Tabela 13).....	93
Tabela 17: Parâmetros cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 nas FE preparada com as novas condições de preparo das FE com a sílica Kromasil. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min ⁻¹	94
Tabela 18: Níveis do planejamento fatorial 2 ⁴⁻¹ com a sílica Rainin.....	97
Tabela 19: Ensaios do planejamento fatorial 2 ⁴⁻¹	97
Tabela 20: Resultados cromatográficos calculados para as FE preparadas com a sílica Rainin pelos ensaios do planejamento fatorial 2 ⁴⁻¹ . Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min ⁻¹ ou 0,4 mL min ⁻¹ (ensaio nº 7).....	100
Tabela 21: Efeitos calculados a partir da eficiência do naftaleno (dados referente à Tabela 20).....	102
Tabela 22: Efeitos calculados a partir da assimetria do pico do composto básico N,N-dimetilanilina (dados referentes à Tabela 20).....	103
Tabela 23: % C, % perda massa obtida por TGA, quantidade de PMOS retido e espessura da camada formada (τ) de algumas FE preparadas com a sílica Kromasil e Rainin.....	107
Tabela 24: Quantidades relativas dos silanóis em relação aos grupos siloxano da superfície da sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada com H ₂ O / 24 h, HNO ₃ 2,0 mol L ⁻¹ / 15 h ou NH ₄ OH 0,01 mol L ⁻¹ / 4 h obtidas por CP / MAS ²⁹ Si NMR.....	116
Tabela 25: Resultados cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 obtidos das FE preparadas com a sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada com H ₂ O / 24 h, HNO ₃ 2,0 mol L ⁻¹ / 15 h ou NH ₄ OH 0,01 mol L ⁻¹ / 4 h. As condições de preparo da FE foram: 44 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 60:40 v/v (sílica sem pré-tratamento) e FM metanol / água 70:30 v/v (sílicas pré-tratadas), F: 0,3 mL min ⁻¹	118
Tabela 26: Resultados cromatográficos calculados para a MT1 e a MT2 obtidos das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com H ₂ O / 24 h ou HNO ₃	

2,0 mol L ⁻¹ / 15 h. As condições de preparo das FE foram: 50 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v e F: 0,3 mL min ⁻¹	120
Tabela 27: Resultados cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 obtidos das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com H ₂ O / 24 h, HNO ₃ 2,0 mol L ⁻¹ / 15 h, NH ₄ OH 0,01 mol L ⁻¹ / 4 h e NH ₄ OH 0,01 mol L ⁻¹ / 8 h. As condições de preparo das FE foram 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metano / água 60:40 (sílica sem pré-tratamento) e 70:30 v/v (sílicas pré-tratadas), F: 0,3 mL min ⁻¹	123
Tabela 28: % C, quantidade de PMOS retido, espessura da camada e % perda massa obtida por TGA das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com água, ácido e base com 55 % PMOS inicial.	125
Tabela 29: Fatores e níveis do planejamento fatorial 2 ² com ponto central.	128
Tabela 30: Parâmetros cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 nas FE preparadas pelo planejamento fatorial 2 ² com ponto central. Condições de preparo da FE: 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metano / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min ⁻¹	128
Tabela 31: % C, % perda massa obtida por TGA, quantidade de PMOS retido e espessura da camada polimérica de algumas FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com ácido.....	132
Tabela 32: Níveis do planejamento fatorial saturado com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de lavagem ácida.	134
Tabela 33: Ensaios do planejamento fatorial saturado.....	135
Tabela 34: Parâmetros cromatográficos calculados para a separação da MT1 e MT2 com alguns ensaios do planejamento fatorial saturado. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min ⁻¹	135
Tabela 35: Quantidades relativas dos grupos silanóis em relação aos grupos siloxano da superfície da sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada com aquecimento a altas temperaturas seguido de tratamento hidrotérmico ácido.	139

Tabela 36: % C, quantidade de PMOS retido, espessura da camada e % perda massa obtida por TGA de algumas FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento com HNO_3	140
Tabela 37: % PMOS inicial para o preparo de FE com a sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada.....	142
Tabela 38: Resultados cromatográficos calculados com a MT1 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2O em refluxo por 24 h e ácidos ou bases na concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ por 8 h em refluxo. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$	150
Tabela 39: Cálculos da variância e a estimativa do desvio padrão a partir da eficiência do naftaleno para alguns experimentos feitos com a sílica Rainin pré-tratada com ácidos ou bases.....	156
Tabela 40: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2O / 24 h.	158
Tabela 41: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h.	159
Tabela 42: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com a base fraca 1-metil-piperidina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h.	161
Tabela 43: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h.....	163
Tabela 44: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2O / 24 h. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE.	166
Tabela 45: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE.....	167
Tabela 46: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE.....	168

Tabela 47: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_3PO_4 0,01 mol L^{-1} / 8 h. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE.....	169
Tabela 48: Parâmetros cromatográficos calculados da MT3 (FM metanol / água 30:70 v/v) e MT4 em pH 2,7 e 7,6 (FM 30:70 metanol / tampão fosfato 0,02 mol L^{-1}). F: 0,3 mL min^{-1} (para a sílica Kromasil) e 1,0 mL min^{-1} (para a sílica Rainin).....	172
Tabela 49: Parâmetros cromatográficos calculados da MT3 (FM metanol / água 30:70 v/v) e MT4 em pH 2,7 e 7,6 (Condições cromatográficas: FM 30:70 metanol / tampão fosfato 0,02 mol L^{-1}). F: 1,0 mL min^{-1}	178
Tabela 50: Resultados cromatográficos calculados da FE preparada com a sílica Rainin em uma das colunas do ensaio nº 3 do planejamento fatorial 2^{4-1} (Tabela 19). Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min^{-1}	180
Tabela 51: Resultados cromatográficos calculados da FE preparada com a sílica Rainin em uma das colunas do ensaio nº 6 do planejamento fatorial 2^{4-1} (Tabela 19). Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min^{-1}	180
Tabela 52: Resultados cromatográficos calculados da FE preparada com a sílica Rainin em uma das colunas do ensaio nº 8 do planejamento fatorial 2^{4-1} (Tabela 19). Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min^{-1}	181
Tabela 53: Relação entre a quantidade relativa dos grupos silanóis da sílica obtidas por CP / MAS ^{29}Si NMR e a % C nas FE.	185
Tabela 54: % C, quantidade de PMOS retido, espessura da camada e % perda massa obtida por TGA das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com água, ácidos e bases.	187

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição dos mesmos entre duas fases. Uma das fases permanece estacionária (fase estacionária), enquanto a outra move-se através dela (fase móvel). Devido à diferença nos coeficientes de distribuição de cada um dos analitos nas respectivas fases, obtêm-se velocidades diferentes, de tal modo que o composto menos retido na fase estacionária é eluído primeiramente [1].

Na cromatografia líquida, a fase móvel (FM) é um líquido, enquanto que a fase estacionária (FE) pode ser um sólido ou um líquido sorvido, imobilizado ou quimicamente ligado na superfície do sólido. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) abrange toda técnica de cromatografia líquida que requer pressões elevadas para forçar a passagem da FM pelo leito da FE [2].

Na CLAE, a fase móvel é bombeada sob alta pressão a uma vazão controlada, sendo que, neste sistema, uma pequena quantidade de amostra é introduzida por meio de uma válvula de injeção. A amostra é então arrastada pela FM, passando pela coluna, onde ocorre a separação cromatográfica. A coluna cromatográfica utilizada é recheada com uma FE, que é geralmente constituída por um material de pequenas partículas, cujo tamanho pode variar de 3 a 20 μm . A FM, arrasta os componentes da amostra, que ao saírem da coluna, chegam ao detector onde um sinal, proporcional à concentração do analito, é enviado ao microcomputador [1].

A CLAE é considerada a técnica analítica mais empregada na indústria química, pois permite não apenas separações preparativas de diferentes componentes de uma mistura, mas também permite análises quantitativas e qualitativas simultaneamente. Na indústria farmacêutica, essa técnica é extensivamente utilizada em muitas aplicações, desde análises das matérias primas, até o controle de qualidade dos medicamentos sintetizados. Em análises

clínicas, tem papel fundamental nos estudos farmacopeicos. Em laboratório de análise ambiental, a CLAE é empregada na análise de pesticidas e outros contaminantes presentes no solo e na água. Aplicações da CLAE na indústria de alimentos incluem a determinação de resíduos de pesticidas, nutrientes, como por exemplo, as vitaminas, e até mesmo a presença de aditivos. Estes são apenas alguns exemplos que demonstram o vasto campo de aplicações desta técnica analítica [2].

1.2 - A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR)

A forma mais tradicional da cromatografia líquida emprega uma FE polar como, por exemplo, a sílica, a zircônia ou a alumina, e uma FM apolar, composta basicamente de um hidrocarboneto alifático, juntamente com um alcoxi (por exemplo o isopropanol) ou hidrocarboneto clorado, como o clorofórmio. Essa modalidade da cromatografia líquida é denominada como cromatografia líquida em fase normal (CLFN). O princípio da separação em CLFN se baseia na interação dos grupos funcionais dos analitos com sítios de adsorção polares da superfície da sílica ou outro sólido cromatográfico [2].

Na cromatografia líquida em fase reversa (CLFR) a FE é mais apolar, utilizando um líquido apolar sobre um suporte cromatográfico sólido em conjunto com uma FM mais polar, contendo água e um modificador orgânico miscível. Aproximadamente 70 a 80 % das separações utilizam essa modalidade da cromatografia líquida. A sua popularidade se deve grandemente à versatilidade dessa modalidade, em que a preparação das amostras é mais fácil de ser realizada, o equilíbrio entre as fases é rápido, os tempos de retenção são reprodutíveis e os princípios básicos do mecanismo de retenção podem ser compreendidos facilmente [2].

1.3 – A sílica

A sílica é o suporte cromatográfico mais utilizado em CLAE. Cerca de 90 % das FE utilizadas em CLAE em fase reversa ou em fase normal são baseadas em sílica, pois esta é rígida, permitindo a formação de leitos homogêneos e estáveis sob altas pressões por longos períodos, é estável quimicamente frente a vários solventes, tem uma grande área superficial, é disponível com uma grande variedade de tamanhos de partículas (ex. 3, 5, 10 μm), diâmetros de poros (ex. 8, 30, 100 nm) e possui os grupos silanóis em sua superfície que podem reagir com reagentes apropriados para produzir materiais com diferentes seletividades.

Mas, a sílica não é um suporte cromatográfico perfeito e possui algumas limitações. Em FM com pH acima de 8 ela pode solubilizar rapidamente e causar o colapso do leito cromatográfico, com decréscimo drástico na eficiência da coluna, mudança no tempo de retenção dos compostos e aumento no fator de assimetria dos picos [3]. Em FM com pH abaixo de 2, pode haver a hidrólise de grupos funcionais ligados à superfície da sílica. Outra desvantagem da sílica é a acidez dos grupos silanóis presentes em sua superfície, os quais, se não forem devidamente removidos ou cobertos, podem interagir fortemente com compostos básicos, causando caudas nos picos ou adsorção irreversível.

SiO_2 ou $\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, a sílica gel inclui uma grande classe de produtos. A sílica é um material que ocorre naturalmente em minérios, como o quartzo e plantas como o bambu, arroz, cevada, cana-de-açúcar. Tudo na natureza possui um pouco mais de rigidez contém a sílica. Entretanto, a maioria das sílicas usadas em aplicações químicas tem origem sintética. Na forma natural, ela ocorre freqüentemente na fase amorfa. Várias fases podem ser formadas, dependendo da temperatura, pressão e grau de hidratação. À pressão atmosférica, a sílica anidra cristalina pode ser classificada nas seguintes fases, de acordo com a temperatura:



A 1973 K, a cristobalita é transformada em sílica vítrea amorfa. A forma cristalina envolve um alto grau de ordem numa estrutura densa. A atividade da superfície, que pode participar de muitas interações químicas e físicas, é limitada pela superfície externa das partículas cristalinas, em que a área superficial é similar a sua superfície geométrica. Já a sílica amorfa ocorre em várias formas e pode ser fabricada de acordo com a aplicação, como fibras, lâminas, sóis, géis e pós. As propriedades de todas as formas amorfas da sílica estão relacionadas aos processos de preparação e a principal característica de interesse nesses trabalhos é a porosidade das sílicas amorfas formadas. A porosidade acarreta uma grande área superficial dentro das partículas de sílica, sendo esta característica muito interessante para aplicações químicas e físicas. Variando o método e os parâmetros específicos de preparação da sílica, a área superficial, volume de poros, tamanho de poros e o tamanho das partículas são, até certo ponto, independentemente controlados [4].

Para aplicações em CLAE, micropartículas porosas esféricas de 5 a 10 μm de diâmetro médio de partículas e, em menor extensão, partículas de 3 μm de diâmetro, são preferíveis nas modernas tecnologias de coluna, porque formam leitos cromatográficos mais homogêneos, estáveis e permeáveis. Pequenas partículas de 1 e 2 μm de diâmetro de partícula (porosas ou não) têm sido introduzidas para separações rápidas de biopolímeros que, por causa de seu tamanho, tem pobres características de difusão. Grandes diâmetros de partícula, geralmente entre 10 a 25 μm , são usados em Cromatografia Líquida Preparativa e foram usadas inicialmente em separações sob baixa pressão [5].

Micropartículas irregulares de sílica são mais baratas e ainda são freqüentemente usadas, mesmo porque, na prática, não se tem mostrado que são de qualidade inferior. Porém, o formato das partículas pode se tornar mais importante quando o tamanho das partículas é reduzido. Micropartículas esféricas são consideradas como tendo propriedades superiores às irregulares para diâmetro médio de partículas menores que 5 μm [5].

De maneira similar, partículas de sílica também são caracterizadas por sua estrutura de poros: diâmetro médio de poros, área superficial e volume de poros.

Esses parâmetros podem ser determinados por métodos já bem estabelecidos, como por exemplo, fisiosorção de gases ou vapores. A área superficial pode ser medida considerando os poros ou somente a área superficial externa das partículas. A medida de área superficial com os poros é mais importante porque existe uma relação entre os dois parâmetros: quanto maior a área superficial, menor o diâmetro de poros [5]. Alguns desses valores estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades físicas da sílica Nucleosil [5].

Diâmetro médio de poros (nm)	Volume de poros (mL / g)	Área superficial específica (m ² / g)
5	0,8	500
10	1,0	350
12	0,7	200
30	1,0	100
50	0,9	35
100	0,8	25
400	0,7	10

Sílicas com diâmetro médio de poros entre 5-15 nm e área superficial de 150-600 m² / g são preferidas nas separações de compostos com baixa massa molar, enquanto sílicas com diâmetro médio de poros maiores que 30 nm são preferidas para separações de biopolímeros, pois evita o acesso restrito desses solutos pela FE. Microporos são particularmente indesejáveis, porque eles podem provocar efeito de exclusão de partículas pelo tamanho ou adsorção irreversível. Microporos são considerados ter diâmetros < 3 nm, mesoporos entre 3-50 nm e macroporos > 50 nm (muitos tipos de sílicas cromatográficas são mesoporosas, mas são referenciadas como macroporosas) [5].

1.4 - A natureza da superfície da sílica

As propriedades da superfície da sílica amorfa, que é considerada um óxido adsorvente, depende da presença dos grupos silanóis (Si-OH) em sua superfície. Com uma concentração suficiente desses grupos, a superfície da sílica é hidrofílica e os grupos OH agem como centros de adsorção molecular durante interações específicas com adsorbatos capazes de gerar interações doadores-receptores de elétrons. Remover os grupos hidroxilas da superfície da sílica para a formação dos grupos siloxanos leva a uma diminuição da adsorção e a superfície adquire características mais hidrofóbicas [6].

Os grupos OH da superfície da sílica podem ser subdivididos em silanóis isolados, geminais e vicinais ou ligados por ligação de hidrogênio (Figura 1). Também estão presentes na superfície da sílica os grupos siloxanos, que são hidrofóbicos e, portanto, não reativos. Por último, há também água estruturalmente ligada aos grupos silanóis dentro do esqueleto de sílica e grupos silanóis internos, dentro dos muito finos ultramicroporos ($d < 1 \text{ nm}$) [6].

Portanto, as propriedades da sílica pura, como um óxido adsorvente, são determinadas em primeiro lugar: (a) pela atividade química da superfície (esta atividade depende da concentração e distribuição dos diferentes tipos de grupos OH e a presença de grupos siloxanos e (b) a estrutura dos poros da sílica [6].

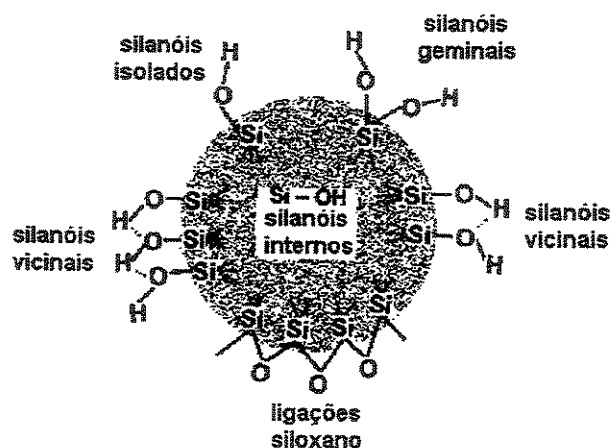


Figura 1: Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica [6].

1.4.1 - O modelo físico-químico de Zhuravlev

Zhuravlev [6] fez um cuidadoso estudo das características estruturais da superfície da sílica amorfa fazendo uso de diferentes amostras de sílica e comparando com dados já existentes na literatura. Este modelo da superfície da sílica amorfa leva em conta um fator determinante, que é a presença dos grupos silanóis e siloxanos. Com esse modelo, é possível determinar a concentração e a distribuição de diferentes tipos de silanóis e siloxanos na superfície da sílica em função da temperatura de pré-tratamento e a possibilidade de acesso aos grupos silanóis internos da sílica. Ele leva em conta possíveis mudanças que ocorrem simultaneamente no grau de cobertura da superfície com moléculas de água adsorvidas e com os diferentes grupos silanóis e a energia dos processos de desidratação (a remoção da água fisicamente adsorvida), desidroxilação (remoção dos grupos silanóis) e a reidroxilação (a restauração da cobertura hidroxilada) [6].

A técnica utilizada por Zhuravlev para medir a concentração dos diferentes grupos silanóis na superfície da sílica, em função da temperatura de pré-tratamento, foi a troca isotrópica de deutério. De acordo com esse método, o número de grupos silanóis por unidade de área (OH nm^{-2}) é determinado pela razão entre uma quantidade conhecida de vapor de água deuterada após a completa troca com deutério e a superfície da sílica e a quantidade de grupos hidroxil não conhecidos presentes na amostra da sílica [6].

1.4.2 – O modelo físico-químico da superfície da sílica amorfa: principais estágios [6]

Estágio inicial ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$):

- A superfície da sílica está no seu grau máximo de hidroxilação, ou seja, todos os diferentes tipos de grupos silanóis (isolados, geminais e vicinais) estão presentes em concentração máxima;
- A superfície da sílica está coberta com água fisicamente adsorvida (múltiplas camadas de água);

- Os grupos OH e a água adsorvida estão permeados por uma rede de ligações de hidrogênio;
- Os grupos OH internos estão presentes dentro da matriz de sílica.

Transição do estágio 1 para o estágio 2 ($T_1 = 25^\circ\text{C}$, sob vácuo) (Figura 2):

- Completa remoção das multicamadas de água fisicamente adsorvida;
- Presença de uma monocamada de água bem adsorvida;
- O processo é reversível se houver um excesso de água no meio.

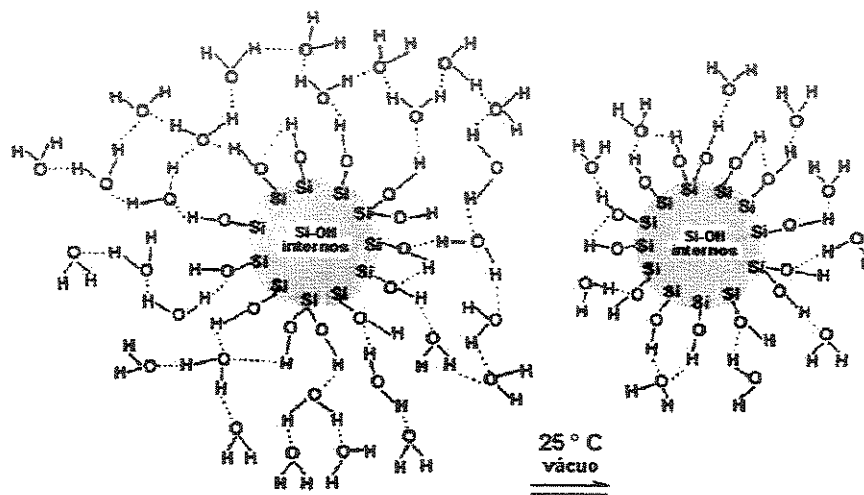


Figura 2: Transição do estágio 1 para o estágio 2 ($T_1 = 25^\circ\text{C}$, sob vácuo) [6].

Estágio 2 ($T = 25 - 190^\circ\text{C}$ sob vácuo, região I da Figura 3):

- A superfície da sílica ainda está no seu grau máximo de hidroxilação;
- A superfície da sílica está coberta com uma monocamada ou menos de água adsorvida, que desaparece completamente no final do estágio 2;
- Os grupos OH e as moléculas de água na superfície da sílica estão predominantemente ligados por ligação de hidrogênio;
- Os grupos silanóis internos estão presentes dentro da matriz de sílica.

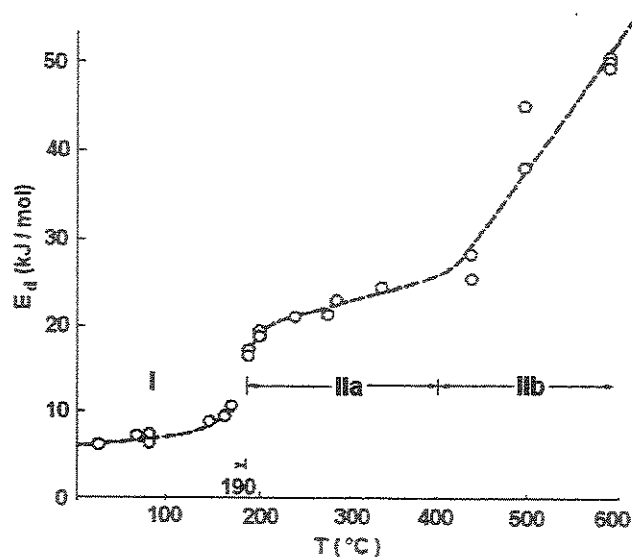


Figura 3: Energia de ativação para dessorção da água da superfície da sílica (E_d), como função da temperatura de pré-tratamento da sílica, sob vácuo: (a) região I, desidratação; (b) regiões IIa e IIb, desidroxilação [6].

Transição do estágio 2 para o estágio 3 ($T_2 = 190^\circ\text{C}$) (Figura 4):

- Completa remoção da monocamada de água enquanto que a superfície da sílica continua no estado máximo de hidroxilação (superfície de sílica seca);
- O processo é reversível se houver excesso de água no meio.

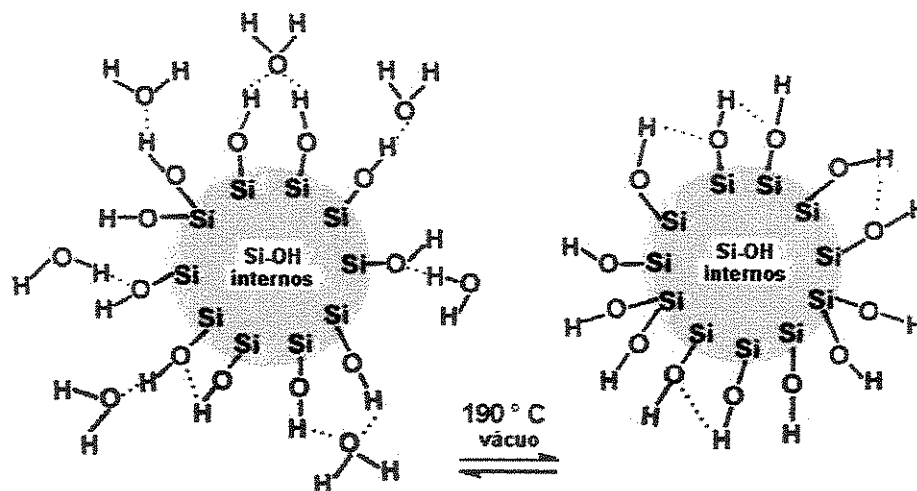


Figura 4: Transição do estágio 2 para o estágio 3 ($T_2 = 190^\circ\text{C}$, sob vácuo) [6].

Estágio 3 ($T = 190 - 400\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob vácuo, região IIa da Figura 3):

- O grau total de hidroxilação da superfície da sílica diminui significativamente;
- Todos os diferentes grupos OH (isolados, geminais e vicinais) ainda estão presentes;
- A concentração de grupos OH isolados aumentam, alcançando um máximo, até $400\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- A concentração de grupos OH vicinais e geminais diminuem;
- Os grupos OH internos desaparecem gradualmente com o aumento da temperatura e duração do tratamento térmico.

Transição do estágio 3 para o estágio 4 ($T_3 = 400\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob vácuo) (Figura 5):

- Completa remoção dos grupos OH vicinais, enquanto que os isolados e geminais permanecem na superfície da sílica;
- O processo ainda é reversível se houver excesso de água no meio.

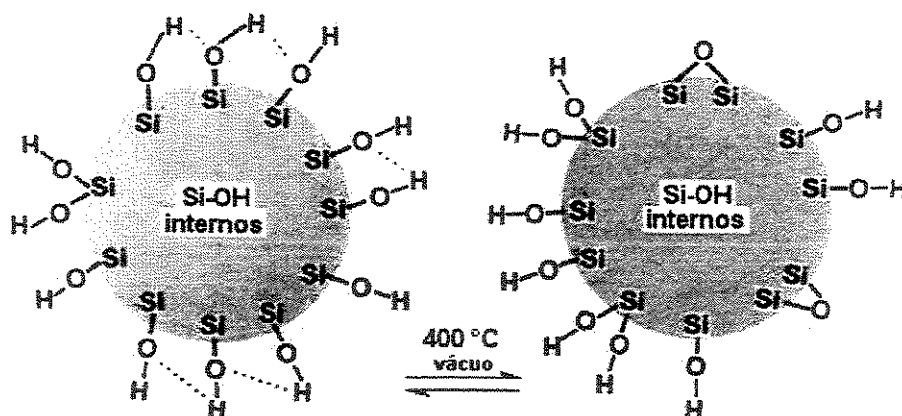


Figura 5: Transição do estágio 3 para 4 ($T_3 = 400\text{ }^{\circ}\text{C}$, sob vácuo) [6].

Estágio 4 ($T = 400 - 900\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob vácuo, região IIb da Figura 3):

- Há apenas grupos OH isolados e geminais livres na superfície da sílica;
- O grau total de hidroxilação da superfície da sílica continua a diminuir, mas de forma mais gradual;

- Nas temperaturas entre 800 – 900 °C, não há mais silanóis geminais livres;
- A concentração de ligações siloxanos aumenta consideravelmente, e a maior parte da área superficial da sílica torna-se coberta por grupos siloxanos;
- Há uma contração na matriz de sílica.

Transição do estágio 4 para 5 ($T_4 \approx 900$ °C) (Figura 6):

- Há uma completa remoção dos silanóis geminais, enquanto que os grupos OH isolados ainda permanecem na superfície da sílica e internamente;
- À temperatura ambiente em um meio com excesso de água o processo de reversibilidade é bastante lento, mas à 100 °C este processo de reversibilidade torna-se bastante rápido.

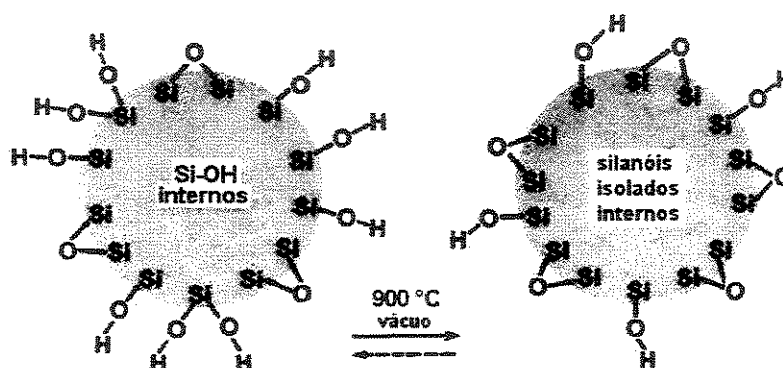


Figura 6: Transição do estágio 4 para 5 ($T_4 \approx 900$ °C) [6].

Estágio 5 ($T = 900 - 1200$ °C):

- O grau de recobrimento da superfície da sílica com grupos OH isolados continua a diminuir até o desaparecimento;
- A concentração de ligações siloxano continua a aumentar;
- A contração da matriz de sílica continua.

Transição do estágio 5 para o 6 ($T_5 \approx 1200$ °C) (Figura 7):

- Completa remoção de todos os grupos OH da superfície da sílica;
- Completa cobertura da superfície da sílica com grupos siloxano.

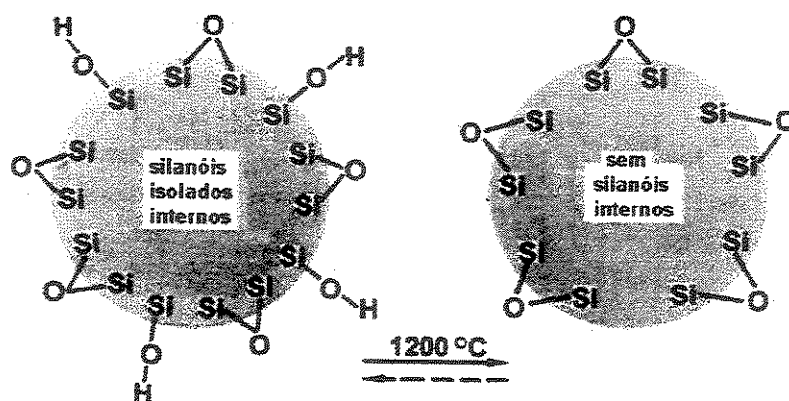


Figura 7: Transição do estágio 5 para 6 ($T_5 \approx 1200^\circ\text{C}$) [6].

Estágio 6: estágio final ($T \geq 1200^\circ\text{C}$):

- A superfície da sílica consiste apenas de ligações siloxano [6].

O gráfico da Figura 8 mostra um resumo de como varia concentração média dos grupos silanóis na superfície da sílica em função da temperatura de pré-tratamento, sob vácuo.

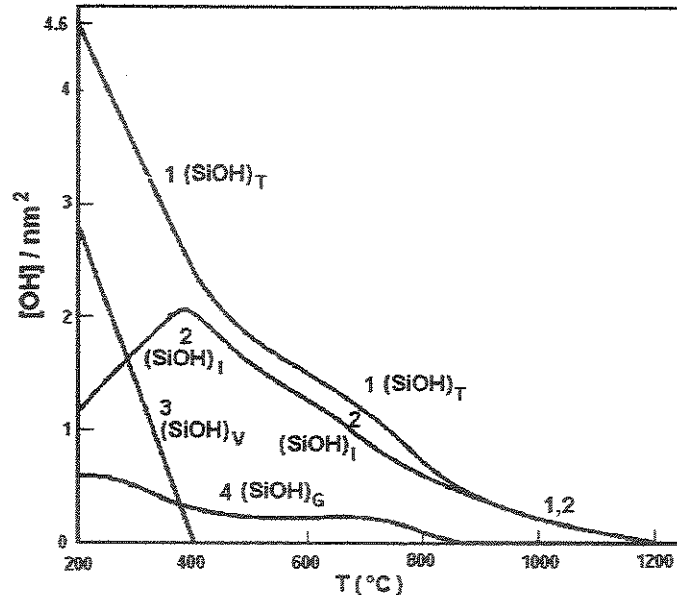


Figura 8: Concentração dos diferentes grupos silanóis na superfície da sílica em função da temperatura de pré-tratamento sob vácuo. 1: média da concentração total de grupos silanóis, 2: média da concentração de grupos silanóis isolados, 3: média da concentração de silanóis vicinais e 4: média da concentração de grupos silanóis geminais [6].

1.5 - Atividade dos silanóis

Tem sido mostrado por anos que os diferentes silanóis da superfície da sílica tem diferentes atividades de adsorção (diferentes reatividades ou diferentes graus de acidez). Silanóis isolados são considerados os mais ativos. Estimativas relativas da razão entre concentração de silanóis isolados, geminais e vicinais na superfície da sílica tem sido discutido na literatura, mas a grande discrepância entre os dados obtidos deixa a questão ainda em aberto, pois os resultados obtidos pelos vários métodos já descritos de determinação da concentração relativa dos sítios são controversos [7].

O valor mais aceito da concentração total de silanóis na superfície da sílica é de $8,0 \pm 1,0 \mu\text{mol} / \text{m}^2$ (considerada por alguns autores como uma constante

físico-química [6,7]), mas diferentes sílicas podem conter diferentes quantidades relativas dos diferentes sítios em sua superfície, pois essas quantidades podem ser, até certo ponto, controladas através do processo de reidroxilação da superfície da sílica. Numa sílica que contém sua superfície completamente hidroxilada (máximo de hidroxilação da superfície) há um maior número de silanóis vicinais (ligados por ligação de hidrogênio), pois os grupos silanóis estão mais próximos uns dos outros e se unem pela ligação de hidrogênio, fazendo com que a acidez da superfície da sílica seja diminuída. Sílicas que contêm baixa concentração de grupos silanóis em sua superfície contêm relativamente alta concentração de grupos silanóis isolados os quais são mais ácidos [6,7].

1.6 - Acidez e impurezas metálicas

A estimativa da razão relativa dos silanóis mais ou menos ativos (ácidos) na superfície da sílica é de grande importância em Cromatografia. Nawrocki et al. [8-10] mostraram em seus estudos, a existência de uma pequena população de grupos silanóis fortemente ativos na superfície da sílica (sítios fortes de adsorção) que podem consideravelmente influenciar as propriedades cromatográficas. Esses sítios são mais ácidos comparados com os outros tipos de grupos silanóis, podendo ser até 50 vezes mais reativos que um sítio comum. A causa dessa forte acidez está na estrutura da sílica ou, mais provavelmente, nas impurezas metálicas contidas na matriz da sílica, que podem influenciar as propriedades cromatográficas indiretamente, através do aumento da acidez dos silanóis vizinhos ou diretamente, reagindo com agentes complexantes contidos na FM.

O mecanismo para este aumento indireto na acidez dos silanóis vizinhos às impurezas metálicas é bem conhecido em estudos de catálise, em que sistemas de óxidos binários são usados particularmente em processos que necessitam de sítios fortes de adsorção. Elementos multivalentes como o Al, Fe, Zr, Ti e La são conhecidos como agentes de sítios de adsorção forte. A Figura 9 mostra um esquema de como esses sítios ácidos são formados. A fraca ligação de hidrogênio na superfície da sílica (ácido de Bronsted) compensa a menor carga formal do

átomo de alumínio (3+) comparada com o átomo de silício (4+) da matriz de sílica (Figura 9) [2].

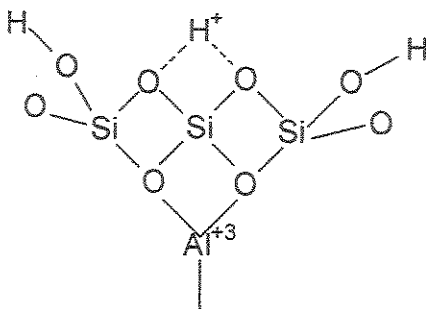


Figura 9: Esquema representativo de uma impureza metálica contida na matriz de sílica [2].

Teoricamente, uma sílica pura tem pK_a de $7,1 \pm 0,5$, mas valores de pK_a de 1,5 até 10 podem ser observados. Altos valores de pK_a foram encontrados para sílicas esféricas, enquanto que partículas irregulares mostraram valores de pH ao redor da neutralidade. Essas diferenças estão provavelmente relacionadas com o método de síntese da sílica e também com a matéria prima de partida usada, que podem deixar mais ou menos quantidades de resíduos na matriz de sílica. Grandes variações na acidez da sílica tem sido notadas não apenas em sílicas provenientes de diferentes fabricantes, mas também de lote para lote de um mesmo fabricante [9].

Os métodos de preparação da sílica estão descritos abaixo [11]:

- Hidrólise ácida de silicatos inorgânicos: método que leva a formação de partículas irregulares contaminadas com traços de impurezas metálicas como o Fe, Al, Na, Mg, Ca, La, Ti, Cr, Mn, Mo.
- Hidrólise de alcoxisilanos: método que leva a formação de partículas esféricas ou irregulares, menos contaminadas por metais.
- O método polietoxisiloxano: forma partículas esféricas ou irregulares com baixa resistência mecânica, contendo menos impurezas metálicas (o método menos usado).

- O método sol-gel: leva a formação de partículas esféricas ou irregulares quimicamente e termicamente estáveis, mas contaminadas com traços de impurezas metálicas (o método mais usado).

Dependendo da quantidade de impurezas metálicas contidas em sua estrutura, a sílica é classificada em dois tipos [11]:

- Tipo A: sílicas mais impuras, contendo alta concentração de impurezas metálicas e silanóis mais ácidos, suficientes para interagirem fortemente com analitos básicos e causar caudas nos picos ou adsorção irreversível desses compostos.
- Tipo B: sílicas altamente puras contendo baixa concentração de impurezas metálicas e silanóis ácidos, excelentes para uso em cromatografia. As sílicas dos tipo B contém apenas 6 μg / g de Al, 7 μg / g de Ti, 1 μg / g de Fe e 3 μg / g de Zr [9].

1.6.1 - Técnicas de reidroxilação e purificação da superfície da sílica

Uma variedade de métodos de reidroxilação e purificação da superfície da sílica utilizada como suporte cromatográfico já foi publicada na literatura, geralmente envolvendo tratamento hidrotérmico da sílica com ácidos ou bases ou aquecimento seguido de tratamento hidrotérmico com ácidos ou bases [12-18].

O estágio de reidroxilação afeta o número e o tipo dos silanóis presentes na superfície da sílica, resultando na redução de silanóis isolados de caráter mais ácido e o aumento na proporção de silanóis vicinais ou ligados por ligação de hidrogênio, deixando uma superfície menos ácida e mais homogênea. Além da reidroxilação, esses métodos de pré-tratamentos da sílica reduzem a quantidade de impurezas metálicas presentes na matriz de sílica que, também afetam a acidez dos grupos silanóis vizinhos. Depois desses pré-tratamentos da sílica é notado então uma significativa melhora no desempenho cromatográfico das FE em relação à separação de bases orgânicas, pois há uma redução de interações

indesejáveis desses compostos com os grupos silanóis mais ácidos da superfície da sílica [19].

Um estudo de Barrett et al. [19] sugeriu que as impurezas metálicas presentes na superfície da sílica afetam mais significativamente as propriedades cromatográficas do que traços de elementos metálicos contidos mais no interior da sílica. Neste estudo, eles investigaram as concentrações de elementos metálicos contidos no interior e na superfície de sílicas preparadas pelo método sol-gel seguido de tratamento hidrotérmico com HCl e HF, utilizando as técnicas de espectrometria de massas por íons secundários estáticos (SSIMS) e espectroscopia fotoelétrica de raios-X (XPS). Ambas as técnicas foram capazes de analisar a superfície da sílica numa profundidade de alguns nanômetros, com uma detectabilidade suficiente para gerar informações a respeito dos grupos silanóis e de elementos em nível traços mais abundantes como o Na, Fe, Al e Ti. Esses resultados foram capazes de revelar mudanças sutis na superfície da sílica que não podem ser detectadas pelas técnicas que somente analisam o interior da sílica.

1.7 - Fases estacionárias quimicamente ligadas

Os silanóis da superfície da sílica podem reagir com muitos diferentes agentes para preparar as chamadas fases estacionárias quimicamente ligadas. As mais populares são as que utilizam sílica ligada com cadeias de oito ou dezoito átomos de carbonos (tipos C-8 e C-18), mas outros agentes hidrofóbicos também são utilizados, como o fenil, propil (C-3), cianopropil, butil (C-4), hexil (C-6), ciclohexil, ou duodecil (C-12) [2, 20, 21].

Essas FE quimicamente ligadas são obtidas pela reação de substituição entre um modificador e os grupos silanóis da superfície da sílica. Como consequência, ligações covalentes estáveis são formadas. Clorosilanos mono, di ou trifuncionais são freqüentemente usados como modificadores da superfície. Derivados de metóxi e etóxisilanos são também utilizados. A desvantagem desses modificadores convencionais é que, freqüentemente, os procedimentos de

preparo com os reagentes monofuncionais possuem baixa estabilidade frente à passagem de grandes volumes de FM e as di ou trifuncionais são mais estáveis, mas, os procedimentos de preparo não são tão reprodutíveis, por causa dos subprodutos formados pela reação (metanol, etanol e/ou HCl), que bloqueiam os grupos silanóis da superfície, impossibilitando a modificação [22].

Kováts foi o pioneiro na síntese de FE com uma de cobertura de ligantes altamente densa, próximo do máximo valor teoricamente possível. Investigações de Kinkel, Unger, Buszewski e outros demonstraram a importância do uso de ativadores na formação de FE com densas coberturas. Os resultados desses estudos mostraram como controlar o processo de modificação da superfície do suporte cromatográfico e obter FE quimicamente ligadas com grau de cobertura controlado [22].

Uma ênfase especial é dada aos diferentes tipos de sílica que são freqüentemente usadas no preparo de FE quimicamente ligadas. Vários fatores como porosidade, tipo e concentração dos grupos silanóis e a pureza da superfície influenciam significativamente a modificação e a formação da FE quimicamente ligadas. Volume, diâmetro e distribuição dos poros determinam a área superficial e, indiretamente, também influenciam a formação de coberturas densas [22,23].

Uma sílica com sua superfície completamente hidroxilada contém cerca de $8 \mu\text{mol} / \text{m}^2$ de silanóis. Mesmo com a melhor condição de preparo das FE, apenas menos que $4 \mu\text{mol} / \text{m}^2$ desses silanóis podem reagir. Embora os outros $4 \mu\text{mol} / \text{m}^2$ não estejam livres para a reação com os agentes modificadores, devido ao impedimento estérico, eles ainda estão suficientemente acessíveis para interagir com compostos presentes na FM, principalmente os de caráter básico, causando o aumento na retenção e caudas nos picos [2].

A melhor sílica para a preparação de FE reversas é a que possui sua superfície completamente hidroxilada e contém baixa concentração de impurezas metálicas, pois são menos ácidas e menos reativas frente a analitos básicos [24]. Técnicas de reidroxilação e purificação da superfície da sílica têm sido propostas na literatura com bons resultados cromatográficos. Porém, essa é uma opinião divergente, porque também tem sido mostrado que FE preparadas com sílicas

mais impuras são mais estáveis, suportando a passagem de um volume maior de FM. Isto acontece porque as impurezas metálicas deixam a sílica menos sujeita à dissolução [25].

Uma prática comum na preparação de FE reversas para CLAE é o capeamento das FE quimicamente ligadas com um silano de cadeia curta, numa reação secundária. Alguns silanóis residuais podem ser removidos, melhorando o desempenho das colunas, especialmente nos casos em que a primeira reação de silanização não foi efetiva, mas uma remoção completa dos silanóis é impossível [2,20].

Outras diferentes estratégias, além dos pré-tratamentos da sílica e do capeamento, tem sido propostas para produzir FE com reduzidas atividades de silanóis residuais. Essas estratégias são: o entrecruzamento de cadeias, polimerização horizontal, proteção estérica, coberturas altamente densas, FE bidentadas ou com grupos polares embutidos [26]. E também o uso de outros suportes cromatográficos como a alumina, a zircônia ou a titânia, os suportes poliméricos, carbono grafite poroso, suportes híbridos e as sílicas monolíticas [11].

1.8 – Estabilidade das fases estacionárias quimicamente ligadas

A estabilidade das FE quimicamente ligadas em FM com baixos e altos valores de pH estão sumarizados na Tabela 2 [11].

A estabilidade das FE quimicamente ligadas frente à passagem de grande volume de FM é investigada em baixos e altos valores de pH. A um valor baixo do pH da FM pode levar a hidrólise das cadeias do ligante e a estabilidade das FE vai depender da qualidade da sílica e da densidade da cobertura dos ligantes na FE. Uma sílica com sua superfície completamente hidroxilada e, portanto, com uma superfície mais homogênea leva a formação de coberturas mais densas e mais estáveis quimicamente [11].

Tabela 2: Influência do pH da FM na estabilidade das FE quimicamente ligadas baseadas em sílica [11].

pH	Problema	Fatores que intensificam a dissolução da FE
Baixo	Hidrólise das cadeias do ligante	- silanóis ácidos - cadeias curtas do ligante - baixa densidade da cobertura - policamada (mais que uma monocamada)
Alto	Dissolução da sílica	- alta % de água na FM - alta permeabilidade do material - baixa densidade do ligante - alta pureza da sílica - alta temperatura - alta concentração do tampão na FM

Em valores de pH da FM acima de 9 as sílicas podem se dissolver. Os estudos sobre a influência da pureza da sílica na estabilidade das FE indicaram que suportes mais impuros são menos sujeitas à dissolução. A densidade de cobertura da superfície da sílica pelo ligante também é um fator que influencia a estabilidade química das FE, sendo que coberturas mais densas e ligadas mais fortemente à sílica são mais estáveis, porque protegem melhor a sílica do ataque químico de componentes presentes na FM. Outros fatores como a concentração e a identidade (o ânion) do tampão na FM, a temperatura, a quantidade de água na FM e a porosidade da sílica também influenciam a velocidade de dissolução da sílica pela FM [11,25].

1.9 - Fases estacionárias com polímeros sorvidos e imobilizados

Na tentativa de se obterem FE com uma maior blindagem dos grupos silanóis da superfície da sílica e a maior estabilidade da FE frente à passagem de FM neutras ou básicas, foi desenvolvido um novo tipo de FE para CLAE-FR, que

consiste em sorver e/ou imobilizar polímeros como os polissiloxanos ou polibutadieno, dentre outros, sobre sílica e sílica modificada com óxidos metálicos.

Um grupo de pesquisa que explorou bastante a imobilização de polímeros sobre suporte de sílica durante os anos 80 foi coordenado por Schomburg. Este grupo preparou diversas FE para CLAE através do entrecruzamento de polissiloxanos sobre sílica, induzidos por aquecimento com peróxido, decomposição térmica e radiação gama. Eles investigaram as propriedades físicas e cromatográficas dessas FE e encontraram que elas são razoavelmente estáveis e capazes de produzir excelentes separações em CLAE [27-29].

Schomburg et al. [29] também investigaram polissiloxanos imobilizados por tratamento térmico a 180 °C, sem a presença de reagentes indutores de entrecruzamentos. Tratamentos térmicos de imobilização a baixas temperaturas não foram extensivamente estudados porque os polissiloxanos adsorvidos na sílica podiam ser completamente arrastados pelos solventes da FM [27].

Nos últimos anos, desenvolveu-se no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida (LabCrom) do Instituto de Química da Unicamp, um tipo de FE que contém uma camada de polissiloxanos ou polibutadieno adsorvidos nas paredes dos poros da sílica (ou sílica modificada com óxidos metálicos) sem nenhum tratamento específico, com boas propriedades cromatográficas e de estabilidade para CLAE-FR [30-38].

Estudos recentes de cinética de adsorção do poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) sobre sílica mostraram que a retenção do PMOS nos poros da sílica aumenta com o tempo sem nenhum tratamento específico, simplesmente deixando a FE em repouso após seu preparo. Este processo foi denominado de "auto-imobilização" [35,36,39]. A caracterização dessas FE por espectroscopia de RMN de ^{29}Si , em períodos de tempo específicos após o preparo das FE, mostrou novos sinais em deslocamentos químicos diferentes do sinal do PMOS puro, indicando a formação de espécies de silício com grupos quimicamente ligados, que foram atribuídos ao PMOS auto-imobilizado. A caracterização cromatográfica dessas FE também mostrou que, quanto mais tempo a FE foi deixada em repouso, melhor foi o desempenho cromatográfico, com aumento do fator de

retenção e melhora nos parâmetros cromatográficos de resolução e eficiência cromatográfica [35,39].

Então, no processo da auto-imobilização, o rearranjo das cadeias de polímero dentro dos poros da sílica para estruturar a formação de uma camada uniforme é bastante lento. Portanto, o controle do tempo após o preparo das FE sorvidas e imobilizadas é um fator importante para obtenção de colunas com parâmetros cromatográficos reprodutíveis [35].

Também foram feitos estudos sobre a influência dos grupos silanóis da superfície da sílica no processo de auto-imobilização do PMOS sobre a sílica. Para isso, modificou-se a superfície da sílica com grupos hidrofóbicos, que bloquearam os grupos silanóis, havendo assim uma diminuição da interação do PMOS com a superfície da sílica. Depois dessa etapa, a auto-imobilização não alcançou uma eficácia tão significativa quanto em uma superfície de sílica nua, mostrando que a incorporação do polímero na sílica acontece através de sua interação com os grupos silanóis [35].

Estudos de imobilização por tratamento térmico do polímero sobre a sílica aceleraram o rearranjo do polímero nos poros da sílica, principalmente quando a camada do polímero ainda não está uniformemente distribuída nas paredes dos poros da sílica [35,40-43]. Quando o polímero já se encontra no estágio de uma configuração bastante uniforme, obtido pela auto-imobilização (depois de meses em repouso da FE), o tratamento térmico não altera esta configuração e os parâmetros cromatográficos permanecem constantes após o tratamento[35,40].

Os métodos de imobilização por tratamento térmico de polímeros sobre sílica e sílica modificada com óxidos metálicos vem sendo intensamente estudados no LabCrom, com ótimos resultados. Em relação à espessura da camada de polímero formada sobre a sílica, esses resultados mostraram que, quando tais FE são submetidas aos tratamentos térmicos, dentro de uma faixa de temperatura de 80 a 150 °C, com extração do excesso de polímero com solventes, há um acréscimo na quantidade de polímero adsorvido nos poros da sílica, atingindo a configuração de uma monocamada (expressão físico-química que define o tipo de camada). Tratamento térmico acima de 150 °C levou à formação

de uma FE com uma camada densa de polímero, atribuindo a elas uma configuração de uma bicamada (expressão físico-química que define o tipo de camada). A avaliação cromatográfica dessas FE mostrou que a formação da monocamada resultou em parâmetros cromatográficos excelentes, enquanto que a bicamada resultou em baixa eficiência cromatográfica [35,41,42].

Uma ênfase especial é dada ao processo de extração dos excessos de polímero da FE com solventes, que é uma etapa bastante importante no preparo das FE. Muitos estudos têm sido feitos no LabCrom sobre esse assunto, analisando-se vários fatores que podem melhorar o desempenho cromatográfico da FE, como o tipo de solvente usado e o método mais eficaz. Bottoli fez um estudo detalhado desse processo e verificou que FE com falta ou excesso de polímero não resultam em bons desempenhos cromatográficos, sendo que a configuração de uma monocamada completa de polímero sobre a sílica é a que resulta na melhor transferência de massa entre o analito, a FE e a FM (Figura 10) [35,41].

Na Figura 10, a curva A representa as FE que não passaram pela etapa de extração dos excessos de polímero com solventes, obtendo grande quantidade de polímero (dado em massa específica de polímero, g polímero / 1 g sílica) e não resultaram em FE com bons desempenhos cromatográficos, independentes da temperatura de imobilização térmica utilizada. A curva B representa as FE extraídas após a etapa de imobilização térmica do polímero na sílica. A quantidade de polímero incorporado nessas FE teve grande dependência com a temperatura de imobilização térmica, cujas temperaturas abaixo de 120 °C resultaram em FE com a configuração de uma monocamada de polímero sobre a sílica e excelentes desempenhos cromatográficos e temperaturas acima de 150 °C resultaram em FE com a configuração de uma bicamada de polímero, que não obtiveram bons resultados cromatográficos. E a curva C,D são as FE que passaram pela etapa de extração dos excessos de polímero com solventes antes da imobilização térmica obtendo pouca quantidade de polímero na FE devido ao arraste do polímero que ainda não estava fortemente incorporado, também não resultando em FE com bons desempenhos cromatográficos.

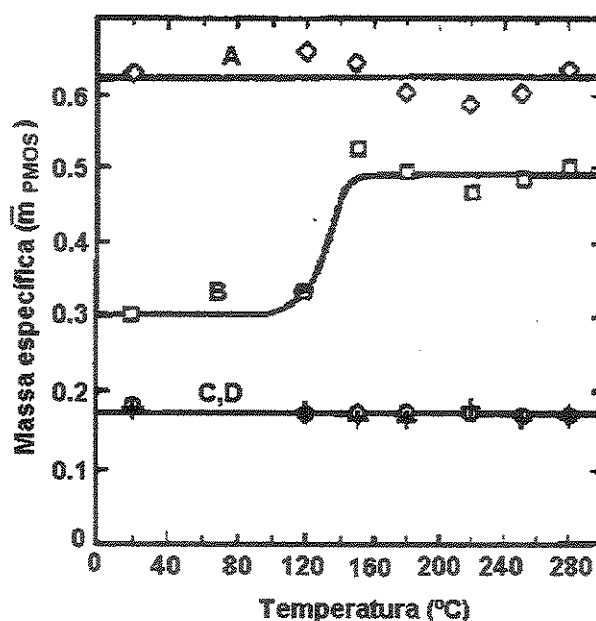


Figura 10: Massa específica de PMOS sobre a sílica Davisil, $\bar{m}_{\text{PMOS}}$ (massa de PMOS por grama de sílica), em relação à extração do excesso PMOS com solventes e a temperatura de imobilização térmica. A: sem extração, B: extração após a imobilização térmica e C,D: extração antes da imobilização térmica [35,41].

Outros métodos de imobilização de polímeros sobre sílica e sílica modificada com óxidos metálicos além do tratamento térmicos também vem sendo estudados no LabCrom, como a radiação gama e a radiação microondas, com bons resultados cromatográficos e de estabilidade química [37,38,44-53].

1.9.1 - Distribuição do polímero sobre a sílica

Em trabalhos anteriores no LabCrom [35,54], foi sugerido um modelo de distribuição do polímero nos poros da sílica baseado no fenômeno da “instabilidade de Rayleigh” [55], em que se acredita que o polímero se deposita como “plugs” ou gotas estendidas na superfície dos poros da sílica, no qual é energeticamente desfavorável para um líquido atingir uma configuração tal como

uma camada fina depositada na superfície, quando existe a opção da formação de “plugs”.

Para uma adequada compreensão e discussão a respeito das FE com polímeros sorvidos e imobilizados na superfície da sílica, os fenômenos de adsorção de polímeros sobre superfícies sólidas, particularmente em solução, devem ser levados em consideração. A adsorção resulta de interações energeticamente favoráveis entre um adsorbato sólido e o soluto e, freqüentemente, é um processo complexo influenciado por contribuições de diferentes tipos de interações adsortivas, como forças de Van der Waals, interações dipolo-dipolo e ligações covalentes entre a sílica e o polímero [56].

Na interface sólido-líquido as macromoléculas usualmente preferem uma configuração que tenda a um máximo de contato com a superfície. Normalmente, uma conformação interfacial consiste de seqüências de segmentos adsorvidos (“trains”) alternando com “loops” tridimensionais livres estendidos da superfície e com a cadeia terminando em ambos os fins pendurados livremente (“tails”), como pode ser visualizado na Figura 11 [57].

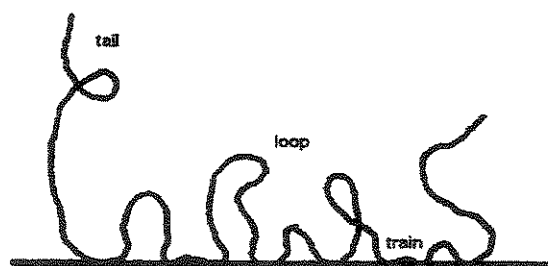


Figura 11: Representação esquemática de um polímero adsorvido em uma interface plana, mostrando a presença de “trains”, “loops” e “tails” [57]

Considerando o processo de auto-imobilização estudado no LabCrom, comprovou-se que, quando o PMOS líquido é depositado na sílica, é possível que ocorram alguns pontos de contato entre o polímero e a sílica. Com o processo de auto-imobilização, vários pontos adjacentes entram em contato com a sílica. Após um longo período de tempo ou, ainda, com o tratamento térmico, muitos pontos de

contato ocorrem, levando a uma configuração mais estável, que é a imobilização (Figura 12) [35].

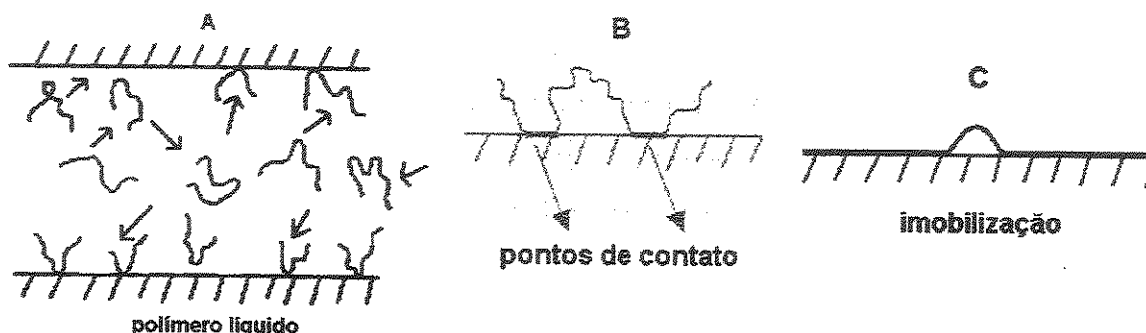


Figura 12: Modelo de adsorção no processo de auto-imobilização e imobilização de polímero sobre sílica [35].

1.10 – Avaliação de colunas cromatográficas

Quando uma coluna é nova, seja ela adquirida comercialmente ou através de enchimento no próprio laboratório, os cálculos dos parâmetros cromatográficos devem ser feitos a fim de avaliar o potencial desta coluna para futuras separações cromatográficas. Estes cálculos são realizados com os dados experimentais obtidos em um cromatograma típico, como mostra a Figura 13.

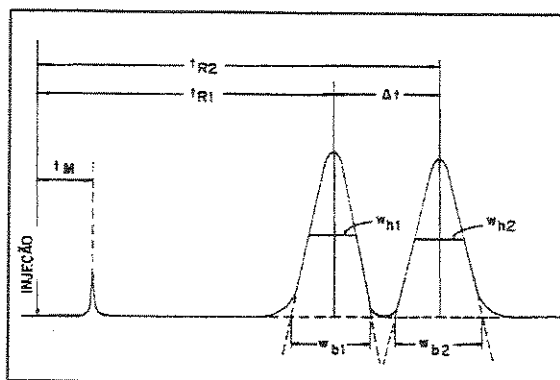


Figura 13: Cromatograma típico obtido na separação de uma mistura de dois componentes [1].

O **tempo de retenção do analito**, t_R , é o tempo gasto desde o momento da injeção até a detecção do pico [58]. O **tempo de retenção de um composto não retido**, t_M , é o tempo gasto por ele para percorrer todo o sistema cromatográfico desde a injeção até a saída da coluna. Estes valores são obtidos diretamente do cromatograma quando se tem um integrador. O tempo de retenção ajustado, t'_R , é o tempo real que as moléculas do analito ficam retidas na FE, calculado por:

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

O **fator de retenção**, k , é determinado pela razão entre tempos em que as moléculas do analito ficam retidas na FE ou percorrendo a coluna na FM [2]. Esse parâmetro é bastante útil na comparação da retenção de um mesmo composto em diferentes colunas ou diferentes composições da FM.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

A **resolução**, R_s , é uma medida quantitativa do grau de separação entre dois picos adjacentes e pode ser calculada de acordo com a Equação 3 [2]:

$$R_s = 1,777 \left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h2} + w_{h1}} \right) \quad (3)$$

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

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

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (4)$$

A **eficiência** e o **número de pratos** podem ser considerados como sinônimos. Da mesma forma que a resolução, R_s , o número de pratos é uma medida da qualidade da separação cromatográfica. Enquanto a resolução é baseada na largura e o tempo de retenção de dois picos adjacentes, o número de pratos leva em consideração um único pico. A nomenclatura reflete a origem do conceito da teoria de cromatografia gasosa em que a coluna poderia ser considerada como uma torre de destilação. Aplicando esse conceito, um certo comprimento da coluna deve ser ocupado por vários pratos ou várias etapas de equilíbrio. A eficiência, N , é a medida do número de etapas de equilíbrio do analito entre a FM e a FE, calculada por meio da Equação 5:

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

A **altura do prato**, H , é a razão entre o comprimento da coluna (L) expressa em metros e o número de pratos (N), que pode ser calculado por:

$$H = L / N \quad (6)$$

Existe um outro número denominado de **altura do prato reduzido**, h . Esse parâmetro é um número adimensional calculado pelo quociente da altura do prato e o diâmetro médio das partículas, dp , que compõem a fase estacionária em cromatografia líquida:

$$h = H / dp \quad (7)$$

Esse parâmetro é útil para comparar colunas recheadas com partículas de tamanhos diferentes [2]. A eficiência de uma coluna depende da vazão que se utiliza e este comportamento pode ser verificado empregando a equação de van Deemter [59], que matematicamente pode ser expressa como:

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

onde, μ = velocidade linear da FM (expressa por cm s^{-1}), obtida pela Equação 9:

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

A Figura 14 mostra o formato da curva de van Deemter e as várias contribuições de cada um dos termos da equação.

O termo A, chamado de difusão turbilhonar, refere-se ao alargamento dos picos devido aos caminhos múltiplos percorridos pelas moléculas do analito. O termo B é devido à difusão longitudinal ao longo da coluna e o termo C está relacionado com a velocidade de transferência de massa, ou seja, com a facilidade que as moléculas do soluto têm em serem transferidas da FM e a FE ou vice-versa.

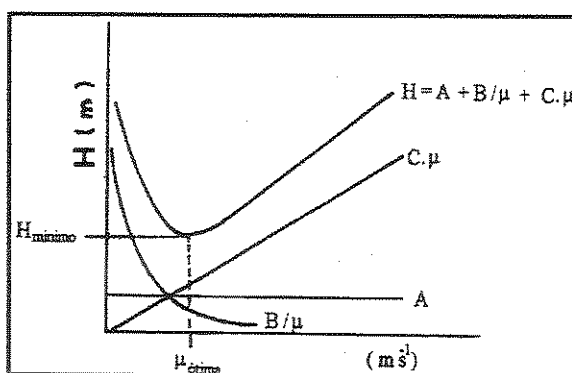


Figura 14: Hipotética curva de van Deemter mostrando a relação entre eficiência e a velocidade linear média da FM [59].

A curva de van Deemter mostra que existe uma vazão ótima, que está diretamente relacionada com a velocidade linear ótima ($\mu_{\text{ótima}}$) da FM, na qual H terá um valor e corresponde ao máximo de eficiência da coluna. Na prática, a

definição da vazão ótima é obtida variando a velocidade do fluxo no sistema cromatográfico.

1.10.1 - A cauda nos picos e o fator de assimetria

O **fator de assimetria**, que é um parâmetro cromatográfico que dimensiona a cauda nos picos, será bastante avaliado neste trabalho e por isso será feita uma abordagem mais detalhada sobre o assunto neste capítulo.

Um pico está com cauda ou assimétrico quando ele desvia do ideal, que é um pico em formato de Gaussiana. A Figura 15 mostra um exemplo de um pico com cauda. O pico está dividido horizontalmente a partir do máximo, em duas partes. A parte da direita está mais larga e isso é acentuado quanto mais próximo da linha de base. A cauda frontal (parte esquerda do pico) acontece mais raramente que a cauda do pico (parte direita do pico), mas as duas podem causar problemas na qualidade da separação. Por isso é preciso ter a medida desse parâmetro [60].

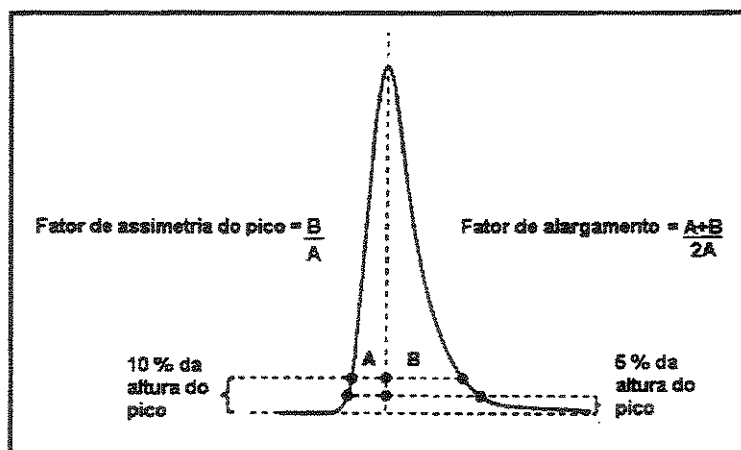


Figura 15: Exemplo de um pico cromatográfico [61].

Existem dois tipos de medidas para a cauda nos picos, o fator de alargamento (T_f),

$$T_f = \frac{A+B}{2A} \quad (10)$$

onde A e B são as partes anterior e posterior do pico a 5 % da altura do pico, como mostrado na Figura 15, e o fator de assimetria do pico (A_s) (Equação 11):

$$A_s = \frac{B}{A} \quad (11)$$

onde A e B são medidas a 10 % da altura do pico. Se $A = B$, ambas as medidas dão valor igual a 1,0, que é o valor do pico sem cauda. Para valores até aproximadamente 2,0, a A_s e o T_f são praticamente os mesmos, como mostra a Tabela 3, calculados para os picos da Figura 16 [60].

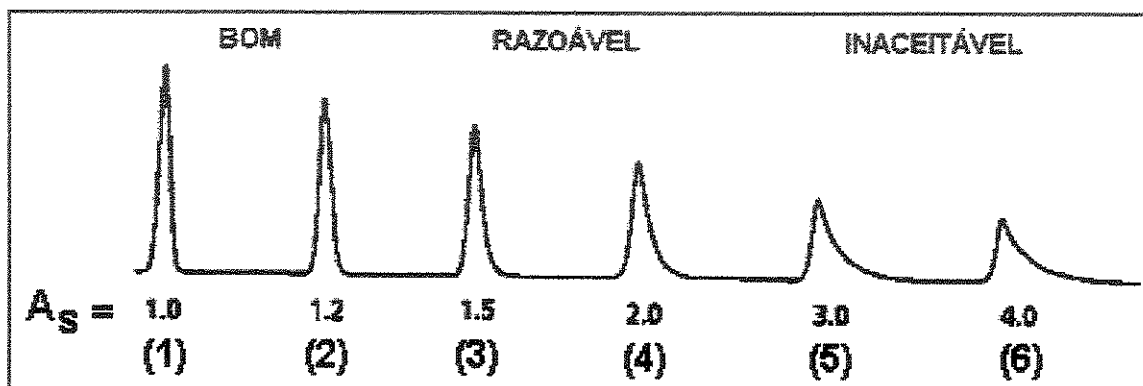


Figura 16: Exemplos de picos com diferentes graus de assimetria (Figura modificada da referência 60).

Tabela 3: Valores dos fatores de assimetria (A_s) e alargamento dos pico (T_f) [60]

Pico da Figura 2	Medidas	
	A_s	T_f
1	1,0	1,0
2	1,3	1,2
3	1,7	1,4
4	2,5	1,9
5	3,8	2,9
6	5,5	3,5

Alguma cauda nos pico é aceitável, mas até quanto é tolerado? A Figura 16 mostra alguns exemplos de picos com vários valores de fatores de assimetria. Quando a coluna é nova, os fabricantes usam o critério de valores aceitáveis entre 0,9 (leve cauda frontal) e 1,2 (leve cauda no pico). Na prática, para separação de compostos em misturas reais, valores entre 1,5 até próximo de 2,0, são tolerados.

Geralmente, quando o fator de assimetria é maior que 2,0, pode-se gerar erros nas quantificações, porque alguns erros nas medidas das áreas dos picos podem ser causados pelas caudas nos picos. Comparando o pico com fator de assimetria 1,0 e o pico com 4,0, a diferença é drástica. Embora a área do pico seja a mesma, pode haver diferenças na medida do comprimento do pico a 5 ou 10 % da altura, já que os algoritmos usados no sistema de aquisição dos dados podem fazer determinações da área dos picos a partir das medidas do começo e do fim do pico. Em todos os picos mostrados na Figura 16, o início do pico é o mesmo e é fácil para o sistema de aquisição de dados determinar este valor, porém, quando o pico apresenta a cauda, mais difícil será determinar o valor da medida no final do pico, principalmente se a linha de base não está bem resolvida. Então, se o sistema de dados usar esses valores, haverá diferença entre as medidas e, depois de múltiplas injeções, esses resultados gerarão erros nas áreas dos picos. Quando usadas na quantificação de compostos em nível traço, essas medidas

podem ser críticas para determinar pequenos valores de limite de quantificação [60].

A cauda nos picos também será problemática se picos pequenos eluem próximos a picos grandes, porque se o pico maior tem cauda ele pode esconder o pico menor. Métodos para análise de rotina em CLAE normalmente exigem resolução da linha de base e tempos de corrida o menor possível. Pela Figura 16, a resolução da linha de base fica mais demorada quando os picos têm mais cauda. Portanto, a cauda nos picos não apenas reduzem a qualidade da separação, mas compromete a quantificação dos componentes da mistura [60].

Existem vários problemas que resultam em cauda no pico. Talvez o mais importante é devido aos diferentes mecanismos de retenção que ocorrem entre os analitos, a FM e a FE numa corrida cromatográfica, principalmente as interações que ocorrem entre os analitos e os silanóis residuais da FE, como a troca iônica e formação de ligação de hidrogênio. Os analitos de caráter básicos são os que apresentam os maiores problemas com esses tipos de interações, porque a troca iônica é o seu principal mecanismo de retenção. O problema se intensifica quando impurezas metálicas estão contidas na sílica em quantidade suficiente para deixarem a superfície mais ácida e interagirem mais fortemente com os analitos básicos, causando as caudas nos picos ou até a adsorção irreversível desses compostos [7].

1.10.2 - Avaliação cromatográfica das colunas

Com os avanços da tecnologia de preparação de FE dos últimos anos, uma variedade de FE para CLAE está disponível comercialmente. Muitas das FE são nominalmente semelhantes como, por exemplo, as tradicionais FE tipo C-18, mas suas propriedades podem variar bastante. Essas diferenças se devem às características heterogêneas da sílica e os vários métodos de preparo das FE. Por isso, ainda é necessário ter critérios de escolhas das FE para aplicações específicas. Os métodos químicos e físicos usados para avaliar as FE, como os métodos espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear de ^{29}Si , ^{13}C , ^1H ou

no Infravermelho, utilizam instrumentação cara e dão poucas informações a respeito da retenção dos analitos na FE, que incluem os efeitos de cobertura da superfície, a quantidade de silanóis residuais e sítios de troca iônica presentes na superfície da sílica. Adicionalmente, os resultados são bastante complexos e a relação com as observações cromatográficas são incertas e menos relevantes para os usuários da técnica cromatográfica. Em contraste, os métodos de caracterização cromatográfica são mais expressivos e buscam medir e especificar discretas interações físico-químicas entre os analitos e a FE [62].

Talvez um dos aspectos mais estudados em cromatografia é a origem das diferenças existentes entre colunas nominalmente semelhantes. Há dois diferentes tipos de opiniões a respeito de quais solutos devem ser usados na avaliação cromatográfica das FE. Uns acreditam que solutos bem comportados, de caráter apolar, como o tolueno, dá a avaliação das colunas em termos geométricos, ou seja, avaliam a acomodação das partículas ao longo do leito cromatográfico depois do enchimento, que pode ser medido pelo parâmetro de eficiência das colunas. Outros acreditam que o soluto usado também deve dar medidas em condições não ideais, por isso quanto mais polar for o soluto, maiores serão as diferenças nos desempenhos cromatográficos [63].

Outras propriedades cromatográficas também são identificadas como relevantes para a caracterização das FE. A retenção de solutos apolares tem sido descrita como “hidrofobicidade” [64]. Esta propriedade está relacionada com o comprimento das cadeias alquil das FE ou a densidade das cadeias. Na ausência de mudanças na seletividade, mudanças na retenção causam problemas na identificação dos compostos de uma mistura e, quando isso acontece o método de separação deve ser ajustado.

Uma outra propriedade que deve ser considerada na avaliação cromatográfica é freqüentemente descrita como “atividade silanofílica” e é atribuída às interações de solutos polares com os silanóis residuais da superfície da sílica [64]. Essas interações podem acontecer através dos mecanismos de formação de ligações de hidrogênio e também pela troca iônica, pois dependendo do pH da FM, os grupos silanóis podem estar nas formas neutras ou iônicas.

A ionização da sílica depende do seu pKa e do ponto de carga zero (pcz) (pH em que superfície da sílica é neutra). Acima do pcz, a sílica funciona como trocador catiônico (SiO^-) e abaixo do pcz, funciona como trocador aniônico (SiOH_2^+). O pcz da sílica varia entre 2,0 a 4,0 (essa variação é devido à variação do pKa das sílicas), portanto, ela é quase que exclusivamente um trocador catiônico. Quando existem sítios trocadores catiônicos abaixo do pcz significa que existem na superfície da sílica sítios muito ácidos, causados pela presença de impurezas metálicas, que deixam os silanóis adjacentes aos metais muito mais ácidos. Normalmente, assume-se que em $\text{pH} \geq 4$ os silanóis estão completamente desprotonados (SiO^-) e em pH 2,1 há a supressão dos silanóis ionizados, exceto os muito ácidos [7].

A atividade silanofílica é uma característica muito importante das FE, porque a troca iônica é o principal mecanismo envolvido na separação de bases hidrofílicas. As bases fortes (pKa entre 7 e 9), por exemplo, se ionizam na FM e interagem com os silanóis residuais também ionizados, dependendo do pH da FM. Em baixo valor do pH há pouca retenção desses compostos porque os grupos silanóis não estão dissociados, mas a medida em que se aumenta o pH da FM, há um aumento na dissociação dos grupos silanóis e conseqüentemente um aumento na retenção das bases, até atingir um máximo quando o pH da FM for igual ao pKa da base. E quanto maior o pKa da base, maior a retenção. A observação cromatográfica desses fenômenos são picos assimétricos, adsorção irreversível (não eluição) e baixa eficiência [7].

A influência do conteúdo de metais na superfície da sílica também pode ser avaliada pelo parâmetro de "atividade metalofílica", particularmente de solutos que podem complexar com os metais ou compostos que serão influenciados indiretamente através da interação com silanóis mais ácidos adjacentes aos metais.

Outro parâmetro a ser analisado é a "seletividade estérica" das FE, que pode ser dado como a razão relativa entre a retenção de dois solutos com pequena diferença na estrutura molecular, podendo diferenciar colunas aparentemente similares. Muitos estudos vêm sendo feitos sobre este assunto e

são especialmente relevantes para FE utilizadas em separações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e carotenóides isômeros [64].

Mas, mesmo que um fabricante faça o mesmo tipo de FE, suas colunas podem diferir significativamente. Mais uma vez, vê-se a natureza complexa relacionada à heterogeneidade estrutural da sílica (muitas partículas não são uniformes em relação à forma e ao tamanho das partículas, bem como a estrutura dos poros, o grau de hidroxilação e a quantidade de impurezas metálicas), além dos diferentes métodos de preparo das FE. Portanto, as características de reprodutibilidade entre as FE e a repetitividade entre as corridas cromatográficas são parâmetros de extrema relevância quando as colunas são avaliadas [62,63].

Uma variedade de testes cromatográficos vem sendo desenvolvido para caracterizar as propriedades das FE de retenção, hidrofobicidade, atividade silanofílica, atividade metalofílica, capacidade de troca iônica, habilidade para formar ligações de hidrogênio e seletividade estérica, além da eficiência da coluna com compostos neutros, ácidos e básicos e os parâmetros de reprodutibilidade e repetitividade [65-68].

Muitos dos métodos para avaliar diferenças na retenção e hidrofobicidade são baseados na retenção absoluta de solutos específicos (normalmente apolares). O estudo sobre a atividade de silanóis residuais é mais amplo. O mais comum é o uso de testes com solutos contendo um ou mais bases nitrogenadas. Nessas misturas testes estão incluídos aminoácidos, peptídeos, amitriptilina e outros compostos farmacêuticos, N,N-dietil-m-toluamida, anilina, cafeína e toluidinas isômeras. As caudas apresentadas nesses picos são as características associadas com a atividade dos silanóis residuais e o fator de assimetria do pico (A_s) é comumente usada como figura de mérito para esta propriedade [64,65].

Testes da atividade silanofílica das FE vêm sendo publicados usando FM tamponadas e não tamponadas. Engelhardt et al. [66] tem desenvolvido indicadores sensíveis à atividade silanofílica baseados na retenção e assimetria dos picos da anilina, N,N-dimetilanilina e toluidinas isoméricas em FM neutra de metanol / água, 49:51 m/m. Já Neue et al. [69] utilizaram amitriptilina em FM tamponada (metanol / tampão fosfato 20 mmol L⁻¹, pH 7,0, 65:35, m/m). Em FM

tamponada, as condições do teste são mais controladas e são menos influenciadas pelas condições da FM usada anteriormente na coluna, gerando um teste mais robusto e reprodutível. Em geral, o formato dos picos é melhorado a baixo valor de pH, mas a detectabilidade é diminuída [64]. Tanaka et al. [70] recomendam que a atividade silanofílica seja avaliada em condições neutras e ácidas para também medir os sítios trocadores iônicos nessas duas condições.

Verzele e Dewaele [71] reportaram a influência da contaminação da sílica por metais utilizando uma mistura contendo vários ácidos e descreveu a atividade metalofílica baseado na assimetria do pico desses compostos. Engelhardt e Lobert [72] descreveram o uso de 2,2-bipiridina como indicador de contaminação por metais, pois esse composto forma quelatos com metais. Entretanto, como o formato do pico da 2,2-bipiridina também é co-influenciada pela atividade silanofílica, foi definida uma razão da assimetria do pico da 2,2-bipiridina e a 4,4-bipiridina (a 4,4-bipiridina não forma quelato, mas interage com silanóis). Porém, esse método apresentou a desvantagem de os compostos poderem reagir com os “metais” do sistema cromatográfico, como os fritz, tubos e conexões, não havendo confiabilidade nos resultados.

Uma completa caracterização das FE é extremamente desejável para diferenciar características aparentemente semelhantes entre as FE. Embora muitos avanços vêm ocorrendo na ciência das separações, ainda coloca-se no mercado FE preparadas por métodos que formam interações fracas entre a sílica (ou outro suporte cromatográfico) e o ligante e por isso ainda carecem de seleção.

1.10.3 - O método de Tanaka para caracterização cromatográfica

Para facilitar a discussão dos resultados, o método desenvolvido por Tanaka et al. [70] para avaliação cromatográfica será aqui brevemente discutido, uma vez que alguns dos parâmetros foram utilizados neste trabalho.

O método de avaliação cromatográfica desenvolvido por Tanaka et al. vem sendo utilizado por muitos outros pesquisadores, porque é um teste robusto,

reprodutível e é possível avaliar características sutis entre as diferentes FE. Os parâmetros cromatográficos avaliados foram:

- **Fator de retenção (k):** foram avaliados os fatores de retenção (k) de alguns compostos apolares como o benzeno, acetofenona, metil benzoato e amilbenzeno. O k do amilbenzeno (k_{AB}) é um indicador da densidade do ligante, relacionado com a área superficial da sílica e sua cobertura.
- **Hidrofobicidade [α_{CH_2}]:** medida da razão entre o fator de retenção do amilbenzeno (k_{AB}) e do butilbenzeno (k_{BB}) em FM metanol / água 80:20 v/v. Esta também é uma medida da cobertura da superfície da sílica nas FE, pois a diferença entre os dois compostos é de um grupo metil e a separação depende da densidade do ligante.
- **Seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$):** razão entre os fatores de retenção do trifenileno e o o-terfenil, $\alpha_{T/O} = k_T/k_O$. Estes compostos têm propriedades hidrofóbicas similares, mas diferem na planaridade da molécula e esta é uma medida da seletividade e da funcionalidade do agente sililante.
- **Capacidade para formar ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/F}$):** razão entre os fatores de retenção da cafeína e o fenol, $\alpha_{C/F} = k_C/k_F$. Esta é uma medida da quantidade de silanóis residuais e o grau de capeamento das FE, uma vez que a cafeína forma ligação de hidrogênio com os silanóis residuais. O fenol é usado para normalizar a retenção desses compostos polares e cancelar as diferenças nas propriedades hidrofóbicas entre as diferentes FE.
- **Capacidade de troca iônica a pH 7,6 ($\alpha_{A/FpH\ 7,6}$):** razão entre os fatores de retenção de alguma amina e do fenol, $\alpha_{A/FpH\ 7,6} = k_A/k_F$, em FM tamponada a pH 7,6. Esta também é uma estimativa da atividade total dos silanóis residuais, pois neste pH os grupos silanóis estão na forma desprotonada (iônica) (SiO^-), podendo interagir através do mecanismo de troca iônica com aminas protonadas neste pH.
- **Capacidade de troca iônica a pH 2,7 ($\alpha_{A/FpH\ 2,7}$):** razão entre os fatores de retenção de uma amina e do fenol, $\alpha_{A/FpH\ 2,7} = k_A/k_F$, em FM tamponada a pH 2,7. Este parâmetro define a atividade ácida dos grupos silanóis

residuais, pois neste pH os grupos silanóis estão na forma protonada (SiOH) e, se a sílica contém impurezas metálicas na sua matriz, os silanóis adjacentes aos metais adquirem um caráter mais ácido e pelo mecanismo de troca iônica as aminas protonadas, neste pH, interagem facilmente com esses silanóis mais ácidos da superfície da sílica.

1.10.4 - O uso da análise de componentes principais (PCA) como uma ferramenta para classificação de colunas cromatográficas [62]

A análise de componentes principais (PCA) é uma ferramenta que vem cada vez mais, sendo empregada para a classificação de colunas cromatográficas [62,73,74]. Essa ferramenta ajuda a identificar colunas com propriedades equivalentes, classificar colunas do tipo farmacopéicas, melhor entender os mecanismos de separação e eliminar parâmetros cromatográficos que geram os mesmos tipos de informações [62].

A PCA é geralmente usada para interpretar uma quantidade grande de dados. O número de variáveis (no caso, os parâmetros de caracterização cromatográfica) é reduzida pela projeção dos objetos de estudo (as diferentes FE) dentro de um número menor de novas variáveis, chamadas de componentes principais (CP). As CP são orientadas de forma que a primeira CP descreva o máximo possível da variação original entre os objetos. A segunda CP é orientada de maneira ortogonal a primeira CP, descrevendo o máximo possível da variação entre os objetos que não foi descrita pela primeira CP e assim por diante [62].

O gráfico da projeção dos objetos dentro das CP é chamado de escores ("scores"). Graficando os escores de duas CP é possível graficamente encontrar similaridades e diferenças entre os objetos (as FE). A distância entre os objetos dentro dos gráficos dos escores mostra se eles são semelhantes ou diferentes [62].

O quanto de cada variável original é incluído nas CP é descrito pelo chamado gráfico dos carregamentos ("loadings"). Graficando os carregamentos de duas CP, é possível verificar quais das variáveis originais são mais importantes (a

maior distância da origem) e se as variáveis são correlacionadas (a mesma direção ou a direção oposta em linha reta através da origem) [62].

O número de FE incluídas nos conjuntos de dados usados na avaliação por PCA vem aumentando cada vez mais, pois novas gerações de FE estão sendo colocadas no mercado. Euerby e Petersson [75] publicaram em 2000 um artigo classificando 79 colunas do tipo C-18 disponíveis comercialmente. Eles usaram parâmetros de seleção cromatográfica bem estabelecidos, como os testes de Tanaka, e utilizaram o PCA como uma ferramenta de seleção. Recentemente, eles publicaram um artigo incluindo no conjunto de dados, novos tipos de FE contendo cadeias do tipo ciano, fenil e pefluoradas, FE com grupos polares embutidos, FE polares/hidrofílicas (aumento da seletividade polar), capeadas ou não, tipo aqua, FE alquil de cadeia pequena, algumas FE não baseadas em sílica, e as tradicionais fases C-8 e C-18 [62].

Neste novo artigo, o PCA dos dados completos foi utilizado para caracterizar sub-classes. As FE não baseadas em suporte de sílica obtiveram perfis bastante diferentes das FE baseadas em sílica. Com exclusão dessas FE não baseadas em sílica e as FE do tipo amino, nas primeira e segunda CP, três grandes grupos foram diferenciados. Um grupo A foi caracterizado pela alta atividade silanofílica e baixa retenção, sendo estas as tradicionais FE C-18. Em contraste, um grupo B, contendo a nova geração de FE C-18, exibe baixa atividade silanofílica e alta retenção. Um grupo C continha FE com grupos polares embutidos e estas foram diferenciados das outras, devido sua característica de alta seletividade estérica e baixas retenção, hidrofobicidade e atividade silanofílica [62].

Nas primeira e terceira CP algumas FE foram agrupadas juntas, apresentando alta atividade silanofílica e matalofílica. Outras FE foram separadas devido suas altas retenções e hidrofobicidade, atribuído ao alto conteúdo de carbono na cadeia (> 22). Muitas das FE tipo ciano foram agrupadas juntas e as FE perfluoradas também formaram um grupo devido ao alto valor no parâmetro de seletividade estérica. Foi mostrado também por esse conjunto de dados que a capacidade de formar ligação de hidrogênio não se correlaciona com a

capacidade de troca iônica, ou seja, esses dois mecanismos de retenção acontecem separadamente [62].

O PCA de somente FE tipos C-8 e C-18 diferenciou-se das demais devido a pureza do suporte de sílica, separando FE preparadas com as tradicionais sílicas do tipo A, sílicas pré-tratadas hidrotermicamente com ácido ou preparadas com a nova geração de sílicas altamente puras, que contém baixa quantidade de impurezas metálicas. Estas FE foram diferenciadas pelo fator capacidade de troca iônica em pH 2,7, sendo um valor alto para as tradicionais FE C-8 e C-18 e baixo para as FE preparadas com as sílicas altamente puras. Estas características foram refletidas no desempenho cromatográfico de cinco bases hidrofílicas. O melhor formato dos picos foi obtido com as sílicas de maior pureza, com picos simétricos para todos as bases, seguido da sílica purificada e reidroxilada pelo pré-tratamento hidrotérmico ácido, apresentado uma leve cauda nos picos dos compostos e, por fim, a FE preparada com uma sílica do tipo A, que obteve picos com intensas caudas e a adsorção irreversível de dois dos compostos [62].

1.11 - Colunas cromatográficas

A coluna é o coração do sistema cromatográfico, pois é nela que há a separação dos componentes da mistura [59,76]. A seletividade, a eficiência e a estabilidade da coluna são afetadas pela natureza do material de recheio e pelas dimensões da coluna. A Figura 17 indica como os componentes da coluna contribuem para o desempenho das FE numa separação cromatográfica.

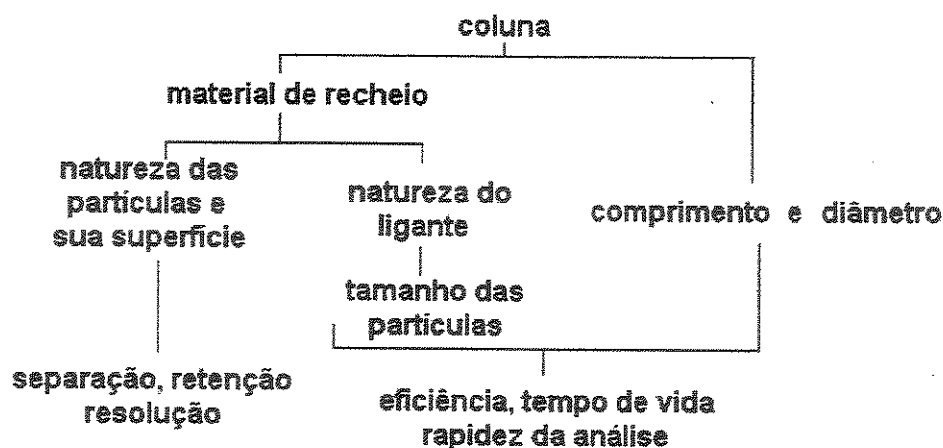


Figura 17: Relações entre os componentes da coluna e o desempenho cromatográficos das FE [76].

As colunas para CLAE devem ser resistentes para suportar as altas pressões empregadas e ser inerte frente aos diversos tipos de solventes da FM. A maioria das colunas são constituídas de aço inoxidável 316 devido à sua rigidez e resistência mecânica [76].

O diâmetro interno da coluna afeta a quantidade de amostra que pode ser analisada, a vazão da FM, a eficiência e o alargamento da banda cromatográfica. Quanto maior o diâmetro interno, maior a capacidade de amostragem e maior a vazão da FM que pode ser utilizada. Entretanto, o alargamento da banda cromatográfica aumenta com o diâmetro interno da coluna, o que diminui a detectabilidade da amostra no detector. A maioria das colunas analíticas tem diâmetros internos que variam de 2,0 a 5,0 mm. Colunas com diâmetro interno de 2,0 mm ou menos são usadas em aplicações que necessitam alta detectabilidade, quando a quantidade de amostra é limitada ou quando os custos dos solventes são significativos [76].

O comprimento da coluna afeta tanto a eficiência como a velocidade das separações. Colunas longas resultam em longos tempos de análise, porém sua eficiência é aumentada. Em geral, colunas curtas são usadas em separações simples. Colunas analíticas podem variar de 30 a 300 mm de comprimento [76].

1.12 – O enchimento de colunas cromatográficas

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

O enchimento de colunas é considerado mais como uma arte do que uma ciência e as experiências nos procedimentos dificilmente poderiam ser trocadas entre pesquisadores [77]. Além disso, cada laboratório possui um sistema de enchimento diferente e, mesmo usando como recheio fases estacionárias derivadas das sílicas, elas podem diferir quanto ao fabricante, forma, tamanho de partículas e funcionalidade [78]. Resumidamente, pode-se afirmar que, no procedimento de enchimento de colunas, utilizando o método de suspensão sob alta pressão, além das variáveis citadas acima, existem pelo menos cinco outras variáveis diferentes.

A primeira variável seria a direção do enchimento, que pode ser ascendente ou descendente. Alguns trabalhos no passado recomendavam que, para partículas menores que 10 μm , era mais interessante utilizar o enchimento na direção ascendente, evitando assim que os aglomerados entrassem no leito da coluna, obtendo uma coluna com um leito mais homogêneo. Entretanto, outros autores recomendam que, se o enchimento na direção descendente for rápido, este deve ser preferido, pois é mais reproduzível quando comparado ao método ascendente [79].

A segunda variável está relacionada ao tipo de solvente utilizado na preparação da suspensão de sílica. O solvente apropriado para a suspensão deve evitar a formação de aglomerados de partículas e, para isso, as interações sílica-solvente devem ser maiores que as interações entre as partículas de sílica.

Portanto, é muito importante estudar quimicamente a superfície da sílica a ser utilizada como FE [80].

Outro aspecto importante diz respeito à densidade e à viscosidade do solvente de suspensão a ser escolhido. Sabe-se que, quanto mais denso e viscoso for o solvente, mais lento será o enchimento da coluna. Na prática, o que se procura fazer é encontrar um solvente que apresente baixa viscosidade e densidade relativamente próxima à da sílica utilizada como recheio. Pode-se ainda escolher solventes de baixa densidade, desde que a suspensão seja suficientemente estável durante o procedimento de enchimento [81].

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

Sabe-se que, quanto menor o tamanho das partículas, maior a pressão a ser utilizada no enchimento e que partículas irregulares necessitam de uma pressão ainda maior, quando comparadas com as partículas esféricas, utilizando o mesmo solvente de suspensão. Deve-se tomar o cuidado também de não utilizar pressões muito altas a fim de não danificar as partículas e diminuir a eficiência da coluna.

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

A última variável está relacionada com a forma de agitação da suspensão, que pode ser mecânica, com o auxílio do ultrassom ou a combinação de ambos. Na realidade, o que se deseja é obter um alto grau de dispersão das partículas de sílica na suspensão e, no caso do ultrassom, cuidados devem ser tomados para

não danificar as partículas da sílica. Além disso, pode-se usar diferentes concentrações da suspensão, mas os valores utilizados são geralmente de 10, 20, e 30 % em relação massa de sílica e volume de solvente.

Infelizmente, muito dos avanços no procedimento de enchimento de colunas não são publicados, pois na maioria das vezes são propriedades dos fabricantes de colunas e portanto não existe nenhum interesse em divulgar as técnicas utilizadas no enchimento das colunas para CLAE [78].

1.13 – Planejamento fatorial

Um dos problemas mais comuns, para quem faz experimentos, é analisar os efeitos de dois ou mais tipos de tratamentos no mesmo experimento. Nestes casos, os tipos de tratamentos são os **fatores** e as diferentes categorias de um fator são chamadas **níveis**, o experimento é chamado de **fatorial** e o que se está interessado em descobrir é a **resposta** [82,83].

No planejamento de qualquer experimento, a primeira coisa que se deve fazer é decidir quais são os fatores e as repostas de interesse. Os fatores, em geral, são as variáveis que o experimentador tem condições de controlar, mas, às vezes, num determinado experimento, sabe-se que existem fatores que podem afetar as repostas, porém não se têm condições de controlar ou não se está interessado [83].

Para fazer um **planejamento fatorial completo**, devem-se realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores. Para k fatores (variáveis controladas pelo experimentador) um planejamento completo de dois níveis exige a realização de 2^k **ensaios** diferentes, sendo chamado de planejamento fatorial 2^k . O tipo mais simples de experimento fatorial é o 2^2 (lê-se: dois por dois). Nestes experimentos são analisados dois fatores, em dois níveis e são realizados 4 ensaios. Num planejamento fatorial 2^3 (dois por três), os fatores envolvidos são três, cada um em dois níveis, sendo realizados 8 ensaios [83].

A lista dessas combinações de níveis e fatores, que é **chamada de matriz de planejamento**, é representada pela combinação dos sinais (-) (nível inferior) e

(+) (nível superior). A Tabela 4 mostra um exemplo de como são colocados os sinais numa matriz de planejamento fatorial 2^3 . Os sinais dos níveis dos fatores se alternam na primeira coluna, sempre começando com o nível (-), sendo que na segunda e terceira coluna as alterações são de pares ou por quatro. Os sinais para calcular as interações de dois fatores, 12, 13, 23, e de três fatores, 123, são obtidos multiplicando-se os sinais das correspondentes colunas, pertencentes aos fatores principais.

Tabela 4: Relações de sinais para um planejamento fatorial 2^3 [83].

Fator Ensaio	(1)	(2)	(3)	(12)	(13)	(23)	(123)	Resposta
1	-	-	-	+	+	+	-	$\bar{y}_1$
2	+	-	-	-	-	+	+	$\bar{y}_2$
3	-	+	-	-	+	-	+	$\bar{y}_3$
4	+	+	-	+	-	-	-	$\bar{y}_4$
5	-	-	+	+	-	-	+	$\bar{y}_5$
6	+	-	+	-	+	-	-	$\bar{y}_6$
7	-	+	+	-	-	+	-	$\bar{y}_7$
8	+	+	+	+	+	+	+	$\bar{y}_8$

A partir da matriz de planejamento e as respostas dos ensaios pode-se estudar os efeitos de qualquer fator sobre uma dada resposta. Quando o efeito de uma variável depende do nível de outra ou de outras, diz-se que essas variáveis interagem e pode-se calcular o **efeito de interação** sobre a resposta. O efeito de um fator sem interações é chamado de **efeito principal**. Os efeitos são calculados a partir da Equação 12, onde $\bar{y}_+$ é a média das respostas no nível (+) e $\bar{y}_-$ é a média das respostas no nível (-).

$$\text{Efeito} = (\bar{y}_+ - \bar{y}_-) \quad (12)$$

Por exemplo, a partir da matriz de planejamento da Tabela 4, o efeito do fator principal 1 é dado por:

$$\text{Efeito fator 1} = \left(\frac{\bar{y}_2 + \bar{y}_4 + \bar{y}_6 + \bar{y}_8}{4} \right) - \left(\frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_3 + \bar{y}_5 + \bar{y}_7}{4} \right) \quad (13),$$

cujos valores de $\bar{y}_2, \bar{y}_4, \bar{y}_6, \bar{y}_8$ são as repostas nos níveis (+) do fator 1 e $\bar{y}_1, \bar{y}_3, \bar{y}_5, \bar{y}_7$ são as respostas nos níveis (-) do mesmo fator.

1.13.1 - A análise da variância e o teste de hipóteses

Normalmente, para se fazer uma **análise de variância** é preciso proceder a uma série de cálculos e saber interpretar as fórmulas, que exigem o conhecimento da notação. Na análise de variância, a idéia é comparar a variação nos valores das repostas devido aos tratamentos ou a variação devido ao acaso. Para decidir qual dessas duas hipóteses é a mais provável, é necessário submeter os dados aos **testes estatísticos de significância** [82].

A partir das repetições feitas nos ensaios dos planejamentos fatoriais pode-se obter uma estimativa do **desvio padrão experimental** e, também, de acordo com a extensão desse desvio padrão, decidir se existem ou não efeitos estatisticamente significativos dos fatores sobre a resposta. Para obter as estimativas do desvio padrão experimental, primeiramente calcula-se a **estimativa da variância para cada observação individual**, s^2 , dada por:

$$s^2 = \frac{\sum (y_i - \bar{y})^2}{n - 1} \quad (14)$$

onde y_i = resposta, $\bar{y}$ = média das repostas e n = número de repostas.

Seguidamente, calcula-se a **estimativa conjunta de variância**, s_p^2 pela Equação 15 :

$$s_p^2 = \frac{(v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_n s_n^2)}{(v_1 + v_2 + \dots + v_n)} \quad (15)$$

onde $v_i = n_i - 1$ é o número de graus de liberdade de s_i^2 , a estimativa de variância do i – ésimo ensaio.

A raiz quadrada de s_p^2 fornece a estimativa do **desvio padrão experimental** das respostas, s .

$$s = (s_p^2)^{1/2} \quad (16)$$

Para verificar quais os efeitos calculados são estatisticamente significativos (diferentes de zero), pode-se empregar o teste t , de Student, o qual possui valores tabelados, considerando o nível de 95 % de confiança, com os graus de liberdade dado por $\sum v_i$ (soma do número de graus de liberdade para cada ensaio). Para isto, é necessário calcular o desvio padrão de um efeito, através da raiz quadrada da **variância de um efeito**, ou seja:

$$\text{Variância de um efeito: } V_{\text{efeito}} = \alpha_i^2 s_p^2 \quad (17),$$

onde α_i^2 = constante que depende do número de ensaios.

$$\text{Desvio padrão de um efeito: } s_{\text{efeito}} = (V_{\text{efeito}})^{1/2} \quad (18)$$

Os efeitos cujas estimativas forem superiores em valor absoluto ao produto do desvio padrão de um efeito pelo valor de distribuição de Student ($s_{\text{efeito}} \times t_{v_i}$) serão estatisticamente significativos [83].

1.13.2 - Planejamento fatorial fracionário

O número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial 2^k completo aumenta rapidamente com o aumento de k , o número de fatores investigados. Quando o número de fatores aumenta, crescem as chances de um ou mais deles não afetarem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais ou por meio de efeitos de interação. Mas, para não excluir fatores que possam ser importantes, é possível, através de **planejamentos fatoriais fracionários**, estudar o maior número de fatores sem aumentar o número de ensaios. Isso é possível porque no jogo de sinais da matriz de planejamento há fatores e interações que se confundem, ou seja, tem os mesmos sinais [83].

Num planejamento fatorial 2^4 completo (4 fatores sendo estudados em dois níveis) o número de ensaios é de 16. É possível diminuir o número de ensaios pela metade através de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , que uma **fração meia** de um planejamento fatorial 2^4 completo. Essa fração meia foi obtida a partir da igualdade $4 = 123$, ou seja, os sinais do fator 4 é o produto dos sinais dos três primeiros fatores, seguindo a mesma relação de sinais de um planejamento fatorial 2^3 (Tabela 4). A literatura costuma apresentar essa relação na forma equivalente $I = 1234$, que é a relação geradora do fatorial fracionário. Através dela é possível obter todos os sinais da matriz de planejamento. A Tabela 5 mostra a relação entre as colunas com os mesmos sinais para este planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} [83].

Tabela 5: Relação entre as colunas de sinais.

Relação entre as colunas de sinais
I = 1234
1 = 234
2 = 134
3 = 124
4 = 123
12 = 34
13 = 24
14 = 23

Um **planejamento fatorial saturado** é aquele que permite um máximo de fatores a serem investigados com um mínimo de ensaios [83].

1.13.3 - Metodologia da superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta tem duas etapas distintas: a modelagem e o deslocamento, que são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima da superfície investigada. A modelagem normalmente é feita ajustando-se modelos simples, em geral, lineares ou quadráticos, às respostas obtidas com planejamentos fatoriais. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada. Através da análise de variância dos dados é possível verificar se o modelo ajustado tem ou não falta de ajuste, ou seja, se ele é estatisticamente significativo [83].

2 - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi preparar e avaliar por métodos químicos, físicos, cromatográficos e de estabilidade fases estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa, a partir da sorção e imobilização por tratamento térmico de poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), tipo C-8, sobre sílicas sem pré-tratamento e pré-tratadas com lavagem com água ou solução ácida ou básica em refluxo a 100 °C ou aquecimento entre 300 °C e 350 °C, seguida de lavagem com solução ácida, em refluxo a 100 °C . Estas etapas de pré-tratamentos foram estratégias que visaram reidroxilar e/ou purificar a superfície das sílicas como tentativas para melhorar, a repetitividade, o desempenho cromatográfico e de estabilidade das fases estacionárias preparadas.

3 - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Materiais

3.1.1 - Reagentes

- Acetona p. a., Merck
- Ácido clorídrico p. a., Merck
- Ácido fosfórico, Mallinckrodt
- Ácido nítrico p. a., Synth
- Ácido perclórico p. a., Nuclear
- Água deionizada, sistema Milli-Q, Millipore
- Benzonitrila, Riedel-de Haen
- Benzeno p. a., Synth
- Bicarbonato de sódio p. a., Alkimia
- Clorofórmio p. a., Merck
- Dihidrogenofostato de potássio p. a., Merck
- EDTA p. a., Synth
- Fenol p. a., Ecibra
- Hexano grau cromatográfico, Tedia
- Hidrogenofosfato de dipotássio p. a., Merck
- Hidróxido de potássio p. a., Merck
- Hidróxido de sódio p. a., Grupo Química
- Isopropanol p. a., Tedia
- Metanol grau cromatográfico, Tedia
- 1-Metil piperidina, Aldrich
- Naftaleno p. a., Vetec Química Fina
- N,N-Dimetilanilina p. a., Quimex
- Tolueno p. a., Merck
- Uracil, Aldrich

3.1.2 - Equipamentos

- Agitador Magnético, Corning Glass Works modelo PC-351
- Agitador Roto Torque, Cole-Parmer Instruments Company modelo 7637-10
- Agitador Roto Torque, Marconi modelo MA161
- Analisador Elementar, Perkin Elmer modelo CHN-2400
- Analisador Termogravimétrico, TA Instruments modelo TGA-2050
- Balança Analítica (sensibilidade de 0.0001g), Fischer Scientific modelo A-250
- Bomba a Vácuo, Marconi
- Bomba a Vácuo, KNF Laboport
- Bomba de Enchimento de Colunas com faixa de pressão de 6,9 a 60 MPa (1000-10000 psi), Alltech modelo 1666 Slurry Packer
- Bombas de Enchimento de Colunas com faixa de pressão de 6,9 a 207,0 MPa (1000-30000 psi), Haskel modelos 51769 e 16501
- Bomba para CLAE, Waters modelo 510
- Cromatógrafo a Líquido utilizado para a avaliação cromatográfica das colunas, composto por: Bomba de Alta Pressão, tipo recíproca de pistão duplo, Shimadzu, modelo LC-10 A; Injetor com alça de amostragem de 5 μ L, Rheodyne modelo 8125; Detector Espectrofotométrico de Absorção no UV-vis, comprimento de onda fixo em 254 nm, Alltech modelo 450 ou Detector Espectrofotométrico de Absorção no UV-vis, comprimento de onda variável entre 190 e 900, Shimadzu modelo SPD-10 A; Sistema de Aquisição de Dados de Microcomputador, com Software de aquisição de dados Cromatográficos Chrom Perfect e de Tratamento de Dados Report Write Plus da Chrom Perfect.
- Cromatógrafo a Líquido utilizado para a realização dos testes de estabilidade em condições agressivas, composto por: Bomba de Alta Pressão, tipo recíproca de pistão duplo, Shimadzu modelo LC-10 A; Auto Injetor com amostragem programada de 10 μ L, Shimadzu modelo SIL-10 AD; Detector Espectrofotométrico de Absorção no UV-vis, de comprimento de onda variável entre 190 e 900, Shimadzu modelo SPD-10 A; Forno para Coluna, Shimadzu modelo CTO-10AS; Controlador de Sistema, Shimadzu modelo SCL-10 A e

Sistema de Aquisição de Dados: Microcomputador, com Software de aquisição de dados cromatográficos Class VP da Shimadzu.

- Espectrofotômetro Infravermelho, Perkin Elmer modelo FT-IR 1600
- Espectrofotômetro de Ressonância Magnética Nuclear, Bruker AC / 300MHz
- Estufa a Vácuo, Yamato modelo ADP-21
- Forno de Aquecimento a Altas Temperaturas, EDG modelo 10P-S, equipado com sistema de fluxo de nitrogênio
- Geladeira, General Electric
- Manta de Aquecimento de 250 mL, potência de 200 W, Fisatom modelo 52
- Medidor da Área Superficial, Micrometrics modelo ASAP-2010
- Microscópio Eletrônico de Varredura, JEOL modelo JSM-5900 LV, localizado no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas, SP
- pH metro, Digimed modelo DC21
- Reator Nuclear, TRIGA MARK I modelo IPR-R1, localizado no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear / Comissão Nacional de Energia Nuclear (CDTN / CNEN) em Belo Horizonte, MG
- Sistemas Ultra-Som, Thornton modelos T14 e T50

3.1.3 – Vidraria

- Balão de Destilação de 250 mL, Vidrolabor
- Béqueres
- Condensador de Bolas
- Funil de Placa Porosa n ° 4 de 125 mL, Vidrolabor

3.1.4 - Gás

- Nitrogênio, White Martins

3.1.5 - Suportes cromatográficos

Como suporte cromatográfico, foram utilizadas as sílicas amorfas porosas:

- Kromasil, obtida da Akzo Nobel, lote nº AT 0235, de forma esférica, tamanho de partícula de 5 μm .
- Rainin, obtida da Varian lote nº 1324-B, de forma esférica, tamanho de partícula de 5 μm .

3.1.6 - Fase estacionária líquida

Como líquido estacionário foi utilizado o polímero, da classe dos silicones:

- Poli(metiloctilsiloxano) (PMOS), da United Chemical Technologies, viscosidade 600 a 1000 centitokes a 25 °C, densidade de 0,97 g / cm^3 a 25 °C, massa molar por peso médio (M_w) de 6000, CAS nº 068440-90-4, lote nº 145-041.

3.2 - Procedimentos de pré-tratamentos das sílicas

Os procedimentos de pré-tratamentos das sílicas, antes do preparo das fases estacionárias, foram feitos de diferentes maneiras:

- Tratada com água por 24 h em refluxo a 100 °C;
- Tratada com solução ácida (HNO_3 , HCl , H_2SO_4 ou H_3PO_4) ou básica (NH_4OH , EDTA, KOH ou NaOH), em refluxo a 100 °C, em diferentes concentrações e por diferentes tempos de reação;
- Aquecida entre 300 e 400 °C (para desidroxilação da superfície da sílica) dentro de um tubo de aço inoxidável acoplado com filtros, redutores de vazão e terminais em suas extremidades, em forno de aquecimento vertical sob fluxo de nitrogênio (Figura 18). Uma de suas extremidades foi conectada à linha de gás nitrogênio, sob um fluxo de 5 mL min^{-1} e a outra

foi conectada a uma tubulação para medir o fluxo e direcionar a saída do gás para fora do forno. Depois, fez-se a programação do forno, iniciando na temperatura ambiente e elevando, seguindo uma rampa de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, até a temperatura programada. Após o aquecimento, a sílica foi submetida a um tratamento em solução de HNO_3 , em refluxo a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, em diferentes concentrações e por diferentes tempos de reação, para reidroxilação da superfície da sílica.

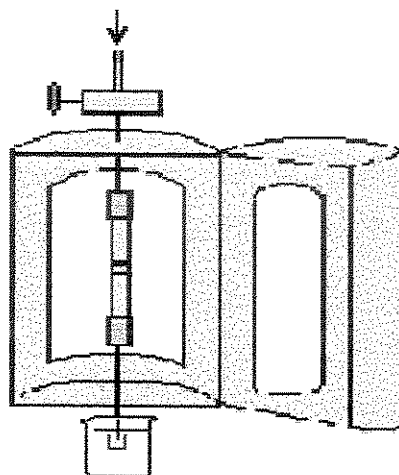


Figura 18: Forno vertical de aquecimento a altas temperaturas sob fluxo de nitrogênio.

3.3 - Preparo das fases estacionárias

A primeira etapa no preparo das FE consistiu em ativar um ou dois gramas de sílica na estufa a uma temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h e a seguir suspendê-las em 30 mL de hexano e submetê-las ao ultra-som por 10 min. Em outro recipiente, uma quantidade de PMOS (quantidade otimizada juntamente com os fatores de temperatura e tempo de imobilização térmica e os dias de repouso da FE) foi solubilizada em 15 mL de hexano com agitação magnética por aproximadamente 10 min. A suspensão de sílica foi transferida para o béquer contendo a solução de PMOS já sob agitação, coberto e deixado sob agitação por mais 3 h. Transcorrido esse período, o béquer foi coberto com papel furado e deixado na capela para

evaporação do solvente por um período fixo (6 dias para a sílica Kromasil ou 4 ou 8 dias para a sílica Rainin).

Após este período de repouso, iniciou-se a segunda etapa do procedimento de preparo das FE, que consiste na imobilização térmica do PMOS sobre a sílica, num forno de aquecimento vertical conectado a uma linha de gás nitrogênio (Figura 18), seguindo o mesmo procedimento de aquecimento da sílica a altas temperaturas, mas utilizando a temperatura programada ideal para este estudo, conforme descrito a seguir.

3.4 – Otimização das condições de preparo das fases estacionárias

As condições de imobilização térmica das FE de temperatura e tempo de reação foram otimizadas seguindo um planejamento fatorial, juntamente com o fator quantidade de PMOS inicial e o fator tempo de repouso da FE após o preparo da FE para a sílica Rainin.

As quantidades de PMOS em cada FE foram descritas em termos de porcentagem do polímero na FE (Equação 19) e de massa específica, $\bar{m}_{PMOS}$, que é a relação da massa do polímero (em g) para um grama de sílica (Equação 20). A Tabela 6 mostra uma comparação destes valores:

$$\%_{PMOS} = \frac{g_{PMOS}}{g_{PMOS} + g_{sílica}} \cdot 100 \quad (19)$$

$$\bar{m}_{PMOS} = \frac{g_{PMOSinicial}}{1g_{sílica}} \quad (20)$$

Tabela 6: Conversão da porcentagem de PMOS em massa específica de PMOS contido nas FE preparadas com a sílica Kromasil.

% de PMOS	$\overline{m}_{\text{PMOS}}$
30	0,429
35	0,554
40	0,667
45	0,818
50	1,000
55	1,222
60	1,500

A $\overline{m}_{\text{PMOSretido}}$ é calculada utilizando o valor obtido da % de carbono (% C), através da análise elementar de carbono, das FE após seu preparo (após a etapa de extração dos excessos de PMOS). Considerando que 62 % da massa de PMOS é referente à carbono, utilizamos a Equação 21 para transformar a quantidade de carbono da FE em massa específica, enquanto que a Equação 22 oferece esse valor em termos de % $_{\text{PMOSretido}}$.

$$\overline{m}_{\text{PMOSretido}} = \frac{\%C}{62 - \%C} \quad (21)$$

$$\%_{\text{PMOSretido}} = \frac{\overline{m}_{\text{PMOSretido}}}{\overline{m}_{\text{PMOSinicial}}} \cdot 100 \quad (22)$$

Também é possível calcular a espessura da camada, τ , de PMOS formada nas FE preparadas através da Equação 23:

$$\tau = - \left(\frac{\sqrt{d^2 - Fd^2} - d}{2} \right) \quad (23)$$

onde F é a fração de PMOS imobilizado sobre a sílica e d é o diâmetro médio de poros. Para este cálculo, assume-se que os poros da sílica têm um diâmetro constante e que o polímero imobilizado é caracterizado por uma camada de espessura constante nas paredes dos poros da sílica.

A fração F é obtida a partir da Equação 24:

$$F = \frac{\overline{m}_{PMOSretido}}{\overline{m}_{PMOSporoscheios}} \quad (24)$$

As massas necessárias para encher os poros da sílica são mostrados na Tabela 7, considerando a densidade (ρ) do PMOS igual a $0,91 \text{ g mL}^{-1}$ e os volumes de poro específicos (vp) de cada sílica (Equação 25).

$$\overline{m}_{PMOSPOROSCHEIOS} = vp_{SÍLICA} (\text{mL g}^{-1}) \times \rho_{PMOS} (\text{g mL}^{-1}) \quad (25)$$

Tabela 7: Volume dos poros e massa específica de PMOS necessária para encher os poros das sílicas.

Sílica	Volume de poros (mL g^{-1})	$\overline{m}_{PMOS}$ para encher os poros ($\text{g}_{PMOS}/\text{g}_{sílica}$)
Kromasil	0,88	0,801
Rainin	0,54	0,491

3.5 - Extração dos excessos de PMOS

Os excessos de PMOS que não foram imobilizados termicamente foram extraídos com solventes extratores. Para este procedimento, o tubo de aço inoxidável contendo a FE sorvida e imobilizada foi conectado a uma bomba cromatográfica (Figura 19). As FE preparadas com a sílica Kromasil foram extraídas pela passagem de clorofórmio pelo tubo de aço, numa vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ por 2 h seguido de metanol a $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ por 2 h. Para a sílica Rainin o tubo de extração contendo a FE foi colocado em um forno de aquecimento de colunas cromatográficas a uma temperatura de 50°C e conectado a uma bomba cromatográfica, utilizando o hexano como solvente extrator numa vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ por 3 h. Após a extração, a FE foi transferida para um béquer e deixada secar na estufa a temperatura de 40°C por uma noite.

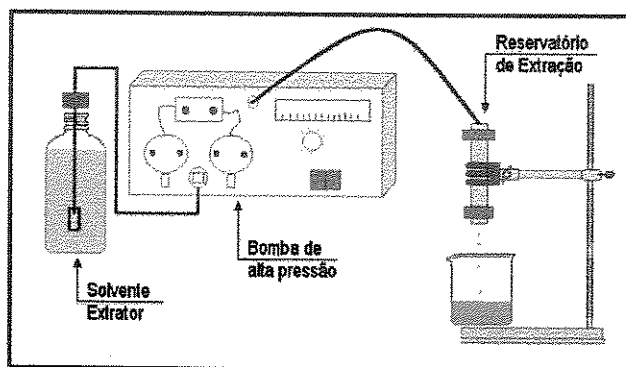


Figura 19: Sistema de extração dos excessos de PMOS da FE.

3.6 - Colunas cromatográficas

Neste trabalho, foram usadas colunas de aço inoxidável 316 no formato de um tubo cilíndrico de comprimento de 60 mm com 3,9 mm de diâmetro interno. Além do corpo de aço inoxidável, a coluna é composta por outros acessórios que ficam conectados em suas extremidades: anel de aço inoxidável, filtro sinterizado poroso de $0,5 \mu\text{m}$, redutor de fluxo de aço inoxidável, tubo de alinhamento de aço inoxidável, terminal e tampa para coluna. A Figura 20 mostra uma coluna

cromatográfica. Tanto as colunas como os acessórios foram confeccionados na oficina mecânica do Instituto de Química da Unicamp.

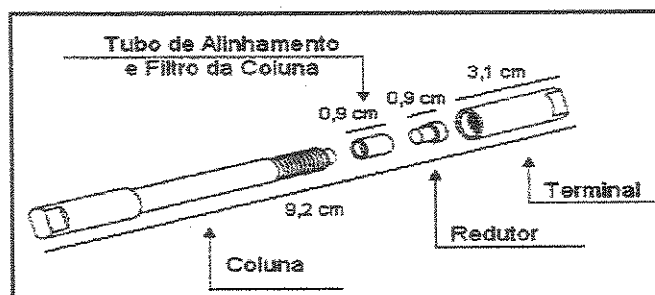


Figura 20: Peças da coluna cromatográfica.

3.7 - Polimento das colunas

A superfície interna da coluna deve estar muito bem polida para não oferecer qualquer tipo de resistência ao escoamento do líquido e assim conseguir a máxima eficiência. Para isso, as colunas foram polidas de acordo com um método desenvolvido no LabCrom [84]. Neste procedimento, a coluna é polida de acordo com o esquema apresentado na Figura 21.

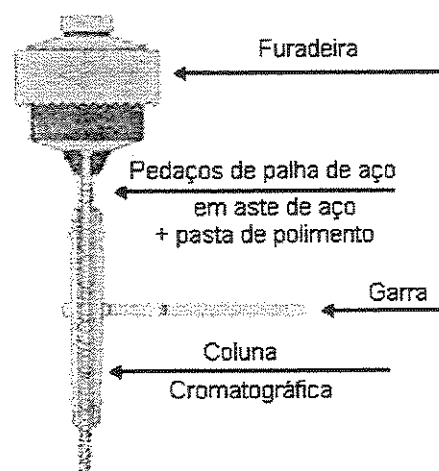


Figura 21: Configuração do sistema utilizado no polimento das colunas cromatográficas [84].

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

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

Após o polimento, a coluna é esfregada interna e externamente com uma escova, água e sabão e em seguida lavada com solução de HNO_3 1:1 v/v para remover qualquer tipo de impureza, que por ventura tenha ficado aderida à superfície interna da coluna e depois é lavada abundantemente com água deionizada e, por fim, com hexano para retirar a gordura.

3.8 - Preparo da suspensão de fase estacionária para o enchimento das colunas cromatográficas

Neste trabalho, foi utilizado o clorofórmio como solvente de suspensão, baseado em resultados prévios, que investigaram a substituição do tetracloreto de carbono, um solvente bastante utilizado em trabalhos anteriores no LabCrom, mas que teve a sua venda controlada, impossibilitando a compra em grande escala [34,85] .

As suspensões de FE utilizadas para fazer o enchimento das colunas foram preparadas num tubo de ensaio com tampa, utilizando uma concentração de 10 % m/v em clorofórmio. As suspensões ficaram em agitação, num agitador roto-torque, de um dia para o outro.

3.9 - Procedimento de recheio das colunas cromatográfica com a fase estacionária

As colunas foram recheadas usando-se o sistema mostrado na Figura 22. O procedimento de enchimento de colunas, descrito a seguir, foi desenvolvido e aperfeiçoado no LabCrom, ao longo dos anos 80 e 90.

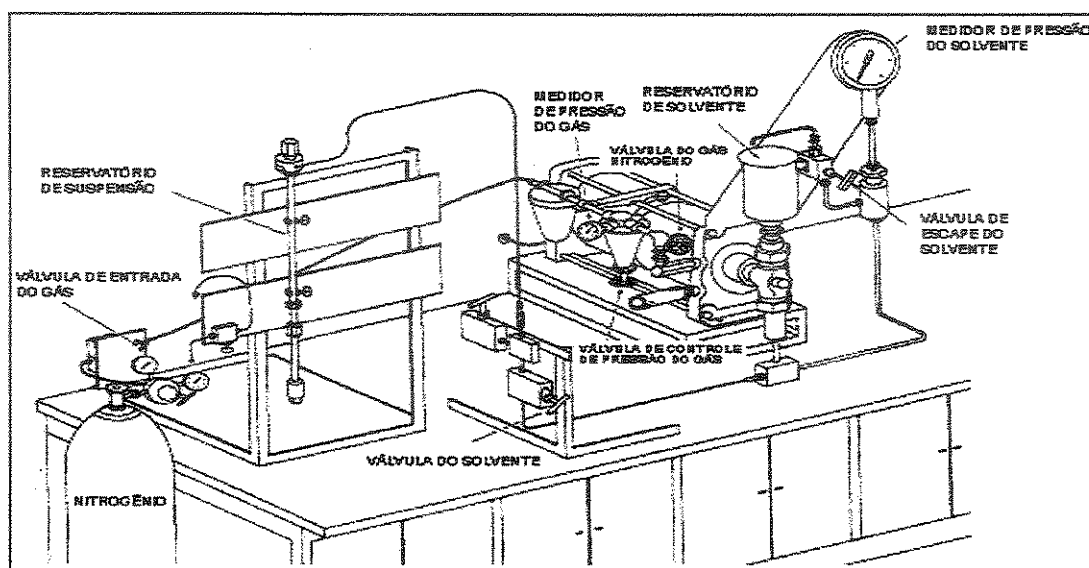


Figura 22: Sistema de enchimento de colunas.

O procedimento consistiu das seguintes etapas (a Figura 23 mostra um esquema do sistema utilizado):

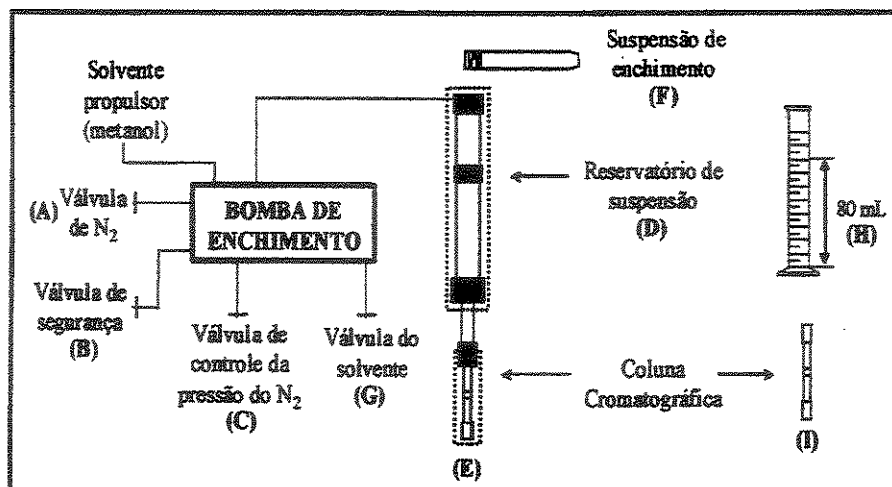


Figura 23: Representação esquemática do sistema de enchimento de colunas cromatográficas.

O procedimento de recheio das colunas cromatográficas consistiu das seguintes etapas (referência ao esquema Figura 23):

1. Inicialmente, abriu-se a válvula da linha de gás nitrogênio (A) e a válvula de segurança (B);
2. Abriu-se a válvula de controle de pressão do gás (C) até obter a pressão desejada: 5000 psi (alta pressão);
3. Conectou-se na parte inferior do reservatório de suspensão (D) a coluna (E) que possui um filtro poroso e as peças terminais em sua extremidade oposta;
4. Transferiu-se rapidamente a suspensão de FE (F) para o reservatório de suspensão (D) para evitar sedimentação das partículas; completou-se o volume com clorofórmio e imediatamente fechou-se a entrada superior do reservatório evitando a introdução de bolhas de ar dentro do sistema;
5. Abriu-se a válvula do solvente (G) e deixaram-se passar 80 mL do solvente propulsor (metanol), que foi recolhido em uma proveta (H) colocada abaixo da saída da coluna. Com a passagem do solvente, a FE fica retida dentro da coluna através do filtro de 0,5 μm , formando o leito da coluna;

6. Após a passagem dos 80 mL de metanol, fechou-se a válvula (G) do solvente e aguardou-se 20 min para equilibrar a pressão interna com a pressão atmosférica;
7. Desconectou-se a coluna do reservatório cuidadosamente a fim de não quebrar o leito de FE formado nas paredes internas da coluna de aço inoxidável. O excesso de FE foi cuidadosamente removido da extremidade da coluna e em seguida adaptou-se os acessórios da coluna (filtro redutor de vazão e o terminal) (I);
8. Em seqüência, fechou-se a válvula de controle de pressão do gás (C), a válvula de segurança (B) e depois a do nitrogênio (A);
9. Ambos os lados da coluna foram fechados com tampas para impedir a evaporação do solvente dentro da coluna e evitar possíveis rachaduras no leito da nova coluna.

3.10 - A repetitividade de enchimento cromatográfico

O procedimento de enchimento de colunas cromatográficas a altas pressões sempre gera grande erro experimental. Essa é uma afirmação que vem sendo diariamente observado por qualquer aluno que prepare FE no LabCrom. A mesma FE, preparada num único lote, quando recheadas duas colunas cromatográficas, uma seguida da outra, podem diferir significativamente em termos de respostas cromatográficas.

Na literatura, diz-se que o enchimento de colunas cromatográficas não é uma técnica, mas uma arte [59,76]. Nos Simpósios de Cromatografia, ouve-se que na indústria, a pessoa encarregada de fazer o enchimento das colunas cromatográficas, normalmente não produz FE com bons desempenhos cromatográficos nas segundas-feiras e ao longo da semana vai melhorando, mostrando que a pessoa a qual faz os enchimentos das colunas carecem de algumas habilidades para realizar o procedimento como prática, treino, além de concentração e paciência.

Quando se suspeita de erros sistemáticos relacionados ao procedimento de enchimento das colunas cromatográficas, alguns procedimentos podem ser colocados em prática. Inicialmente, deve-se prestar atenção na limpeza das peças que compõem a coluna cromatográfica e os reservatórios de solventes e de enchimento. Em seguida, verificar o polimento da parte interna da coluna cromatográfica e do reservatório de enchimento e, se for necessário, realizar um novo polimento.

Deve-se também verificar os diâmetros internos das colunas, que aumentam de tamanho à medida que se procede o polimento das colunas com esponja de aço e pasta aderente. Esta medida pode afetar significativamente o desempenho cromatográfico das FE e também a repetitividade do enchimento das colunas, pois colunas com diâmetros diferentes produzirão colunas com resultados diferentes.

Outro procedimento que pode ser realizado quando o enchimento da coluna cromatográfica não está com boa qualidade é esvaziar a coluna e recheá-la novamente. Na indústria, problemas com o enchimento cromatográfico também ocorrem, mas somente são colocadas no mercado as colunas que obtiveram bons resultados cromatográficos. As outras colunas são esvaziadas e a FE utilizada para recheiar outras novas colunas.

Mas, os problemas relacionados ao enchimento das colunas, na maioria das vezes, são difíceis de identificar, porque quando se testa uma FE em condições ainda não experimentadas, se os resultados cromatográficos não forem bons, sempre fica a dúvida se o problema está no preparo das FE ou se foram problemas no enchimento.

Pelo aspecto dos cromatogramas da mistura teste 1, utilizada neste trabalho, é possível identificar problemas de enchimento das colunas cromatográficas. A cauda frontal no pico dos compostos é uma dessas características, mas perda de eficiência, picos duplos, perda de resolução e a não repetitividade dos parâmetros cromatográficos também podem estar relacionados com o procedimento de enchimento das colunas. A pessoa que faz os enchimentos é que quem deve perceber se é ou não problemas de enchimento e saber o que fazer para resolvê-los.

A repetitividade nos parâmetros cromatográficos entre uma corrida e outra também é um parâmetro que deve ser avaliado nas FE, porque se não há repetitividade, principalmente no tempo de retenção dos compostos, a FE pode ser descartada, já que não se é possível fazer a identificação de compostos e desenvolver métodos analíticos. Por isso, este é um parâmetro que também deve ser monitorado com bastante atenção.

3.11 - Condicionamento das colunas cromatográficas

Após o enchimento das colunas, elas foram condicionadas com a FM a ser empregada na análise cromatográfica, para retirar o metanol utilizado durante o enchimento das colunas e haver o equilíbrio perfeito entre a FM e a FE e obter repetitividade nos tempos de retenção dos compostos a serem eluídos. O condicionamento das colunas após o enchimento foi feito sem acoplá-lo ao detector para evitar que partículas (sílica ou polímero) provenientes da coluna pudessem obstruir a tubulação de entrada ou saída do detector ou, principalmente, a cela de detecção. O condicionamento das colunas foi feito numa vazão ótima de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ (calculado através da curva de van Deemter) por um período de três horas ou numa vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ por uma hora, quando utilizado uma FM tamponada (nesse caso utilizou-se uma vazão mais alta porque o objetivo não foi analisar o parâmetro de eficiência cromatográfica, cujo valor máximo depende da vazão ótima, mas apenas determinar o fator de retenção dos compostos, que eluem mais rapidamente numa vazão mais alta).

3.12 - Preparo da fase móvel

A qualidade dos solventes utilizados como FM (e também de todos os outros solventes utilizados) é um ponto crítico. Além de contaminantes dissolvidos e particulados, a FM pode conter gases dissolvidos, que podem se fixar nas válvulas do cromatógrafo no momento da análise e interferir na vazão dos

solventes ou se alojarem na cela do detector, promovendo a instabilidade na linha de base.

Portanto, todos os solventes utilizados na preparação da FM foram filtrados em uma membrana GV (Durapore) em PVDF, 0,22 μm de poro, 47 mm de diâmetro, hidrofílica (GVWPO4700-Millipore) para eliminar as impurezas sólidas. Os volumes dos solventes que compõem a FM foram medidos individualmente e a seguir misturados. Após a preparação e também rotineiramente antes da sua utilização, as FM foram desgaseificadas em ultra-som e sistema de vácuo por 30 min.

Para os testes realizados, foram preparadas FM de metanol e água nas proporções 70:30 e 60:40 v/v. Alguns testes também foram feitos em FM metanol / água 30:70 v/v, FM 30:70 v/v metanol / tampão fosfato ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$), pH 2,7 e 7,6 (ajustado com ácido fosfórico na solução aquosa, antes da mistura) ou FM 50:50 v/v metanol / tampão carbonato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,4.

3.13 - Avaliações cromatográficas das colunas

As análises cromatográficas foram feitas num Cromatógrafo a Líquido com detector por absorção no UV-vis no comprimento de onda de 254 nm. Quatro misturas testes foram usadas para a avaliação das colunas:

- **mistura teste 1 (MT1)**, contendo os compostos uracil, acetona, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno (compostos neutros de diferentes polaridades), utilizando uma FM metanol / água 70:30 ou 60:40 v/v;
- **mistura teste (MT2)**, contendo uracil, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno (contém compostos ácido e básico), também utilizando uma FM metanol / água 70:30 ou 60:40 v/v;
- **mistura teste 3 (MT3)**, contendo uracil, cafeína e fenol em FM metanol / água 30:70 v/v;

- **mistura teste 4 (MT4)**, contendo uracil, fenol e benzilamina, em FM metanol / tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹ 30:70 v/v, pH 2,7 ou 7,6.

Em cada análise foram injetados 5 µL de amostra, em duplicata, triplicata ou até com mais repetições quando necessário.

3.13.1 – Os parâmetros cromatográficos avaliados

Com as misturas testes padrão utilizadas neste trabalho, os parâmetros avaliados para a caracterização cromatográfica das FE preparadas foram:

- **a eficiência do naftaleno e da N,N-dimetilanilina (N/m)**: Este é o único parâmetro cujo valor deve ser o maior possível, pois quanto mais eficiente a coluna cromatográfica, melhor será a transferência de massa entre o analito, a FM e a FE.
- **o fator de assimetria do naftaleno e da N,N-dimetilanilina (As)**: Principalmente do composto básico N,N-dimetilanilina, e é uma medida da atividade silanofílica da FE.
- **o fator de retenção do naftaleno (k)**: Medida de hidrofobicidade da FE ou o grau de recobrimento da sílica pelo PMOS.
- **a resolução entre o naftaleno e o tolueno (Rs)**: Expressa a separação entre os compostos da mistura, ou seja, a seletividade da FE em fase reversa.
- **capacidade de formar ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/F}$)**: Razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/F} = k_C/k_F$. Medida do número de silanóis livres e o grau de capeamento da FE.

- **capacidade de troca iônica em pH 2,7 ($\alpha_{B/F\text{pH } 2,7}$):** Razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol em FM tamponada a pH 2,7, $\alpha_{B/F\text{ pH } 2,7} = k_B/k_F$. Define a atividade ácida dos grupos silanóis residuais da FE.
- **capacidade de troca iônica em pH 7,6 ($\alpha_{B/F\text{pH } 7,6}$):** Razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol em FM tamponada a pH 7,6, $\alpha_{B/F\text{ pH } 7,6} = k_B/k_F$. Estimativa da atividade total dos silanóis residuais da FE.

Ao decorrer do trabalho, estes parâmetros são apresentados e discutidos.

3.14 - Estudo da estabilidade das fases estacionárias

Com o objetivo de verificar a estabilidade das FE preparadas, uma das colunas que apresentou bom desempenho cromatográfico foi submetida à passagem contínua de FM neutra, metanol / água 70:30 v/v. Se essa coluna resistisse à passagem de grande quantidade de FM neutra, outro estudo de estabilidade seria aplicado, utilizando um procedimento desenvolvido no LabCrom [85,86] em condições agressivas da FM, sendo ela composta de 50:50 v/v metanol / tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹, pH 8,4, em temperatura de 60 °C, para acelerar o teste e reduzir a quantidade de solventes utilizados (esse teste é realizado em um ou dois dias, enquanto que o teste com FM neutra gasta em torno de um mês). A estabilidade das FE foi avaliada injetando-se a MT1 e a cada determinado volume de FM passada analisou-se os parâmetros cromatográficos de eficiência, assimetria e fator de retenção do composto mais retido da MT1, o naftaleno.

3.15 - Caracterização química e física das sílicas e das FE preparadas

- **Análise Elementar:** A análise elementar consistiu em determinar o teor total de carbono nas amostras de FE.

- **Espectroscopia no Infravermelho (IR):** Os espectros na região do infravermelho (IR) foram obtidos no intervalo espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . A amostra de PMOS foi preparada sob a forma de um filme em cela de cloreto de sódio, enquanto que as amostras de sílica e das FE foram preparadas em pastilhas de KBr.
- **Análise termogravimétrica (TGA):** As análises termogravimétricas (TGA) das FE foram realizadas utilizando-se um analisador térmico em que, através de uma microbalança, obteve-se a porcentagem de perda de massa da amostra com o aumento da temperatura. Neste teste, utilizaram aproximadamente 10 mg de amostra e a análise foi realizada em atmosfera de nitrogênio, com velocidade de aquecimento constante de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, desde a temperatura de 25 até 1000 $^{\circ}\text{C}$.
- **Espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS):** O conteúdo de impurezas metálicas contidas nas sílicas Kromasil e Rainin por FAAS já havia sido determinado em trabalhos anteriores no LabCrom, sendo feita, gentilmente, pelo Prof. José Salvador Barone, no Laboratório Purquímica em São Paulo [37,53].
- **Análise por ativação neutrônica (NAA) pelo método K_0 :** Para também determinar os conteúdos de impurezas metálicas das sílicas Kromasil e Rainin sem pré-tratamento e pré-tratadas, amostras foram irradiadas com nêutrons num reator de pesquisa, adequado para a aplicação da técnica, localizado no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear / Comissão Nacional de Energia Nuclear, CDTN / CNEN. Neste estudo foi aplicada a técnica de Análise por Ativação Neutrônica método k_0 para determinação elementar [10, 11]. Os espectros gama gerados foram convertidos pelo programa computacional Genie-PC num tempo de contagem necessário para uma boa estatística de contagem. A avaliação dos espectros gama foi executado através do programa Hyperlab PC e os cálculos das concentrações foram feitos através do

programa KAYZERO SOLCOI. Este estudo foi feito pela Dra. Maria Ângela Menezes do CDTN.

- **Ressonância magnética nuclear (NMR) aplicada a sólidos:** Os espectros de NMR no estado sólido de ^{29}Si para as sílicas puras e pré-tratadas e das FE preparadas foram obtidas no espectrômetro Bruker de 300 MHz, utilizando a técnica de polarização cruzada e rotação ao ângulo mágico (CP / MAS). Foi utilizado um tempo de contato de 5 ms e um intervalo de pulso de 1,5 s, numa frequência de 59,6 MHz.
- **Microscopia eletrônica de varredura (SEM):** As fotomicrografias das sílicas Kromasil e Rainin sem e com pré-tratamentos foram feitas no Microscópio Eletrônico de Varredura, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) em Campinas. As amostras foram preparadas recobrindo-as com uma fina camada de ouro de aproximadamente 16 nm. As análises foram feitas com aumentos da ordem de 1000 e 5000 vezes.
- **Medidas de área superficial, volume e tamanho de poros das sílicas Kromasil e Rainin:** Estas medidas também já haviam sido feitas em trabalhos anteriores no LabCrom, calculadas através da isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K, obtida no analisador ASAP [37,53].

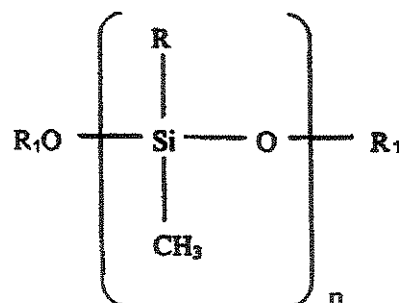
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I

FASES ESTACIONÁRIAS PREPARADAS COM AS SÍLICAS SEM PRÉ-TRATAMENTOS

4.1 – O poli(metiloctilsiloxano) (PMOS)

O polímero poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) (tipo C-8) foi escolhido para este trabalho por ter sido bastante estudado em trabalhos anteriores no LabCrom, com bons resultados cromatográficos, semelhantes ou melhores que as FE preparadas com o poli(metioctadecilsiloxano) (PMODS) (tipo C-18) e também pelo fato de uma grande quantidade de PMOS estar disponível no laboratório. A estrutura molecular do PMOS está mostrado na Figura 24.



onde R = octil

R₁ = trimetilsilil ou dimetilvinilsilil

Figura 24: Estrutura molecular do poli(metiloctilsiloxano) (PMOS)

O espectro infravermelho (IR) do PMOS líquido (Figura 25) apresenta bandas relativas aos grupos metila (triplete em 2900 cm⁻¹) e aos grupos siloxano (duplete forte em 1098 e 1021 cm⁻¹).

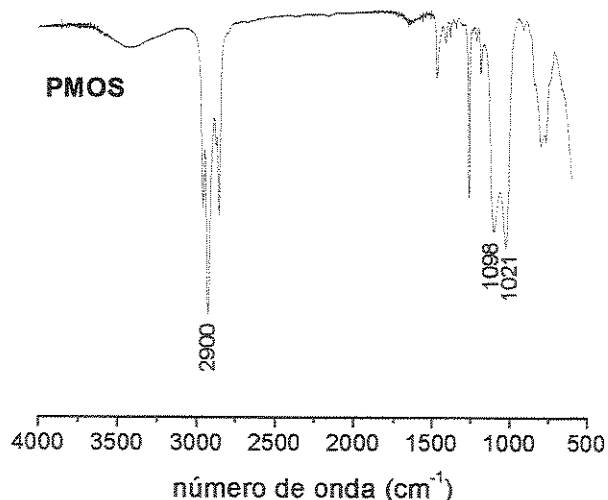


Figura 25: Espectro de IR do PMOS.

4.2 – Caracterizações química e física das sílicas Kromasil e Rainin

Duas sílicas foram utilizadas neste trabalho, a sílica Kromasil e a sílica Rainin, ambas esféricas, de diâmetro de partícula de 5 μm . Sílicas com este tamanho de partículas estão sendo empregadas no preparo das novas gerações de FE, porque partículas esféricas com este diâmetro proporcionam um leito cromatográfico mais eficiente, possibilitando que pressões mais adequadas possam ser utilizadas e proporcionam uma melhor transferência de massa entre o analito, a FM e a FE. As medidas de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros estão mostradas na Tabela 8.

Tabela 8: Medidas de área superficial, volume específico e tamanho médio de poros das sílicas.

Sílica	Área superficial (m ² g ⁻¹)	Volume específico de poros (mL g ⁻¹)	Diâmetro médio de poros (nm)
Kromasil	306	0,90	11,1
Rainin	188	0,55	11,8

Tanto a sílica Kromasil como a Rainin são classificadas pelos fabricantes como do Tipo B, altamente puras e menos ácidas. Com as novas tecnologias no preparo das sílicas, este fator está sendo rigorosamente controlado e sílicas altamente puras e menos ácidas estão sendo preparadas. As Tabelas 9 e 10 mostram os resultados das análises de impurezas metálicas contidas nas sílicas Kromasil e Rainin, feitas por Espectroscopia de Absorção Atômica por chama (FAAS) e por Análise por Ativação de Nêutrons (NAA), respectivamente.

Tabela 9: Conteúdo de impurezas metálicas contidas nas sílicas Kromasil e Rainin feitas por FAAS ($\mu\text{g} / \text{g}$).

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

[illegible]

Tabela 10: Conteúdo de impurezas metálicas contidas nas sílicas Kromasil e Rainin feitas por NAA ($\mu\text{g} / \text{g}$).

Sílica	Cl	Ce	Hf	Sb	Sc	Ta	Th
Kromasil	<200	<2	<0,2	<0,2	<0,1	<0,2	<0,2
Rainin	<200	<2	<2	<0,2	<0,1	<0,2	<0,2

A técnica de ativação neutrônica (NAA) é uma técnica analítica para determinação da composição química elementar que, por meio da indução da radioatividade artificial em uma amostra (no caso, a irradiação com nêutrons) e posterior medida da radioatividade. Nos métodos convencionais de Ativação Neutrônica Instrumental, amostras e padrões dos elementos a serem analisados são ativados simultaneamente, sendo as concentrações dos elementos de interesse determinadas por meio da comparação das respectivas radioatividades [89,90]. Na técnica de ativação neutrônica método k_0 para a determinação multielementar, as concentrações dos elementos são calculadas utilizando-se constantes como o k_0 , já determinados para cada radionuclídeo, bem como os parâmetros do reator e equações específicas [91]. Algumas vantagens do método k_0 em relação ao método convencional são: menor custo, determinação de maior número de elementos por amostra e detecção de elementos que não estavam previstos, pois pelo método k_0 não são necessários padrões de cada elemento de interesse e todos os elementos detectados após a irradiação poderão ser analisados, aumentando a capacidade analítica.

Tanto a NAA como a FAAS são importantes ferramentas analíticas na determinação multielementar em níveis traços em diversas matrizes, apresentando excelentes detectabilidades para inúmeros elementos. Porém, a NAA possui a vantagem de não necessitar de preparo químico prévio das amostras, como por exemplo, dissolução ácida, não havendo perda de constituintes da amostra, contaminação, destruição ou alteração da composição química do material, além de requerer pequena quantidade de amostra.

Mas, nos estudos realizados nesse trabalho, as análises feitas pela FAAS apresentaram algumas vantagens em relação a NAA. As análises feitas pela FAAS apresentaram menores limites de detecção para os elementos de maior interesse como o Ca, Na, Fe e Al (elementos normalmente presentes em maior quantidade e que formam sítios de adsorção forte na superfície da sílica), possibilitando observar a variação no conteúdo de metais entre as duas sílicas. Outra vantagem da FAAS foi a possibilidade de determinar do teor de alumínio na sílica, o que não foi possível pela NAA, porque o silício é o maior constituinte da amostra e ambos, o silício e o alumínio, produzem o mesmo radionuclídeo em ativação neutrônica. Existem procedimentos que corrigem esse problema, mas no caso da sílica, a quantidade de silício é muito grande para que essa interferência não ocorra.

A pesquisadora Dra. Maria Ângela Menezes do CDTN, que realizou as medidas por NAA método k_0 , não havia trabalhado antes com amostras de sílica e não havia estudos sobre a interferência do Al nessas amostras, por isso, não houve confiabilidade nos valores obtidos da concentração desse elemento, que foram muito altos, da ordem de 1200 ug / g.

Os resultados obtidos pela FAAS mostraram que a sílica Rainin contém maior quantidade de impurezas metálicas em sua matriz do que a sílica Kromasil, por isso melhores resultados na separação de compostos básicos são esperados com as FE preparadas com a sílica mais pura.

A espectroscopia no infravermelho (IR) é muito usada para a caracterização da superfície química da sílica, sendo considerada uma das ferramentas mais importantes. Bandas de 3760-3735 cm^{-1} indicam a presença de silanóis isolados e geminais (sobreposição de bandas). Bandas em 3680 cm^{-1} são referentes aos silanóis vicinais ou ligados por ligação hidrogênio. Já as bandas de 3620-3200 cm^{-1} , centradas em 3500 cm^{-1} , são devido a silanóis vicinais, indicando a sobreposição de bandas de silanóis vicinais e isolados [7]. Embora, a espectroscopia no IR seja uma técnica excelente para dados qualitativos, para uma avaliação quantitativa é preciso se ter cautela em relação às condições do aparelho e da amostra, que devem ser muito bem estabelecidas e controladas

para não haver erros nas medidas. Como essas análises foram feitas pelo técnico do Instituto de Química da Unicamp, num aparelho multiusuário, neste trabalho, espectros de IR somente foram usados em interpretações qualitativas para verificar a presença dos picos característicos.

As principais bandas observadas nos espectros de IR das sílicas Kromasil e Rainin (Figura 26) podem ser atribuídas às vibrações dos grupos hidroxilas da superfície da sílica ligados por ligação de hidrogênio à água fisicamente adsorvida e também aos grupos silanóis vicinais (sobreposição de bandas por volta de 3500 cm^{-1}), ao estiramento das ligações siloxano (1115 cm^{-1}), aos grupos silanóis isolados (ombro em 975 cm^{-1}) e a banda em 1640 cm^{-1} que indica a presença de absorções de moléculas de água [12].

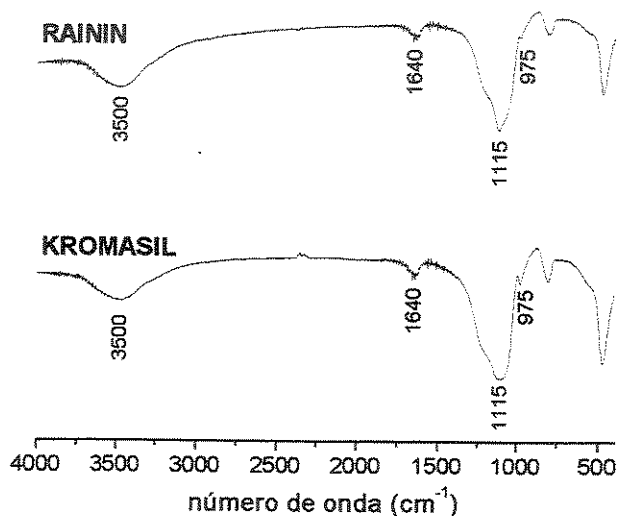


Figura 26: Espectros de IR das sílicas Kromasil e Rainin.

Os espectros de CP / MAS ^{29}Si NMR das sílicas Kromasil e Rainin estão mostrados na Figura 27. Os sítios Q2 em -89 ppm são atribuídos aos silanóis geminais, os Q3 em -100 ppm aos isolados e vicinais (é necessário destacar que esse sinal refere-se tanto aos silanóis isolados como os vicinais, não sendo possível distinguir esses dois sítios por esta técnica) e os Q4 em -109 ppm às ligações siloxanos [4]. Esta técnica foi usada em interpretações quantitativas dos sítios presentes na superfície das sílicas, sendo muito importante para estimar as

quantidades relativas de silanóis isolados e geminais na superfície das diferentes sílicas sem pré-tratamento e pré-tratadas e verificar as diferenças no grau de reatividade ou acidez da superfície das sílicas.

Para este estudo quantitativo, fez-se a deconvolução dos espectros das sílicas e calculou-se as áreas dos picos. A técnica de polarização cruzada e rotação ao ângulo mágico (CP / MAS) não é um método adequado para uso quantitativo, pois ela aumenta a intensidade dos picos, mas como todas as amostras foram feitas nas mesmas condições, normalizou-se as áreas dos picos dos silanóis isolados (e também os vicinais) (Q3) e geminais (Q2) em relação ao pico dos grupos siloxanos (Q4). Portanto, os números apresentados de quantificação dos diferentes grupos silanóis na superfície das sílicas é uma medida relativa e não um valor real. Esses valores são: para a sílica Kromasil, $Q2/Q4 = 0,069$ e $Q3/Q4 = 1,51$ e para a sílica Rainin, $Q2/Q4 = 0,533$, e $Q3/Q4 = 5,82$, mostrando que a sílica Rainin apresenta maior quantidade de silanóis isolados (ou vicinais) e geminais (mais ácidos) que a sílica Kromasil, apresentando um caráter mais ácido de sua superfície. Portanto, é de se esperar que a sílica Kromasil apresente melhores resultados cromatográficos com compostos de caráter básicos do que a sílica Rainin.

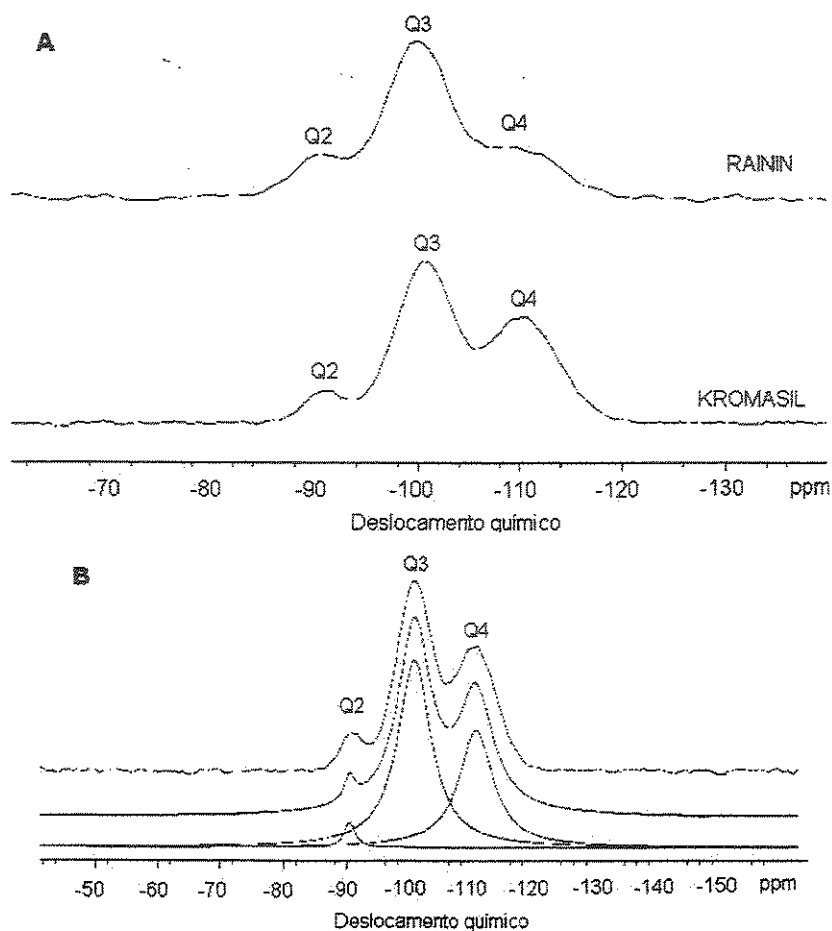


Figura 27: A) Espectro de CP-MAS ^{29}Si NMR das sílicas Kromasil e Rainin. B) Espectro deconvoluído da sílica Kromasil.

As micrografias eletrônicas das sílicas feitas por MEV (Figuras 28-31) mostraram que a sílica Kromasil apresenta menor variação no tamanho das partículas e menos partículas quebradas e com imperfeições do que a Rainin. Segundo Meyer [93], a obtenção de uma boa coluna cromatográfica, que está baseada no seu recheio, deve ser composto por partículas com uma faixa de distribuição a mais estreita possível. Assim, a sílica Kromasil deve apresentar melhores resultados cromatográficos que a sílica Rainin.

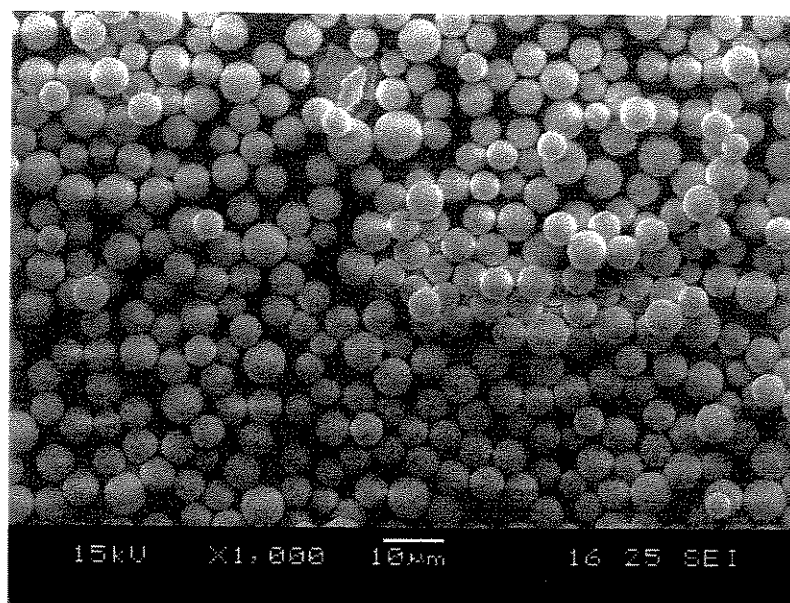


Figura 28: Micrografia eletrônica da sílica Kromasil com aumento de 1000 vezes.

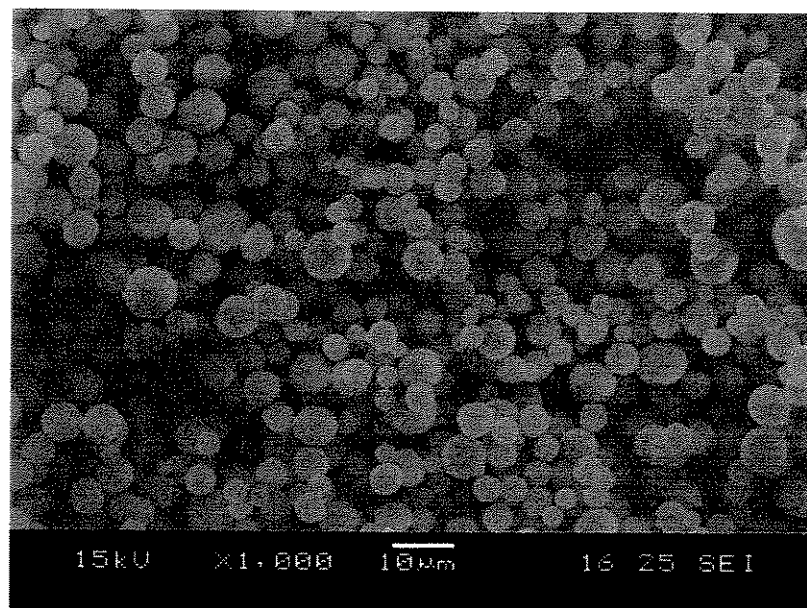


Figura 29: Micrografia eletrônica da sílica Rainin com aumento de 1000 vezes.

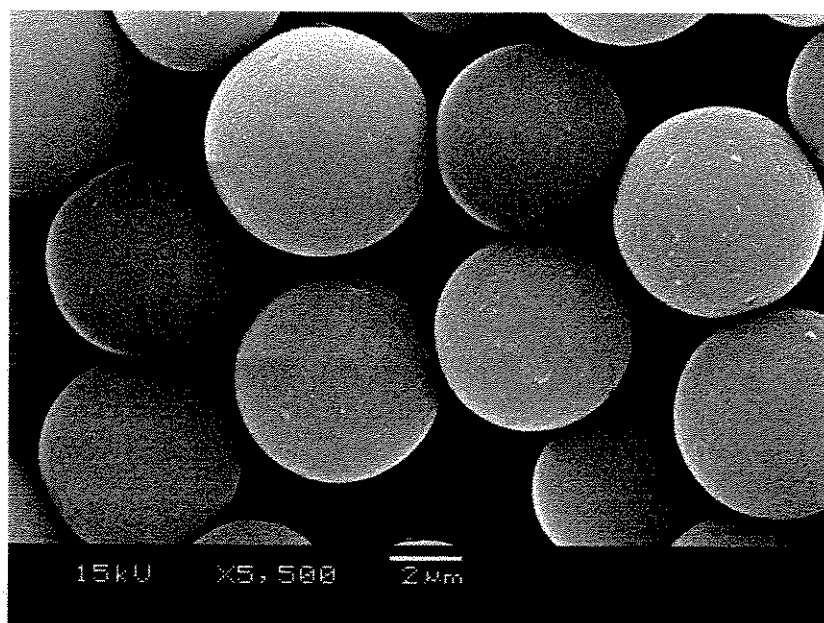
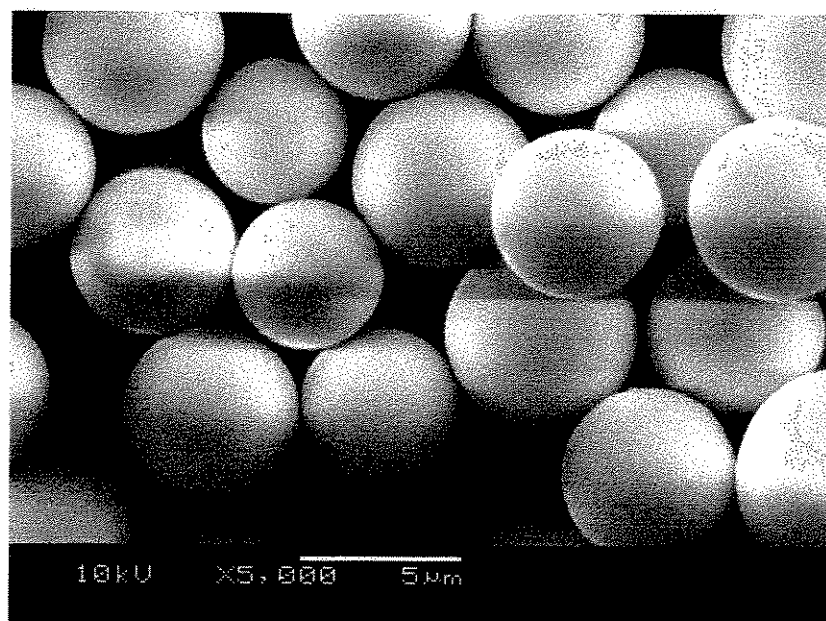


Figura 30: Micrografias eletrônicas da sílica Kromasil com aumento da ordem de 5000 vezes.

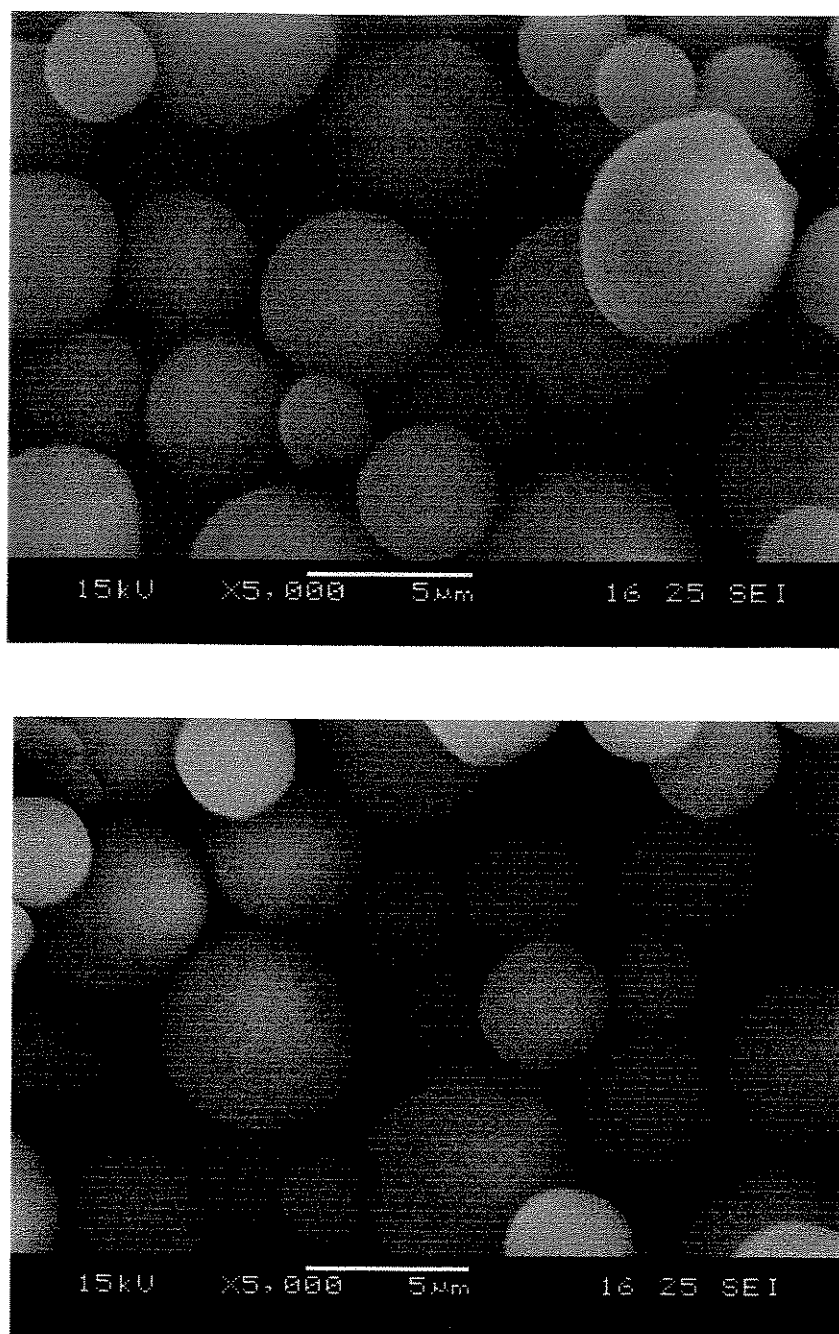


Figura 31: Micrografias eletrônicas da sílica Rainin com aumento da ordem de 5000 vezes.

4.3 – Otimização das condições de preparo das fases estacionárias com a sílica Kromasil

4.3.1 – Planejamento Fatorial

Já foram realizados trabalhos anteriores no LabCrom com o PMOS (tipo C-8) e o PMODS, poli(metiloctadecilsiloxano) (tipo C-18) sorvido e imobilizado por tratamento térmico sobre sílica e sílica modificada com óxidos metálicos [35,41-45,53]. Naqueles trabalhos, observaram-se comportamentos semelhantes entre os dois polímeros, sendo que, temperaturas de imobilização térmica até 150 °C para o PMOS e 120 °C para o PMODS produzem a formação de uma monocamada de polímero sobre a sílica, obtendo colunas com bons resultados cromatográficos (altas eficiências, boas simetrias de pico e boa separação entre os componentes da mistura teste 1 e 2), enquanto que temperaturas de imobilização térmica acima dessas temperaturas indicaram a formação de uma bicamada de PMOS sobre a sílica, que não resultam em colunas com bons desempenhos cromatográficos. Portanto, neste trabalho, partimos de condições de temperaturas (100, 120 ou 140 °C) para a formação de uma monocamada de PMOS sobre as sílicas Kromasil e Rainin.

Usou-se planejamento fatorial 2^3 [83] para otimizar as condições de preparo das FE preparadas com a sílica Kromasil. Os fatores ou variáveis de maior relevância estudados foram a % PMOS inicial (dado em % PMOS / % sílica), a temperatura de imobilização térmica e o tempo de imobilização térmica. O tempo de repouso da FE após seu preparo para a evaporação do solvente (1 ° etapa do procedimento de preparo das FE, item 3.3) foi fixado em 6 dias, com base em trabalhos anteriores no LabCrom [44,47].

A FM usada foi metanol / água 60:40 v/v na vazão ótima de 0,3 mL min⁻¹, encontrada através da curva de van Deemter. A Tabela 11 mostra os fatores e os níveis do planejamento fatorial 2^3 , enquanto na Tabela 12 estão mostrados os ensaios do planejamento.

Os resultados cromatográficos estão apresentados na Tabela 13. Observar que as colunas com os valores dos parâmetros cromatográficos calculados estão **divididas em duas**, pois para cada FE preparada pelos ensaios do planejamento, duas colunas foram recheadas para avaliar a repetibilidade no enchimento das colunas cromatográficas. É importante ressaltar que quando duas colunas foram recheadas, as FE foram preparadas pelo mesmo lote, portanto a variação não é de todo o procedimento de preparo das FE, mas do procedimento de enchimento das colunas cromatográficas no sistema Haskel. De acordo com Barros et al. [83], essas repetições são chamadas de não autênticas, pois não são realizações, pela segunda vez, de todas as etapas do procedimento de preparo das FE, mas apenas do enchimento das colunas cromatográficas. Portanto, em todo trabalho, foi considerado somente o erro experimental relacionado ao procedimento de enchimento das colunas cromatográficas. Os valores dos parâmetros cromatográficos calculados para cada coluna correspondem à média de duas ou três injeções da mistura teste. Os cromatogramas da MT1 e MT2 estão apresentados na Figura 32.

Tabela 11: Níveis para o planejamento fatorial 2^3 para otimização das condições de preparo das FE com a sílica Kromasil.

FATORES	NÍVEIS	
	(-)	(+)
(1) % PMOS inicial	35	44
(2) Temperatura de imobilização térmica (° C)	100	120
(3) Tempo de imobilização térmica (h)	8	16

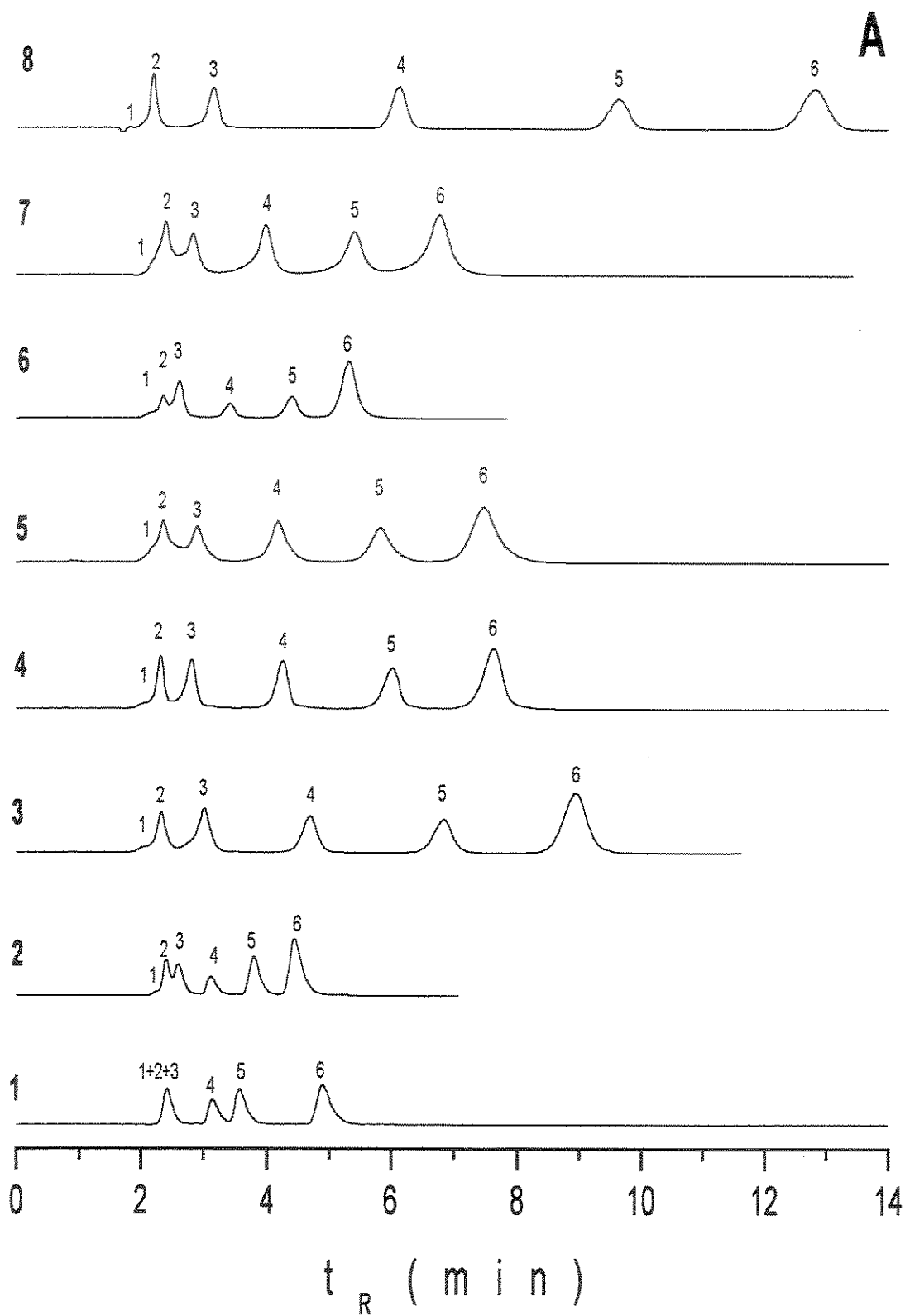
Tabela 12: Ensaios do planejamento fatorial 2^3 .

Fator Ensaio	(1)	(2)	(3)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Tabela 13: Resultados cromatográficos calculados das MT1 e MT2 obtidos das FE preparadas pelo planejamento fatorial 2^3 . Condições cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹.

Ensaio	N/m ^a		As ^a		k ^a		Rs ^b		N/m ^c		As ^c	
1	31500		1,9		0,8		1,2		28400		1,9	
2	39400		2,0		1,0		2,0		36200		2,0	
3	41400	49900	1,1	1,3	3,3	3,1	3,3	3,2	32800	37200	1,1	1,3
4	47700		1,0		2,7		3,1		41600		1,0	
5	26700	28100	1,1	1,2	2,6	2,4	2,5	2,6	22500	24100	1,2	1,1
6	37300		1,1		1,5		2,3		33500		1,1	
7	30600		1,0		2,3		2,4		28000		1,0	
8	65200		1,0		5,9		4,4		57500		1,0	

^a Calculado para o naftaleno^b Entre o naftaleno e tolueno^c Calculado para a N,N-dimetilanilina



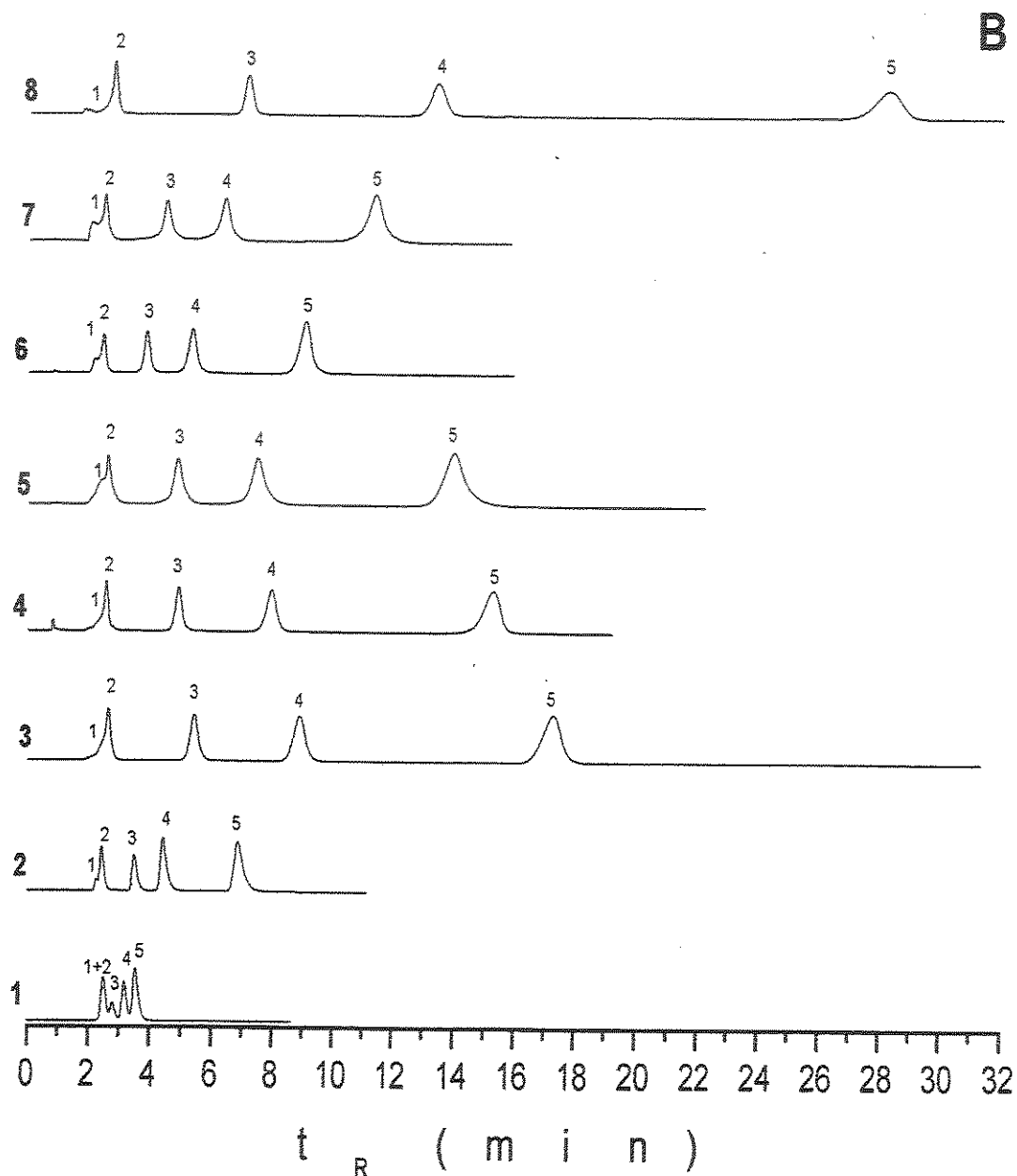


Figura 32: Cromatogramas da MT1 (A) e da MT2 (B) obtidos dos ensaios do planejamento fatorial 2^3 com a sílica Kromasil. O número nos cromatogramas corresponde ao número do ensaio do planejamento (Tabela 12). Condições cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.3.2 - Efeito do tempo de repouso da FE após seu preparo

A Tabela 14 e a Figura 33 mostram os resultados cromatográficos e os cromatogramas das MT1 e MT2 obtidos da coluna preparada pelo ensaio nº 5 do planejamento fatorial 2^3 , recheadas logo após o preparo da FE e após 5 meses do preparo. Esses resultados mostram que o tratamento térmico não foi suficiente para deixar o PMOS na forma mais estável dentro dos poros da sílica e as cadeias do polímero continuaram a se rearranjar com o passar do tempo, ou seja, continuaram a se auto-imobilizar nos poros da sílica, refletindo numa grande melhora dos parâmetros cromatográficos de resolução e eficiência. Os estudos de auto-imobilização feitos anteriormente no LabCrom [35,36,39], mostraram que, mesmo depois de um ano do preparo das FE, os parâmetros cromatográficos ainda continuaram melhorando devido ao processo de auto-imobilização do polímero na sílica.

Tabela 14: Parâmetros cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 com a coluna nº 5 do planejamento fatorial 2^3 logo após o preparo e depois de 5 meses. Condições cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v (logo após preparo) e 70:30 v/v (depois de 5 meses), F: 0,3 mL min⁻¹.

Ensaio	N/m ^a		As ^a		k ^a		Rs ^b		N/m ^c		As ^c	
Logo após preparo	26700	28100	1,2	1,1	2,7	2,5	2,5	2,6	22500	24100	1,1	1,2
5 meses depois	62100		0,9		2,7		2,3		58100		1,0	

^a Calculado para o naftaleno

^b Entre o naftaleno e tolueno

^c Calculado para a N,N-dimetilanilina

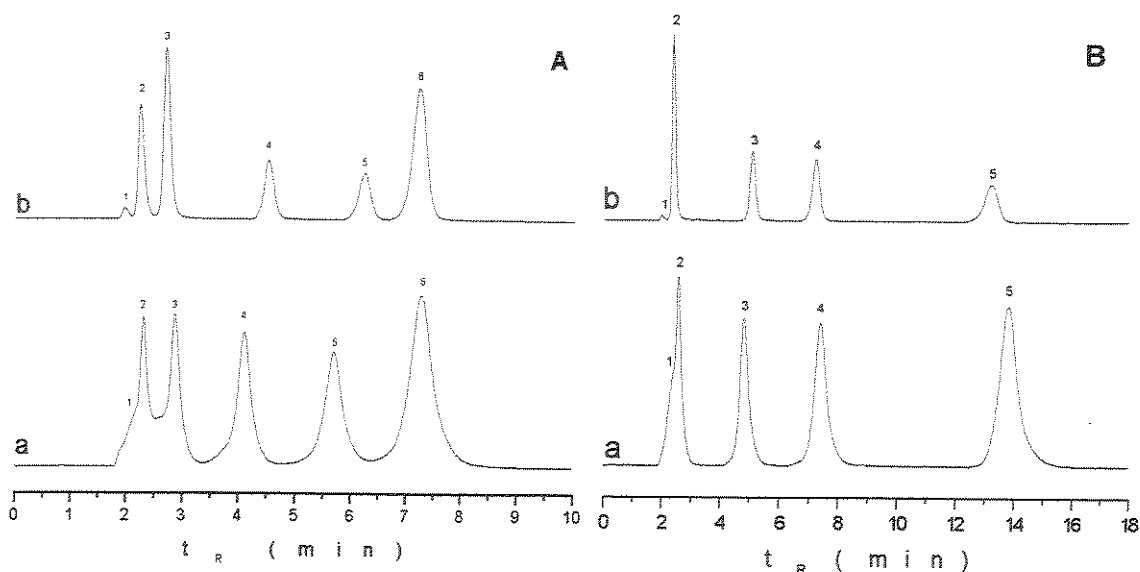


Figura 33: Cromatogramas da MT1 (A) e da MT2 (B) obtidos do ensaio número 5 do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 12) (a) logo após preparo da FE e (b) depois de 5 meses. Condições cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v (logo após preparo) e 70:30 v/v (depois de 5 meses), F: 0,3 mL min⁻¹. MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.3.3 - Curva de van Deemter: otimização da velocidade linear da FM

Com a coluna nº 8 do planejamento fatorial para otimização das condições de preparo das FE com a sílica Kromasil (Tabelas 12) foi feito a curva de van Deemter para determinar a vazão ótima da FM, através da injeção da MT1 em diferentes vazões, que variaram de 0,1 mL min⁻¹ até 0,9 mL min⁻¹ e calculando-se o valor de eficiência do composto mais retido na FE, o naftaleno. No gráfico da Figura 34, H é a altura do prato, calculado da seguinte forma: $H = L / N$, onde L = 0,06 m (comprimento da coluna cromatográfica) e N é o valor da eficiência (do naftaleno) dado em N/m, portanto H é dado em m² N, μ é a velocidade linear da FE, $\mu = L / t_M$ (dado em m min⁻¹), onde L é o comprimento da coluna (dado em m) e t_M é o tempo de retenção do composto não retido na FE (dado em min). O

gráfico obtido está mostrado na Figura 34. A vazão ótima é a vazão no qual a coluna apresenta o mínimo valor de H e a máxima eficiência, no caso, 30 m min^{-1} ou $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.

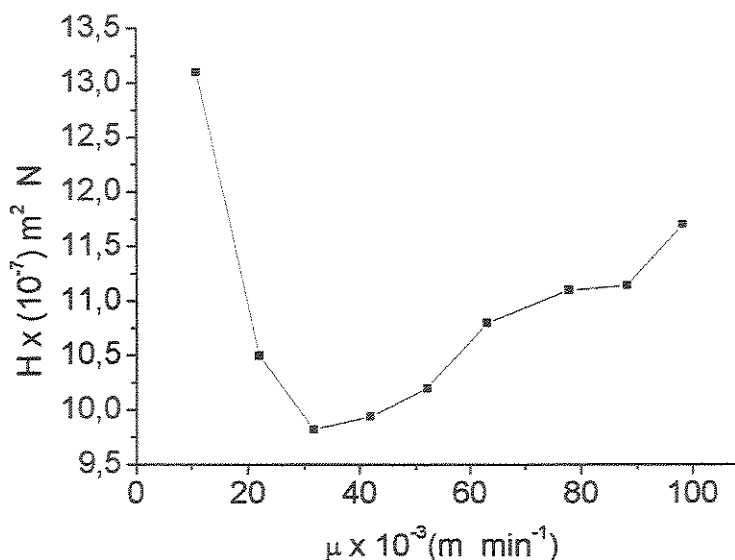


Figura 34: Curva de van Deemter mostrando a relação entre a eficiência e a velocidade linear média da FM.

4.3.4 - Cálculo dos efeitos

Os cálculos dos efeitos obtidos pelos resultados do planejamento fatorial 2^3 foram feitos utilizando o software Statistica, com a ajuda do Prof. Dr. Roy E. Bruns, do Instituto de Química da UNICAMP. Os efeitos foram calculados utilizando os dados de eficiência para o naftaleno (Tabela 15) e da N,N-dimetilanilina (Tabela 16), cujo objetivo é direcionar os estudos para se tentar uma maximização desses valores. O cálculo dos efeitos foi feito com o valor das médias dos parâmetros avaliados quando duas colunas foram recheadas nos ensaios do planejamento. Quando só uma coluna foi recheada, foi usado o valor absoluto obtido com essa coluna para cada parâmetro cromatográfico, sendo este o valor da média de duas ou três injeções da mistura teste.

Tabela 15: Efeitos calculados a partir da eficiência do naftaleno (dados referentes à Tabela 13).

Média global	40593 ± 1424
Efeitos principais	
1	13610 ± 2848
2	13387 ± 2848
3	-940 ± 2848
Interações entre dois fatores	
12	4712 ± 2848
13	8637 ± 2848
23	2162 ± 2848
123	7637 ± 2848

$$\text{Teste t: } t_2 \times s(\text{efeito}) = 4,303 \times 2848 = \pm 12255$$

No nível de 95 % de confiança, somente são considerados estatisticamente significativos os efeitos cujos valores são maiores que 12255, calculado para a eficiência do naftaleno, pois somente assim o intervalo de confiança não incluirá o valor zero. Portanto, nesse conjunto de experimentos (Tabela 13), somente os efeitos principais 1 e 2, % PMOS inicial e a temperatura de imobilização térmica, são significativos.

Tabela 16: Efeitos calculados a partir da eficiência da N,N-dimetilanilina (dados referente à Tabela 13).

Média global	35438 ± 774
Efeitos principais	
1	13525±1548
2	10175±1548
3	275±1548
Interações entre dois fatores	
12	4525±1548
13	6325±1548
23	4175±1548
123	5125±1548
Teste t: $t_2 \times s(\text{efeito}) = 4,303 \times 1548 = \pm 6661$	

No nível de 95% de confiança, somente são considerados estatisticamente significativos os efeitos cujos valores são maiores que ± 6661 . Portanto, nesse conjunto de experimentos, somente os fatores 1 e 2, % PMOS inicial e a temperatura de imobilização térmica são significativos, semelhante aos resultados obtidos com a eficiência do naftaleno.

4.3.5 - Aperfeiçoamento das condições de preparo das fases estacionárias

Novos experimentos foram feitos com sílica Kromasil para aperfeiçoar as condições de preparo das FE. As novas condições foram escolhidas seguindo as tendências obtidas através do cálculo dos efeitos, ou seja, aumentar a % PMOS inicial e a temperatura de imobilização térmica das FE. As novas condições de preparo das FE avaliadas foram: 55 % PMOS inicial (poros da sílica cheios mais 10 % de excesso), 120 °C / 16 h e 55 % PMOS inicial, 140 °C / 16 h. Os resultados cromatográficos utilizando as MT1 e MT2 estão apresentados na Tabela 17 e os cromatogramas na Figura 35. Vê-se que esses resultados foram excelentes, com

boa separação entre os componentes das misturas testes, altas eficiências e boas assimetrias de pico para o naftaleno e a N,N-dimetilanilina. O alto valor do fator de retenção, com a FM metanol / água 70:30 v/v, é um indicativo do alto grau de recobrimento da sílica com o PMOS. Os cromatogramas das diferentes FE na Figura 35 apresentam tempos de retenção bastante diferentes porque os experimentos foram feitos em FM com diferentes forças cromatográficas, uma em metanol / água 60:40 v/v e outra em 70:30 v/v. Nos primeiros experimentos feitos com a sílica Kromasil (Tabela 13 e Figura 32), utilizou-se FM metanol / água 60:40 v/v, pois as condições cromatográficas ainda não estavam otimizadas. Nos experimentos seguintes, mais otimizados, percebeu-se que em FM metanol / água 70:30 v/v ainda há boa resolução entre os componentes com a metade do tempo de corrida cromatográfica. Todos os experimentos seguintes, utilizando as MT1 e MT2, foram feitos em FM metanol / água 70:30 v/v.

Tabela 17: Parâmetros cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 nas FE preparada com as novas condições de preparo das FE com a sílica Kromasil. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹.

Ensaio	N/m ^a		As ^a		k ^a		Rs ^b		N/m ^c		As ^c	
55 % 120 °C / 16 h	73500	52400	1,1	0,8	6,0	6,5	4,8	4,1	50500	70000	1,5	0,9
55 % 140 °C / 16 h	77500	67400	0,9	1,0	2,3	2,1	2,5	2,2	66200	57600	1,0	1,2

^a Calculado para o naftaleno

^b Entre o naftaleno e tolueno

^c Calculado para a N,N-dimetilanilina

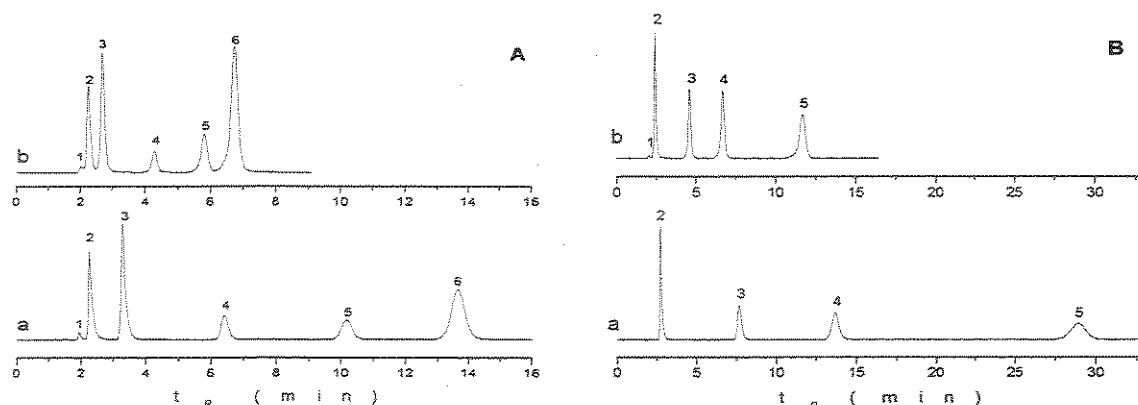


Figura 35: Cromatogramas da MT1 (A) e da MT2 (B) obtidos dos ensaios de aperfeiçoamento das condições de preparo de FE com a sílica Kromasil. a) 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e b) 55 % PMOS inicial, 140 °C / 16 h. Condições cromatográficas: FM metanol / água 60:40 v/v (a) e 70:30 v/v (b), F: 0,3 mL min⁻¹. MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.4 – Otimização das condições de preparo das fases estacionárias com a sílica Rainin

4.4.1 – Planejamento Fatorial

Usou-se planejamento fatorial 2⁴ [83] para otimizar as condições de preparo das FE com o PMOS sorvido e imobilizado por tratamento térmico sobre a sílica Rainin. A FM usada foi metanol / água 70:30 v/v a uma vazão de 0,3 mL min⁻¹ (obtida pela curva de van Deemter) (o ensaio n° 7 foi feito na vazão de 0,4 mL min⁻¹). Este estudo foi feito em conjunto com outra aluna de Mestrado no LabCrom [40], sendo que para ela é importante entender o efeito do tempo de repouso da FE após seu preparo, por evaporação do solvente, em conjunto com o tratamento térmico. Por isso, esse fator também foi adicionado nesse planejamento fatorial. O efeito dessa etapa de repouso no preparo das FE é importante porque a incorporação do polímero e o rearranjo de suas cadeias dentro dos poros da sílica

aumentam simplesmente deixando a FE em repouso, sem nenhum tratamento específico (fenômeno da auto-imobilização), como foi verificado em trabalhos anteriores no LabCrom [35,36,39] e também pelo estudo mostrado no item 4.3.3.

Porém, a auto-imobilização é um processo lento, podendo levar até mais de um ano para que a FE esteja completamente auto-imobilizada, dependendo da sílica utilizada como suporte. Por isso, é utilizado o tratamento térmico das FE para acelerar esse processo [35,41-43].

Os fatores estudados e os níveis do planejamento fatorial 2^{4+1} estão apresentados na Tabela 18 e na Tabela 19 estão os ensaios do planejamento. É importante salientar que na Tabela 18, 34 % de PMOS inicial calculado para a sílica Rainin correspondem aos poros cheios da sílica com o PMOS, enquanto que 44 % correspondem aos poros cheios mais um excesso de 10 % (calculados pela Equação 25). Já para as FE preparadas com a sílica Kromasil, 44 % de PMOS correspondem aos poros cheios de PMOS e 55 % é que correspondem a, aproximadamente, poros cheios mais 10 % de PMOS. Os níveis mais altos de % PMOS e das temperaturas de imobilização térmica que compõem esse planejamento fatorial de preparo das FE com a sílica Rainin foram escolhidos a partir dos resultados obtidos com a sílica Kromasil (comparar Tabelas 11 e 18), que obtiveram a tendência de aumentar o nível desses fatores (seções 4.3.5 e 4.3.6). A escolha dos níveis dos fatores é muito importante, porque pode-se escolher faixas de estudos onde não haja variação na resposta ou que não sejam adequados para se obter a resposta desejada.

Tabela 18: Níveis do planejamento fatorial 2^{4+1} com a sílica Rainin.

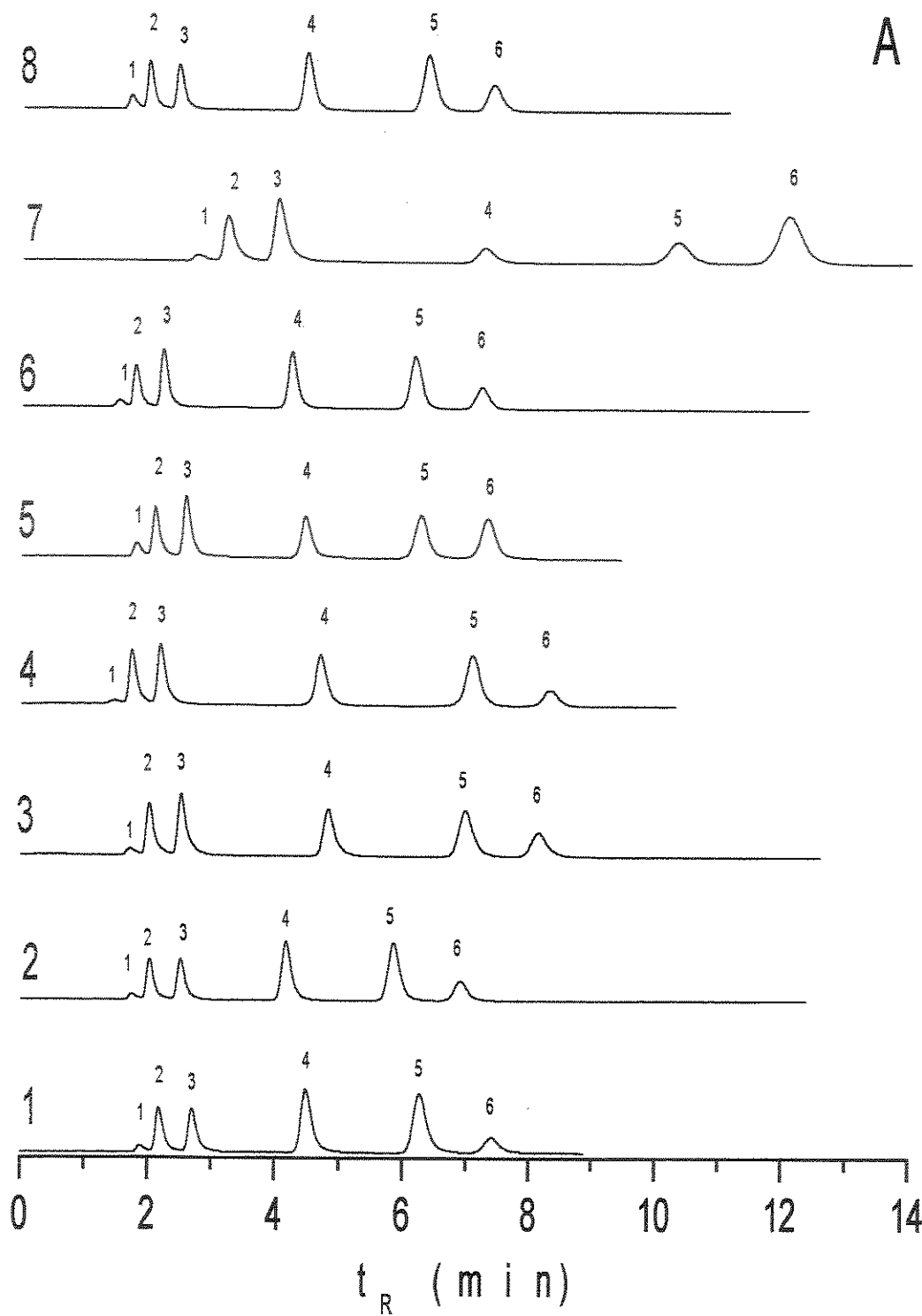
FATORES	NÍVEIS	
	(-)	(+)
(1) % PMOS inicial	34	44
(2) Temperatura de imobilização térmica (° C)	120	140
(3) Tempo de imobilização térmica (h)	8	16
(4) Tempo de repouso (dias)	4	8

Tabela 19: Ensaios do planejamento fatorial 2^{4+1} .

Fator \ Ensaio	(1)	(2)	(3)	(4)
1	-	-	-	-
2	+	-	-	+
3	-	+	-	+
4	+	+	-	-
5	-	-	+	+
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	+

* Os sinais do fator 4 foram gerados pela multiplicação dos outros três fatores: 4 = 123, ou como a literatura costuma apresentar essa relação: I = 1234 (relação geradora) [83].

Os resultados cromatográficos da MT1 e a MT2 estão apresentados na Tabela 20 e os cromatogramas na Figura 36.



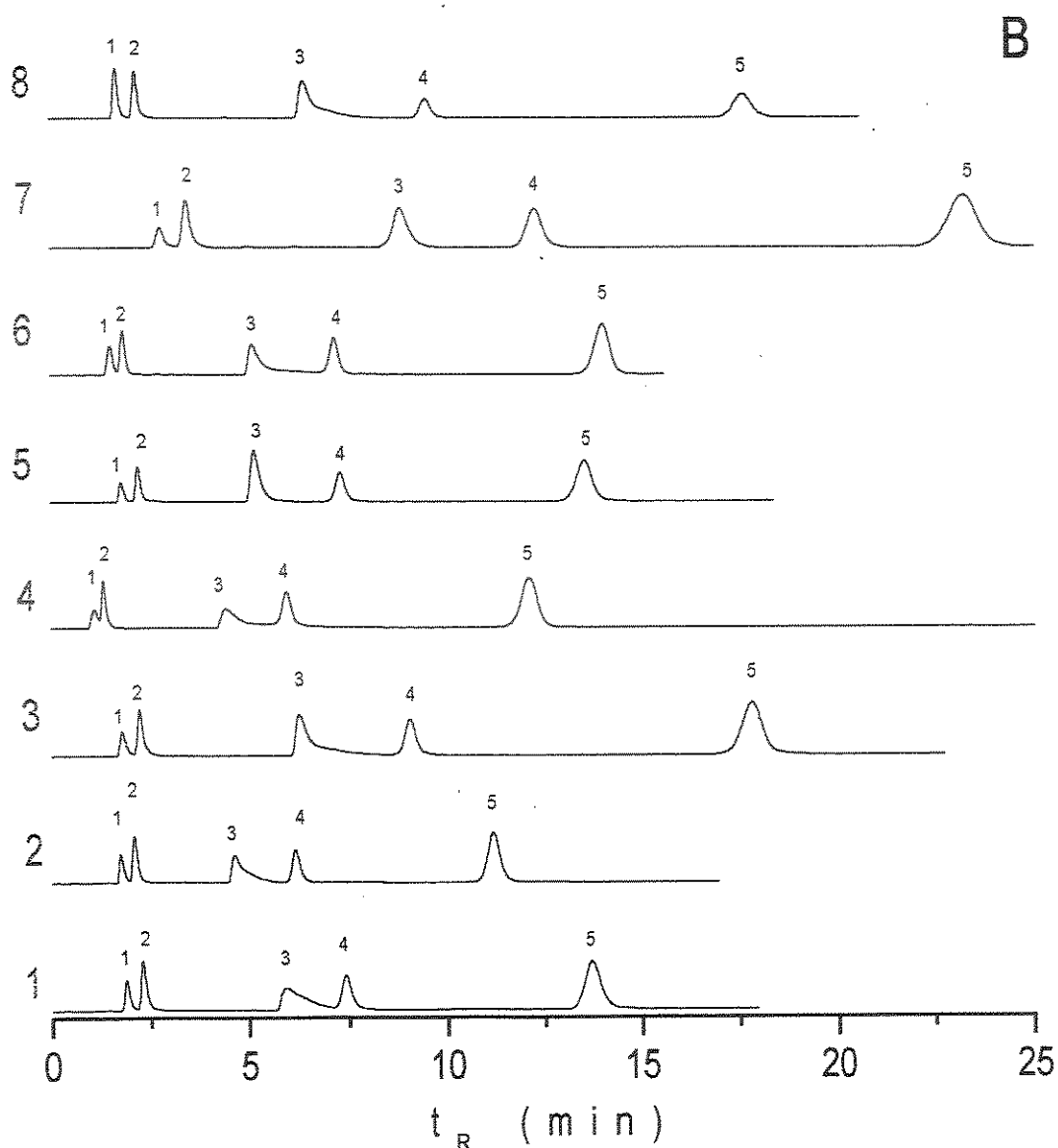


Figura 36: Cromatogramas das MT1 (A) e MT2 (B) obtidas da FE preparada pelos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1} com a sílica Rainin. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹ e 0,4 mL min⁻¹ (ensaio nº 7). MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Tabela 20: Resultados cromatográficos calculados para as FE preparadas com a sílica Rainin pelos ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1} . Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹ ou 0,4 mL min⁻¹ (ensaio nº 7).

Ensaio	N/m ^a		As ^a		k ^a		Rs ^b		N/m ^c		As ^c	
1	71800	64500	1,6	1,2	2,9	2,9	2,7	2,5	7500	7300	5,4	3,7
2	81300	58600	1,5	1,5	2,7	2,5	2,6	2,1	18706	20081	5,9	4,1
3	82300	79100	1,5	1,3	3,8	3,8	2,7	2,6	26900	32200	6,8	7,9
4	85800	57200	1,1	1,2	4,7	4,5	2,8	2,3	13800	12900	8,2	7,9
5	74500	66600	1,2	1,0	3,1	3,0	2,6	2,4	43800	45100	2,7	2,5
6	89600	82500	1,3	1,2	3,8	3,7	2,9	2,7	27100	25000	8,5	10,6
7	62400	79600	1,2	1,2	3,5	3,4	2,4	2,6	52800	33200	1,6	3,3
8	75600	77600	1,4	1,3	3,4	3,4	2,5	2,5	41200	41900	3,9	7,7

^a Calculado para o naftaleno

^b Entre o naftaleno e tolueno

^c Calculado para a N,N-dimetilanilina

Vê-se que estas FE produziram boa separação entre os componentes das misturas testes, altas eficiências e boa assimetria de pico para o composto naftaleno, semelhantes ou melhores que às FE preparadas com a sílica Kromasil. Já para o composto básico N,N-dimetilanilina estas FE apresentaram baixa eficiência e fortes caudas nos picos com altos valores dos fatores de assimetria (entre 2 até 10).

Esses resultados cromatográficos, de forte cauda nos picos do composto básico N,N-dimetilanilina, estão coerentes com os resultados da análise do conteúdo de impurezas metálicas, obtidas por FAAS, e do grau de reatividade dos silanóis da superfície das sílicas obtidas pelo CP / MAS ²⁹Si NMR, os quais mostraram que a sílica Rainin é mais impura e contém maior quantidade de silanóis isolados (ou vicinais) em sua superfície do que a sílica Kromasil. A quantidade de metais e os silanóis isolados são suficientes para deixar a

superfície dessa sílica mais ácida e para interagirem mais fortemente com o composto básico N,N-dimetilanilina.

Mas, somente através dessas caracterizações físicas e cromatográficas da sílica Rainin não é possível identificar qual dos dois fatores, se o conteúdo de metais ou a concentração dos silanóis isolados na superfície da sílica está influenciando mais na interação com o composto básico N,N-dimetilanilina.

Como os resultados cromatográficos calculados a partir dos outros componentes das MT1 e MT2 se mostraram excelentes para todas as FE preparadas com a sílica Rainin, com eficiências até maiores do que as obtidas com a sílica Kromasil, isso sugere que a diferença nos tamanhos, distribuição e forma das partículas das sílicas, obtidos pela microscopia eletrônica de varredura, não estão refletindo num melhor comportamento das FE preparadas com a sílica Kromasil, como era de se esperar.

Deve-se notar, também, que o procedimento de extração dos excessos de PMOS nessas FE foi feito com hexano, numa vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 50°C (observar item 3.5 do procedimento experimental), em substituição do clorofórmio / metanol, que apresentam alta toxicidade e necessitam de grande volumes desses solventes, mostrando que esse procedimento com hexano (menos tóxico) também resulta em FE com bons desempenhos cromatográficos.

4.4.2 - Curva de van Deemter: otimização da velocidade linear da FM

Com o ensaio nº 7 do planejamento fatorial 2^{4-1} foi construída a curva de van Deemter para otimizar a velocidade linear da FM. Os parâmetros utilizados para a construção do gráfico da Figura 37 foram calculados da mesma forma que para a sílica Kromasil (item 4.3.4). De acordo com os resultados obtidos pela curva de van Deemter, as melhores vazões da FM encontrada foram $0,3$ ou $0,4 \text{ mL min}^{-1}$, mas foi escolhido $0,3 \text{ mL min}^{-1}$ para se poder comparar os valores dos parâmetros cromatográficos com os das FE preparadas com a sílica Kromasil, cuja vazão ótima foi definida em $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.

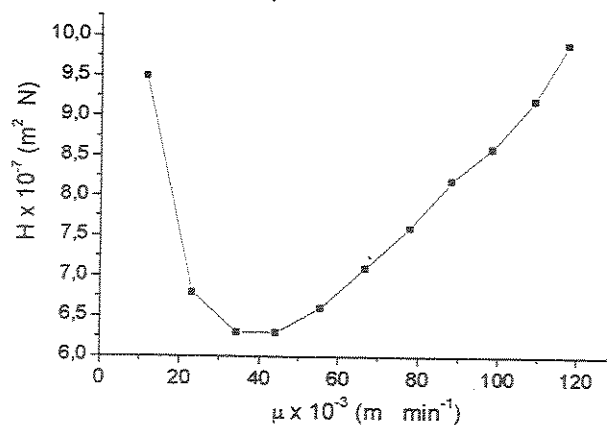


Figura 37: Curva de van Deemter construída com a FE preparada pelo ensaio nº 7 do planejamento fatorial 2^{4+1} .

4.4.3 – Cálculo dos efeitos

Os efeitos para o planejamento fatorial fracionário 2^{4+1} foram calculados a partir dos valores da eficiência para o naftaleno (Tabela 21) e a assimetria do pico da N,N-dimetilanilina (Tabela 22), cujas equações foram mostradas no item 1.12.

Tabela 21: Efeitos calculados a partir da eficiência do naftaleno (dados referente à Tabela 20).

Média global	$80300 \pm 0,35$
Efeitos principais	
1	$6,5 \pm 0,72$
2	$2,0 \pm 0,72$
3	$0,05 \pm 0,72$
4	$-2,8 \pm 0,72$
Interações entre dois fatores	
12	$-5,8 \pm 0,72$
13	$0,04 \pm 0,72$
23 = 14	$-5,5 \pm 0,72$

- Estimativa conjunta de variância, s_p^2 : $16,800 / 8 = 2,100$
- Variância de um efeito, V_{efeito} : $2,100 / 4 = 0,525$
- Erro padrão de um efeito, S_{efeito} : $\sqrt{0,525} = 0,724$
- Teste t , no nível de 95 % de confiança: $t_8 \times S_{\text{efeitos}} = 2,306 \times 0,724 = \pm 1,669$

São considerados estatisticamente significativos os efeitos cujos valores são maiores que $\pm 1,669$. Portanto, foram significativos os efeitos principais 1, 2 e 4, % PMOS inicial (tendência para aumentar), a temperatura de imobilização térmica (tendência para aumentar), e os dias de repouso da FE após seu preparo (tendência para diminuir), e os efeitos de interação 12 e 23 (ou 14), entre a % PMOS inicial e a temperatura de imobilização térmica e entre a temperatura de imobilização térmica e o tempo de imobilização térmica (ou entre % PMOS inicial e os dias de repouso da FE).

Tabela 22: Efeitos calculados a partir da assimetria do pico do composto básico N,N-dimetilanilina (dados referentes à Tabela 20).

Média global	$5,8 \pm 0,46$
Efeitos principais	
1	$2,8 \pm 0,23$
2	$0,4 \pm 0,23$
3	$-1,6 \pm 0,23$
4	$-0,9 \pm 0,23$
Interações entre dois fatores	
12	$-0,4 \pm 0,23$
13	$1,8 \pm 0,23$
23 = 14	$-1,5 \pm 0,23$

- Estimativa conjunta de variância, s_p^2 : $1,72 / 8 = 0,215$
- Variância de um efeito, V_{efeito} : $0,215 / 4 = 0,0538$
- Erro padrão de um efeito, s_{efeito} : $\sqrt{0,0538} = 0,231$
- Teste t , no nível de 95 % de confiança: $t_8 \times s_{\text{efeitos}} = 2,306 \times 0,231 = \pm 0,535$

Para as respostas considerando a assimetria do pico da N,N-dimetilanilina (cujo objetivo é diminuir o valor até 1,0) são estatisticamente significativos os efeitos de valores maiores que $\pm 0,535$, que são a % PMOS inicial (tendência para diminuir), o tempo de imobilização térmica (tendência para aumentar), os dias de repouso da FE após seu preparo (tendência para aumentar) e os efeitos de interação entre a % PMOS inicial e o tempo de imobilização térmica e entre a temperatura de imobilização térmica e o tempo de imobilização térmica (ou % PMOS inicial e os dias de repouso da FE).

Porém, esses resultados são atípicos, porque seria de se esperar que o fator % PMOS inicial tivesse a tendência para aumentar e não diminuir, já que os valores das assimetrias dos picos estão relacionados com a quantidade de silanóis residuais que não foram cobertos pelo PMOS. Seria interessante então, calcular os efeitos a partir dos dados de % C retido na FE ou a % perda massa obtida por TGA. Esses resultados serão discutidos quando esses dados forem apresentados.

Pensou-se então, em utilizar os valores do parâmetro de fator de retenção do naftaleno ou do acenafteno (compostos mais retidos das duas misturas testes) para o cálculo dos efeitos, mas os ensaios nº 7 do planejamento fatorial foram feitos na vazão de $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ e os outros em $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, portanto não se pode comparar esses valores, porque a velocidade de transferência de massa do analito entre a FM e a FE muda se for alterado a velocidade linear da FM. Esse comportamento pode ser visualizado na Figura 36, nos quais os componentes da MT2 ficam bem mais retidos no ensaio nº 7. Portanto, também não foi possível utilizar este parâmetro para o cálculo dos efeitos.

4.5 – Caracterizações física e química das fases estacionárias

4.5.1 – Caracterização das fases estacionárias por análise elementar de carbono e análise termogravimétrica (TGA)

As análises de % C e % perda massa por TGA das FE, estão mostrados na Tabela 23. A partir dos dados de % C, foi possível determinar a massa específica de PMOS retido sobre a sílica, $\bar{m}_{\text{PMOS retido}}$, após o preparo das FE, essa quantidade dada em % PMOS retido e a espessura da camada de polímero formada nas paredes dos poros da sílica, τ (assumindo que os poros da sílica tenha diâmetro constante e que o PMOS imobilizado é caracterizado por uma espessura de camada constante nos poros). Esses resultados foram obtidos a partir das Equações mostradas no item 3.4.

De maneira geral, os resultados obtidos com as duas técnicas, a %C e TGA, estão coerentes entre si, havendo algumas poucas diferenças. Considerando somente as FE preparadas com a sílica Kromasil, as FE com maior conteúdo de C foram as que obtiveram melhores desempenhos cromatográficos. Em relação à sílica Rainin, todas as FE apresentaram excelentes desempenhos cromatográficos quando avaliadas com a MT1 (somente compostos neutros), mas pela acentuada cauda no pico do composto básico N,N-dimetilanilina da MT2 é possível concluir que ainda há uma quantidade considerável de silanóis residuais nas FE, que interagem fortemente com compostos básicos. É possível que as FE preparadas com a sílica Kromasil contenham muitos silanóis residuais, mas como eles têm caráter menos ácidos não interagem com analitos básicos (hipótese que ainda não foi confirmada).

Analisando os dados contidos na Tabela 23, observa-se que a espessura da camada de PMOS, τ , formada nas FE preparadas com a sílica Rainin (que supomos ser uma monocamada de PMOS, devido ao comportamento cromatográfico das FE) é mais espessa que a monocamada formada com as FE preparadas com a sílica Kromasil (com a sílica Kromasil o valor do τ fica em torno de um, enquanto que com a sílica Rainin, chega a ultrapassar o valor de dois), ou

seja, a monocamada é mais completa utilizando a sílica Rainin como suporte cromatográfico. De acordo com os estudos feitos por Bottoli [35], a incorporação do PMOS depende dos silanóis da superfície da sílica, ou seja, o processo de sorção e imobilização do PMOS nas paredes dos poros da sílica acontece devido às interações entre as cadeias do polímero e os grupos silanóis da superfície da sílica. Portanto, o que estes resultados sugerem é que uma superfície da sílica mais ácida, devido ao maior número de silanóis isolados ou quantidades significativas de impurezas metálicas contidas na matriz, favorece uma maior incorporação do polímero na superfície da sílica.

Também é preciso considerar relevante o tempo de repouso da FE antes do tratamento térmico, para que ocorra o processo da auto-imobilização do polímero na sílica, porque como foi observado por Bottoli [35,43], há um aumento na % C na FE com o aumento do tempo de repouso da FE antes do tratamento térmico. Como nesse caso os dias em que as FE ficaram de repouso foram semelhantes (4, 6 ou 8 dias de repouso), pode-se concluir que a causa da formação de uma monocamada de PMOS mais espessa sobre a sílica Rainin, quando comparada com a Kromasil é devido à sua superfície mais ácida, causada pela maior quantidade de impurezas metálicas e ao maior número de silanóis isolados na superfície dessa sílica.

Tanto os valores da % C como a % perda massa por TGA para o ensaio nº 1 do planejamento fatorial 2^{4+1} (Tabela 19) para a sílica Rainin estão atípicos, porque não estão coerentes com os resultados cromatográficos, cujas FE preparadas por esse ensaio obtiveram resultados cromatográficos semelhantes aos outros ensaios, com tempos de retenção e fatores de retenção (parâmetros cromatográficos relacionados com a cobertura do PMOS sobre a sílica) semelhantes às outras FE.

As análises elementares de C e a % perda de massa por TGA para esse ensaio foram então repetidos, mas os resultados obtidos foram semelhantes aos já encontrados anteriormente. Por isso, esses dados foram considerados “outliers” e não foi possível também realizar os cálculos dos efeitos dos ensaios do

planejamento fatorial 2^{4-1} utilizando os resultados de % C ou a % perda de massa por TGA das FE.

Tabela 23: % C, % perda massa obtida por TGA, quantidade de PMOS retido e espessura da camada formada (τ) de algumas FE preparadas com a sílica Kromasil e Rainin.

Amostras *	% C	$\bar{m}_{\text{PMOS}}$ (gPMOS/gsil)	$\bar{m}_{\text{PMOSretido}}$ (gPMOS/gsil)	% PMOS retido	τ nm	% perda massa (TGA)
Kromasil						
1	3,1	0,54	0,05	9,2	0,17	6,2
2	2,7	0,80	0,04	5,0	0,14	5,5
3	7,5	0,54	0,14	25,9	0,49	10,1
8	13,1	0,80	0,27	33,7	1,04	16,2
55 % 120 °C / 16 h	11,3	1,22	0,22	18,0	0,82	14,1
55 % 140 °C / 16 h	11,7	1,22	0,23	18,8	0,87	13,8
Rainin						
1	5,0	0,53	0,08	16,6	0,56	7,0
2	12,5	0,77	0,25	32,8	1,68	29,3
3	13,3	0,51	0,27	54,2	1,86	15,8
4	14,6	0,72	0,31	43,0	2,18	17,2
5	11,9	0,54	0,24	43,9	1,56	14,1
6	14,1	0,77	0,29	38,0	2,04	15,8
7	12,3	0,52	0,25	47,3	1,64	Nd
8	12,9	0,75	0,26	35,3	1,78	14,8

* os números referem-se ao número do ensaio dos planejamentos fatoriais (Tabela 13 para a sílica Kromasil e Tabela 20 para a sílica Rainin).

Nd = não determinado

4.5.2 – Caracterização das fases estacionárias por Espectroscopia no Infravermelho (IR)

A Figura 38 mostra os espectros no IR da sílica Kromasil e das FE preparadas com o PMOS sorvido e imobilizado sobre esta sílica. Os espectros correspondem à sílica Kromasil (a) e às FE preparadas pelos ensaios número 1, 3 e 8 (espectros b, c e d) do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 13) e de aperfeiçoamento, com 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h (e).

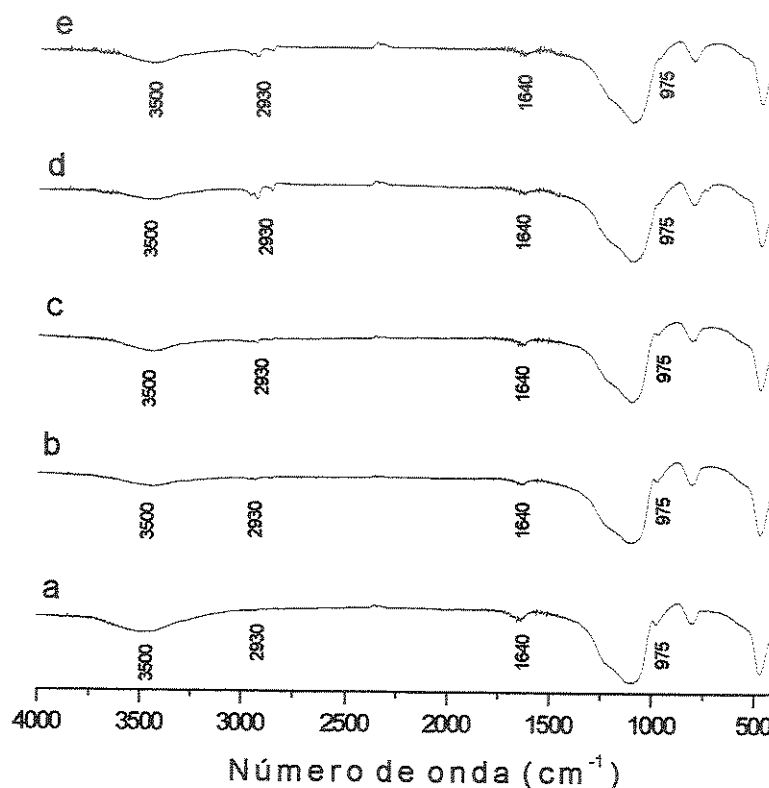


Figura 38: Espectros de IR da sílica Kromasil (a) e das FE preparadas com a sílica Kromasil pelos ensaios número 1, 3 e 8 (espectros b, c, e d respectivamente) do planejamento fatorial 2^3 (Tabela 13) e de aperfeiçoamento: 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h (e).

Os espectros de IR das FE preparadas com o PMOS sorvido e imobilizado sobre a sílica Kromasil mostra uma banda na região de 2930 cm^{-1} , característica do estiramento da ligação C - H do PMOS, evidenciando a presença do polímero na superfície da sílica. Observa-se também que as bandas em 975 cm^{-1} , característica dos grupos silanóis livres (isolados) da sílica, diminuíram de tamanho, enquanto as bandas em 2930 cm^{-1} aumentaram, à medida que mais PMOS foi imobilizado na sílica, refletindo na melhora do comportamento cromatográfico das FE. Porém, mesmo com uma boa cobertura do polímero, ainda observa-se a banda em 975 cm^{-1} dos grupos silanóis isolados da superfície da sílica, mostrando que as FE ainda contém silanóis residuais, mas devido à pureza da sílica Kromasil e a menor acidez dos grupos silanóis não há uma interação forte desses sítios com o composto básico N,N-dimentilanilina da MT2.

As bandas em 3500 e 1640 cm^{-1} , referentes à água adsorvida na superfície da sílica (água adsorvida nos silanóis), ainda aparecem nas FE, com uma intensidade menor do que na sílica nua, mas também indicando que ainda existem sítios adsorventes expostos na superfície da sílica que não foram cobertos pelo PMOS, mas, devido às características menos ácidas desses sítios, eles não interagem fortemente com o composto básico.

A Figura 39 mostra os espectros no IR da sílica Rainin (a) e das FE preparadas com a sílica Rainin pelos ensaios número 3, 4 e 7 (b, c e d, respectivamente) do planejamento fatorial 2^{4-1} (Tabela 20).

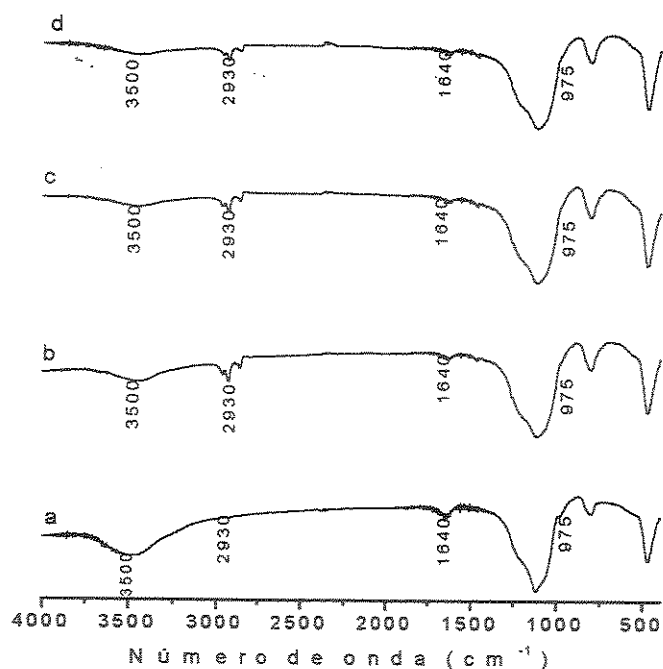


Figura 39: Espectros no IR da sílica Rainin (a) e das FE preparadas com a sílica Rainin pelos ensaios número 3 (b), 4 (c) e 7 (d) do planejamento fatorial 2^{4-1} (Tabela 20).

Analisando os espectros da Figura 39, observa-se comportamentos semelhantes aos das FE preparadas com a sílica Kromasil. A banda em torno de 2930 cm^{-1} , referente ao estiramento C-H do PMOS, evidencia a presença do polímero na sílica e o desaparecimento da banda em 975 cm^{-1} , mostra que houve um bom recobrimento pelo PMOS, refletindo no bom comportamento cromatográfico das FE com compostos neutros. Mas, a presença das bandas em 3500 e 1640 cm^{-1} , referentes à água fisicamente adsorvida na superfície da sílica, indicam que ainda há sítios adsortivos expostos na FE, cujas características mais ácidas da superfície dessa sílica, devido a maior quantidade de impurezas metálicas e o maior número de silanóis isolados mais ácidos, refletem numa maior interação com o composto básico *N,N*-dimetilalanilina, causando acentuadas caudas no pico desse composto (cromatogramas da MT2).

4.5.3 – Caracterização das fases estacionárias por CP / MAS ^{29}Si NMR

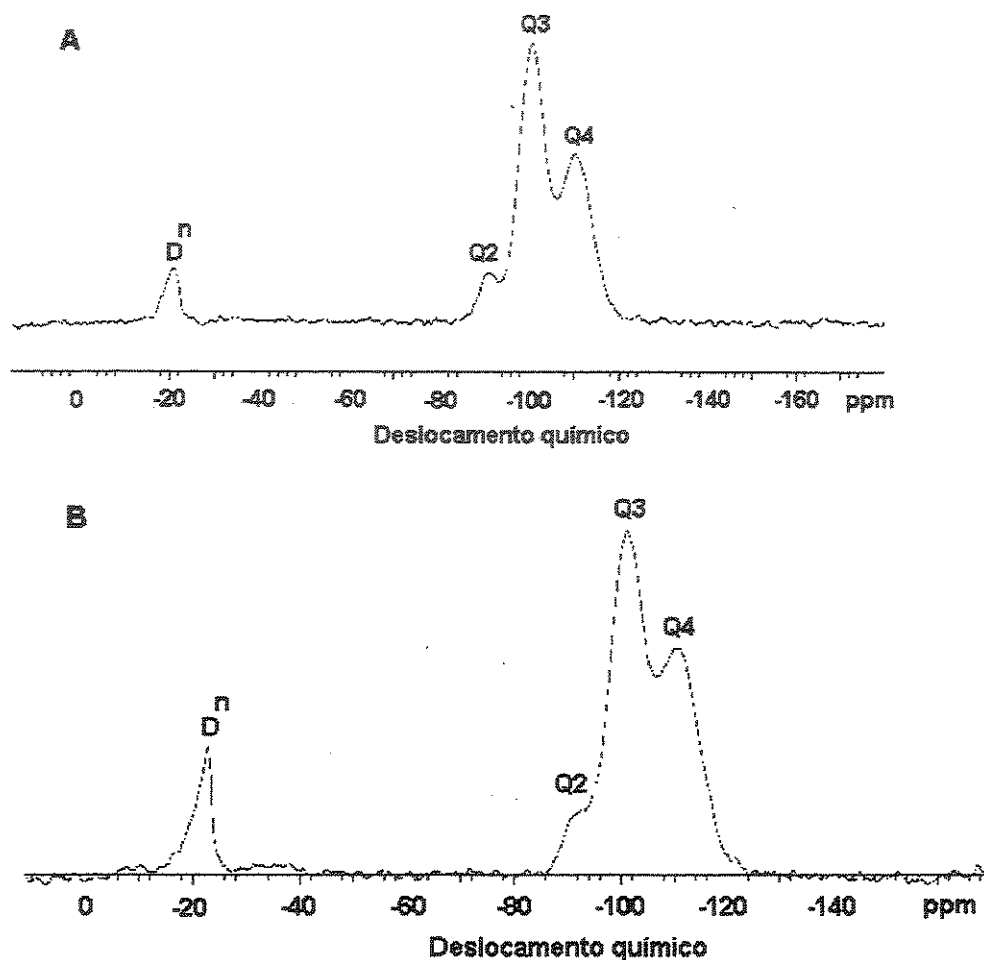


Figura 40: A) Espectro de CP / MAS ^{29}Si NMR da FE preparada com a sílica Kromasil nas condições de 55 % carga inicial de PMOS, 140 °C / 16 h. B) Espectro de CP / MAS NMR de ^{29}Si da FE preparada com a sílica Rainin nas condições de 44 % PMOS inicial, 140 °C / 16 h e 4 dias de repouso.

Os espectros de CP-MAS ^{29}Si NMR das FE preparadas com as sílicas Kromasil e Rainin nas condições de 55 % (Kromasil) ou 44 % (Rainin) de PMOS inicial, 140 °C / 16 h estão mostrados na Figura 40 (espectros A e B, respectivamente). Observando essas Figuras, vê-se que as FE apresentaram

comportamentos semelhantes. Além dos sinais característicos da sílica pura em -92 ppm (Q2 = silanóis geminais), -100 ppm (Q3 = silanóis isolados ou vicinais) e -110 ppm (Q4 = ligações siloxano) (Figura 27), os espectros apresentam um grupo de sinais D^n , que é a sobreposição de vários sinais atribuídos ao PMOS imobilizado (sorvido e quimicamente ligado) sobre a sílica. Nos estudos feitos por Albert, Collins et al. [35,39,43], fez-se a deconvolução dos sinais do grupo D^n e foram encontrados os deslocamentos químicos em -21,9 ppm atribuído ao líquido PMOS puro ($D^{2''}$) e os sinais em -20,6 ppm (D^{2a}), bem como em -18,0 ppm ($D^{2a'}$) e -15,5 ppm ($D^{2a''}$) atribuídos ao PMOS imobilizado sobre a sílica (Figura 41).

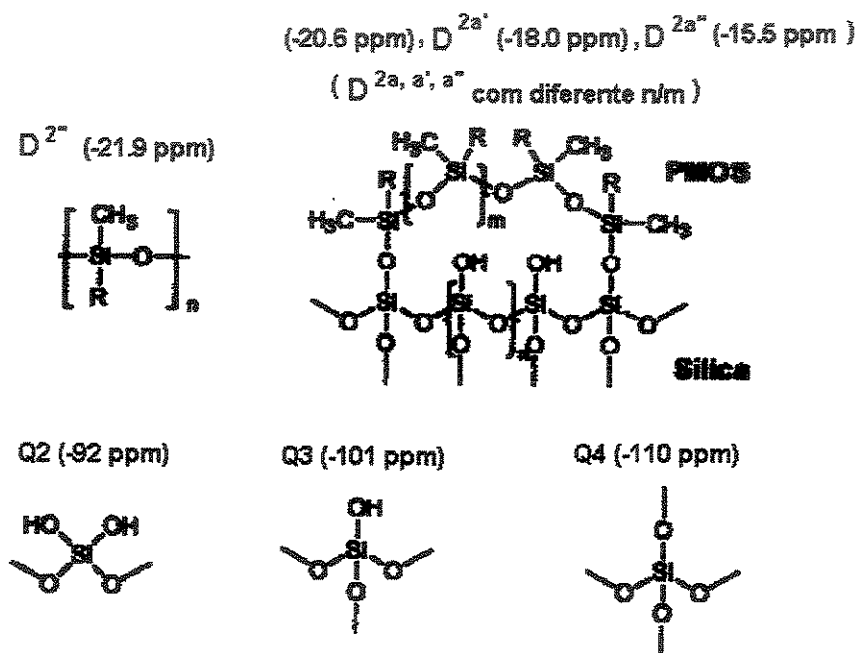


Figura 41: Estrutura das espécies D^{2a} ($D^{2a'}$, $D^{2a''}$) e $D^{2''}$ e os deslocamentos químicos dos CP-MAS ^{29}Si NMR das FE contendo o PMOS sorvido e imobilizado nas paredes dos poros da sílica [35,37,41].

Em estudos feitos por ^{29}Si NMR de FE quimicamente ligadas, a presença do sinal Q2 em -92 ppm (referente aos silanóis geminais da superfície da sílica) indica que ainda há silanóis residuais na FE, os quais não reagiram com o ligante

(por exemplo, uma FE na qual a densidade do ligante é baixa e não houve a etapa de capeamento) [94]. Porém, nos espectros de CP-MAS ^{29}Si NMR de FE com polímeros sorvidos e imobilizados, a presença dos sítios Q2 pode tanto indicar a presença de silanóis descobertos pelo polímero, como de silanóis cobertos, mas que não foram modificados, já que a maior parte das interações entre o polímero e a sílica acontecem por adsorção e não por ligação química.

4.6 – Conclusões da Parte I

As melhores condições de preparo das FE foram 55 % PMOS inicial (sílica Kromasil) ou 44 % PMOS inicial (sílica Rainin), que correspondem à quantidade de PMOS suficiente para encher os poros da sílica mais um excesso de 10 %, temperatura de imobilização térmica de 120 °C ou 140 °C, sendo 8 h um tempo suficiente para a imobilização e 6 dias de repouso da FE antes da extração dos excessos de PMOS e a imobilização térmica para que se aconteça o processo de redistribuição do polímero na superfície das sílicas.

O procedimento de extração dos excessos de PMOS com hexano foi tão eficiente quanto o clorofórmio / metanol usados em trabalhos anteriores no LabCrom, mostrando que este procedimento pode continuar sendo utilizado.

O estudo do tempo de repouso da FE após seu preparo mostrou que, se a temperatura e o tempo de tratamento térmico na FE não foram suficientes para deixar o polímero na forma mais estável dentro dos poros da sílica, as cadeias do polímero continuam a se rearranjar com o passar do tempo, ou seja, o PMOS continua a se auto-imobilizar nos poros da sílica, refletindo numa melhora dos parâmetros cromatográficos de resolução e eficiência.

O uso de planejamentos fatoriais foi essencial para se chegar a essas condições ótimas de preparo das FE. As escolhas dos parâmetros e seus níveis são fundamentais nesse processo, porque as respostas desejadas vão depender do intervalo e das faixas escolhidas. Por isso, para um uso eficiente dos planejamentos experimentais, é importante que se tenha um conhecimento prévio

do sistema a ser estudado, para que, a partir dos parâmetros e dos níveis escolhidos, encontre-se a resposta desejada.

As FE produziram boa separação, altas eficiências e boas assimetrias de picos para compostos neutros, porém, as FE preparadas com a sílica Rainin obtiveram baixa eficiência e valores altos de assimetria no pico do composto básico N,N-dimetilanilina, atribuído à maior quantidade de impurezas metálicas e a maior quantidade de silanóis isolados (ou vicinais) presentes na superfície dessa sílica (obtidos por FAAS e CP / MAS ^{29}Si NMR), suficientes para torná-la mais ácida e interagir mais fortemente com o composto básico, causando caudas nos picos desse composto.

Os resultados de Espectroscopia no Infravermelho também mostraram que as FE preparadas com a sílica Kromasil contém silanóis residuais, mas como esses silanóis não têm caráter mais ácidos, eles não têm interação forte com o composto básico N,N-dimetilanilina, com picos simétricos para este composto.

Os resultados de análise elementar de carbono mostraram que a espessura da monocamada de PMOS (τ) formada nas FE preparadas com a sílica Rainin, mais impura e com maior número de silanóis isolados, é mais espessa que a monocamada formada nas FE preparadas com a sílica Kromasil. Estes resultados evidenciam que a interação do polímero é mais forte com silanóis mais ácidos da superfície das sílicas.

PARTE II
FASES ESTACIONÁRIAS PREPARADAS COM
AS SÍLICAS PRÉ-TRATADAS

4.7 – Fases estacionárias preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratadas com água, ácido ou base

4.7.1 - Caracterização por CP / MAS ^{29}Si NMR das sílicas Kromasil após pré-tratamento com água, ácido ou base

A sílica Kromasil foi pré-tratada com H_2O / 24 h, HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h ou NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h em refluxo a 100 °C. Para avaliar a acidez da superfície dessas sílicas após os pré-tratamentos, devido ao aumento ou a diminuição no número de silanóis isolados (ou vicinais) e geminais foram obtidos os espectros de CP / MAS ^{29}Si NMR dessas sílicas. A partir da deconvolução desses espectros obteve-se as áreas dos picos e calculou-se a quantidade relativa dos diferentes sítios na superfície das sílicas pré-tratadas. Os resultados estão mostrados na Tabela 24 e a Figura 42 mostra o espectro de CP / MAS ^{29}Si NMR da sílica Kromasil pré-tratada com NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h.

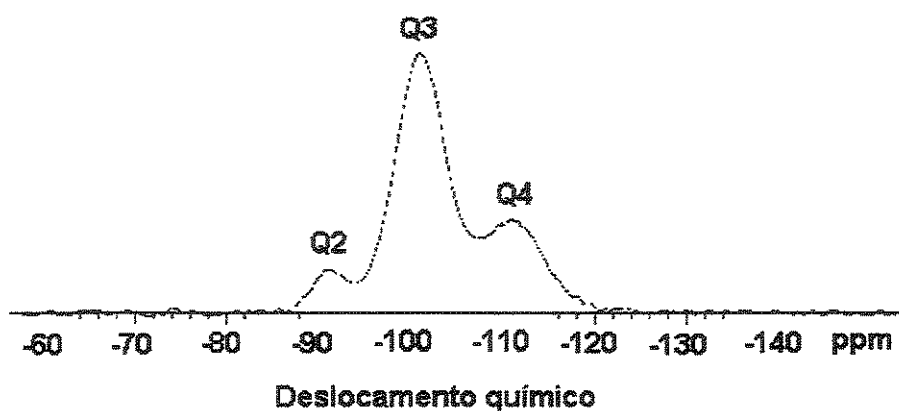


Figura 42: CP / MAS ^{29}Si NMR da sílica Kromasil pré-tratada com NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h.

Tabela 24: Quantidades relativas dos silanóis em relação aos grupos siloxano da superfície da sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada com H_2O / 24 h, HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h ou NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h obtidas por CP / MAS ^{29}Si NMR.

Sílica Kromasil	Q2 / Q4 (silanóis geminais)	Q3 / Q4 (silanóis isolados)
Sem pré-tratamento	0,07	1,5
$\text{H}_2\text{O}/24$ h	0,14	4,0
HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h	0,14	2,9
NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h	0,10	3,2

A área dos picos dos grupos silanóis foram divididos pela área dos picos dos grupos siloxano para normalizar as medidas, já que as análises foram feitas todas nas mesmas condições. Pelos resultados da Tabela 24 observa-se um aumento na quantidade relativa dos grupos silanóis geminais e principalmente dos grupos silanóis isolados (ou vicinais) na superfície das sílicas pré-tratadas em relação à sílica Kromasil sem pré-tratamento. Esses resultados indicam um aumento na acidez da superfície das sílicas pré-tratadas, tornando-as mais susceptíveis à interações fortes com compostos básicos.

De acordo com Nawrocki [6], quando se faz um pré-tratamento ácido em uma sílica que já é completamente hidroxilada, a acidez da superfície da sílica aumenta, sugerindo que a sílica Kromasil contém sua superfície completamente hidroxilada. Portanto, contém maior quantidade de silanóis ligados por ligação de hidrogênio de caráter menos ácido. O tratamento ácido fez com que diminuísse a quantidade desses silanóis ligados por ligação de hidrogênio e aumentasse o número de silanóis isolados mais ácidos.

4.7.2 - Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho (IR) das sílicas Kromasil pré-tratadas com água, ácido ou base

A Figura 43 mostra os espectros de IR da sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada com H_2O / 24 h, HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h ou NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h. Analisando visualmente esta Figura observa-se que não há nenhuma diferença entre os espectros da sílica Kromasil sem pré-tratamento e os das sílicas pré-tratadas, mostrando que somente através da análise visual dos espectros de IR não é possível obter informações relevantes a respeito de mudanças na superfície da sílica com os pré-tratamentos efetuados. O emprego de PCA é uma ferramenta alternativa, muito versátil e eficaz nas análises de espectros, porque através dela é possível detectar mudanças em curvas aparentemente semelhantes e também quando o número de dados e as variáveis são muitas.

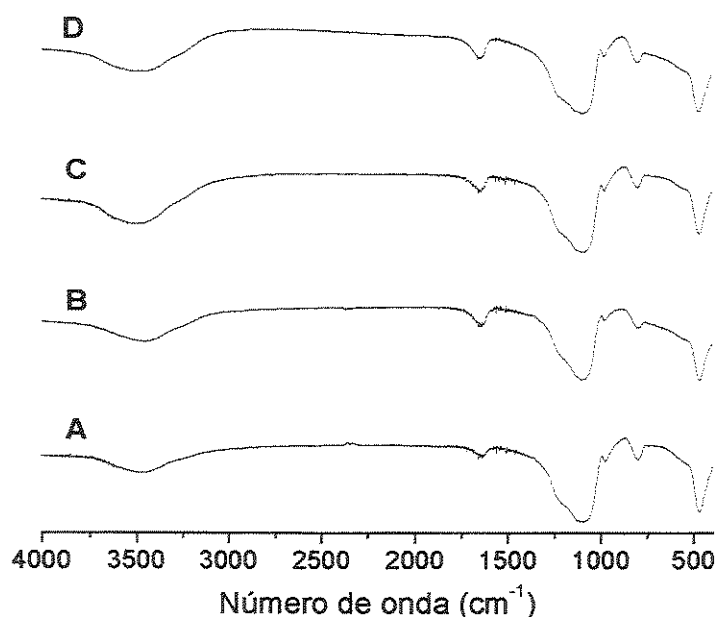


Figura 43: Espectros de IR da sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratadas. A) Kromasil sem pré-tratamento, B) com H_2O / 24 h, C) HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h e D) NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h.

4.8 – Preparo de fases estacionárias com as sílicas Kromasil pré-tratadas com água, ácido ou base

4.8.1 – Fases estacionárias preparadas com 44 % PMOS inicial

Como a FE preparada pelo ensaio nº 8 do planejamento fatorial 2^3 , para otimização das condições de preparo das FE com sílica Kromasil sem pré-tratamento (Tabela 13), mostrou bons resultados cromatográficos, então preparou-se FE nessas mesmas condições (44 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h) com a sílica Kromasil pré-tratada com H_2O / 24 h, HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h e NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h. Os cromatogramas e os parâmetros cromatográficos estão apresentados na Figura 44 e na Tabela 25.

Tabela 25: Resultados cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 obtidos das FE preparadas com a sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada com H_2O / 24 h, HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h ou NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h. As condições de preparo da FE foram: 44 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 60:40 v/v (sílica sem pré-tratamento) e FM metanol / água 70:30 v/v (sílicas pré-tratadas), F: 0,3 mL min^{-1} .

Sílica Kromasil	N/m ^a		As ^a		Rs ^b		N/m ^c		As ^c		t _R ^c	
Sem pré-tratamento	65200		1,0		4,4		57500		1,0		4,3	
H ₂ O / 24 h	61000		1,6		1,8		13400		4,4		7,5	
HNO ₃ 2,0 mol L ⁻¹ / 15 h	61700	75600	1,4	1,2	1,9	2,1	43400	44400	1,5	1,6	3,7	3,8
NH ₄ OH 0,01 mol L ⁻¹ / 4 h	67900	70200	1,5	1,5	2,1	2,1	39400	57500	2,0	1,5	5,3	4,9

^a Calculado para o naftaleno

^b Entre o naftaleno e tolueno

^c Calculado para a N,N-dimetilanilina

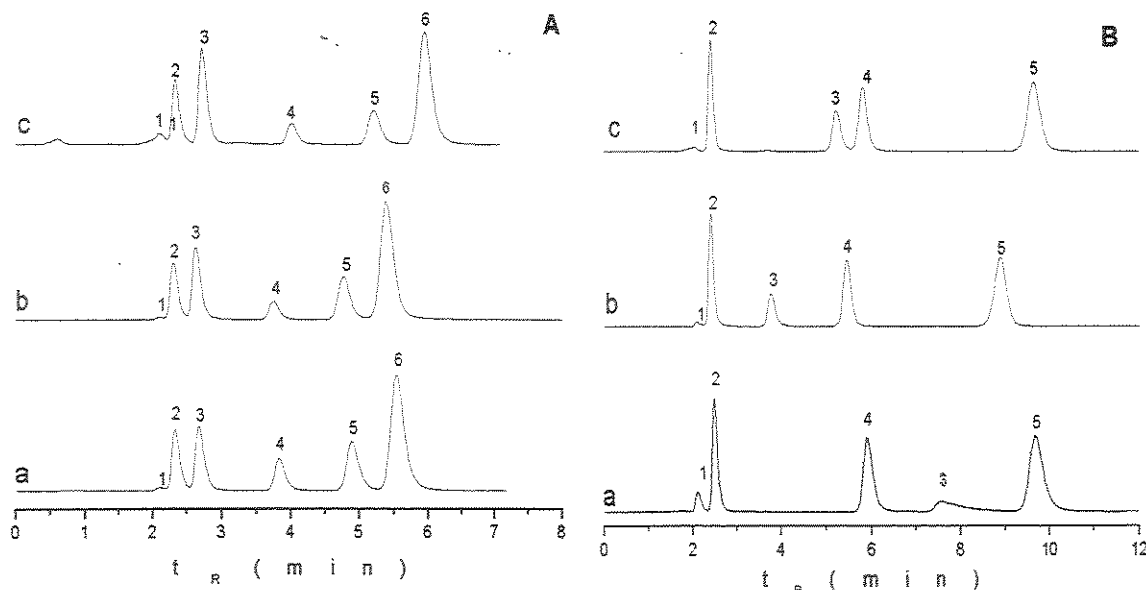


Figura 44: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratadas com: a: H_2O / 24 h, b: HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h e c: NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h. As condições de preparo das FE foram: 44 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min^{-1} . MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Analisando os dados da Tabela 25, vê-se que houve uma piora nos resultados cromatográficos de eficiência para a N,N-dimetilanilina e assimetria dos picos do naftaleno e da N,N-dimetilanilina com as FE preparadas com as sílicas pré-tratadas com H_2O / 24 h, HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h e NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h, em comparação com a FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento. Esses resultados sugerem várias hipóteses: menos PMOS foi retido nos poros das sílicas pré-tratadas, o número de silanóis totais na superfície da sílica aumentou e a quantidade de PMOS não foi suficiente para recobri-los ou houve um aumento na acidez dos grupos silanóis, os quais interagiram mais fortemente com os

componentes das misturas testes. A última hipótese foi confirmada pelos resultados de CP / MAS ^{29}Si NMR, mas não excluiu as outras.

A mudança no t_R da N,N-dimetilanilina e até mesmo a inversão da ordem de eluição da N,N-dimetilanilina e do naftaleno na MT2, mostram que essas FE estão com muitos silanóis residuais, com a N,N-dimetilanilina ficando muito retida na FE devido a uma forte interação desse composto com os silanóis residuais.

4.8.2 – Fases estacionárias preparadas com 50 % PMOS inicial

Devido à indicação de que houve um aumento no número de silanóis na superfície das sílicas pré-tratadas, optou-se por aumentar a % PMOS inicial nas FE para 50 %. Os parâmetros cromatográficos das MT1 e MT2 estão mostrados na Tabela 26 e os cromatogramas nas Figuras 45 e 46. A Figura 46 mostra os cromatogramas das três primeiras corridas da MT2 com a FE preparada com a sílica Kromasil pré-tratada com H_2O / 24 h.

Tabela 26: Resultados cromatográficos calculados para a MT1 e a MT2 obtidos das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com H_2O / 24 h ou HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h. As condições de preparo das FE foram: 50 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v e F: 0,3 mL min^{-1} .

Ensaio	N/m ^a	As ^a	k ^a	Rs ^b	N/m ^c	As ^c	Rs ^d
Kromasil H_2O / 24 h	51400	1,6	1,7	1,8	Não repetitivo	Não repetitivo	Não repetitivo
Kromasil - HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h	65700	1,4	2,4	2,4	Não repetitivo	Não repetitivo	Não repetitivo

^a Calculado para o naftaleno

^b Entre o naftaleno e tolueno

^c Calculado para a N,N-dimetilanilina

^d Entre o naftaleno e a N,N-dimetilanilina

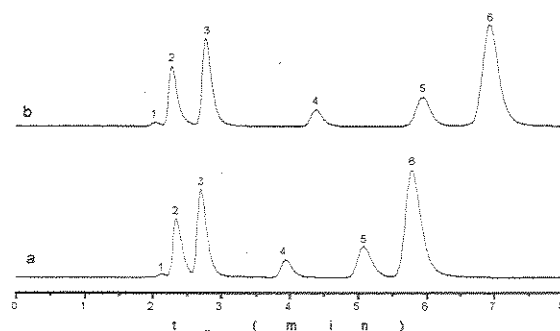


Figura 45: Cromatogramas da MT1 com as FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com: a: H_2O / 24 h e b: HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h. As condições de preparo das FE foram: 50 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min^{-1} . MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

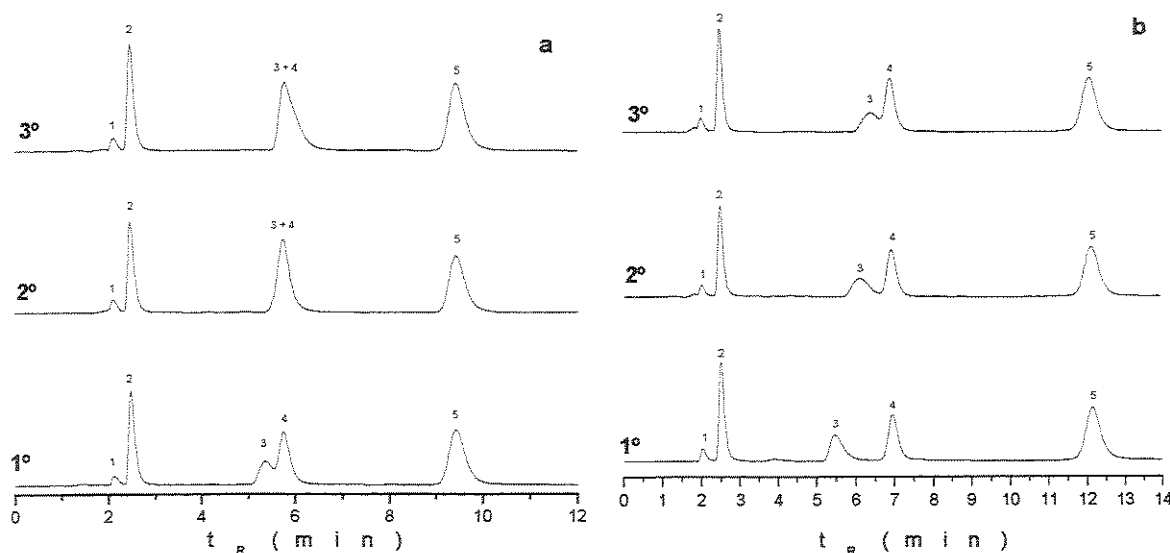


Figura 46: Três primeiras corridas cromatográficas da MT2 obtida da FE preparada com a sílica Kromasil pré-tratada com a: H_2O / 24 h e b: HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h. Condições de preparo da FE: 50 % PMOS inicial 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min^{-1} . MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Analisando os dados da Tabela 26 e as Figuras 45 e 46, vê-se que os resultados cromatográficos ainda continuam piores que para a FE preparada com a sílica Kromasil sem pré-tratamento: a assimetria dos picos do naftaleno aumentou, houve a inversão da ordem de eluição da N,N-dimetilanilina e do naftaleno na MT2 e a não repetitividade no tempo de retenção da N,N-dimetilanilina entre uma corrida e outra, o que impossibilitou os cálculos dos parâmetros cromatográficos da N,N-dimetilanilina.

Esses resultados também sugerem que o número de silanóis totais ou o número de silanóis isolados mais ácidos na superfície da sílica aumentaram e a quantidade de PMOS inicial ainda não foi suficiente (nesse tempo de repouso da FE) para recobrir todos os silanóis, havendo forte interação com o composto básico N,N-dimetilanilina.

4.8.3 – Fases estacionárias preparadas com 55 % PMOS inicial

Nesta etapa, resolveu-se aumentar a % PMOS inicial para 55 % (poros cheios mais 10 % de excesso) com a sílica Kromasil pré-tratada com H_2O / 24 h, HNO_3 2,0 mol L^{-1} por 15 h e NH_4OH 0,01 mol L^{-1} por 4 e 8 h. Os resultados cromatográficos estão mostrados na Tabela 27 e na Figura 47.

Tabela 27: Resultados cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 obtidos das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com H_2O / 24 h, HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h, NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h e NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 8 h. As condições de preparo das FE foram 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metano / água 60:40 (sílica sem pré-tratamento) e 70:30 v/v (sílicas pré-tratadas), F: 0,3 mL min^{-1} .

Ensaio	N/m ^a		As ^a		k ^a		Rs ^b		N/m ^c		As ^c	
Sem Pré-tratamento	73500	52400	1,1	0,8	6,0	6,4	4,8	4,1	50500	70000	1,5	0,9
H_2O / 24 h	75700		0,9		2,1		2,4		57900		1,2	
HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h	60900	70200	1,0	0,8	2,2	2,3	2,2	2,4	52700	62300	1,1	1,1
NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h	65100	64300	1,0	1,1	2,6	2,6	2,4	2,3	61900	55900	1,2	1,3
NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 8 h	50300	70000	0,7	0,9	2,0	1,9	1,9	2,2	47900	60050	0,8	1,1

^a Calculado para o naftaleno

^b Entre o naftaleno e tolueno

^c Calculado para a N,N-dimetilanilina

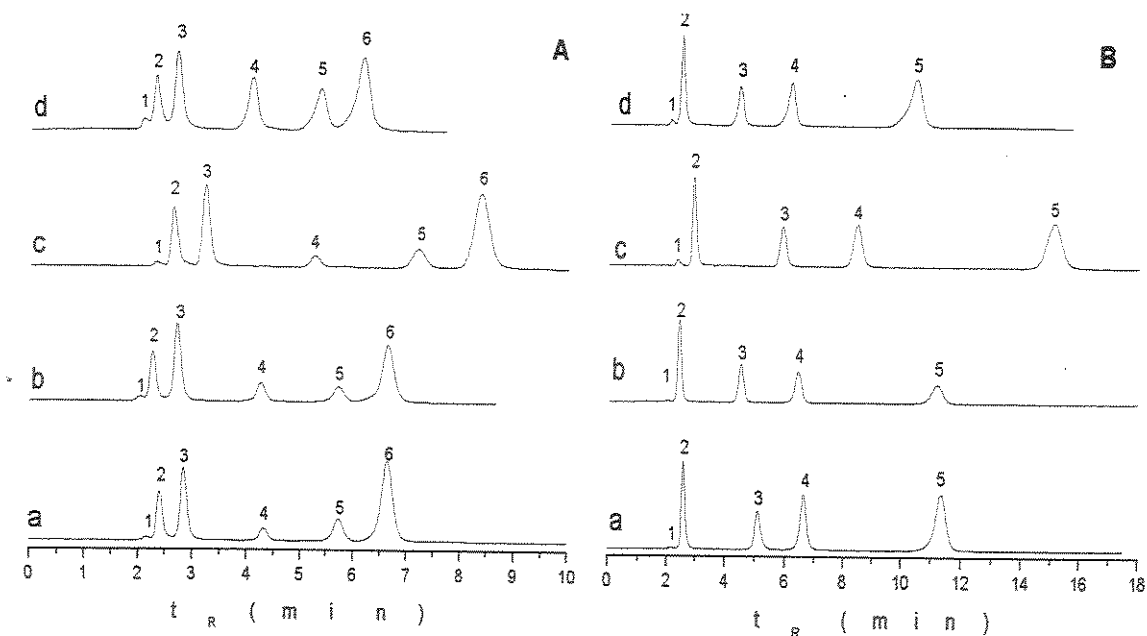


Figura 47: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratada com: a: H_2O / 24 h, b: HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h e c: NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h e d: NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 8 h. As condições de preparo das FE foram: 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min^{-1} . MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Analisando os resultados da Tabela 27, vê-se que as FE preparadas aumentando-se a % PMOS inicial para 55 % obtiveram bons resultados cromatográficos com boa separação entre os componentes das misturas testes, altas eficiências para o naftaleno e a N,N-dimetilanilina e picos simétricos, semelhante às FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento. Esses resultados mostram que o fator % PMOS inicial é extremamente significativo na preparação das FE e a monocamada de polímero deve ser a mais completa possível para cobrir todos os silanóis da superfície da sílica.

4.8.4 – Caracterização física e química das fases estacionárias preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratadas com água, ácido ou base

Foram feitas somente as caracterizações físicas e químicas das FE preparadas com 55 % PMOS inicial, que obtiveram os melhores resultados cromatográficos.

As % C das FE após a etapa de extração, a % de perda massa por TGA das FE após a etapa de extração e os cálculos da massa específica de PMOS retido sobre a sílica, $\bar{m}_{\text{PMOSretido}}$, a % PMOS retido e a espessura da camada de polímero formada nas paredes dos poros das sílicas, τ , das FE preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratadas com água, HNO_3 ou NH_4OH podem ser vistos na Tabela 28. Os resultados calculados foram obtidos a partir das Equações mostradas no item 3.4.

Tabela 28: % C, quantidade de PMOS retido, espessura da camada e % perda massa obtida por TGA das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com água, ácido e base com 55 % PMOS inicial.

Amostras Kromasil	% C	$\bar{m}_{\text{PMOS}}$ (g _{PMOS} /g _{sil})	$\bar{m}_{\text{PMOSretido}}$ (g _{PMOS} /g _{sil})	% PMOS retido	τ nm	% perda massa (TGA)
Sem pré-tratamento						
55 %, 120 ° C / 16 h	11,3	1,22	0,22	18,0	0,82	14,1
55 %, 140 ° C / 16 h	11,7	1,22	0,23	18,8	0,87	13,8
Pré-tratada						
Kromasil / H ₂ O	10,7	1,22	0,21	17,2	0,77	12,9
Kromasil / HNO ₃	12,0	1,22	0,23	19,6	0,91	13,8
Kromasil / NH ₄ OH	9,1	1,22	0,17	13,9	0,61	12,7

Pelos dados da Tabela 28 observa-se que a % C e a % perda massa por TGA das FE preparadas com as sílicas pré-tratadas com H₂O e HNO₃ (com 55 %

PMOS inicial) são semelhantes às FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento. Para a FE preparada com a sílica pré-tratada com NH_4OH (com 55 % PMOS inicial) esses valores foram um pouco menores do que para a FE preparada com a sílica sem pré-tratamento, mas cromatograficamente elas obtiveram resultados semelhantes, mostrando que até o valor de 9,0 % C ainda se produz FE com bons desempenhos cromatográficos.

A caracterização por espectroscopia no IR das FE preparadas com o PMOS sorvido e imobilizado sobre a sílica Kromasil pré-tratada com H_2O / 24 h, HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h ou NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h está mostrado na Figura 48. Caracterizaram-se também somente as FE preparadas com 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h, que foram as que obtiveram os melhores desempenhos cromatográficos.

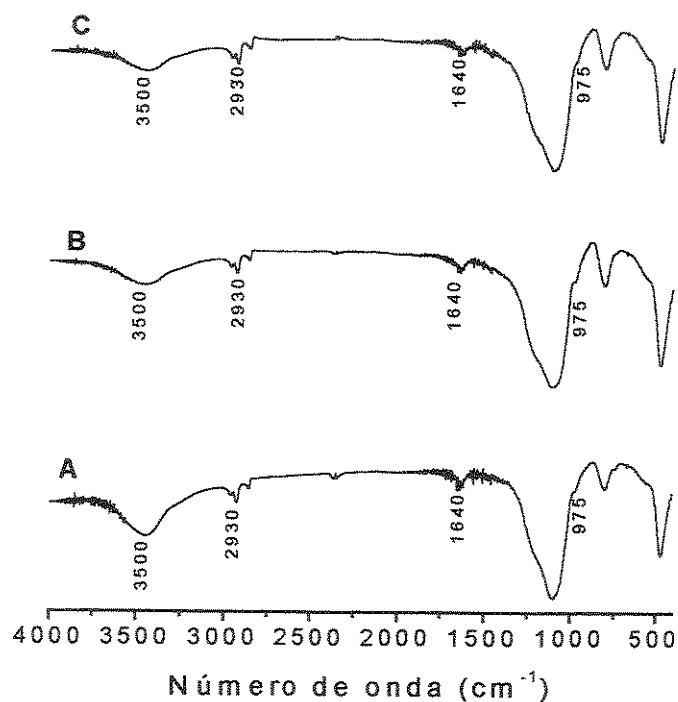


Figura 48: Caracterização por IR das FE preparadas com 55 % inicial, 120 °C / 16 h sobre a sílica Kromasil pré-tratada com A) H_2O / 24 h, B) HNO_3 2,0 mol L^{-1} / 15 h e C) NH_4OH 0,01 mol L^{-1} / 4 h.

Observando a Figura 48, vê-se que os picos em torno de 2930 cm^{-1} referente ao PMOS dentro dos poros da sílica estão acentuados e a banda em 975 cm^{-1} referente aos grupos silanóis isolados da superfície da sílica é menor nas FE preparadas com a sílica pré-tratada com H_2O / 24 h e NH_4OH do que no espectro da FE preparada com a sílica pré-tratada com HNO_3 . Mas, cromatograficamente, todas as FE obtiveram resultados semelhantes, mostrando que o aspecto visível relacionado ao tamanho das bandas no IR não são indicativos de maior ou menor quantidade de silanóis expostos nas FE.

O aparecimento das bandas em torno de 3500 e 1640 cm^{-1} , referentes à água adsorvida na superfície da sílica (água adsorvida nos silanóis), confirmam que ainda existem sítios adsorventes expostos na superfície das sílicas, que não foram cobertos pelo PMOS, em todas as FE.

4.9 - Otimização das condições de pré-tratamento da sílica Kromasil com HNO_3 , variando a concentração do ácido e o tempo de reação.

4.9.1 –Planejamento fatorial

Nesta etapa optamos por fazer mais testes com pré-tratamentos hidrotérmico com ácido nítrico na sílica Kromasil, variando a concentração do ácido e o tempo de reação. O objetivo desse estudo foi verificar se o pré-tratamento a baixas concentrações do ácido melhoram a performance cromatográfica das FE, já que nos trabalhos mostrados na literatura os pré-tratamentos foram feitos com ácido concentrado [12-15]. O inconveniente de se trabalhar com ácido muito concentrado diariamente no laboratório, especialmente o ácido nítrico, é devido a sua volatilidade, que pode prejudicar a saúde das pessoas e danificar equipamentos, mesmo com o procedimento sendo feito na capela.

Para este novo estudo então, utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 com ponto central, pois é possível varrer três níveis de cada fator e não apenas dois e também ajustar uma superfície de resposta em torno das condições de pré-

tratamento da sílica e verificar se há ou não falta de ajuste para um modelo linear, o que seria impossível se os fatores estivessem em apenas dois níveis [83]. Os fatores e os níveis do planejamento fatorial estão mostrados na Tabela 29. Na Tabela 30 estão mostrados os ensaios do planejamento fatorial e as respectivas respostas cromatográficas calculadas a partir das MT1 e MT2. A Figura 49 apresenta os cromatogramas das MT1 e MT2.

Tabela 29: Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2 com ponto central.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
X_1 : $[H^+]$ (mol L ⁻¹)	0,10	1,0	2,0
X_2 : Tempo (h)	5	10	15

Tabela 30: Parâmetros cromatográficos calculados para a MT1 e MT2 nas FE preparadas pelo planejamento fatorial 2^2 com ponto central. Condições de preparo da FE: 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metano / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹.

Ensaio	X_1	X_2	N/m ^a		As ^a		k ^a		Rs ^b		N/m ^c		As ^c	
1	-1	-1	54700		1,1		1,9		1,5		54400		2,2	
2	+1	-1	48200	62800	0,7	1,2	1,9	1,9	1,0	1,4	49100	53500	1,8	2,1
3	-1	+1	55100	57300	1,7	1,6	1,2	1,2	1,7	1,7	47100	47700	1,6	1,7
4	+1	+1	60900	70200	1,0	0,8	2,2	2,3	2,2	2,4	52700	62300	1,1	1,1
5	0	0	62000	57000	1,2	1,5	1,6	1,6	1,7	1,6	51800	49900	1,8	1,8
6	0	0	55000		1,3		1,6		1,4		54600		1,8	
7	0	0	44900	58100	1,7	1,5	1,6	1,6	1,9	1,6	39700	55000	1,6	1,8

^a Calculado para o naftaleno

^b Entre o naftaleno e tolueno

^c Calculado para a N,N-dimetilanilina

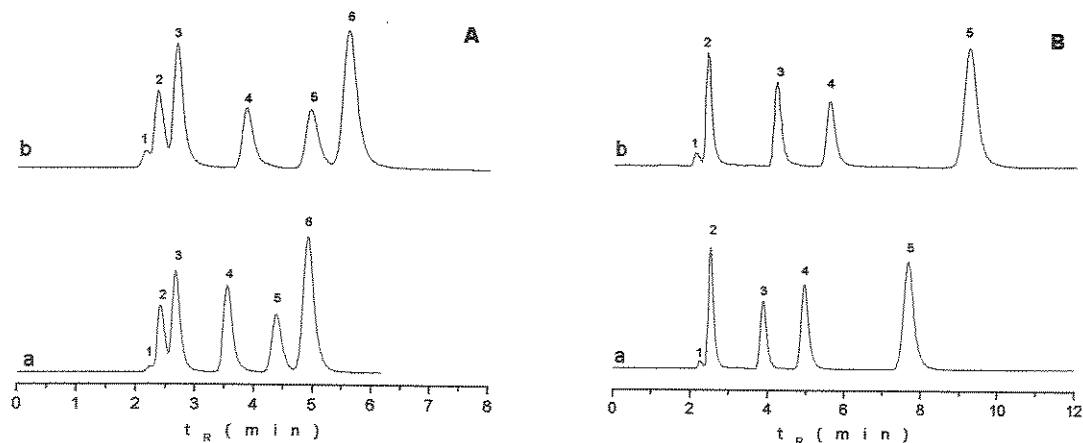


Figura 49: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com HNO_3 . Os cromatogramas a e b correspondem aos ensaios número 3 e 7, respectivamente, do planejamento fatorial 2^2 com ponto central. As condições de preparo das FE foram: 55 % PMOS inicial, 120°C / 16 h e as condições cromatográficas foram: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3\text{ mL min}^{-1}$. MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Com a ajuda do Software Statistica, a partir dos resultados de eficiência do naftaleno obtidos pelos ensaios do planejamento fatorial 2^2 com ponto central, foi possível ajustar um modelo linear.

$$Y = 56700 + 3200 X_1 + 3500 X_2$$

$$(\pm 2000) (\pm 2600) (\pm 2600)$$

F tabelado: $F_{2/7} = 4,74$

F calculado: $MQ_{\text{faj}}/MQ_{\text{ep}} = 0,464$

Pelo teste F, no nível de 95 % de confiança, $0,464 < 4,74$, portanto o modelo não apresenta falta de ajuste e explica 64,7 % da variação em torno da

média [83]. A superfície de resposta para o modelo ajustado está mostrado na Figura 50.

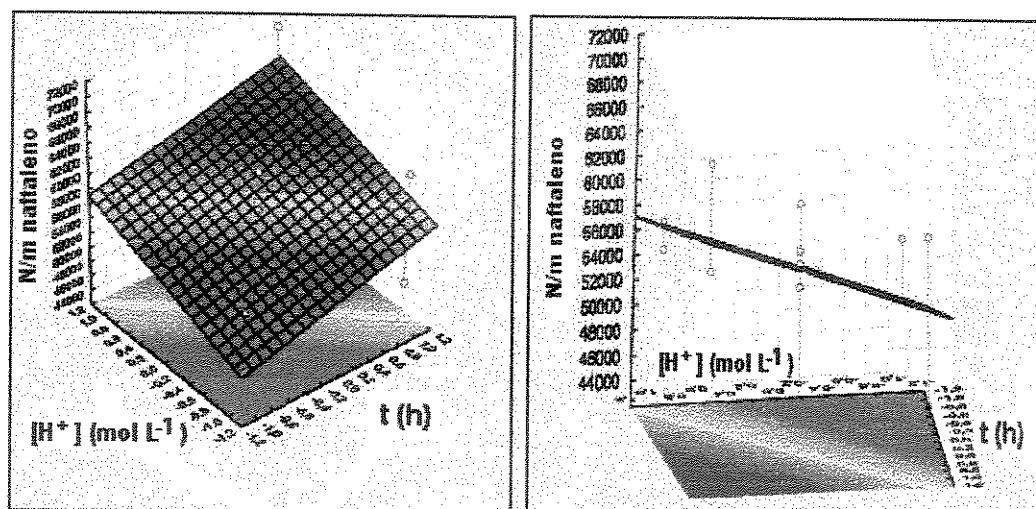


Figura 50: Superfície de resposta do planejamento fatorial 2^2 com ponto central, construída a partir dos dados de eficiência do naftaleno. Os gráficos são os mesmos, apenas vistos de ângulos diferentes.

O que se observa através dos cálculos estatísticos é que o erro dos parâmetros da reta é muito grande. A partir desse resultado é possível tirar algumas conclusões: nenhum dos fatores, a concentração do ácido (X_1) e o tempo de reação (X_2) são significativos nesse intervalo, ou seja, a variação na resposta de eficiência para o naftaleno, observada pela inclinação da reta no gráfico B da Figura 50, não indica uma tendência em direção ao ponto ótimo, devido a grande dispersão dos resultados.

Como o modelo não tem falta de ajuste, todo esse erro é atribuído ao experimento. Para interpretar esse resultado, é preciso observar que o desempenho cromatográfico das FE preparadas com as sílicas pré-tratadas com HNO_3 em diferentes concentrações e tempos de reação foram, em média, piores do que com as FE preparadas sem pré-tratamentos, nas mesmas condições (55 % de carga inicial de PMOS, 120 °C / 16 h), com perda de eficiência para o

naftaleno e a N,N-dimetilanilina e aumento da assimetria de pico do composto básico N,N-dimetilanilina, provavelmente devido ao aumento na quantidade dos silanóis isolados mais ácidos na superfície das sílicas pré-tratadas, como também foram mostrados pelo resultados de CP / MAS ^{29}Si NMR (Tabela 24).

Portanto, o que concluímos a partir desses resultados é a possibilidade de FE preparadas com sílicas com a superfície mais ácida gerarem maior erro experimental que FE preparadas com sílicas menos ácidas, ou seja, há maior repetitividade no enchimento de colunas preparadas com sílicas menos ácidas.

4.9.2 – Caracterização das fases estacionárias preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com HNO_3 em diferentes concentrações e tempos de reação

A % C, a % de perda massa por TGA e o cálculos da massa específica de PMOS retido sobre a sílica, $\overline{m}_{\text{PMOSretido}}$, a % PMOS retido e a espessura da camada de polímero formada nas paredes dos poros das sílicas, τ , das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada HNO_3 em diferentes concentrações e tempos de reação estão mostrados na Tabela 31. Os resultados calculados foram obtidos a partir das Equações mostradas no item 3.4.

Tabela 31: % C, % perda massa obtida por TGA, quantidade de PMOS retido e espessura da camada polimérica de algumas FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com ácido.

Amostras	% C	$\bar{m}$ iPMOS (g _{PMOS} /g _{sil})	$\bar{m}$ PMOSretido (g _{PMOS} /g _{sil})	% PMOS retido	τ nm	% perda massa (TGA)
Sem pré-tratamento						
55 %, 120 ° C / 16 h	11,3	1,22	0,22	18,0	0,82	14,1
55 %, 140 ° C / 16 h	11,7	1,22	0,23	18,8	0,87	13,8
Planej. fat. com ponto central						
Ensaio 2	9,7	1,22	0,18	14,7	0,68	14,4
Ensaio 3	7,8	1,22	0,14	11,5	0,52	Nd
Ensaio 4	12,0	1,22	0,24	19,6	0,91	13,8
Ensaio 8	11,6	1,22	0,21	18,8	0,86	Nd

Nd = não determinado

Os dados da Tabela 31 mostram que as % C para as FE preparadas pelos ensaios nº 2, 3, 4 e 8 do planejamento fatorial 2² com ponto central estão semelhantes àsquelas obtidas para as FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento ou pré-tratadas com água ou base (Tabela 28). Somente para a FE preparada pelo ensaio nº 3 o valor de % C está abaixo daquelas FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento, mas cromatograficamente, a assimetria do pico da N,N-dimetilanilina para este ensaio foi menor do que para a maioria dos outros ensaios que obtiveram maior % C na FE.

Como as % C das FE preparadas pelos ensaios do planejamento fatorial 2² com ponto central são semelhantes às FE preparadas com a sílica Kromasil sem pré-tratamento, a explicação para a piora no desempenho cromatográfico das FE também pode ser devido ao aumento no número de silanóis isolados mais ácidos da superfície da sílica (obtida por CP / MAS ²⁹Si NMR) que interagiram mais fortemente com os componentes das misturas testes. Além disso, não é

descartada a hipótese de um aumento no número total dos silanóis da superfície das sílicas, após os pré-tratamentos, cuja quantidade de polímero deixou com que mais silanóis ficassem expostos.

Os espectros no Infravermelho de algumas das FE preparadas pelos ensaios do planejamento fatorial 2^2 com ponto central estão mostrados na Figura 51. Também observa-se as bandas em torno de 2930 cm^{-1} referente ao PMOS dentro dos poros da sílica. As bandas em 975 cm^{-1} referente aos grupos silanóis isolados da superfície da sílica e as bandas em torno de 3500 e 1640 cm^{-1} , referentes à água adsorvida na superfície da sílica, indicam que ainda existem sítios ativos na superfície das sílicas que não foram cobertos pelo PMOS.

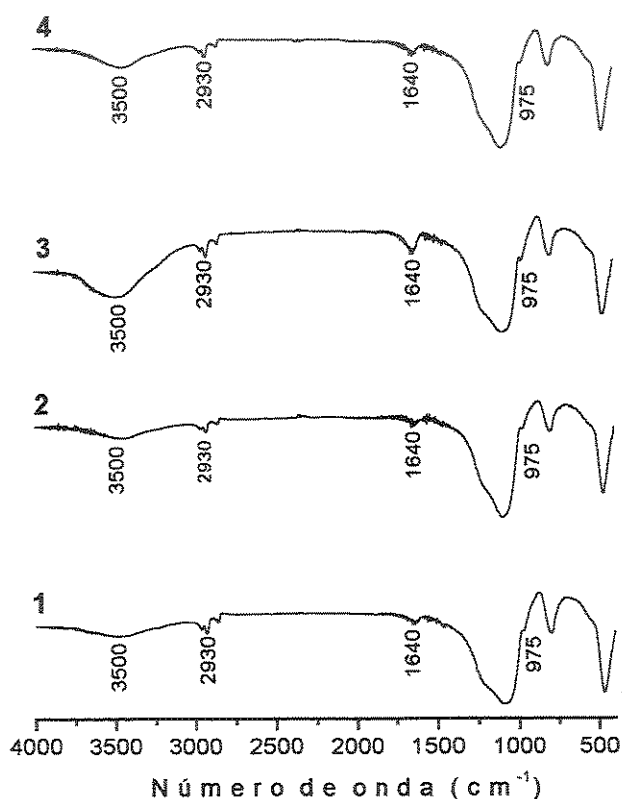


Figura 51: Caracterização por IR das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com HNO_3 em diferentes concentrações de tempos de reação. O número no espectro corresponde ao número do ensaio do planejamento fatorial 2^2 com ponto central.

4.10 – Preparo de fases estacionárias com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento ácido

4.10.1 – Planejamento fatorial

Este estudo foi feito com as sílicas Kromasil pré-tratadas com aquecimento a temperaturas entre 300 e 350 °C para desidroxilar a superfície da sílica e em seguida pré-tratadas hidrotermicamente em solução de ácido nítrico para reidroxilar a superfície das sílicas. Para a otimização das condições desse pré-tratamento foi usado um planejamento fatorial saturado, porque são muitas variáveis a serem estudadas e este planejamento permite até sete variáveis com o mínimo de oito experimentos [83]. A % PMOS inicial foi fixada em 55 %. A Tabela 32 mostra os fatores a serem estudados e os níveis escolhidos e a Tabela 33 apresenta os ensaios do planejamento fatorial saturado. A Tabela 34 apresenta os resultados cromatográficos com as MT1 e MT2 e os cromatogramas estão apresentados na Figura 52.

Tabela 32: Níveis do planejamento fatorial saturado com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de lavagem ácida.

Fatores	Níveis	
	(-)	(+)
(1) Temperatura de aquecimento (°C)	300	350
(2) Tempo de aquecimento (h)	5	10
(3) [H ⁺] (mol/L)	0,01	0,10
(4) Tempo de reação com o H ⁺ (h)	4	8
(5) Temperatura de imobilização térmica (°C)	120	140
(6) Tempo de imobilização térmica (h)	16	20

Tabela 33: Ensaios do planejamento fatorial saturado.

Fatores Ensaio	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	-	-	+
3	-	+	-	-	+	-
4	+	+	-	+	-	-
5	-	-	+	+	-	-
6	+	-	+	-	+	-
7	-	+	+	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+

Tabela 34: Parâmetros cromatográficos calculados para a separação da MT1 e MT2 com alguns ensaios do planejamento fatorial saturado. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹.

Ensaio	N/m ^a		As ^a		k ^a		Rs ^b		N/m ^c		As ^c	
D	77500	67400	0,9	1,0	2,3	2,1	2,5	2,2	66200	57600	1,0	1,2
E	53400	51400	1,7	1,5	4,9	4,9	1,7	1,6	45800	44200	1,7	1,6
2	77000	71300	1,0	1,1	1,6	1,6	4,8	4,6	68000	62700	1,2	1,2
6	74200		0,9		2,7		6,1		69700		1,0	1,0
7	74100	56100	1,0	0,9	2,2	1,9	5,5	4,7	65900	57220	1,0	1,0
8	48700	69300	0,9	0,9	2,2	2,3	4,7	5,5	48400	63500	1,0	1,0

^a Calculado para o naftaleno^b Entre o naftaleno e tolueno^c Calculado para a N,N-dimetilanilina

D: FE preparadas com a sílica Kromasil sem pré-tratamento, nas condições de 55 % PMOS inicial, 140 °C / 16 h.

E: FE preparadas com a sílica Kromasil sem pré-tratamento, nas condições de 55 % PMOS inicial, 140 °C / 20 h.

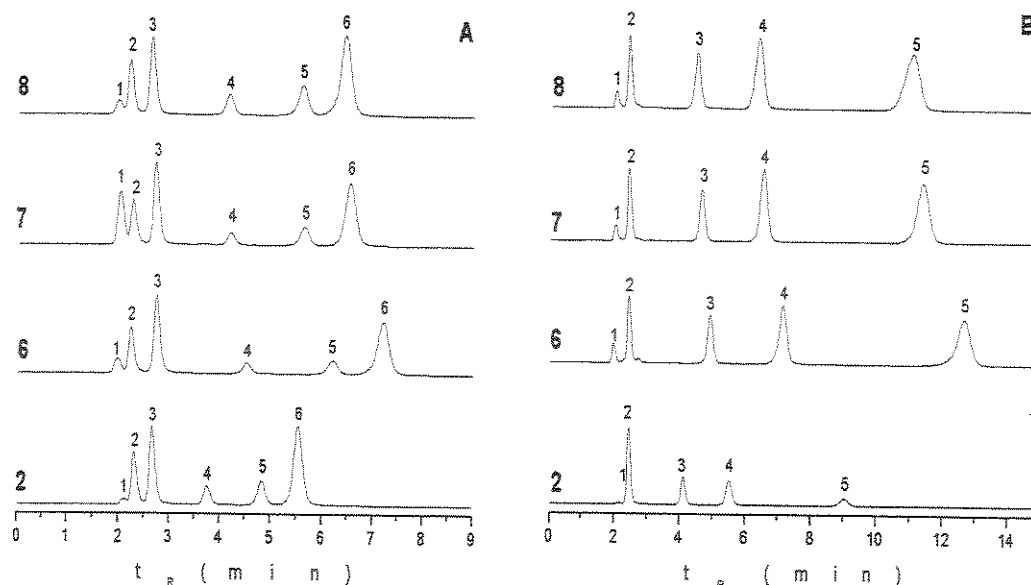


Figura 52: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas pelos ensaios do planejamento fatorial saturado. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Foram realizadas somente alguns dos ensaios do planejamento fatorial saturado, que estão apresentados na Tabela 34. Aplicando um teste F para comparar as médias das eficiências para o naftaleno entre os diferentes ensaios, F calculado = -0,86 e $F_{4,4}$ tabelado = 6,39. Como $-0,86 < 6,39$ rejeita-se a hipótese de que as médias sejam diferentes, ou seja, os diferentes tratamentos não produziram resultados diferentes entre si e diferentes da sílica sem pré-tratamento (condições de preparo: 55 % PMOS inicial, 140 °C / 16 h). As eficiências tanto para o naftaleno como para a N,N-dimetilanilina foram altas e as assimetrias dos picos desses compostos foram excelentes, ao redor de 1,0, concluindo que a sílica Kromasil já é de alta pureza e possui sua superfície completamente hidroxilada, resultando em FE com bons desempenhos cromatográficos.

Sendo que um dos fatores estudados foi o tempo de imobilização térmica (16 e 20 h), a Tabela 34 também inclui resultados com uma FE preparada com

sílica sem pré-tratamento, nas condições de 55 % PMOS inicial, 120 °C / 20 h. Este resultado sugere que o ponto ótimo para as condições de imobilização das FE com a sílica sem pré-tratamento está sendo ultrapassado, porque houve uma piora no desempenho cromatográfico dessa FE em relação à FE com 16 h de imobilização térmica.

As FE preparadas pelo ensaio nº 2 do planejamento fatorial saturado (Tabela 33), cujas condições de preparo são 55 % PMOS inicial, 120 °C / 20 h, com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento ácido, obtiveram excelentes desempenhos cromatográficos, sugerindo que o procedimento de desidroxilação e reidroxilação da superfície da sílica antes do preparo das FE aumenta o ponto ótimo das condições de preparo das FE, fazendo com que as FE tenham maior probabilidade de serem recheadas com sucesso (Figura 53).

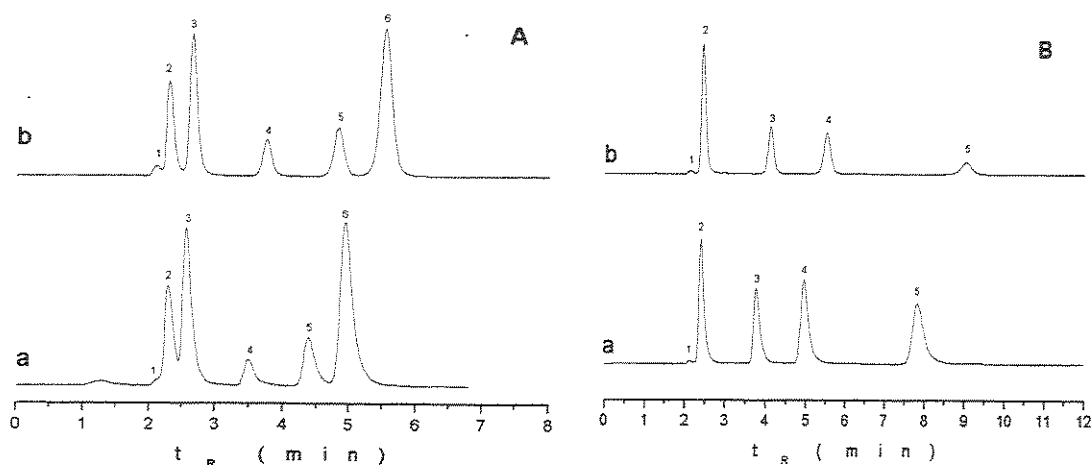


Figura 53: Cromatogramas das MT1 (A) MT2 (B) com as FE preparadas com as FE preparadas com 55 % PMOS inicial, 120 °C/ 20 h com a sílica sem pré-tratamento (a) e a sílica pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento hidrotérmico (ensaio nº 2 do planejamento fatorial saturado) (b). Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT1 (A): (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno e MT2 (B): (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.10.2 – Caracterização por CP / MAS ^{29}Si NMR das sílicas Kromasil pré-tratadas com aquecimento seguido de tratamento com HNO_3

Para avaliar a acidez da superfície das sílicas Kromasil pré-tratadas com aquecimento a altas temperaturas seguido de tratamento hidrotérmico ácido foram obtidos os espectros de CP / MAS ^{29}Si NMR dessas sílicas, que foram deconvoluídos para se obter os valores das áreas dos picos e calcular a quantidade relativa desses sítios mais ácidos na superfície das sílicas em relação a sílica sem pré-tratamento. O resultado da quantidade relativa dos silanóis presentes na superfície das sílicas sem pré-tratamento e pré-tratadas está mostrado na Tabela 35. Os números na Tabela 35 são os ensaios do planejamento fatorial saturado (Tabela 33) em que foram feitos somente alguns experimentos. A Figura 54 mostra um dos espectros de CP-MAS ^{29}Si NMR da sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento hidrotérmico ácido (ensaio nº 6 do planejamento fatorial saturado) (Tabela 33).

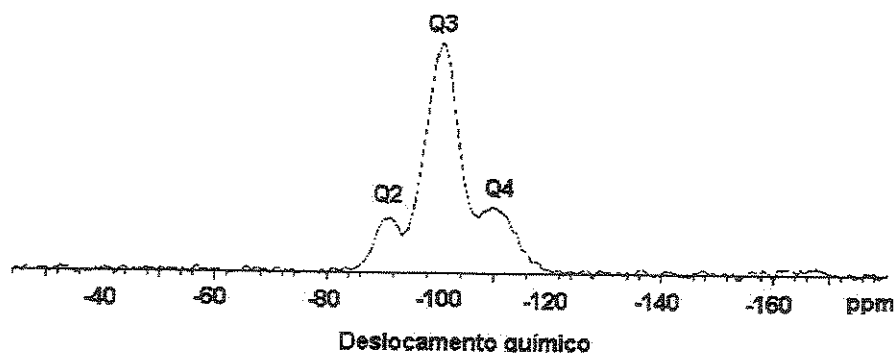


Figura 54: CP / MAS ^{29}Si NMR da sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento hidrotérmico ácido (ensaio número 6 do planejamento fatorial saturado).

Tabela 35: Quantidades relativas dos grupos silanóis em relação aos grupos siloxano da superfície da sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada com aquecimento a altas temperaturas seguido de tratamento hidrotérmico ácido.

Ensaio do planejamento fatorial saturado	Q2 / Q4 (silanóis geminais)	Q3 / Q4 (silanóis isolados)
Sem pré-tratamento	0,07	1,5
6	0,39	5,6
7	0,21	3,3

Pelos resultados da Tabela 35 observa-se um aumento na quantidade relativa dos grupos silanóis geminais e principalmente dos grupos silanóis isolados (ou vicinais) na superfície das sílicas pré-tratadas em relação à sílica Kromasil sem pré-tratamento.

É importante ressaltar que os sítios Q3 correspondem aos grupos silanóis isolados e também aos grupos silanóis vicinais ou ligados por ligação de hidrogênio, então o aumento na quantidade relativa desse sítio pode corresponder ao aumento no número de silanóis vicinais, o que explicaria o motivo pelo qual as FE preparadas com as sílicas pré-tratadas com aquecimento seguido de tratamento ácido terem obtido excelentes resultados cromatográficos, semelhantes às FE preparadas com a sílica sem o pré-tratamento, além de ter o ponto ótimo aumentado e uma conseqüente melhora na repetitividade no preparo das FE.

Até o momento, em nenhuma etapa das discussões dos resultados falou-se sobre a distribuição do polímero sobre a sílica, pois nenhuma técnica física disponível para o trabalho consegue avaliar esse parâmetro. Com o aumento no número de silanóis ligados por ligação de hidrogênio há uma maior homogeneidade ou uniformidade na superfície sílica, tanto em termos de configuração espacial dos grupos silanóis, como de reatividade [7]. Essa maior homogeneidade da superfície da sílica pode contribuir para uma distribuição mais

homogênea do polímero sobre a sílica, o que leva a formação de um leito cromatográfico mais homogêneo após o enchimento das colunas, possibilitando uma eficiente transferência de massa entre o analito a FM e a FE.

4.10.3 – Caracterização física e química das fases estacionárias preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento com HNO_3

A % C, a % perda massa por TGA e o cálculos da massa específica de PMOS retido sobre a sílica, $\overline{m}_{\text{PMOSretido}}$, a porcentagem de PMOS retido e a espessura da camada de polímero formada nas paredes dos poros das sílicas, τ , das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento hidrotérmico ácido estão mostrados na Tabela 36. Os resultados calculados foram obtidos a partir das Equações mostradas no item 3.4.

Tabela 36: % C, quantidade de PMOS retido, espessura da camada e % perda massa obtida por TGA de algumas FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento com HNO_3 .

Amostras – Kromasil	% C	$\overline{m}_{\text{PMOS}}$ (gPMOS/gsil)	$\overline{m}_{\text{PMOSretido}}$ (gPMOS/gsil)	% PMOS retido	τ nm	% perda massa (TGA)
Sem pré-tratamento						
55 %, 120 ° C / 16 h	11,3	1,22	0,22	18,0	0,82	14,1
55 %, 140 ° C / 16 h	11,7	1,22	0,23	18,8	0,87	13,8
55 %, 120 ° C / 20 h	8,2	1,22	0,15	12,3	0,55	11,1
Planej. fat. saturado						
Ensaio 2	9,2	1,22	0,17	13,9	0,62	11,3
Ensaio 6	13,8	1,22	0,29	23,8	1,10	16,2
Ensaio 7	11,7	1,22	0,23	18,8	0,87	14,5
Ensaio 8	12,7	1,22	0,26	21,3	0,97	Nd

Os dados da Tabela 35 mostram que as FE preparadas pelos ensaios 6, 7 e 8 do planejamento fatorial saturado obtiveram % C igual ou maior que as FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento, confirmado pelos dados de % perda massa por TGA. O ensaio nº 2 obteve % C e % perda massa menor que os outros ensaios do planejamento, mas ainda em torno de 9,0, valor que ainda se produz FE com bons desempenhos cromatográficos.

A Tabela 36 também mostra as % carbono das FE preparadas com 55 % PMOS inicial, aquecida a 120 °C por 16 e 20 h com a sílica Kromasil sem pré-tratamento. Comparando o resultado do tratamento à 120 °C / 20 h com a FE preparada pelo ensaio nº 2 do planejamento fatorial saturado, vê-se que, para esta última FE a % C foi um pouco maior, suficiente para um bom desempenho cromatográfico, enquanto que o valor em torno de 8,0 % de C para a primeira FE não foi suficiente.

A Figura 55 mostra o espectro de CP / MAS ^{29}Si NMR da FE preparada de acordo com o ensaio nº 6 do planejamento fatorial saturado, o qual obteve a maior cobertura pelo polímero. O espectro apresenta os sinais característicos da sílica pura em -92 ppm (Q2 = silanóis geminais), -100 ppm (Q3 = silanóis isolados ou vicinais) e -110 ppm (Q4 = ligações siloxano) e o grupo de sinais Dⁿ, que é a sobreposição de vários sinais atribuídos ao PMOS imobilizado (sorvido e quimicamente ligado) sobre a sílica.

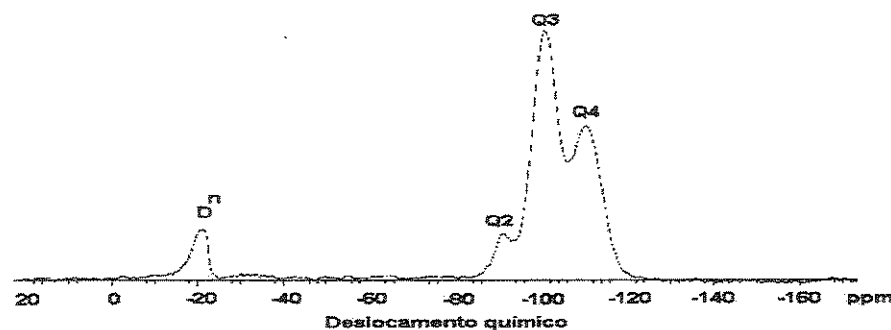


Figura 55: A) Espectros de CP / MAS ^{29}Si NMR da FE preparada com a sílica Kromasil pré-tratada com aquecimento seguido de tratamento hidrotérmico ácido (ensaio nº 6 do planejamento fatorial saturado).

4.11 – Relação entre a espessura da camada de polímero e o comportamento cromatográfico das fases estacionárias medida com as MT1 e MT2

Os dados a seguir reúnem alguns resultados novos com alguns já apresentados, com o intuito de visualizar que, através do comportamento cromatográfico das MT1 e MT2, é possível identificar a espessura da camada polimérica formada na FE, se há falta ou excesso de polímero ou se formou uma monocamada polimérica próxima do ideal, na qual tenha baixa atividade de silanóis residuais e que permite uma boa transferência de massa entre o analito, a FM e a FE, sem a necessidade de análises químicas ou físicas das FE.

A Tabela 37 mostra as % PMOS iniciais para as FE preparadas com a sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada com água, ácido, base e aquecimento (Δ) seguido de tratamento ácido.

Tabela 37: % PMOS inicial para o preparo de FE com a sílica Kromasil sem pré-tratamento e pré-tratada.

Sílica Kromasil	% PMOS inicial				
Sem pré-tratamento	35	44		55	
Pré-tratada – HNO ₃		44	50	55	
Pré-tratada – NH ₄ OH		44		55	
Pré-tratada – H ₂ O		44	50	55	
Pré-tratada – Δ - HNO ₃				55	60

Inicialmente, testou-se 35 % e 44 % de PMOS inicial com a sílica sem pré-tratamento (ensaios nº 1 e 8, respectivamente, do planejamento fatorial 2³ para otimização das condições de preparo das FE com a sílica Kromasil (Tabela 13). A FE preparada com 35 % PMOS inicial não proporcionou uma boa separação dos componentes das misturas, resultando em baixa resolução e pouca retenção dos componentes das misturas. Isso indica que houve a formação de uma

monocamada incompleta de PMOS. A FE preparada com 44 % PMOS inicial para a sílica sem pré-tratamento resultou em uma FE com alta eficiência, boa separação, resolução e aumento no tempo de retenção dos compostos, mostrando que houve uma boa cobertura da sílica pelo PMOS. Assim, testou-se também 44 % para as sílicas pré-tratadas, mas não se obteve bons resultados cromatográficos, com inversão da ordem de eluição do composto básico N,N-dimetilanilina e do naftaleno (MT2), aumento na cauda do pico da N,N-dimetilanilina e a não reprodutibilidade nos tempos de retenção desses compostos. Esse comportamento é devido ao fato de uma grande quantidade de silanóis livres, de caráter mais ácido estarem presentes nessas FE, havendo então uma maior retenção do composto básico, chegando até a eluir depois do naftaleno.

Aumentando-se então, a % PMOS inicial para 50 %, ainda obteve-se FE com comportamento cromatográfico semelhante às FE preparada com 44% PMOS inicial e a sílica pré-tratada, sugerindo que a camada polimérica não foi suficiente para cobrir todos os silanóis, principalmente quando estes têm caráter mais ácidos. 55 % PMOS inicial foi uma quantidade ótima para todas as sílicas (quantidade suficiente para encher os poros da sílica mais um excesso de 10 %), suficiente para formar uma monocamada de PMOS que ofereça boa transferência de massa entre os analitos, a FM e a FE, não deixando silanóis residuais e obtendo altas eficiências, boas resoluções e picos simétricos.

A FE preparada com 60 % PMOS inicial resultou em uma FE com menor eficiência em relação à de 55 % (os resultados cromatográficos não foram apresentados). O próprio aspecto da FE também mudou, apresentando um aglomerado de difícil manipulação como se contivesse apenas polímero. Isso mostrou que essa FE está com excesso de PMOS e isso também não contribui para um bom desempenho cromatográfico das FE preparadas. Neste caso, porém, se a extração dos excessos de PMOS com solventes for suficiente, a FE pode ainda obter um bom desempenho cromatográfico, dependendo também da qualidade do enchimento das colunas. Conclui-se que, 55 % foi a melhor

quantidade de PMOS inicial utilizada no preparo das FE com a sílica Kromasil, independente do pré-tratamento.

Como já foi dito anteriormente, o aspecto dos cromatogramas das MT1 e MT2 também podem identificar problemas de enchimento das colunas cromatográficas. A cauda frontal é uma dessas características, mas perda de eficiência, picos duplos, perda de resolução e a não repetitividade dos parâmetros cromatográficos também podem estar relacionado com o procedimento de enchimento das colunas cromatográficas. Para estes casos, a identificação é difícil e é preciso prestar atenção em todos os detalhes, desde o início do preparo das FE e, se for o caso, tomar providências que possam sanar o problema, como discutido no item 3.10.

A formação da camada polimérica de configuração de uma monocamada ou de bicamada (dependendo da temperatura do tratamento térmico) também pode ser identificada pelo aspecto dos cromatogramas das MT1 e MT2. Os resultados cromatográficos apresentados por Bottoli et al. [35,41,42] sobre a monocamada e a bicamada formadas com o PMOS e o PMODS sorvidos e imobilizados por tratamento térmico nos poros da sílica, seguido de extração do excesso do polímero com solventes, indicaram que a monocamada polimérica resulta em FE com bons desempenhos cromatográficos (boa eficiência, boa forma dos picos e boa separação entre os componentes das misturas e em pouco tempo de corridas) e a bicamada polimérica resulta em cromatogramas com picos alargados e com assimetrias altas, não havendo separação dos compostos, como mostrado nas Figuras 56-58. Resultados de análise elementar de C nessas FE comprovaram que as FE que obtiveram a configuração de uma bicamada de polímero sobre a sílica com o comportamento cromatográfico de alargamento dos picos na FE possuem grande % C (>20 %).

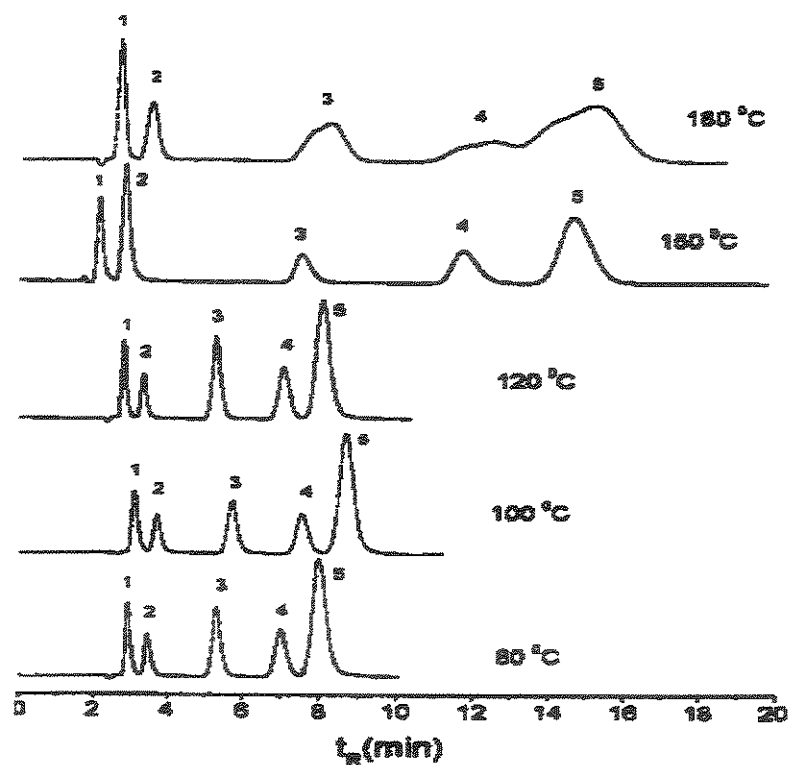


Figura 56: Comportamento cromatográfico da MT1 com FE preparadas com o PMOS sorvido e imobilizado por tratamento térmico por 4 h em diferentes temperaturas nos poros da sílica Davisil (partículas irregulares de 13 μm de tamanho de partículas). MT1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno [42].

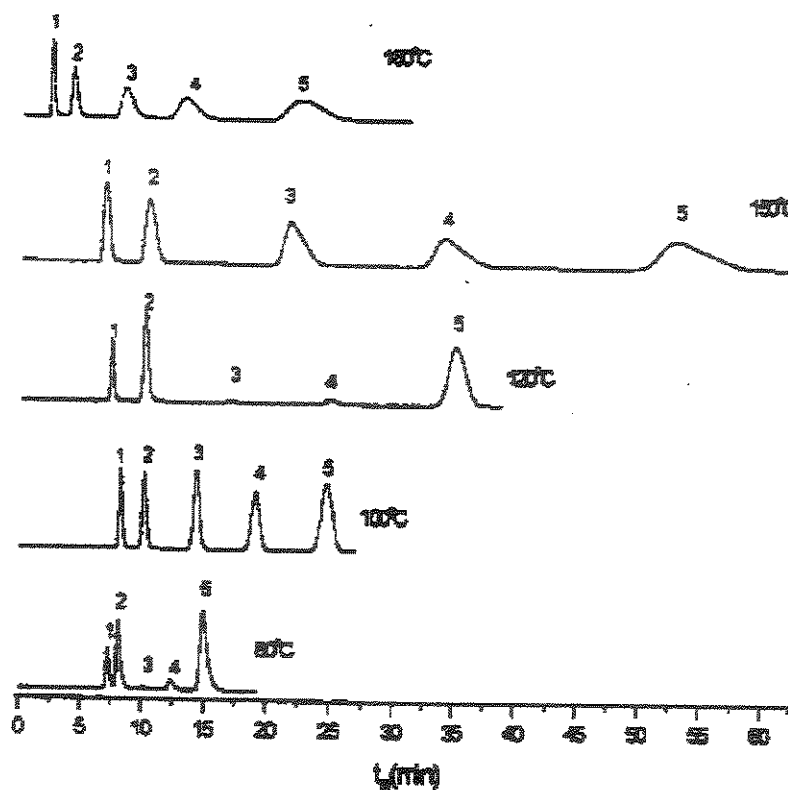


Figura 57: Comportamento cromatográfico da MT1 com FE preparadas com o PMODS (polimetiloctadecilsiloxano, tipo C-18) sorvido e imobilizado por tratamento térmico por 4 h em diferentes temperaturas nos poros da sílica Davisil (partículas irregulares de 13 μm de tamanho de partículas). MT1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno [42].

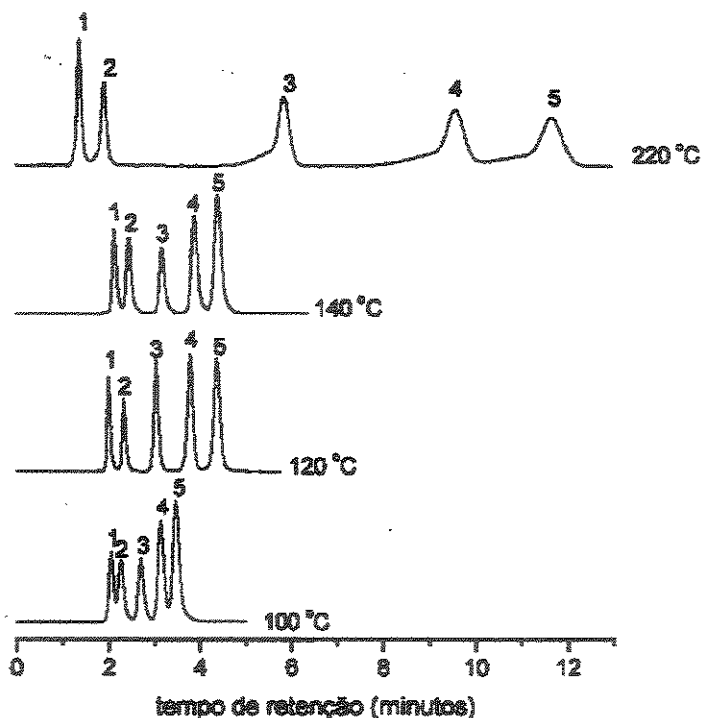


Figura 58: Comportamento cromatográfico da MT1 com FE preparadas com o PMOS sorvido e imobilizado por tratamento térmico por 4 h em diferentes temperaturas nos poros da sílica Kromasil modificada com óxido de titânio. MT1: (1) acetona, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno [53,95].

4.12 – Preparo das fases estacionárias com a sílica Rainin pré-tratada com água, ácido ou base

Nesta etapa do trabalho foram preparadas FE com o PMOS sorvido e imobilizado por tratamento térmico nos poros da sílica Rainin pré-tratada com água, H_2SO_4 , HCl , HNO_3 , H_3PO_4 , NH_4OH , EDTA, 1-metil-piperidina, NaOH e KOH em refluxo a 100 ° C. Com exceção da água, que foi refluxada com a sílica Rainin por 24 h, os demais ácidos e bases foram refluxados com a sílica Rainin numa concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1} / 8 \text{ h}$.

As condições escolhidas para preparar as FE foram 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h após 4 dias de repouso (mesmas condições de preparo da FE do ensaio

nº 5 do planejamento fatorial 2^{4+1} , Tabela 19). Como as tendências observadas a partir dos efeitos calculados dos resultados cromatográficos ou medidas de análises químicas ou físicas do planejamento fatorial 2^{4+1} para a otimização das condições de preparo das FE com a sílica Rainin sem pré-tratamento não foram conclusivas (discussão no item 4.4.3), as condições de preparo das FE com a sílica Rainin pré-tratada foram escolhidas seguindo o mesmo raciocínio obtido, a partir dos resultados com a sílica Kromasil.

Portanto, foi escolhido a quantidade de polímero suficiente para encher os poros da sílica mais um excesso de 10 % (44 % PMOS para a sílica Rainin), os menores tempos de imobilização térmica (8 h) e de repouso da FE após seu preparo (4 dias) e 140 °C como a temperatura de imobilização térmica. Estas são as mesmas condições de preparo da FE do ensaio número 5 do planejamento fatorial 2^{4+1} e que obteve a menor simetria de pico para o composto básico N,N-dimetilanilina (Tabela 20).

Os resultados cromatográficos apresentados serão divididos e discutidos de acordo com as misturas testes padrão usadas, avaliando parâmetros específicos para cada mistura. Com a MT1 foram feitas corridas cromatográficas em duplicatas ou triplicatas com o objetivo de, a partir da média nos valores de eficiência para o naftaleno (composto mais retido na FE), avaliar a repetitividade no enchimento das colunas cromatográficas, pois um mesmo lote de FE foi preparado e uma, duas ou três colunas cromatográficas foram recheadas.

Com a MT2 foram feitas muitas corridas cromatográficas com as várias colunas recheadas e o objetivo foi o de avaliar a repetitividade nos parâmetros cromatográficos entre uma corrida e outra, avaliando a eficiência, a assimetria dos picos e, principalmente, o tempo de retenção dos compostos ácido, básico e neutro. A avaliação do parâmetro de repetitividade entre uma corrida cromatográfica e outra é de extrema importância porque, se eles não se repetirem, não é possível desenvolver métodos analíticos qualitativos e quantitativos para os compostos de interesse em amostras reais utilizando tal coluna, ou seja, a FE não funcionaria em aplicações analíticas.

4.12.1 – Caracterização cromatográfica com a MT1

A seguir estão mostrados os resultados das caracterizações cromatográficas com a mistura teste 1 (MT1), avaliando as FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácido ou base. Além de testar as colunas na separação de compostos neutros, este estudo também teve como objetivo avaliar a repetitividade no enchimento cromatográfico das colunas. Para os ensaios feitos em duplicata, com os valores de eficiência do naftaleno foram calculados as variâncias e as estimativas dos desvios padrão e, em seguida, a variância e a estimativa conjunta do desvio padrão, entre todos os ensaios. A Tabela 38 mostra as diferentes FE e os parâmetros cromatográficos calculados. Os cromatogramas estão apresentados nas Figuras 59-68. Os valores apresentados são as médias entre duas ou três corridas cromatográficas.

Tabela 38: Resultados cromatográficos calculados com a MT1 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H₂O em refluxo por 24 h e ácidos ou bases na concentração de 0,01 mol L⁻¹ por 8 h em refluxo. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹.

Pré-tratamento da sílica Rainin	t _R ^a (min)		N/m ^a		As ^a		k ^a		Rs ^b	
Sem pré-tratam.	6,7	6,4	74500	67300	0,9	1,0	3,1	3,0	2,5	2,2
H ₂ O	7,4		79800		0,9		3,2		2,7	
H ₂ SO ₄	7,4	9,5	77800	57000	1,0	1,2	2,6	3,7	2,6	2,6
HCl	8,7	9,6	79700	72400	0,9	1,1	4,0	3,7	2,9	2,8
HNO ₃	7,8	11,4	64400	74200	1,2	1,4	4,5	6,1	2,4	3,3
H ₃ PO ₄	8,3	8,2	72100	68600	0,7	0,9	3,9	3,4	2,4	2,5
NH ₄ OH	6,8		68400		0,9		1,9		2,3	
EDTA	6,0	7,3	16200	70300	1,4	1,2	2,6	2,8	1,2	2,4
1-metil-piperidina	6,8	6,2	67900	10800	0,8	0,9	2,5	2,1	2,4	0,9
NaOH	9,3		79500		0,7		6,5		3,0	
KOH	7,9	9,3	69300	19100	0,6	1,0	3,4	5,6	2,3	1,4

^a Calculado para o naftaleno

^b Entre o naftaleno e tolueno

Fazendo uma análise geral dos dados da Tabela 38 observa-se que as respostas cromatográficas não diferem muito das obtidas com as FE preparadas com a sílica sem o pré-tratamento (Tabela 20), com variações nos valores de eficiência para o naftaleno entre 60000 e 80000 N/m. As assimetrias nos picos desse composto também são similares, com poucas excessões.

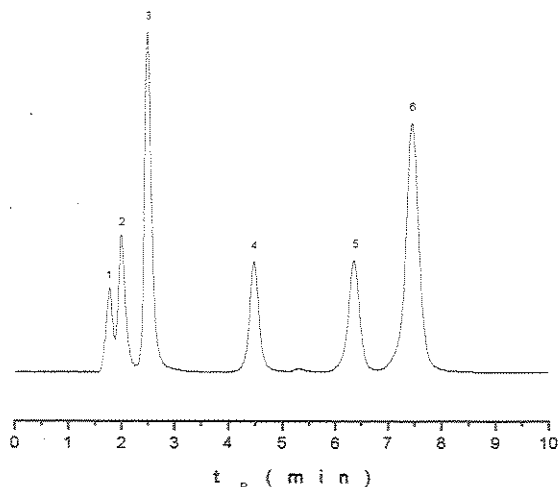


Figura 59: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2O / 24 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3\text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno.

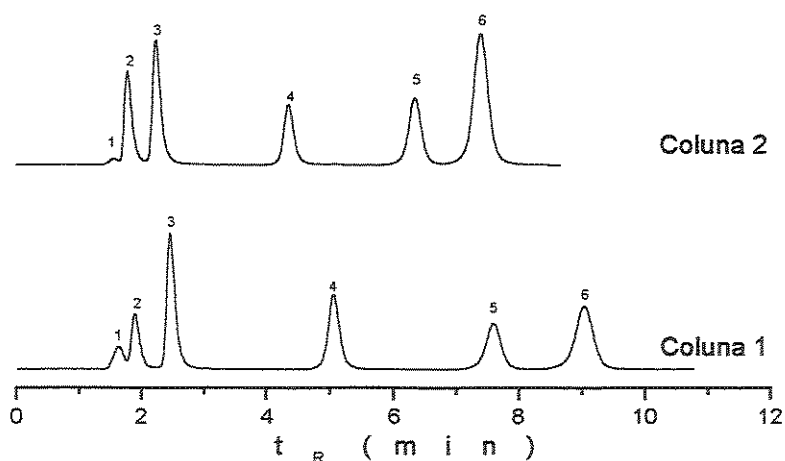


Figura 60: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2SO_4 $0,01\text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3\text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno.

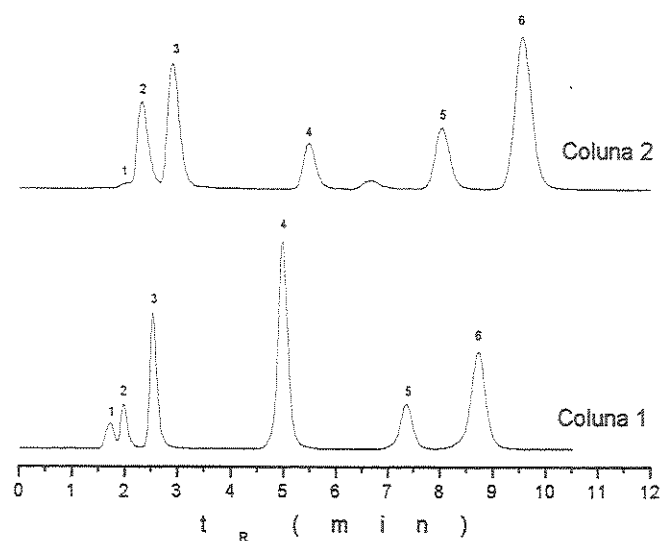


Figura 61: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno.

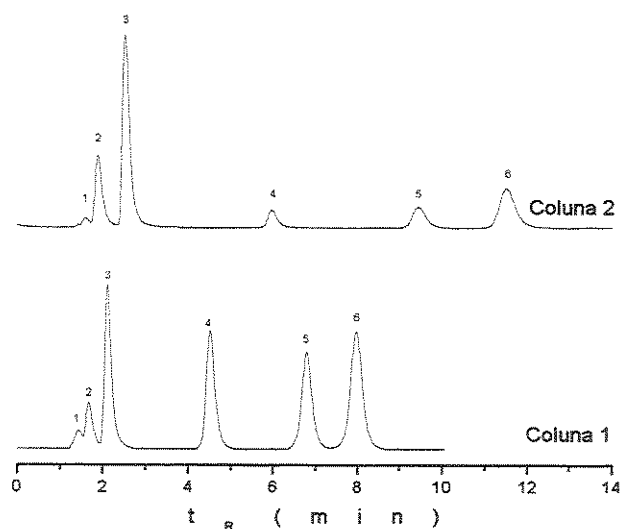


Figura 62: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com HNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno.

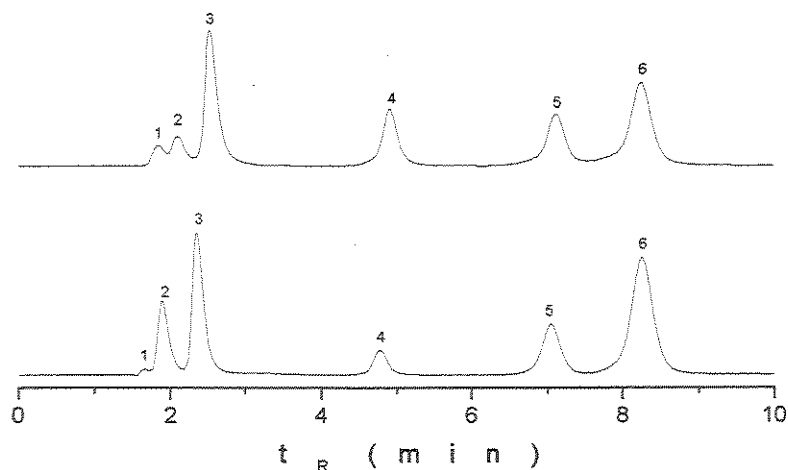


Figura 63: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_3PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno;

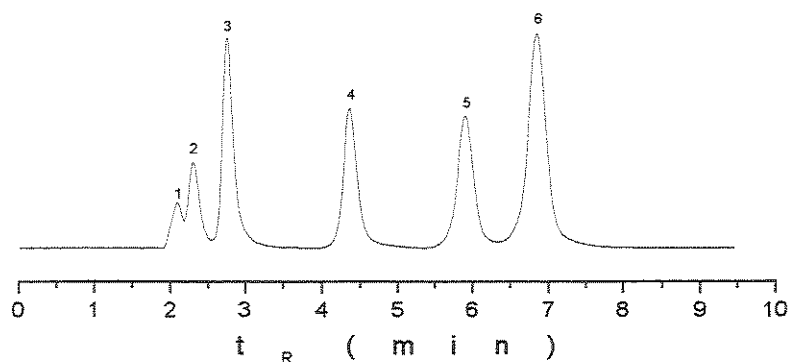


Figura 64: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno.

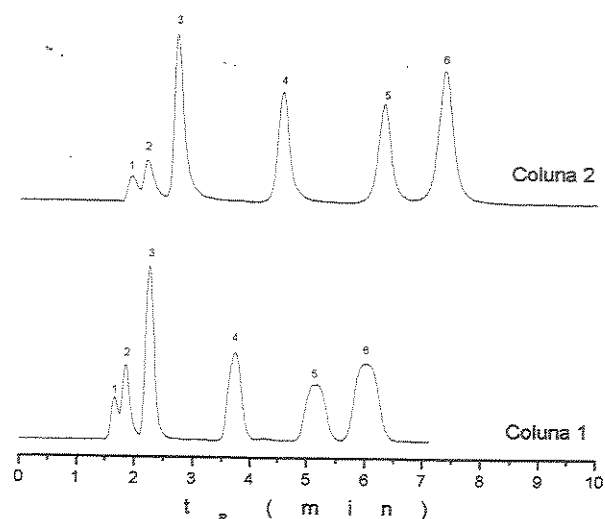


Figura 65: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com EDTA $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno.

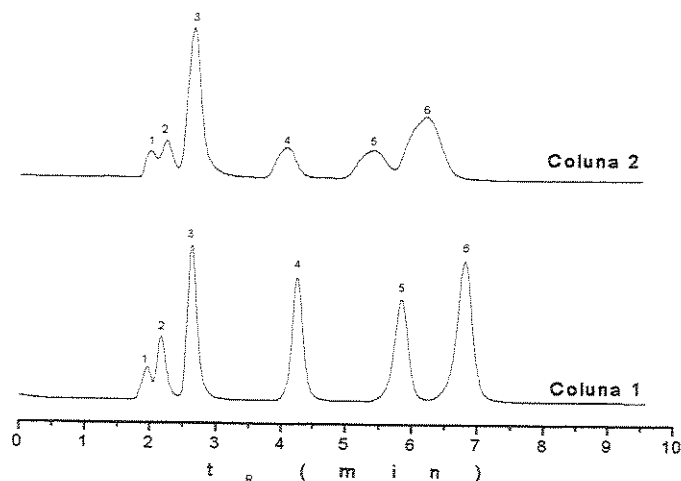


Figura 66: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com 1-metil-piperidina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno.

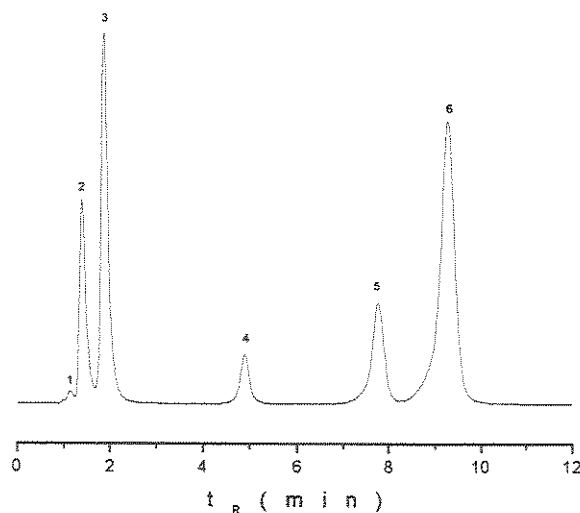


Figura 67: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NaOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno

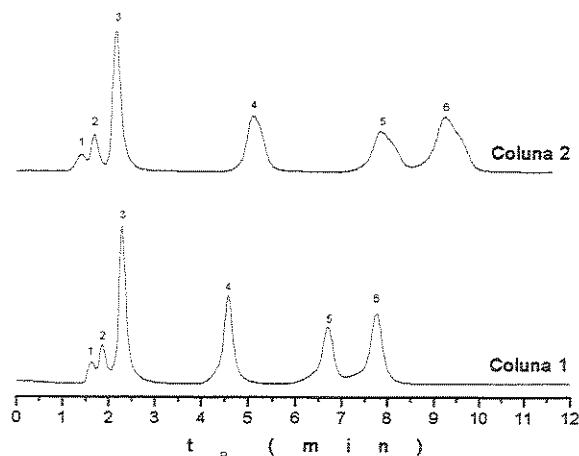


Figura 68: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com KOH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT1: (1) uracil, (2) acetona, (3) benzonitrila, (4) benzeno, (5) tolueno e (6) naftaleno.

4.12.2 – Cálculos da variância e da estimativa do desvio padrão experimental

Para os ensaios em que duas colunas foram recheadas, calculou-se variância e as estimativas do desvio padrão experimental a partir dos valores de eficiência do naftaleno. Os resultados estão apresentados na Tabela 39. Com esses resultados, também calculou-se a variância conjunta para estimar o desvio padrão experimental relacionado com todos os experimentos.

Tabela 39: Cálculos da variância e a estimativa do desvio padrão a partir da eficiência do naftaleno para alguns experimentos feitos com a sílica Rainin pré-tratada com ácidos ou bases.

	N/m naftaleno		$\bar{y}$	s_i^2	s
H ₂ SO ₄	77800	57000	67400	216320000	± 14700
HCl	79700	72400	76050	26645000	± 5200
HNO ₃	64400	74200	69300	48020000	± 6900
H ₃ PO ₄	72100	68600	70350	6125000	± 2500
EDTA	16200	70300	43250	1463405000	± 38300
1-metil-piperidina	67900	10800	39350	1630205000	± 40400
KOH	69300	19100	44200	1260020000	± 35500

Variância conjunta, $s^2 = 664300000$

Desvio padrão experimental conjunto $s = \pm 25800$

Observa-se que os valores das variâncias e os desvios padrão calculados a partir da eficiência para o naftaleno, na maioria dos ensaios, foram elevados, refletindo também num elevado desvio padrão conjunto dos experimentos. Esses resultados confirmam que o erro experimental relacionado com o procedimento de enchimento das colunas cromatográficas é grande. Este fato fica evidente quando se observam as colunas recheadas com as sílicas Rainin pré-tratadas com EDTA

(Figura 65), 1-metil-piperidina (Figura 66) ou com KOH (Figura 68), vendo que os cromatogramas feitos em duplicatas diferem drasticamente um do outro.

A partir desses resultados é possível concluir que, as características que diferem os cromatogramas feitos em duplicata, como os picos duplos, picos alargados, perda de eficiência e a cauda frontal estão relacionados com os problemas no enchimento cromatográfico, sendo possível suspeitar de anomalias no sistema de enchimento quando estas características forem observadas nos cromatogramas.

4.12.3 – Caracterização cromatográfica com a MT2

Neste item estão apresentados e discutidos os resultados das caracterizações cromatográficas com a MT2, nas avaliações das FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácido ou base. Este estudo teve dois objetivos principais: 1) avaliar as colunas nas separações de compostos ácido e básico e observar se houve melhora nas medidas devido aos pré-tratamentos; 2) analisar a repetitividade nos parâmetros cromatográficos entre as corridas cromatográficas. Para isso foi necessário avaliar as colunas uma a uma, como será apresentado a seguir.

4.12.3.1 - Fase estacionária preparada com a sílica Rainin pré-tratada com H₂O em refluxo por 24 h

A Tabela 40 mostra os resultados cromatográficos das cinco primeiras corridas utilizando a MT2 para avaliar a FE preparada com a sílica Rainin pré-tratada com H₂O / 24 h. Um dos cromatogramas está apresentado na Figura 69. Observa-se que a assimetria do pico do composto básico N,N-dimetilanilina é menor do que com a FE preparada com a sílica sem o pré-tratamento (o ensaio nº 5 da Tabela 20 foi preparado nas mesmas condições), sugerindo que esse tipo de pré-tratamento foi eficaz para diminuir a acidez da superfície da sílica Rainin, obtendo uma menor interação com o composto básico.

Os valores de eficiência para o fenol e o acenafteno estão excelentes, comparáveis com as FE preparadas com a sílica sem o pré-tratamento e também com a sílica Kromasil. A cauda frontal no pico do acenafteno sugere que o enchimento da coluna não foi eficiente.

Tabela 40: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H₂O / 24 h.

	N/m ^a	As ^a	tr ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	tr ^b	N/m ^d	As ^d	tr ^d
1º corrida	68800	1,4	5,3	6,1	23100	1,5	2,1	82800	0,7	14,6
2º corrida	63300	1,4	5,2	6,2	23000	1,5	2,1	82500	0,7	14,5
3º corrida	63800	1,6	5,2	6,2	23100	1,5	2,1	82700	0,7	14,6
4º corrida	64700	1,6	5,2	6,3	18900	2,6	2,1	83000	0,7	14,5
5º corrida	64900	1,6	5,2	6,3	19600	2,6	2,1	83800	0,7	14,5

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

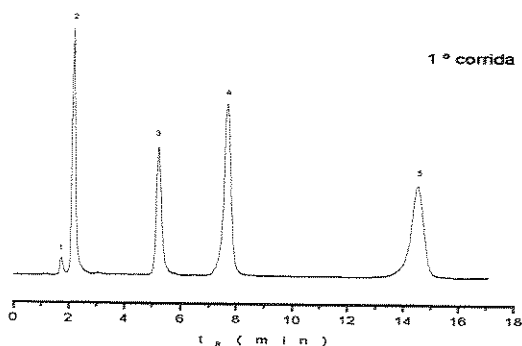


Figura 69: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H₂O / 24 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.12.3.2 – Fase estacionária preparada com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em refluxo por 8 h.

Este experimento avaliou uma das FE preparada com a sílica pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Na Tabela 41 estão apresentados os valores dos parâmetros cromatográficos calculados da MT2 com o decorrer das corridas cromatográficas. Na Figura 70 estão mostrados alguns desses cromatogramas. Observa-se pela Tabela 41 que, devido ao pré-tratamento, houve uma diminuição na assimetria no pico da N,N-dimetilanilina até valores aceitáveis, mostrando que o pré-tratamento foi eficaz para diminuir a acidez da superfície da sílica Rainin, obtendo uma menor interação com o composto básico. Mas, com o decorrer das corridas cromatográficas houve perda de eficiência e aumento na cauda do pico da N,N-dimetilanilina e diminuição nos tempos de retenção do composto básico e também do fenol e do acenafteno. Este comportamento sugere que está havendo uma rápida perda de polímero da FE devido ao fluxo da FM. A cauda frontal no pico do acenafteno sugere problemas no enchimento da coluna cromatográfica.

Tabela 41: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
1º corrida	55500	1,5	5,7	4,8	23100	1,6	2,8	70100	0,7	13,7
3º corrida	53700	1,7	5,4	4,8	23100	1,9	2,7	71400	0,8	13,0
5º corrida	51000	1,9	5,3	4,7	23000	1,7	2,7	71700	0,8	12,7
7º corrida	49400	1,9	5,2	4,7	23000	1,7	2,6	73300	0,8	12,4
10º corrida	48500	1,8	5,0	4,8	23300	1,9	2,5	75200	0,8	12,2

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

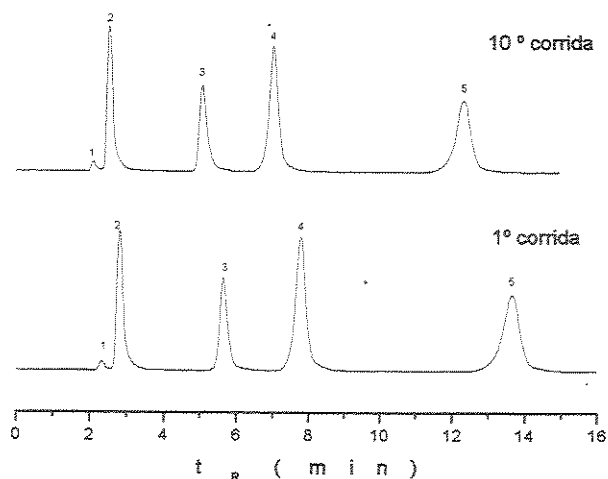


Figura 70: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.12.3.3 – Fase estacionária preparada com a sílica Rainin pré-tratada com a base fraca 1-metil-piperidina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em refluxo por 8 h.

O mesmo comportamento mostrado no item anterior foi observado nesse experimento, em que a sílica Rainin foi pré-tratada com a base fraca 1-metilpiperidina. Os resultados da Tabela 42 mostram que o pré-tratamento da sílica foi eficiente para diminuir o alto valor da assimetria do pico do composto básico N,N-dimetilanilina em relação as FE preparadas com a sílica sem nenhum tratamento prévio. Porém, observa-se também que, com a passagem da FM pela coluna, há perda de eficiência e um rápido aumento na cauda do pico da N,N-dimetilanilina e uma diminuição nos tempos de retenção dos compostos. Supõe-se que esse comportamento seja devido a uma rápida perda polímero da FE, que foi arrastado pelos solventes da FM. Nesse experimento também foi observado a cauda frontal no pico do acenafteno, indicando problemas no enchimento cromatográfico. A Figura 71 mostra alguns dos cromatogramas.

Tabela 42: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com a base fraca 1-metil-piperidina 0,01 mol L⁻¹ / 8 h.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
1º corrida	54400	1,5	5,1	4,9	24500	1,7	2,0	74100	0,6	12,7
2º corrida	49000	2,0	5,1	4,7	2400	1,6	1,9	75900	0,7	12,6
3º corrida	44200	2,4	5,0	4,6	24400	1,7	1,9	74800	0,7	12,5
4º corrida	41000	2,5	5,0	4,5	24000	1,6	1,9	76700	0,7	12,5
5º corrida	38900	2,9	5,0	4,5	23800	1,6	1,9	77200	0,7	12,5
6º corrida	36900	2,9	5,0	4,4	23500	1,9	1,9	77800	0,7	12,4

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

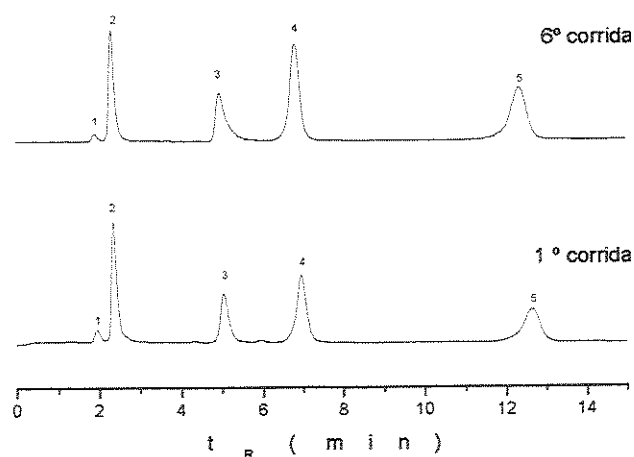


Figura 71: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com 1-metil-piperidina 0,01 mol L⁻¹ / 8 h (coluna 1). Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Em quase todos os experimentos feitos com as sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácido ou base foi observado comportamentos semelhantes aos mostrados anteriormente. Algumas colunas obtiveram comportamentos semelhantes às FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento, com altas eficiências para os compostos neutros, até maiores do que com as FE preparadas com a sílica Kromasil, mas altas assimetrias no pico do composto básico N,N-dimetilanilina (acima do aceitável). Em outras colunas, os pré-tratamentos foram eficientes para diminuir a cauda no pico da N,N-dimetilanilina em relação as FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento, mas com a passagem da FM, observou-se perda de eficiência e rápido aumento nas assimetrias dos picos da N,N-dimetilanilina (principalmente) e do fenol, diminuição nos tempos de retenção dos compostos e cauda frontal no pico do acenafteno (atribuído a problemas no sistema de enchimento cromatográfico).

Como esse comportamento foi observado para a maioria dos experimentos realizados com as sílicas Rainin pré-tratadas, esses resultados não foram todos apresentados para não deixar os dados repetitivos. Os pré-tratamentos com a água e as soluções de H_2SO_4 , H_3PO_4 , NH_4OH , 1-metilpiperidina, EDTA e NaOH foram eficientes para diminuir a cauda frontal no pico da N,N-dimetilanilina em relação à sílica sem pré-tratamento, mas com as corridas cromatográficas observou-se perda de eficiência e um rápido aumento no valor da assimetria do pico da N,N-dimetilanilina e mudança no tempo de retenção dos compostos, além da cauda frontal no pico do acenafteno.

Algumas das colunas preparadas com a sílica Rainin pré-tratada, como por exemplo, umas das sílicas pré-tratadas com H_2SO_4 0,01 mol L^{-1} / 8 h (Tabela 43 e Figura 72) obtiveram comportamentos cromatográficos um pouco diferentes das demais. Neste exemplo citado, a coluna foi preparada e recheada nas mesmas condições das outras colunas avaliadas neste item. Mas, neste experimento, com o decorrer das corridas cromatográficas vê-se o mesmo comportamento de perda de eficiência e aumento na assimetria do pico da N,N-dimetilanilina, mas com uma diferença: houve um aumento no tempo retenção dos compostos e pico simétrico do acenafteno. Supomos então que, possa existir uma relação entre a

qualidade no enchimento das colunas cromatográficas e o mecanismo de retenção dos compostos, no decorrer das corridas cromatográficas. Essa é uma questão que vai ainda ser melhor analisada.

Tabela 43: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
2º corrida	40000	1,8	5,9	6,0	14900	1,8	2,0	64700	1,0	18,4
3º corrida	38500	1,8	5,9	5,9	14800	1,8	2,0	64400	1,0	18,4
4º corrida	34400	1,9	5,9	5,6	14700	1,7	2,0	63900	1,0	18,3
5º corrida	35000	1,8	5,9	5,6	15000	1,6	2,0	63800	1,0	18,2
6º corrida	33700	1,8	5,9	5,5	14400	1,7	2,0	63200	1,0	18,1
Depois de mais 3 h de condicionamento da coluna na FM										
	22400	2,3	6,2	4,9	11800	2,0	2,1	66400	1,0	19,2
	22800	2,2	6,1	4,9	11200	1,8	2,0	65000	1,0	19,1
	24900	2,2	6,2	5,1	11800	1,9	2,1	65600	1,0	19,2

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

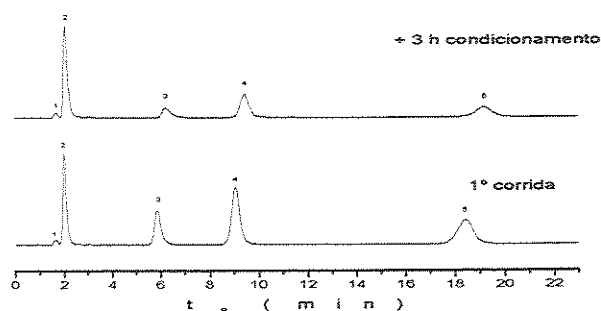


Figura 72: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.
¹. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.12.4 - Resultados cromatográficos com a MT2 das FE recheadas seis meses após seu preparo.

Algumas das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada ficaram de repouso por seis meses antes de serem recheadas na coluna cromatográfica. Estas colunas obtiveram alguns resultados diferentes dos observados anteriormente. Duas colunas, uma preparada com a sílica pré-tratada com H_2O / 24 h e outra com HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h (Tabelas 44 e 45 e Figuras 73 e 74) apresentaram bons resultados cromatográficos com altas eficiências, assimetrias do pico da N,N-dimetilanilina com valores aceitáveis e menores do que com a sílica sem o pré-tratamento, pico simétrico do acenafteno, além de se manterem estáveis após mais 3 h de condicionamento da coluna na FM. Mas, ainda assim houve um aumento sutil na assimetria do pico da N,N-dimetilanilina e uma pequena diminuição no tempo de retenção dos compostos.

Porém, duas outras FE preparadas com as sílicas pré-tratadas com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h e H_3PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h (Tabelas 46 e 47 e Figuras 75 e 76), também recheadas seis meses após seu preparo não melhoraram os resultados cromatográficos, mostrando perda de eficiência e aumento na assimetria do pico da N,N-dimetilanilina, diminuição no tempo retenção dos compostos com o decorrer das corridas cromatográficas e o recondicionamento da coluna na FM e cauda frontal no pico do acenafteno.

O que se conclui com esses resultados é que, com o maior tempo de repouso dessas FE após seu preparo aumentou-se a quantidade de polímero imobilizado na FE pelo processo da auto-imobilização, em que a incorporação do polímero aumenta simplesmente deixando a FE de repouso após seu preparo. Por isso, as FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_2O e HCl obtiveram melhores resultados cromatográficos e estabilidade nos parâmetros cromatográficos após as corridas cromatográficas.

Mas porque então, as FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH e H_3PO_4 não apresentaram o mesmo comportamento, se elas também foram recheadas seis meses após o preparo? A resposta pode estar no fato de as

duas primeiras colunas terem obtido bons enchimentos cromatográficos, observados pelos picos simétricos e altas eficiências do acenafteno nas duas colunas. Já as duas últimas colunas não obtiveram boa qualidade no enchimento cromatográfico, com cauda frontal no pico do acenafteno e baixa eficiência desse composto, no caso da FE preparada com a sílica pré-tratada com NH_4OH .

É possível concluir então que, a qualidade no enchimento das colunas cromatográficas também é um fator que afeta diretamente e significativamente a estabilidade das FE. De alguma forma os silanóis residuais ficam mais expostos quando a coluna não tem um bom enchimento cromatográfico.

É preciso observar também que, quase todas as colunas recheadas com as FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas obtiveram cauda frontal no pico do acenafteno, mas apresentando alta eficiência para este composto. Este problema pode ser atribuído à problemas no enchimento cromatográfico. Atualmente, nos experimentos realizados no laboratório, a maioria dos alunos também está obtendo esse comportamento, mostrando que o sistema de enchimento está com defeito.

Tabela 44: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H₂O / 24 h. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
1º corrida	62100	1,4	5,0	6,8	19400	1,7	2,0	89100	1,1	14,9
3º corrida	58700	1,6	5,0	6,5	18300	1,9	2,0	87900	1,1	14,9
5º corrida	56800	1,8	5,0	6,4	19200	1,7	2,0	88300	1,1	14,8
7º corrida	55300	1,8	5,0	6,4	19200	1,5	2,0	87900	1,2	14,6
10º corrida	56000	1,7	5,0	6,3	19300	1,9	2,0	88200	1,1	14,5
Depois de mais 3 h de condicionamento da coluna na FM										
	54300	1,9	5,0	6,1	23000	1,6	2,0	92000	1,1	14,2
	61200	1,7	4,6	6,0	22300	1,5	1,9	90600	1,1	12,6
	60800	1,7	4,6	5,9	22100	1,5	1,9	91500	1,1	12,6

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

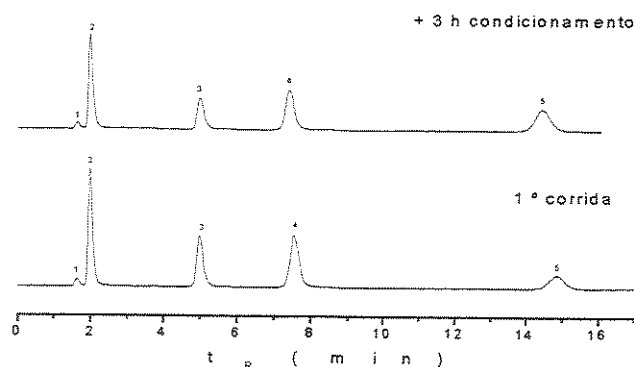


Figura 73: FE preparada com a sílica Rainin pré-tratada com H₂O 0,01 mol L⁻¹ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Tabela 45: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com HCl 0,01 mol L⁻¹ / 8 h. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
1º corrida	33800	1,6	6,6	5,2	7300	1,5	2,5	84500	1,0	19,2
3º corrida	33600	1,6	6,4	5,2	7100	1,4	2,6	86900	1,0	18,8
5º corrida	29100	1,6	6,6	4,7	6800	1,4	2,7	85700	1,0	18,7
7º corrida	33200	1,8	6,4	5,1	8100	1,5	2,5	91600	0,9	18,3
10º corrida	32700	1,8	6,4	5,1	7900	1,4	2,5	91800	1,1	18,3
Depois de mais 3 h de condicionamento da coluna na FM										
	36300	1,7	6,5	5,5	8400	1,5	2,5	94400	1,1	19,1
	35300	1,7	6,4	5,5	8100	1,5	2,5	96400	0,9	19,2
	34800	1,8	6,5	5,5	8300	15	2,5	97000	0,9	16,2

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

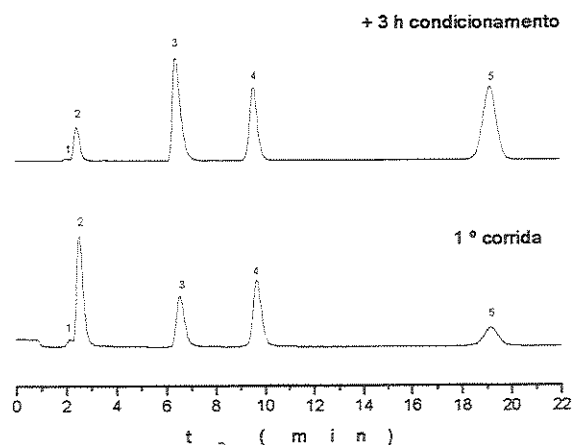


Figura 74: FE preparada com a sílica Rainin pré-tratada com HCl 0,01 mol L⁻¹ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140 °C / 8 h, 4 dias de repouso. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Tabela 46: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
1º corrida	46000	1,7	4,3	4,1	16500	2,5	2,0	31600	0,8	10,8
3º corrida	43600	2,1	4,4	4,0	17300	2,2	2,0	39700	0,8	10,5
5º corrida	31700	2,4	4,1	3,4	14400	2,0	1,9	36300	0,8	9,7
7º corrida	27600	3,0	4,2	3,2	15500	2,2	2,0	36900	0,8	9,8
10º corrida	29700	2,6	4,2	3,3	15400	2,1	2,0	38200	0,8	9,8

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

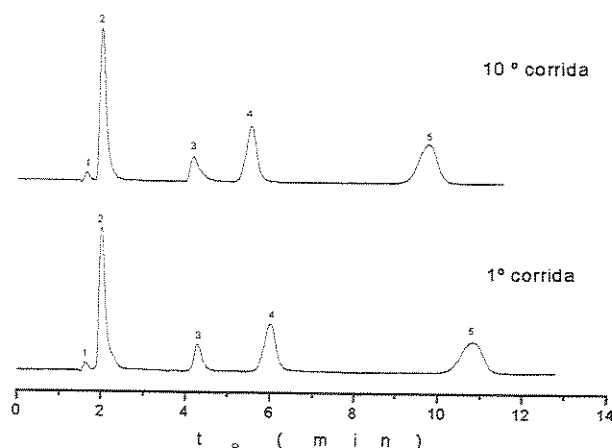


Figura 75: FE preparada com a sílica Rainin pré-tratada com NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Tabela 47: Resultados cromatográficos calculados com a MT2 das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_3PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
1º corrida	54700	1,1	1,8	7,4	16300	1,7	2,1	72700	0,7	17,5
3º corrida	32300	2,7	1,7	6,2	13900	1,9	2,1	70900	0,7	17,4
5º corrida	18100	4,0	1,7	5,1	13400	2,1	2,1	71600	0,7	17,3
7º corrida	11300	4,9	1,7	4,3	13600	2,1	2,0	72300	0,7	17,1
9º corrida	8700	5,0	1,2	3,8	14600	2,3	2,1	71100	0,7	17,3
Depois de mais 3 h de condicionamento da coluna na FM										
	35200	1,6	5,2	6,2	11600	2,1	2,0	67300	0,8	16,6
	14600	4,6	5,3	4,6	11100	1,8	2,1	67300	0,8	16,8
	9700	5,2	5,2	4,0	9000	1,9	1,8	64800	0,7	16,6

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

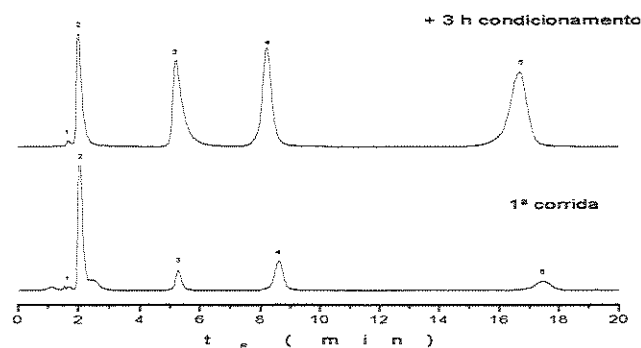


Figura 76: FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com H_3PO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h. Condições de imobilização térmica: 44 % PMOS inicial, 140°C / 8 h, 4 dias de repouso. Coluna recheada após 6 meses de repouso da FE. Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. MT2: (1) uracil, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

4.13 – Considerações sobre os pré-tratamentos

Em todas as FE analisadas nos itens anteriores, observou-se o aumento na assimetria nos picos da N,N-dimetilanilina e do fenol, mudança no tempo de retenção dos compostos e perda de eficiência, ao passar das corridas cromatográficas. Um comportamento semelhante foi observado nas FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada, na qual a quantidade de polímero colocado inicialmente na FE (44 % e 50 % PMOS inicial) não foi suficiente para recobrir a superfície da sílica, deixando as FE com muitos silanóis residuais. Naquelas FE também existiram valores altos na assimetria dos picos e aumento nos tempos de retenção da N,N-dimetilanilina entre as corridas cromatográficas, chegando a N,N-dimetilanilina até a eluir depois do pico do naftaleno.

Pelas semelhanças nesses comportamentos cromatográficos é possível concluir que as FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas contém uma monocamada de polímero incompleta, o qual deixa muitos silanóis residuais, responsáveis pelo comportamento cromatográfico observado. É preciso ressaltar que a sílica Kromasil é de alta pureza e sua superfície está próxima de ser completamente hidroxilada, e a sílica Rainin é mais impura e sua superfície contém maior quantidade de silanóis isolados mais ácidos. Quando as FE preparadas com estas sílicas estão com muitos silanóis residuais, independente da qualidade da sílica, entre as corridas cromatográficas é observado o comportamento de:

- Mudança no tempo de retenção dos compostos, principalmente da N,N-dimetilanilina, que chega a eluir até depois do pico do naftaleno;
- Aumento na assimetria dos picos de compostos ácidos e básicos;
- Perda de eficiência da coluna.

A diferença entre as sílicas ocorre quando se aumenta a quantidade de polímero nas FE. Com a sílica Kromasil, mesmo a FE preparada nas melhores condições, contendo uma quantidade razoável de silanóis residuais, não se observa cauda no pico da N,N-dimetilanilina, porque os silanóis residuais não tem caráter tão ácido e sua quantidade não é suficiente para causar forte interação

com o composto básico. Já nas FE preparadas com a sílica Rainin apenas uma pequena quantidade de silanóis residuais mais ácidos podem interagir fortemente com compostos básicos.

Assim, a quantidade de PMOS inicial suficiente para encher os poros da sílica mais um excesso de 10 % foram suficientes para formar a monocamada sobre a sílica Kromasil, que ofereça boa transferência de massa entre os analitos e a FE e nenhuma interação forte com compostos básicos. Mas, para a sílica Rainin, essa quantidade não foi suficiente, indicando que, se mais FE fossem preparadas, seria necessário aumentar a quantidade de PMOS inicial ou deixar a FE mais tempo repousando para que mais polímero fosse imobilizado.

4.14 – Caracterização cromatográfica com as MT3 e MT4

A mistura teste 3 é composta pela cafeína e o fenol. Pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol é calculado o parâmetro $\alpha_{C/F}$ ($\alpha_{C/F} = k_C/k_F$), que estima o número de silanóis livres e o grau de capeamento da sílica pelo PMOS. A mistura teste 4 é composta pela benzilamina e o fenol. Em pH 2,7, é calculado o parâmetro $\alpha_{B/F \text{ pH } 2,7}$ da razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol ($\alpha_{B/F \text{ pH } 2,7} = k_B/k_F$). Este parâmetro define a atividade ácida dos grupos silanóis da superfície da sílica. Em pH 7,6, é calculado o parâmetro $\alpha_{B/F \text{ pH } 7,6}$ da razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol ($\alpha_{B/F \text{ pH } 7,6} = k_B/k_F$), que estima a atividade total dos silanóis residuais na FE. O uracil é adicionado nas duas misturas como um composto não retido para obtenção do t_M .

Inicialmente, os testes cromatográficos com essas misturas foram aplicados nas FE preparadas com a sílica Kromasil sem pré-tratamento, imobilizada a 140 °C / 16 h e 55 % PMOS inicial e com as sílicas Kromasil pré-tratadas com HNO₃ 2,0 mol L⁻¹ / 15 h com 55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h e as sílicas Kromasil pré-tratadas com aquecimento seguida de tratamento com HNO₃ (ensaios do planejamento fatorial saturado, (Tabela 33) e também com algumas das FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento (Tabela 19). Os parâmetros

cromatográficos calculados estão apresentados na Tabela 48 e alguns dos cromatogramas estão apresentados nas Figuras 77-79.

Tabela 48: Parâmetros cromatográficos calculados da MT3 (FM metanol / água 30:70 v/v) e MT4 em pH 2,7 e 7,6 (FM 30:70 metanol / tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹). F: 0,3 mL min⁻¹ (para a sílica Kromasil) e 1,0 mL min⁻¹ (para a sílica Rainin).

FE – pré-tratamentos da sílica e condições de preparo	$\alpha_{C/F}$	$\alpha_{B/F}$ pH 2,7	$\alpha_{B/F}$ pH 7,6
Kromasil sem pré-tratamento – 55 %, 140°C/16 h (Tabela 17)	1,82	0,07	2,03
Kromasil / HNO ₃ - 55 % 120°C/16 h (Tabela 27)	1,68	0,12	2,02
Kromasil / Δ e HNO ₃ – Ensaio 2 (Tabela 33)	2,16	0,06	2,04
Kromasil / Δ e HNO ₃ – Ensaio 6 (Tabela 33)	2,10	0,07	2,15
Kromasil / Δ e HNO ₃ – Ensaio 7 (Tabela 33)	2,48	0,07	2,33
Kromasil / Δ e HNO ₃ – Ensaio 8 (Tabela 33)	1,96	0,07	2,07
Rainin - Ensaio 2 (Tabela 19)	3,54	0,10	3,13
Rainin - Ensaio 3 (Tabela 19)	5,01	Nd	2,88
Rainin – Ensaio 4 (Tabela 19)	4,25	0,14	3,31
Rainin - Ensaio 7 (Tabela 19)	3,17	0,15	5,37

Nd = não determinado

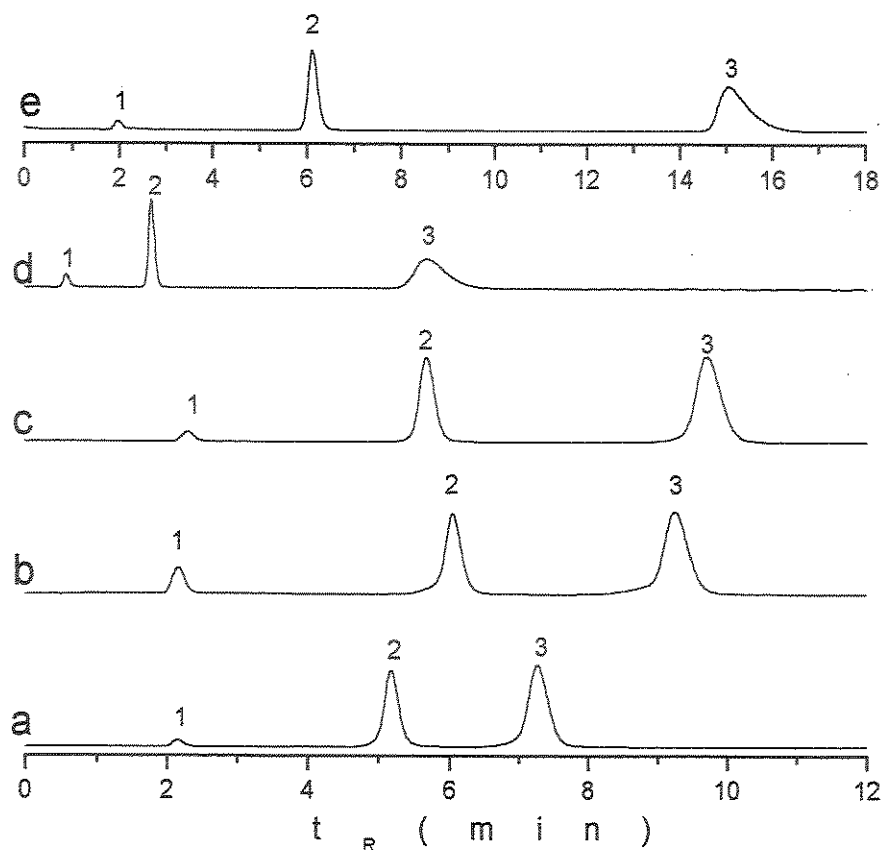


Figura 77: Cromatogramas das MT3. FE preparadas com as sílicas Kromasil, a: sem pré-tratamento, b: pré-tratada com HNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (55 % PMOS inicial, 120°C / 16 h) e c: Δ - seguido de HNO_3 (ensaio 2, Tabela 33). FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento, d: ensaio 3, Tabela 19 e e: ensaio 7, Tabela 19. (1) uracil, (2) fenol e (3) cafeína em FM metanol / água 30:70 v/v.

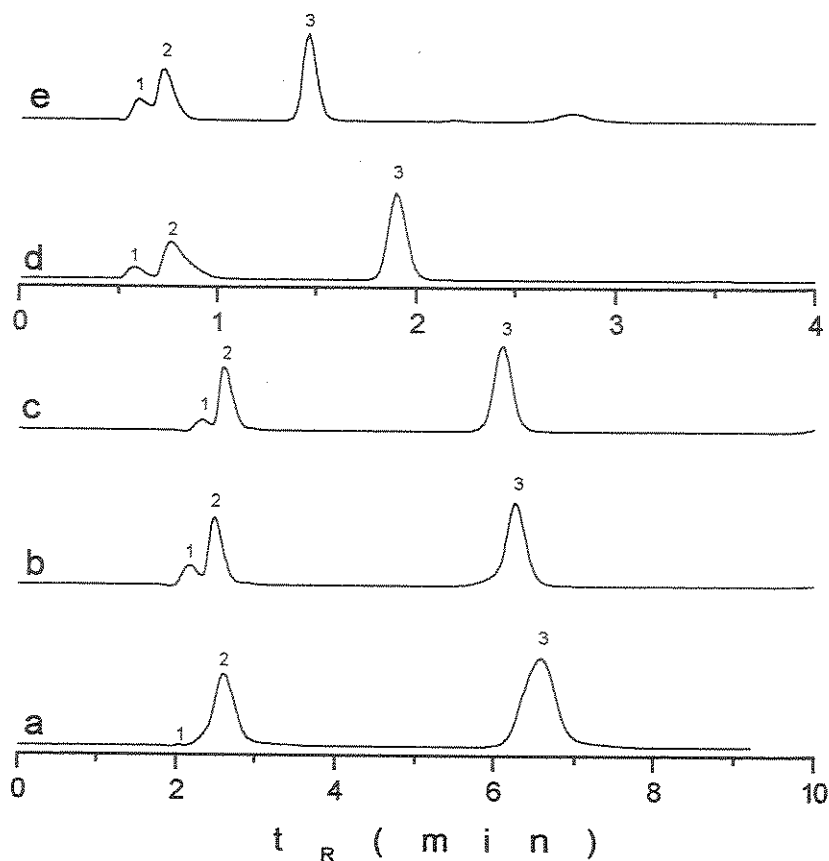


Figura 78: B) Cromatogramas da MT4. FE preparadas com as sílicas Kromasil, a: sem pré-tratamento, b: pré-tratada com HNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (55 % PMOS inicial, 120°C / 16 h) e c: Δ - seguido de HNO_3 (ensaio 2, Tabela 33). FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento, d: ensaio 3, Tabela 19 e e: ensaio 7, Tabela 19. (1) uracil, (2) fenol e (3) benzilamina em FM 30:70 v/v metanol / tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 2,7.

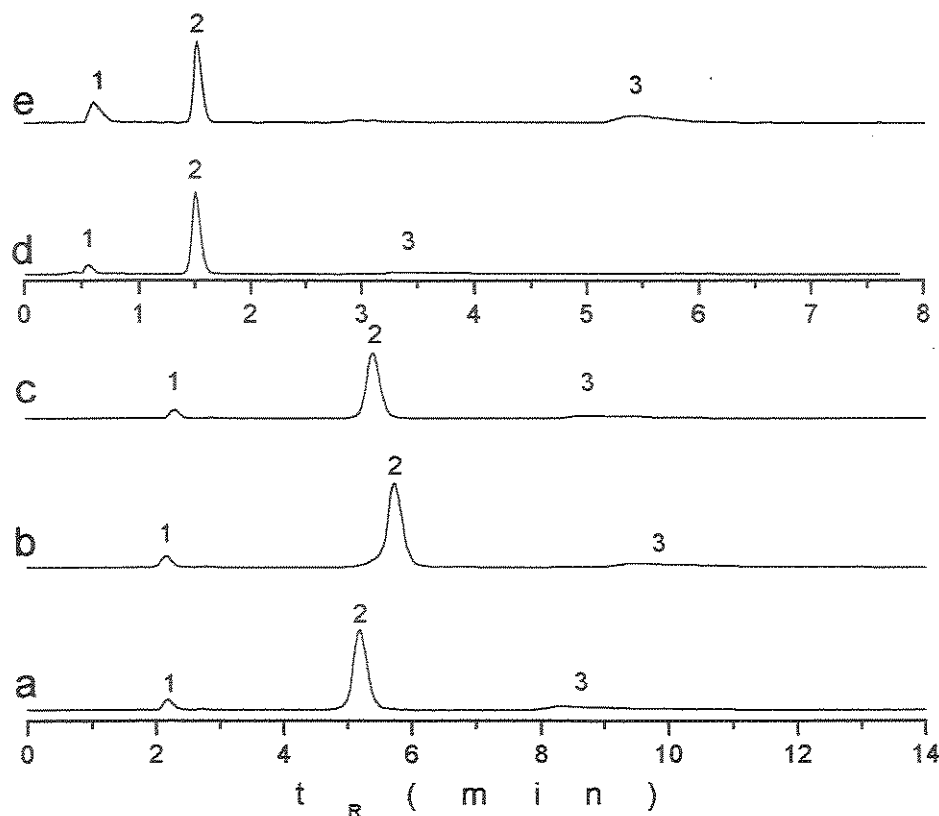


Figura 79: Cromatogramas da MT4. FE preparadas com as sílicas Kromasil, a: sem pré-tratamento, b: pré-tratada com HNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (55 % PMOS inicial, 120°C / 16 h) e c: Δ - seguido de HNO_3 (ensaio 2, Tabela 33). FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento, d: ensaio 3, Tabela 19 e e: ensaio 7, Tabela 19. (1) uracil, (2) fenol e (3) benzilamina em FM 30:70 v/v metanol / tampão fosfato $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,6.

Analisando os resultados da Tabela 48 e comparando com os dados publicados recentemente por Euerby [62], que também utiliza as MT3 e MT4 para avaliar 135 colunas comerciais, vê-se que, tanto para as FE preparadas com a sílica Kromasil ou a Rainin, os valores de $\alpha_{C/F}$ e $\alpha_{B/F}$ pH 7,6 são altos, indicando alta capacidade de formação de ligações de hidrogênio e alta capacidade de troca iônica entre a cafeína e a benzilamina com os silanóis residuais das FE. Comparando esses valores entre as FE preparadas com a sílica Kromasil e a Rainin, observa-se que os valores desses parâmetros são maiores para a Rainin do que com a Kromasil, podendo ser atribuído essa diferença à maior quantidade

de silanóis (geminais e isolados ou vicinais) na superfície da sílica Rainin obtido pelos espectros de CP / MAS ^{29}Si NMR, que não foram cobertos pelo PMOS.

Esses resultados e os anteriores indicam que a monocamada de PMOS sobre as sílicas ainda precisa ser mais densa para que todos os tipos de interações indesejáveis entre o analito e a FE sejam eliminados. Procedimentos de capeamento, entrecruzamentos das cadeias do polímero ou para a formação de uma monocamada de PMOS mais espessa devem ser propostos em trabalhos futuros no LabCrom como uma tentativa de bloquear esses silanóis residuais das FE. Mas, mesmo sem procedimentos de capeamento ou entrecruzamento das cadeias de polímero, as FE com o PMOS sorvido e imobilizado por tratamento térmico nos poros da sílica Kromasil, altamente pura e com a superfície completamente hidroxilada (de caráter menos ácida e mais homogênea), apresentando excelentes desempenhos cromatográficos, mostrando que essas FE são promissoras e devem continuar sendo exploradas.

Um dado interessante está relacionado com o fato do valor de $\alpha_{B/F \text{ pH } 2,7}$ ser baixo para ambas as sílicas, semelhantes às FE preparadas com as sílicas altamente puras mostradas nos dados de Euerby [62]. Este parâmetro mede a atividade dos silanóis mais ácidos da superfície da sílica proveniente de impurezas metálicas contidas na superfície da sílica e dos grupos silanóis isolados mais ácidos, portanto, a quantidade de metais contidos nas duas sílicas, (mostrados nas Tabelas 4 e 5), não são suficientes para deixar a superfície das sílicas mais ácidas na presença da camada de PMOS.

Porém, se o valor do $\alpha_{B/F \text{ pH } 2,7}$ é baixo também para a sílica Rainin, porque então as FE preparadas com esta sílica produz caudas acentuadas no pico do composto básico N,N-dimetilanilina? Para interpretar esse resultado é preciso perceber as sutilezas nos valores apresentados. Embora os valores do $\alpha_{B/F \text{ pH } 2,7}$ sejam pequenos, de acordo com a avaliação de Euerby, em que valores altos, considerados pelo autor, são acima de 0,70, até 13, muitas das FE apresentadas por ele tem valor do $\alpha_{B/F \text{ pH } 2,7}$ de 0,01 e os valores resultantes com as FE preparadas com a sílica Rainin / PMOS estão por volta de 0,14. Comparando também este valor com os obtidos com a sílica Kromasil, é o dobro do valor. Isso

significa que também existe uma pequena contribuição das impurezas metálicas da sílica Rainin que estão deixando os silanóis da superfície mais ácidos.

Parece então, existir três fatores que estão deixando a superfície da sílica Rainin mais ácida que a Kromasil, suficiente para causar forte interação com compostos básicos. Pelos valores dos parâmetros $\alpha_{C/F}$ e $\alpha_{B/F}$ pH 7,6 as FE preparadas com sílica Kromasil também apresentam muitos silanóis residuais, mas a sílica Rainin contém uma pouco mais (1 ° fator). Somando a isso, a sílica Rainin contém maior quantidade de silanóis isolados (2 ° fator). Estes, por sua vez, também sofrem uma pequena influência de metais, deixando os silanóis um pouco mais ácidos (3 ° fator).

Por esses resultados percebe-se que a caracterização cromatográfica pode apresentar maiores sutilezas nas características das FE e das interações que ocorrem entre os analitos e a FE, que muitas vezes passam despercebidas pelas caracterizações químicas e físicas, além destas últimas necessitarem de instrumentação cara, a demanda de pedidos é grande e ainda estão sujeitas a maiores erros quando relacionadas às observações cromatográficas.

Numa segunda etapa, foram feitas avaliações cromatográficas com as MT3 e MT4 avaliadas nas FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas. Estas misturas geram medidas da concentração total dos silanóis residuais na FE e o grau de acidez desses silanóis, os quais vão depender dos resultados obtidos com os diferentes pré-tratamentos da sílica, realizados como esse objetivo, de reidroxilar a superfície da sílica e diminuir a quantidade de impurezas metálicas contidas na sua matriz e assim reduzir a acidez da superfície da sílica e as interações indesejáveis dos silanóis residuais com os analitos (principalmente os de caráter básico, que tem forte interação). Esses resultados serão então comparados com os resultados obtidos com as MT1 e MT2.

Na Tabela 49 estão apresentados os parâmetros cromatográficos calculados das MT3 e MT4 testadas nas FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácidos e bases.

Tabela 49: Parâmetros cromatográficos calculados da MT3 (FM metanol / água 30:70 v/v) e MT4 em pH 2,7 e 7,6 (Condições cromatográficas: FM 30:70 metanol / tampão fosfato 0,02 mol L⁻¹). F: 1,0 mL min⁻¹.

Pré-tratamento da sílica	$\alpha_{C/F}$	$\alpha_{B/F}$ pH 2,7	$\alpha_{B/F}$ pH 7,6
Sem pré-tratam - Ens 2 (Tabela 19)	3,54	0,10	3,13
Sem pré-tratam - Ens 3 (Tabela 19)	5,01	Nd	2,88
Sem pré-tratam - Ens 4 (Tabela 19)	4,25	0,14	3,31
Sem pré-tratam - Ens 7 (Tabela 19)	3,17	0,15	5,37
H ₂ O / 24 h	2,97	0,12	2,53
H ₂ SO ₄	3,84	0,20	3,42
HCl	4,10	0,15	3,20
H ₃ PO ₄	1,68	0,15	2,93
1-metil-piperidina	2,16	0,21	2,28
NaOH	5,51	0,00	4,33
KOH	1,68	0,16	Nd

Analisando os dados da Tabela 49 observa-se que os valores de $\alpha_{C/F}$ e $\alpha_{B/F}$ pH 7,6 ainda estão altos, em comparação com os dados publicados por Euerby [62], indicando que as FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas ainda tem muitos silanóis residuais, confirmando as observações feitas anteriormente. Os valores de $\alpha_{B/F}$ pH 2,7 estão bem próximos do que foi observado para a sílica sem pré-tratamento. Somente o valor de $\alpha_{B/F}$ pH 2,7 para a sílica Rainin pré-tratada com NaOH diferiu dos outros, pois neste experimento a benzilamina eluiu junto com o uracil (composto não retido na FE) e o valor desse parâmetro foi zero. Mas os valores dos outros parâmetros são bastante altos nessa FE indicando uma quantidade grande de silanóis residuais. Embora esse pré-tratamento diminuiu as impurezas metálicas, muitos silanóis ficaram expostos.

Uma questão que surge observando esses resultados é que as FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento obtiveram as respostas dos

parâmetros calculados com as MT3 e MT4 semelhantes às FE preparadas com a sílica pré-tratada, apresentando muitos silanóis residuais. Não seria de se esperar então que, as FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamentos também obtivessem comportamentos cromatográficos semelhantes às FE preparadas com a sílica pré-tratadas, de aumento na assimetria do pico da N,N-dimetilanilina, mudança no tempo de retenção dos composto e perda de eficiência entre as corridas cromatográficas?

Foi então feito uma nova análise dos resultados, corrida por corrida das MT1 e MT2 nas FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento (ensaios do planejamento fatorial 2^{4-1} , Tabela 19)

Na maioria das FE foram feitas apenas duas ou três injeções cromatográficas da MT2 e os resultados foram semelhantes entre as corridas. Mas, em algumas FE pode-se observar uma não repetição dos resultados. Em uma das colunas foi possível observar nitidamente um comportamento de rápido aumento na assimetria do pico da N,N-dimetilanilina, diminuição no tempo de retenção dos compostos e perda de eficiência com as corridas cromatográficas, que estão apresentados nas Tabelas 50 à 52.

Esses resultados indicam que as FE preparadas com a sílica Rainin sem pré-tratamento também geram problemas com a não repetitividade nos parâmetros cromatográficos entre as corridas cromatográficas, devido à grande quantidade de silanóis residuais e de caráter mais ácidos presentes nas FE. Isso explicaria o fato de os efeitos calculados a partir da assimetria do pico da N,N-dimetilanilina não terem sido conclusivos, porque esses valores podem variar muito, sendo impossível fazer os cálculos das médias, como foi feito.

Tabela 50: Resultados cromatográficos calculados da FE preparada com a sílica Rainin em uma das colunas do ensaio nº 3 do planejamento fatorial 2^{4+1} (Tabela 19). Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
1º corrida	31700	10,2	6,0	4,6	21900	2,4	2,1	89000	1,0	15,9
2º corrida	23900	6,0	6,0	5,2	22300	2,2	2,1	88500	1,0	16,4
3º corrida	38100	7,3	6,0	5,4	21000	2,1	2,1	90100	1,0	17,1

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

Tabela 51: Resultados cromatográficos calculados da FE preparada com a sílica Rainin em uma das colunas do ensaio nº 6 do planejamento fatorial 2^{4+1} (Tabela 19). Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
1º corrida	18200	9,7	4,7	3,8	15700	1,8	1,7	89300	0,9	12,9
2º corrida	21000	11,5	4,7	4,1	15900	2,0	1,7	90000	0,9	12,9
3º corrida	22200	10,6	4,7	4,2	16100	1,9	1,7	90700	0,9	12,9

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

Tabela 52: Resultados cromatográficos calculados da FE preparada com a sílica Rainin em uma das colunas do ensaio nº 8 do planejamento fatorial 2^{4+1} (Tabela 19). Condições cromatográficas: FM metanol / água 70:30 v/v, F: 0,3 mL min⁻¹.

	N/m ^a	As ^a	t _R ^a	Rs ^c	N/m ^b	As ^b	t _R ^b	N/m ^d	As ^d	t _R ^d
1º corrida	41200	6,1	6,4	6,1	27100	2,1	2,2	106300	1,1	17,6
2º corrida	41900	6,0	5,5	5,1	26400	2,3	2,1	80600	1,4	14,8
3º corrida	36000	8,0	5,3	4,6	24700	2,2	2,1	77300	1,4	14,2
4º corrida	34500	10,6	5,3	4,5	25100	1,9	2,1	75300	1,4	14,0

^a Calculado para a N,N-dimetilanilina

^b Calculado para o fenol

^c Calculado entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno

^d Calculado para o acenafteno

4.15 – Caracterizações físicas e químicas das sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácidos ou bases

4.15.1 – Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho (IR)

A caracterização por IR das sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácidos ou bases está mostrado na Figura 80. Apenas por uma análise visual dos espectros apresentados nesta Figura não é possível observar diferenças na superfície da sílica Rainin sem pré-tratamento e os das sílicas pré-tratadas, concluindo que o apenas a análise visual dos espectros de IR não oferece informações relevantes a respeito de mudanças na superfície das sílicas pré- tratadas.

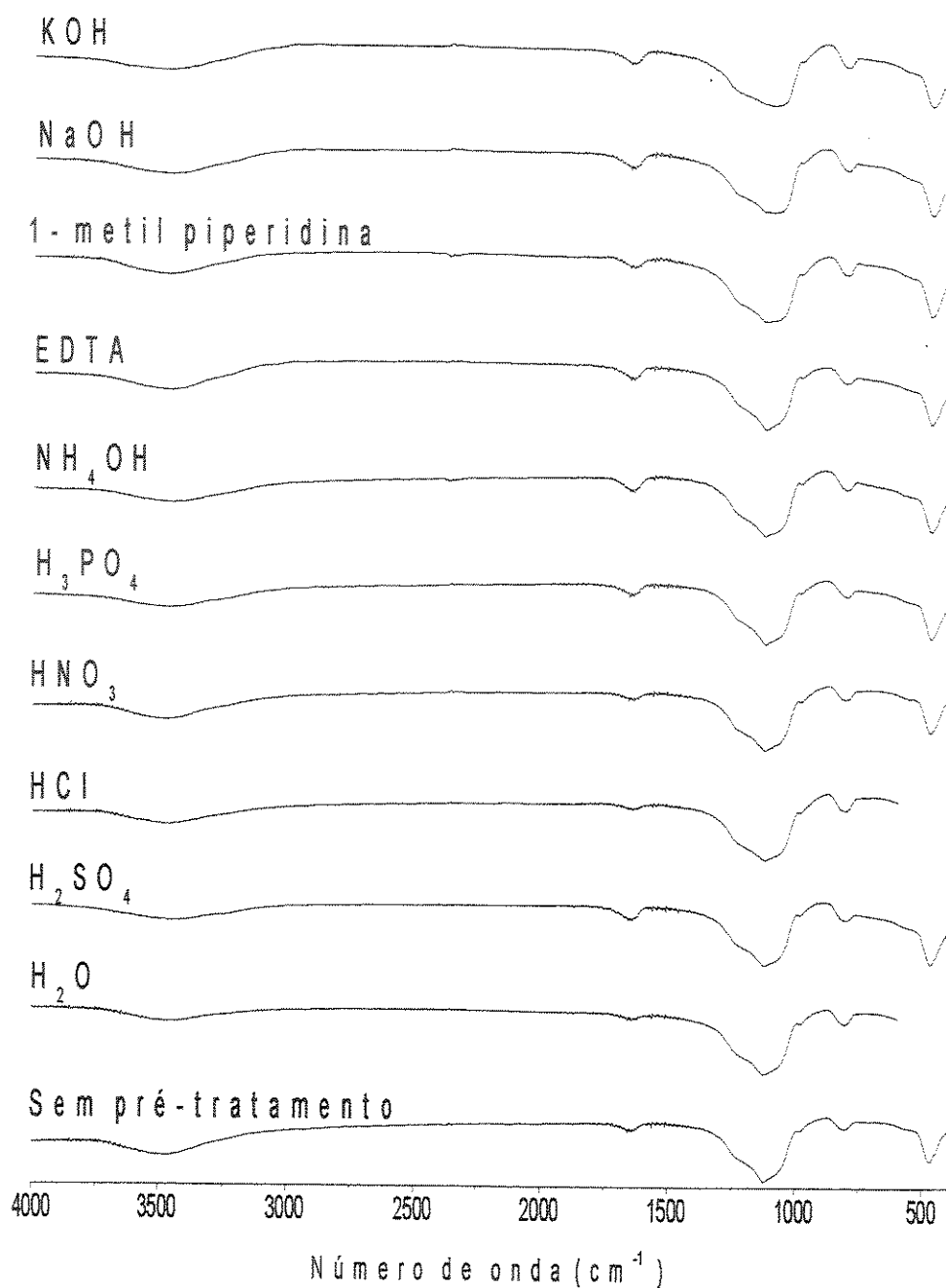


Figura 80: Espectros de IR das sílicas Rainin sem pré-tratamento e pré-tratadas com água, ácidos e bases. A sílica Rainin foi refluxada a 100 ° C por 24 h com água e por 8 h com os ácidos e as bases nas concentrações de 0,01 mol L⁻¹.

4.15.2 – Caracterização por CP / MAS ^{29}Si NMR

Também foi feito um estudo das sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácido e base por CP / MAS ^{29}Si NMR para obter informações a respeito da quantidade relativa dos grupos silanóis da superfície das sílicas. Estes resultados estão apresentados na Tabela 53, juntamente com outros valores já apresentados para a sílica Kromasil, para efeito de comparação. Observou-se uma grande diminuição nos valores das quantidades relativas dos grupos silanóis da superfície das sílicas pré-tratadas em relação à sílica sem pré-tratamento. Também foi observado uma diminuição na % C dessas FE em relação às FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento.

Construiu-se então, um gráfico relacionando os valores apresentados na Tabela 53, entre a quantidade relativa de silanóis isolados (ou vicinais) e a % de C das FE, que está apresentado na Figura 81. A curva da Figura 81 mostra uma relação entre esses parâmetros: há um aumento da % C das FE com o aumento na quantidade relativa de silanóis isolados (ou vicinais) mais ácidos na superfície da sílica, podendo ser reafirmado que é através dos silanóis da superfície da sílica que ocorre a interação com o polímero e, quanto mais ácidos esses silanóis, maior será essa interação. Por isso, as FE preparadas com a sílica Rainin, mais impura e com a superfície mais ácida que a sílica Kromasil produzem monocamadas mais espessas de PMOS.

Voltando a analisar somente as FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratadas, pelos dados da Tabela 53, a grande diminuição nos valores das quantidades relativas dos grupos silanóis da superfície das sílicas pré-tratadas, até menores do que com a sílica Kromasil, mostraram que esses procedimentos de pré-tratamentos da sílica foram efetivos na diminuição da acidez da superfície da sílica, sendo refletido no comportamento cromatográfico de muitas FE, na primeira corrida cromatográfica, em que houve uma diminuição na assimetria do pico da N,N-dimetilanilina até valores aceitáveis, o que não foi conseguido com a sílica sem pré-tratamento.

Mas, devido a grande quantidade dos silanóis residuais não recobertos pelo polímero, ainda agravado pela diminuição na % de carbono devido a diminuição na acidez da superfície da sílica, a assimetria do pico da N,N-dimetilanilina aumentou no decorrer das corridas cromatográficas. Além disso, houve mudança no tempo de retenção dos compostos e perda de eficiência. Essa é uma questão difícil, porque os silanóis adjacentes aos metais e os silanóis isolados conferem uma maior acidez na superfície da sílica e causam forte interação com analitos básicos, e é através deles que há uma maior incorporação do polímero na FE. É nessa segunda linha que o LabCrom vem desenvolvendo suas pesquisas, colocando mais metais nas sílicas para aumentar a estabilidade das FE. O desafio é propor procedimentos para obter uma camada completa de polímero sobre sílica e não deixar silanóis residuais, porque no caso das FE preparadas com a sílica modificada com óxidos metálicos, apenas uma pequena população de silanóis residuais pode interagir fortemente com analitos básicos.

Tabela 53: Relação entre a quantidade relativa dos grupos silanóis da sílica obtidas por CP / MAS ^{29}Si NMR e a % C nas FE.

Fase estacionária	Q2 / Q4 (silanóis geminais)	Q3 / Q4 (silanóis isolados)	% C
Rainin – Ensaio 5 - Tabela 19	0,53	5,82	14,87
Rainin / H ₂ O	0,04	0,54	11,93
Rainin / NH ₄ OH	0,04	0,31	9,13
Kromasil – 55 %, 120 °C / 16 h	0,08	1,50	11,26
Kromasil – 55 %, 140 °C / 16 h	0,08	1,50	11,79
Kromasil / NH ₄ OH	0,14	3,98	10,73
Kromasil / H ₂ O	0,10	3,15	9,05
Kromasil – Ens. 2 – Tabela 30	0,05	0,26	9,7
Kromasil – Ens. 4 – Tabela 30	0,14	2,94	12,0
Kromasil – Ens. 6 – Tabela 33	0,39	5,66	13,77
Kromasil – Ens. 7 – Tabela 33	0,21	3,26	12,73

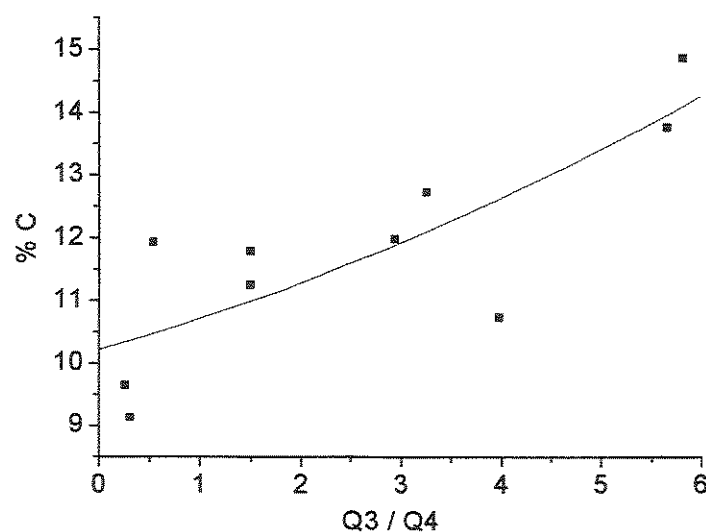


Figura 81: Relação entre a quantidade relativa de silanóis isolados (ou vicinais) na superfície das sílicas e a % C contida na FE.

4.16 – Caracterizações física e química das fases estacionárias preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas com água, ácidos ou bases

Os dados completos de % C, a % perda massa por TGA e o cálculos da massa específica de PMOS retido sobre a sílica, $\overline{m}_{\text{PMOS retido}}$, a porcentagem de PMOS retido e a espessura da camada de polímero formada nas paredes dos poros das sílicas, τ , das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com água, ácidos e bases estão mostrados na Tabela 54.

Foram analisadas somente as FE recheadas de um a dois meses após seu preparo. As análises das FE recheadas após seis meses de repouso não foram realizadas.

Tabela 54: % C, quantidade de PMOS retido, espessura da camada e % perda massa obtida por TGA das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada com água, ácidos e bases.

Amostras – Rainin	% C	$\bar{m}_{\text{PMOS}}$ (g _{PMOS} /g _{sil})	$\bar{m}_{\text{PMOSretido}}$ (g _{PMOS} /g _{sil})	% PMOS retido	τ nm	% perda massa (TGA)
Sem pré-tratamento						
Ens. 3 (Tabela 20)	13,3	0,51	0,27	54,2	1,86	15,8
Ens. 4 (Tabela 20)	14,6	0,72	0,31	43,0	2,18	17,2
Ens. 7 (Tabela 20)	12,3	0,52	0,25	47,3	1,64	Nd
Pré-tratadas						
H ₂ O	11,9	0,78	0,24	30,7	1,68	16,0
H ₂ SO ₄	14,8	0,78	0,31	39,7	2,31	16,3
HCl	13,6	0,78	0,28	35,9	2,03	Nd
HNO ₃	15,6	0,78	0,34	43,5	2,61	Nd
H ₃ PO ₄	14,2	0,78	0,30	38,4	2,21	17,7
NH ₄ OH	9,1	0,78	0,17	21,8	1,40	Nd
EDTA	11,3	0,78	0,22	28,2	1,52	12,9
1-metil-piperidina	9,7	0,78	0,19	24,3	1,29	12,4
NaOH	17,3	0,78	0,38	48,7	3,13	Nd
KOH	17,1	0,78	0,38	48,7	3,07	17,7

Nd = não determinado

Analisando os resultados da Tabela 54 vê-se que a % C e % perda massa por TGA das FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas com H₂O / 24h ou os ácidos nas concentrações de 0,01 mol L⁻¹ / 8 h estão semelhantes às FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento. Nas FE preparadas com a sílica pré-tratada com as bases NH₄OH, EDTA e 1-metil-piperidina, houve uma diminuição da % carbono, confirmado pelos dados de % perda de massa por TGA. Já nas FE

preparadas com a sílica pré-tratada com NaOH e KOH houve um aumento na % C (também confirmado pelo dado de % perda de massa por TGA).

Porém, cromatograficamente todas as FE apresentaram resultados semelhantes, com aumento na assimetria do pico da N,N-dimetilanilina, diminuição no tempo de retenção dos compostos e perda de eficiência com as corridas cromatográficas. Esses resultados sugerem que, com até 17 % de carbono, as FE preparadas com a sílica Rainin ainda contém muitos silanóis residuais, responsáveis pelos comportamentos cromatográficos observados.

Algumas das FE foram caracterizadas por IR e os espectros estão mostrados na Figura 82.

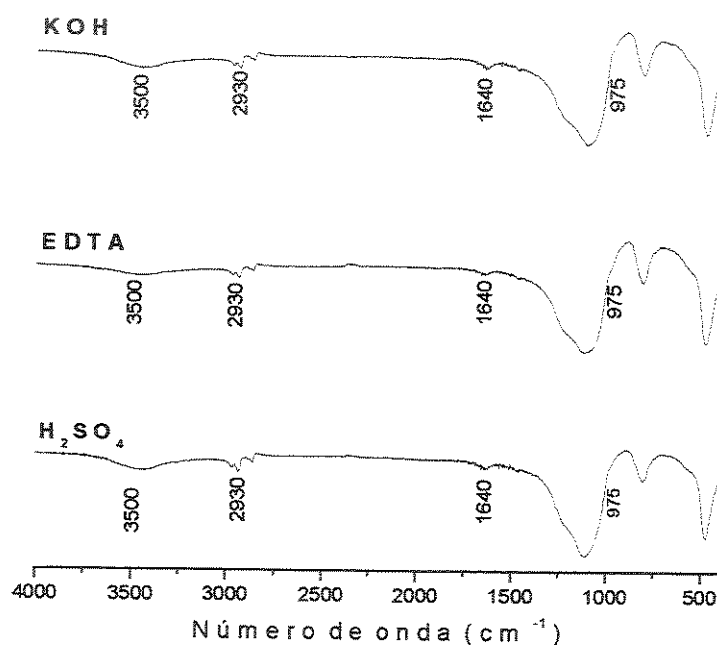
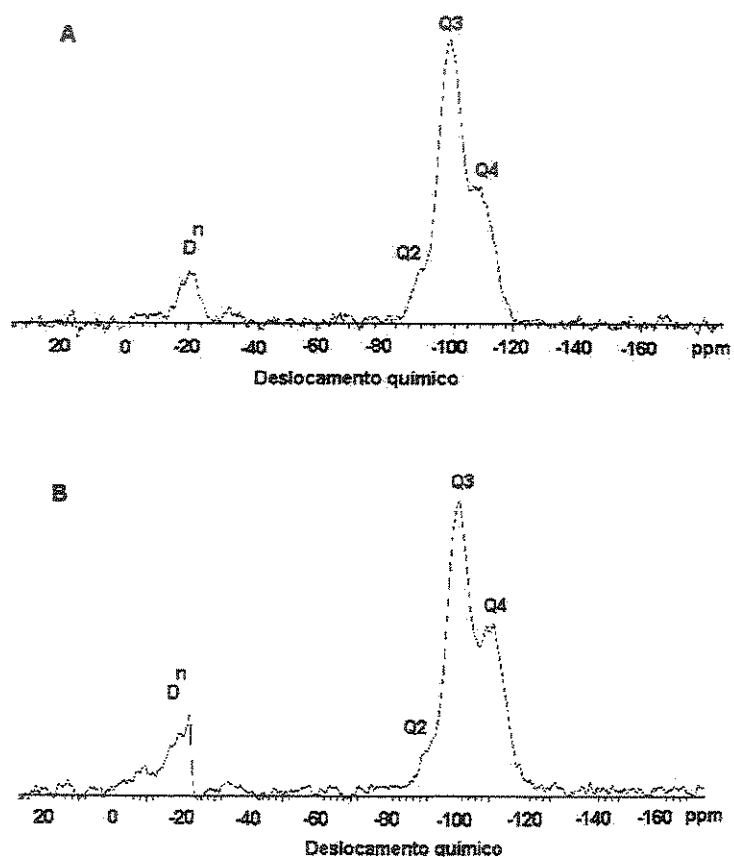


Figura 82: Caracterização por IR das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratadas com ácido e bases.

Observando a Figura 82, vê-se que os picos em torno de 2930 cm⁻¹, referente ao PMOS dentro dos poros da sílica, estão acentuados, mas o aparecimento das bandas 3500 e 1640 cm⁻¹ mostram que ainda há silanóis

residuais nas FE, o que foi confirmado cromatograficamente pelos resultados da MT2, MT3 e MT4.

Também foram feitas caracterizações por CP-MAS ^{29}Si NMR de algumas das FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada, cujos espectros estão mostrados na Figura 83. Também observam-se nesses espectros os sinais característicos da sílica pura em -92 ppm (Q2 = silanóis geminais), -100 ppm (Q3 = silanóis isolados ou vicinais) e -110 ppm (Q4 = ligações siloxano) e o grupo de sinais D^n , que é a sobreposição de vários sinais atribuídos ao PMOS imobilizado (sorvido e quimicamente ligado) sobre a sílica.



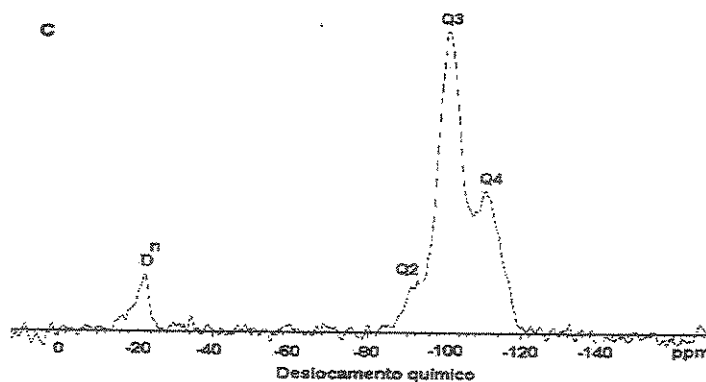


Figura 83: Espectros de CP-MAS ^{29}Si NMR das FE preparadas com as sílicas Rainin pré-tratadas com A) H_2O / 24 h, B) HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h e C) NH_4OH $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ / 8 h em refluxo a 100°C .

4.17 – Estudo da estabilidade das fases estacionárias

Para avaliar a estabilidade das FE em FM neutra, utilizou-se uma coluna preparada com a sílica Kromasil sem pré-tratamento imobilizada a 140°C / 16 h com 55 % PMOS inicial, que obteve bons resultados cromatográficos. O teste foi realizado passando-se através da coluna cromatográfica FM metanol / água 70:30 v/v, à temperatura ambiente, numa vazão de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$. As análises cromatográficas foram feitas injetando-se a MT1 a cada volume determinado de FM passada, diminuindo a vazão para $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. Foram então monitorados os parâmetros de eficiência, assimetria e o fator de retenção do naftaleno, o composto mais retido da MT1.

A Figura 84 mostra resultados cromatográficos de % de perda de eficiência, a assimetria e fator de retenção do naftaleno, após a passagem de 30000 volumes de colunas (V_c) de FM neutra. Os valores de V_c foram calculados pela Equação 26.

$$V_c = \pi \cdot r^2 \cdot L \quad (26)$$

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

Observando a Figura 84, vê-se que a FE se manteve estável após a passagem dos 30000 volumes de coluna de FM, mostrando que a FE é bastante estável à passagem de grande volume de FM neutra. Pelo valor constante do parâmetro de fator de retenção do naftaleno, conclui-se que o PMOS se manteve imobilizado na FE após a passagem do solvente.

Como essa FE suportou a passagem de um grande volume de FM neutra, os próximos testes foram realizados em FM em condições agressivas, com o objetivo de diminuir o tempo de avaliação e economizar solventes. Para isso, utilizou-se um método desenvolvido por Fonseca et al. no LabCrom [85,86]. Esse método consiste na passagem de FM metanol / tampão carbonato 50:50 v/v, pH 8,4, numa vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 60°C .

Esse teste mais agressivo foi aplicado em algumas das FE preparadas com a sílica Kromasil pré-tratada e com a sílica Rainin sem pré-tratamentos (não foram avaliadas as FE preparadas com a sílica Rainin pré-tratada), monitorando-se os mesmos parâmetros cromatográficos descritos anteriormente (para o naftaleno). Os resultados estão mostrados na Figura 85.

Analisando-se a Figura 85, observa-se que as FE preparadas com a sílica Rainin (três curvas que suportam um volume maior de FM) são mais estáveis que as FE preparadas com a sílica Kromasil. É interessante notar que, uma das FE preparadas com a sílica Rainin (ensaio nº 4 do planejamento 2^{4-1} , Tabela 19) suporta o dobro da passagem da FM que a FE preparada com a sílica Kromasil, supondo-se então que, essa FE suportaria a passagem de até 60000 volumes de coluna de FM neutra, nas mesmas condições descritas anteriormente. Esses resultados indicam que FE preparadas com uma sílica mais impura e que contêm a superfície mais ácida, além de produzirem FE com uma maior espessura da camada, são mais estáveis frente a passagem de grande volumes de FM.

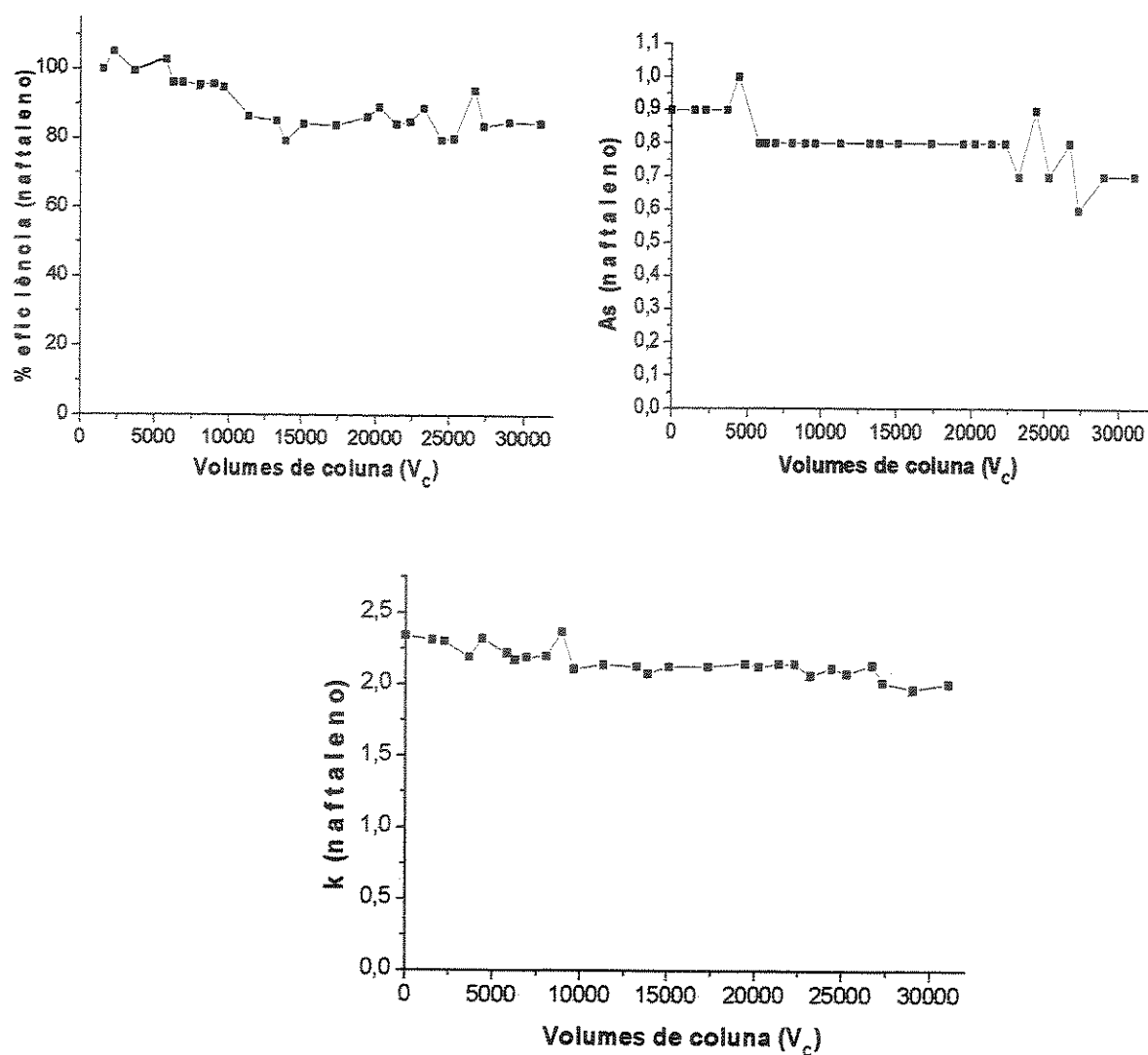
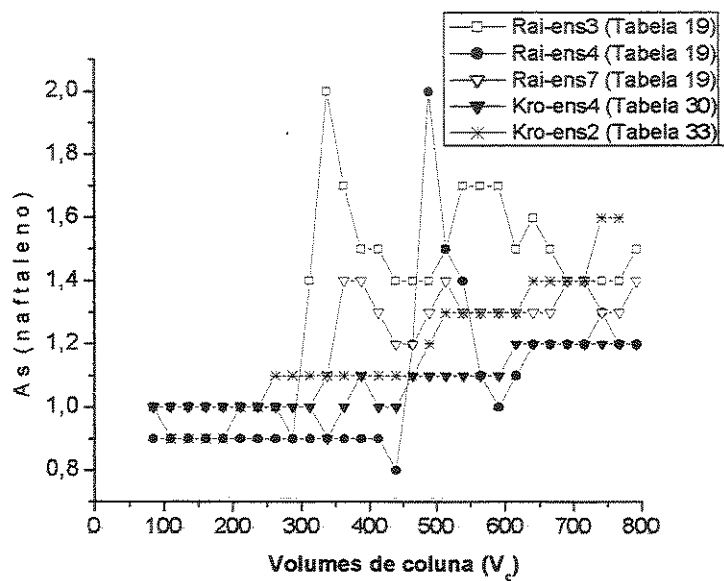
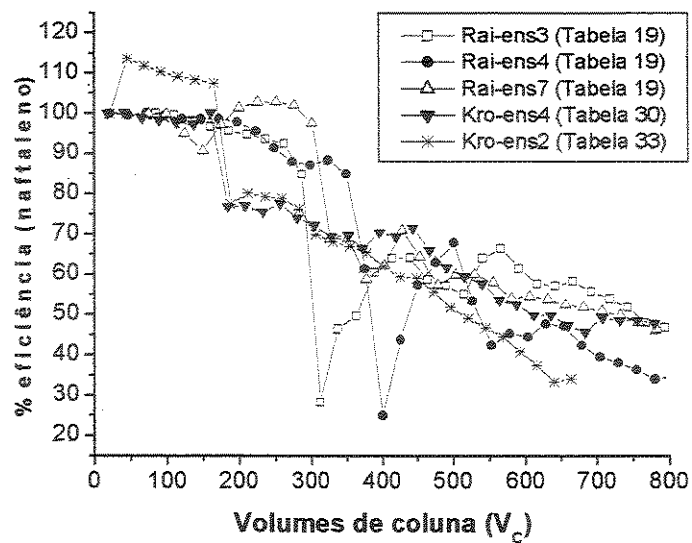


Figura 84: Avaliação da estabilidade da FE preparada com a sílica Kromasil sem pré-tratamento (55 % PMOS inicial, 140 °C / 16 h) em FM neutra metanol / água 70:30 v/v em função dos parâmetros cromatográficos de eficiência, assimetria e fator de retenção do naftaleno.



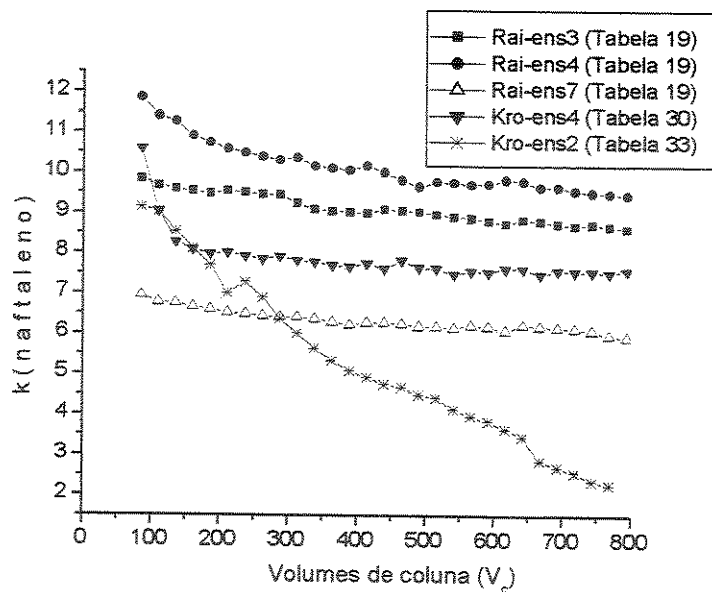


Figura 85: Avaliação da estabilidade das FE preparada com a sílica Kromasil pré-tratada com HNO_3 (55 % PMOS inicial, 120 °C / 16 h) e com aquecimento seguido de tratamento com HNO_3 e a sílica Rainin sem pré-tratamento (ensaios do planejamento fatorial 2^{4+1} , Tabela 19), em condições agressivas, em função dos parâmetros cromatográficos de eficiência, assimetria e fator de retenção do naftaleno.

Na Figura 85 também observa-se que, em duas das colunas avaliadas houve uma queda drástica na % perda de eficiência do naftaleno e depois um rápido aumento, formando um vale nas curvas. Esse comportamento também vem sendo observado por outros alunos no LabCrom e a explicação pode ser devido à um colapso no leito cromatográfico com o fluxo da FM, havendo rápida perda de eficiência da coluna e depois um rearranjo das partículas dentro do leito cromatográfico, voltando à aumentar a sua eficiência.

4.18 – Conclusões da Parte II

As FE preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratadas com água, NH_4OH ou aquecimento a altas temperaturas seguido de tratamento ácido obtiveram bons resultados cromatográficos quando preparadas com 55 % PMOS inicial (120 ou 140 °C por 16 h), semelhantes às FE preparadas com a sílica sem pré-tratamento. Já as FE preparadas com as sílicas Kromasil pré-tratadas com HNO_3 e 55 % PMOS inicial obtiveram perda de eficiência e aumento nas assimetrias dos picos do naftaleno e da N,N-dimetilanilina. Os pré-tratamentos com HNO_3 tornaram a superfície da sílica Kromasil mais ácida e 55 % PMOS inicial não foram suficientes para cobrir todos os silanóis, deixando-os expostos para interagirem mais fortemente com os compostos, causando perda de eficiência e aumento na assimetria dos picos desses compostos. Esses resultados sugeriram que a sílica Kromasil já é de alta pureza e sua superfície aproxima-se de um máximo de hidroxilação, os quais deixam a superfície dessa sílica menos ácida, sem a necessidade de pré-tratamentos antes do preparo das FE.

Os pré-tratamentos da sílica Rainin antes do preparo das FE com água e alguns dos ácidos ou bases avaliados foram eficientes para diminuir a cauda no pico do composto básico N,N-dimetilanilina, mas, devido a presença de grande número de silanóis residuais nessas FE após os pré-tratamentos, os parâmetros cromatográficos não foram repetíveis entre as corridas cromatográficas. Pré-tratamentos de aquecimento a altas temperaturas seguido de tratamento hidrotérmico com ácidos ou bases não foram avaliados com a sílica Rainin, não sendo possível avaliar esses resultados, os quais poderiam ser positivos.

Através dos planejamentos fatoriais foi possível observar que os erros experimentais devido ao procedimento de enchimento das colunas cromatográficas são elevados e esse erro é maior quando as FE são preparadas com sílicas de caráter mais ácidos. Em contrapartida, as FE preparadas com uma sílica de caráter menos ácido, devido à alta pureza e ao alto grau de hidroxilação de sua superfície tornam maiores os pontos ótimos para o preparo das fases, sendo essas mais repetíveis no procedimento de enchimento das colunas.

Os resultados cromatográficos com as MT3 e MT4 mostraram que as FE estacionárias preparadas com as sílicas Kromasil e Rainin, sem pré-tratamentos e após os pré-tratamentos, ainda contém muitos silanóis residuais. Mas, como esses silanóis são mais ácidos na superfície da sílica Rainin, devido à maior quantidade de impurezas metálicas e ao maior número de silanóis isolados mais ácidos, as FE preparadas com esta sílica produz uma alta assimetria no pico do composto básico N,N-dimetilanilina (MT2), que interage fortemente com os silanóis residuais mais ácidos.

É preciso destacar que, através das caracterizações cromatográficas das FE com as diferentes misturas testes foi possível obter muito mais informações a respeito de mudanças sutis ocorridas na superfície das sílicas, a camada polimérica e os mecanismos de retenção dentro do leito cromatográfico do que as informações obtidas pelas análises químicas e físicas, que necessitam de instrumentação e reagentes caros, possuem limite no número de amostras por alunos e professores, além de muitas vezes, não gerarem as informações desejadas.

Os estudos por CP / MAS ^{29}Si NMR das FE mostraram que, embora a presença de silanóis de caráter mais ácidos na superfície das sílicas pode induzir interações com analitos básicos, eles também são os responsáveis por uma interação mais forte com o polímero, tornando a monocamada polimérica sobre a sílica mais espessa e mais estável quimicamente.

O estudo da estabilidade química das FE mostrou que elas são estáveis à passagem de grande volume de fase móvel neutra e que as fases estacionárias preparadas com a sílica Rainin, de caráter mais ácida, são mais estáveis que as FE preparadas com a sílica Kromasil, altamente pura e com alto grau de hidroxilação. Ao decorrer do trabalho também foi observado que a qualidade no enchimento cromatográfico das FE também afeta a estabilidade das mesmas, sendo que as que obtiveram melhores enchimentos, obtiveram os parâmetros cromatográficos mais repetíveis entre as corridas.

5 – CONCLUSÕES FINAIS

As melhores condições de preparo das FE foram: quantidade de PMOS suficiente para encher os poros da sílica mais um excesso de 10 %, seis dias de repouso da FE após seu preparo e 120 ou 140 °C por 8 h para as condições de imobilização térmica, apresentado boa separação dos componentes das misturas testes, altas eficiências e resistência à passagem de grande volume de fase móvel neutra. Os estudos da estabilidade das FE em condições agressivas mostraram que as FE preparadas com a sílica Rainin são mais estáveis que as FE preparadas com a sílica Kromasil, atribuído à maior quantidade de impurezas metálicas e silanóis isolados mais ácidos presentes na superfície da sílica Rainin, responsáveis pela formação de uma monocama polimérica mais espessa sobre esta sílica, que as tornam mais estáveis.

Os parâmetros calculados a partir das diferentes misturas testes mostraram que as FE preparadas nas melhores condições ainda contêm grande quantidade de silanóis residuais, mas, sendo a sílica Kromasil mais pura e com maior grau de hidroxilação da superfície do que a sílica Rainin, não há forte interação com o composto básico N,N-dimetilanilina, com picos simétricos. Porém, as FE preparadas com a sílica Rainin obtiveram acentuadas caudas para o pico do composto básico, atribuído a maior quantidade de impurezas metálicas e a presença de grupos silanóis isolados mais ácidos presentes na superfície dessa sílica, que interagem mais fortemente com a N,N-dimetilanilina.

Os pré-tratamentos da sílica Rainin com água e com algumas das soluções ácidas e básicas foram eficazes para reduzirem a acidez na superfície dessa sílica e diminuir a assimetria no pico da N,N-dimetilanilina até valores aceitáveis. Porém, devido ao grande número de silanóis residuais ainda presentes nessas fases estacionárias, os parâmetros cromatográficos não foram repetíveis entre as corridas cromatográficas, havendo perda de eficiência, aumento na assimetria do pico da N,N-dimetilanilina e mudança no tempo de retenção dos compostos.

Os estudos da superfície das sílicas também mostraram que, embora a presença de impurezas metálicas e a quantidade de silanóis mais ácidos interajam

fortemente com componentes básicos, causando cauda no pico desses compostos, eles são responsáveis por uma interação mais forte com o polímero, formando uma monocamada de polímero mais densa sobre a sílica e FE mais estáveis, já que suportes mais impuros são menos sujeitas à dissolução e a cobertura mais densa protege melhor a sílica do ataque químico pela FM.

O procedimento de enchimento das colunas cromatográficas mostrou-se um fator que gera grande erro experimental, sendo que duas colunas cromatográficas recheadas, uma seguida da outra, podem diferir significativamente em termos de respostas cromatográficas. O reconhecimento de problemas relacionados ao enchimento das colunas é difícil, mas algumas características, como a cauda frontal, a perda de eficiência e de resolução, são alguns dos problemas relacionados ao enchimento cromatográfico. Quando se suspeita de problemas sistemáticos relacionados ao enchimento cromatográfico deve-se tomar as providências necessárias, iniciando-se pela limpeza e o polimento das peças das colunas e da bomba cromatográfica e a pureza dos solventes utilizados.

A qualidade da sílica utilizada no preparo das FE pareceu também influenciar na qualidade do enchimento cromatográfico. Sílicas com a superfície menos ácida e mais homogênea (maior quantidade de silanóis ligados por ligação de hidrogênio) levam à formação de uma camada polimérica mais homogênea sobre a sílica, que têm maior probabilidade de serem recheadas com sucesso.

Foi dado em destaque especial às caracterizações cromatográficas das FE com as diferentes misturas testes, cujos resultados oferecem mais informações a respeito de mudanças sutis ocorridas na superfície das sílicas, a camada polimérica e os mecanismos de retenção dentro do leito cromatográfico do que as informações obtidas pelas análises químicas e físicas das FE, que possuem as desvantagens de necessitarem de instrumentação e reagentes caros, há limites para o número de amostras e muitas vezes não geram as informações desejadas.

As FE preparadas apresentaram excelentes desempenhos cromatográficos e de estabilidade e devem continuar sendo exploradas. Para os trabalhos futuros no LabCrom, o desafio é propor procedimentos capazes de bloquear os silanóis residuais das FE, que interagem fortemente com compostos básicos. Alguns

desses procedimentos são sugeridos, como o capeamento das FE com polímeros de cadeia curta, o entrecruzamento das cadeias do polímero e o maior tempo de repouso das FE para que mais polímero seja auto-imobilizado, ou ainda, mais estudos com a % polímero inicial (fator altamente significativo) e as temperaturas de imobilização térmica, capazes de proporcionar a formação de uma bicamada de polímero sobre a sílica.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S., "Introdução a Métodos Cromatográficos", Editora da Unicamp, 6ª Ed., Campinas, 1994.
- [2] NEUE, U. D. "HPLC Columns, Theory, Technology and Practice" Wiley, New York, 1997.
- [3] SNYDER, L. R., J. S. KIRKLAND, GLAJCH, J. L., "Practical HPLC Method Development", 2ª ed., Wiley, New York, 1997.
- [4] VANSANT, E. F.; VAN DER VOORT, P.; VRANCKEN, K. C., "Characterization and Chemical Modification of the Silica Surface", Elsevier, Amsterdam, 1995.
- [5] POOLE, C. F.; POOLE, S. K., "Chromatography Today", Elsevier, New York, 1991.
- [6] ZHURAVLEV, L. T., The Surface Chemistry of Amorphous Silica. Zhuravlev Model, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **173** (2000) 1.
- [7] NAWROCKI, J., The Silanol Group and its Role in Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* **779** (1997) 29.
- [8] NAWROCKI, J., MOIR, D. L., SZCEZEPANIAK, W., Trace Metal Impurities in Silica as a Cause of Strongly Interacting Silanols, *Chromatographia* **28** (1989) 143.
- [9] NAWROCKI, J., Silica Surface Controversies, Strong Adsorption Sites, Their Blockage and Removal. Part I, *Chromatographia* **31** (1991) 177.
- [10] NAWROCKI, J., Silica Surface Controversies, Strong Adsorption Sites, Their Blockage and Removal. Part II, *Chromatographia* **31** (1991) 193.
- [11] STELLA, C., RUDAZ, S., VEUTHEY, J. L., TCHAPLA, A., Silica and Other Materials as Support in Liquid Chromatography. Chromatographic Test and Their Importance for Evaluating These Supports. Part I, *Chromatographia Supplement* **53** (2001) S-113.
- [12] VERZELE, M., DE POTTER, M., Trace Elements in HPLC Silica Gel, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **2** (1979) 151.
- [13] VERZELE, M., DEWAELE, C., Stationary Phase Characterization in High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.* **217** (1981) 399.
- [14] VERZELE, M., DEWAELE, C., The Evaluation of "Reversed Phase" High-Performance Liquid Chromatography Packing Materials, *Chromatographia* **18** (1984) 84.
- [15] VAN DER DRIEST, P. J., RITCHIE, H. J., Influence of Silica Gel Pretreatment and Bonding Technique on PAH Selectivity of Octadecyl Bonded Phase, *Chromatographia* **24** (1987) 324.
- [16] UNGER, K. K., LORK, K. D., PFLEIDERER, B., ALBERT, K., BAYER, E., Impact of Acidic/Hydrothermal Treatment on Pore Structural and Chromatographic Properties of Porous Silicas, *J. Chromatogr.* **556** (1991) 395.
- [17] OHTSU, Y., SHIOJIMA, Y., OKUMURA, T., KOYAMA, J., NAKAMURA, K., NAKATA, O., KIMATA, K., TANAKA, N., Performance of Polymer-Coated Silica C-18 Packing Materials Prepared from High Purity Silica Gel, *J. Chromatogr.* **481** (1989) 147.
- [18] OKAMOTO, M., NOBUHARA, K., MASATANI, M., JINNO, K., Preparation of Octadecyl Modified Column Gels Using Heat-Treated Silicas and Their Retention

Behaviour in High-Performance Liquid Chromatography, *Chromatographia* **33** (1992) 203.

[19] BARRET, D. A., BROWN, V. A., WATSON, A., DAVIES, M. C., SHAW, P. N., RITCHIE, H. J., Effects of Acid Treatment on the Metal Content of Chromatographic Silica: Bulk Analysis, Surface Analysis and Chromatographic Performance of Bonded Phases, *J. Chromatogr. A* **905** (2001) 69.

[20] VAN DER VOORT, P., VANSANT, E. F., Silylation of the Silica Surface: a Review, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **19** (1996) 2723.

[21] SCOTT, R. P. W., "Silica Gel and Bonded Phases. Their Production, Properties and Use in LC", Wiley, New York, 1993.

[22] BUSZEWSKI, B., JEZIERSKA, M., WELNIAK, M., BEREK, D., Survey and Trends in the Preparation of Chemically Bonded Silica Phases for Liquid Chromatographic Analysis, *J. High Resolut. Chromatogr.* **21** (1998) 267.

[23] BUSZEWSKI, B., Influence of Silica Gel Surface Purity on the Coverage Density of Chemically Bonded Phases, *Chromatographia* **34** (1992) 573.

[24] KÖHLER, J., CHASE, D. B., FARLEE, R. D., VEGA, A. J., KIRKLAND, J. J., Comprehensive Characterization of Some Silica-Based Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* **352** (1986) 275.

[25] KIRKLAND, J. J., VAN STRATEN, M. A., CLAESSENS, H. A., High pH Mobile Phase Effects on Silica-Based Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Columns, *J. Chromatogr. A* **691** (1995) 3.

[26] TONHI, E., COLLINS, K. E., JARDIM, I. C. S. F., COLLINS, C. H., Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) Baseadas em Superfícies de Óxido Inorgânicos Funcionalizados, *Quim. Nova* **25** (2002) 616.

[27] SCHOMBURG, G., DEEGE, A., KÖHLER, J., BIEN-VOGELSANG, U., Immobilization of Stationary Liquids in Reversed and Normal Phase Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.* **282** (1983) 27.

[28] SCHOMBURG, G., KÖHLER, J., FIGGE, H., DEEGE, A., BIEN-VOGELSANG, U., Immobilization of Stationary Liquids on Silica Particles by γ -Radiation. *Chromatographia* **18** (1984) 265.

[29] BIEN-VOGELSANG, U., DEEGE, A., FIGGE, H., KÖHLER, J., Syntheses of Stationary Phase for Reversed-Phase LC Using Silanization and Polymer Coating. *Chromatographia* **19** (1984) 170.

[30] ANAZAWA, T. A., JARDIM, I. C. S. F., Polymethyloctylsiloxane Adsorbed on Porous Silica as a Packing Material for Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography, *J. Liq. Chromatogr.* **17** (1994) 1265.

[31] ANAZAWA, T. A., CARRARO, F., COLLINS, K. E., JARDIM, I. C. S. F., Stability of High Performance Liquid Chromatography Columns Packed with C-1 and C-8 Polysiloxanes Sorbed into Porous Silica Particles, *J. Chromatogr. A* **697** (1995) 159.

[32] ANAZAWA, T. A., "Preparação, Caracterização e Avaliação de Diferentes Fases Estacionária Reversas, Tipo C-8, para CLAE", Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1996.

[33] ANAZAWA, T. A., JARDIM, I. C. S. F., The Chromatographic Behavior of Coated Stationary Phases with Different Silicas, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **21** (1998) 645.

- [34] SILVA, R. B., "Preparação de Fases Estacionárias para CLAE a Partir de Poli(methyloctylsiloxano) Sobre Sílica Titanizada", Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2001.
- [35] BOTTOLI, C. B. G., "Sorção, Imobilização e Extração de Polissiloxanos em Sílicas Porosas para Uso em CLAE", Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2002.
- [36] BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, K. E., COLLINS, C. H., Chromatographic Evaluation of Self-Immobilized Stationary Phases for Reversed-Phase Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* **987** (2003) 87.
- [37] LOPES, N. P., "Fases Estacionárias de Sílica e Polibutadieno para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Tese de Doutorado, Campinas, 2004.
- [38] MORAIS, L. S. R., "Preparação de Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a Partir de Sílica Titanizada e Polibutadieno", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2003.
- [39] COLLINS, K. E., BOTTOLI, C. B. G., VIGNA, C. R. M., BACHMANN, S., ALBERT, K., COLLINS, C. H., Self-Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) on High-Performance Liquid Chromatographic Silica, *J. Chromatogr. A* **1029** (2004) 43.
- [40] VIGNA, C. M., "Tratamento Térmico na Imobilização de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência", Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 2004.
- [41] COLLINS, K. E., SÁ, A. L. A., BOTTOLI, C. B. G., Poly(alkylmethylsiloxanes) Thermally Immobilized on Silica as Stationary Phase for High-Performance Liquid Chromatography, *Chromatographia* **53** (2001) 661.
- [42] BOTTOLI, C. B. G., CHAUDHRY, Z. F., FONSECA, D. A., COLLINS, K. E., COLLINS, C. H., Poly(alkylmethylsiloxane) Thermally Immobilized on Silica as Stationary Phase for High Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* **948** (2002) 121.
- [43] BOTTOLI, C. B. G., VIGNA, C. R. M., FISCHER, G., ALBERT, K., COLLINS, K. E., COLLINS, C. H., Self-immobilization and/or Thermal Treatment for Preparing Silica-Poly(methyloctylsiloxane) Stationary Phases, *J. Chromatogr. A* **1030** (2004) 217.
- [44] TONHI, E., BACHMANN, S., ALBERT, K., JARDIM, I. C. S. F., COLLINS, K. E., COLLINS, C. H., High-Performance Liquid Chromatographic Stationary Phases Based on Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on Silica I. Chromatographic Evaluation, *J. Chromatogr. A* **948** (2002) 97.
- [45] TONHI, E., COLLINS, K. E., COLLINS, C. H., High-Performance Liquid Chromatographic Stationary Phases Based on Poly(methyloctylsiloxane) immobilized on Silica II. Physical and Chemical Characterizations, *J. Chromatogr. A* **948** (2002) 109.
- [46] TONHI, E., COLLINS, K. E., COLLINS, C. H., High-Performance Liquid Chromatographic Stationary Phases Based on Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized on Silica III. Stability Evaluations. *J. of Chromatogr. A* **987** (2003) 93.
- [47] TONHI, E., Preparação de colunas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência recheadas com polissiloxano (C1, C8 e C14) imobilizados sobre partículas de sílica porosa de 5 micrometros. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.

- [48] JARDIM, I. C. S. F., COLLINS, K. E., ANAZAWA, T. A., Radiation Immobilization of Poly(methyloctylsiloxane) on Silica for Use in HPLC: A Uniforme Layes Model, *J. Chromatogr. A* **845** (1999) 423.
- [49] SILVA, R. B., COLLINS, C. H., Chromatographic Evaluation of Radiation-Immobilized Poly(methyloctylsiloxane) on Titanium-Grafted Silica, *J. Chromatogr. A* **845** (1999) 417.
- [50] SILVA, R. B., COLLINS, K. E., COLLINS, C. H., Effects in High Performance Liquid Chromatography of High pH in the Mobile Phase on Poly(methyloctylsiloxane) Immobilized by γ -Radiation on Titanium-Grafted Silica, *J. Chromatogr. A* **869** (2000) 137.
- [51] MELO, L. F. C., JARDIM, I. C. S. F., Development of C-8 Stationary Phases Immobilized by γ -Radiation on Zirconized Silica for High-Performance Liquid Chromatographic Applications, *J. Chromatogr. A* **845** (1999) 423.
- [52] MELO, L. F. C., COLLINS, C. H., COLLINS, K. E., JARDIM, I. C. S. F., Stability of High Performance Liquid Chromatography Columns Packed with Poly(methyloctylsiloxane) Sorbed and Radiation-Immobilized onto Porous Silica and Zirconized Silica, *J. Chromatogr. A* **869** (2000) 129.
- [53] FONSECA, D. A., "Fases Estacionárias Reversas Baseadas em Silica Titanizada, com Poli(metiloctilsiloxano) Imobilizado por Diferentes Tratamentos", Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2003.
- [54] COLLINS, K. E., GRANJA, M. L. M. M., PEREIRA FILHO, R. G., ANAZAWA, T. A., JARDIM, I. C. S. F., The Spatial Distribution of Poly(methyloctylsiloxane) Deposited by Solvent Evaporation in the Pores of HPLC Silica Particles. *Chromatographia* **45** (1997) 99.
- [55] BARTLE, K. D., WOLLEY, C. L., MARKIDES, K. E., LEE, M. L., HANSEN, R. S., Rayleigh Instability of Stationary Phase Films in Capillary Column Chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **10** (1987) 128.
- [56] SOMASUNDARAN, P., KRISHNAKUMAR, S., Adsorption of Surfactants and Polymers at the Solid-Liquid Interface. *Colloids Surf. A: Physicochem Eng Aspects* **123-124** (1997) 491.
- [57] ADAMSON, A. W., GAST, A. P., "Physical Chemistry of Surfaces", 6^o Ed., Wiley, New York, 1997.
- [58] COLLINS, C. H. DE ALQUINO NETO, F. R., DA SILVA, J. R. P., Terminologia em Cromatografia. Parte II. Símbolos para Cromatografia, *Quim. Nova* **12** (1989) 92.
- [59] WESTON, A., BROWN, P. R., "HPLC and CE: Principles and Practice", Academic, San Diego, 1997.
- [60] DOLAN, J. W., Why Do Peaks Tail?, *LC-GC No. Am.* **21** (2003) 612.
- [61] SNYDER, L. R., J. S. KIRKLAND, GLAJCH, J. L., "Practical HPLC Method Development", 2^o Ed., Wiley, New York, 1997.
- [62] EUERBY, M. R., PETERSSON, P., Chromatography Classification and Comparison of Commercially Available Reversed-Phase Liquid Chromatographic Columns Using Principal Components Analysis, *J. Chromatogr. A* **994** (2003) 13.
- [63] GILPIN, R. K., Liquid Chromatography Problem Solving and Troubleshooting, *J. Chromatogr. Sci* **39** (2001) 535.

- [64] SANDER, L. C., WISE, S. A., A New Standard Reference Material for Column Evaluation in Reversed-Phase Liquid Chromatography, *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 283.
- [65] McCALLEY, D. V., Selection of Suitable Stationary Phases and Optimum Conditions for Their Application in the Separations of Basic Compounds by Reversed-Phase HPLC, *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 187.
- [66] ENGELHARDT, H., ARANGIO, M., LOBERT, T., A Chromatographic Test Procedure for Reversed-Phase HPLC Column Evaluation, *LC-GC* **15** (1997) 856.
- [67] SNYDER, L. R., DOLAN, J. W., Characterizing Reversed-Phase Column Selectivity, *LC-GC No. Am.* **20** (2002) 1016.
- [68] CRUZ, E., EUERBY, M. R., JOHNSON, C. M., HACKETT, C. A., Chromatographic Classification of Commercially Available Reversed-Phase HPLC Columns, *Chromatographia* **44** (1997) 151.
- [69] NEUE, U. D., SEROWIK, E., IRANETA, P., ALDEN, B.A., WALTER, T. H., Universal Procedure for the Assessment of the Reproducibility and the Classification of Silica-Based Reversed-Phase Packings - I. Assessment of the Reproducibility of Reversed-Phase Packings, *J. Chromatogr. A* **849** (1999) 87.
- [70] KIMATA, K., IWAGUCHI, K., ONISHI, S., JINNO, K., EKSTEEN, R., HOSOYA, K., ARAKI, M., TANAKA, N., Chromatographic Characterization of Silica C-18 Packing Materials – Correlation Between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase, *J. Chromatogr. Sci.* **27** (1989) 721.
- [71] VERZELE, M.; DEWAELE, C., Stationary Phase Characterization in High-Performance Liquid Chromatography, *J. Chromatogr.* **217** (1981) 399.
- [72] ENGELHARDT, H., LOBERT, T., Chromatographic Determination of Metallic Impurities in Reversed-phase HPLC Columns, *Anal. Chem.* **71** (1999) 1885.
- [73] VISKY, D., HEYDEN, Y. V., IVÁNYI, T.; BATEN, P., DE BEER, J., KOVÁCS, Z., NOSZÁL, B., DEHOUCK, P., ROETS, E., MASSART, D. L., HOOGMARTENS, J., Characterisation of Reversed-Phase Liquid Chromatographic Columns by Chromatographic Tests, Rational Columns Classification by a Minimal Number of Columns Test Parameters, *J. Chromatogr. A* **1012** (2003) 11.
- [74] SÁNDI, Á., BEDE, Á., SZEPESY, L., RIPPEL, G., Characterization of Different RP-HPLC Columns by Gradient Elution Technique, *Chromatographia* **45** (1997) 206.
- [75] EUERBY, M. R., PETERSSON, P., A Classification of Commercially Available RPLC Columns – A Tool for Rational Selection Find out Choose the Most Appropriate RPLC Columns for your Applications, *LC-GC-Eur.* **13** (2000) 665.
- [76] MCMASTER, M. C., "HPLC, A practical user's guide", VCH, New York, 1994.
- [77] BRISTOW, P. A.; BRITTAIN, P. N.; RILEY, C. M.; WILLIAMSON, B. F., Upward Slurry Packing of Liquid-Chromatography Columns, *J. Chromatogr.* **131** (1977) 57.
- [78] SHALLIKER, R. A.; BROYLES, B. S.; GUICHON, G., Evaluation of the Secondary Consolidation of Columns for Liquid Chromatography by Ultrasonic Irradiation, *J. Chromatogr. A* **878** (2000) 153.
- [79] VERZELE, M.; DEWAELE, C.; DUQUET, D., Observations and Ideas on Slurry Packing of Liquid-Chromatography Columns, *J. Chromatogr.* **391** (1987) 111.

- [80] VISSERS, J. P. C.; CLAESSENS, H. A.; LAVEN, J.; CRAMERS, C. A., Colloid-Chemical Aspects of Slurry Packing Techniques in Microcolumn Liquid-Chromatography, *Anal. Chem.* **67** (1995) 2003.
- [81] VERZELE, M., Miniaturization of the Particle-Size and Low Dispersion Liquid-Chromatography – Low Viscosity Solvent Upward Packing Procedure, *J. Chromatogr.* **295** (1984) 81.
- [82] VIEIRA, S., HOFFMANN, R., “Estatística Experimental”, Editora Atlas, São Paulo, 1989.
- [83] BARROS N., B., SCARMINO, I. S., BRUNS, R. E., “Como fazer experimentos”, Editora da Unicamp, Campinas, 2001.
- [84] COLLINS, K. E.; FRANCHON, JARDIM, I. C. S. F.; RADOVANOVIC, E.; GONÇALVES, M. C., The Effects of Inner Surface Roughness of Microbore Column Blanks on Column Performance, *LC-GC*, **18** (2000) 106.
- [85] FONSECA, D. A., “Desenvolvimento de um Novo Procedimento de Avaliação de Estabilidade de Fases Estacionárias para CLAE”, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2001.
- [86] FONSECA, D. A., GUTIERREZ, H. R., COLLINS, K. E., COLLINS, C. H., J. Chromatogr. A, Rapid Method for Evaluating Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Column Stability, *J. Chromatogr. A* **1030** (2004) 149.
- [87] MENEZES, M. Â. B. C., “Avaliação da Exposição e Contaminação por Metais em Galvanoplastias Utilizando Filtros de Ar e Biomonitorios”, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.
- [88] SABINO, C. V. S., MONTOYA, E. H. R., KUSTNER, G. F., FRANCO, M. B., “Testes Relativos a Implantação do Método k_0 no Reator IPR-R1. Centro de Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, 1995 (NT-805-95).
- [89] ADLOFF, J. P., GUILLAUMONT, R., “Fundamentals of Radiochemistry”, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- [90] LIESER, K. H., “The k_0 – Standardization Method; A Move to the Optimization of Neutron Activation Analysis”, VCH, Verlagsgesellschaft mbH, 1997.
- [91] MONTOYA ROSSI, E. H., “Evaluacion y Estandarizacio del Analisis por Activacion Neutronica Segun el Metodo del k_{sub} Cero em el Reactor Nuclear PR-10; Estúdio Preliminar Empleando Irradiaciones Cortas”, Tese de Doutorado - Escuela Peruana de Postgrado Victor Aezamona Castro, Universidade Peruana Cayetano Heredia, Lima, 1995.
- [92] ILER, R. K., “The Chemistry of Silica”, Wiley, New York, 1979.
- [93] MEYER, V., “Practical High-Performance Liquid Chromatography”, 3º Ed., Wiley, New York, 1999.
- [94] BUSZEWSKI, B., KRUPCZYNSKA, K., GADZATA-KOPCIUCH, R. M., RYCHLICKI, G., KALISZAN, R. Evaluation of HPLC Columns: A Study on Surface Homogeneity of Chemically Bonded Stationary Phases, *J. Sep. Sci.* **26** (2003) 313.
- [95] FONSECA, D. A., COLLINS, K. E., COLLINS, C. H., Titanized Silica-Based Stationary Phases Prepared With Thermally and Microwave-Immobilized Poly(methyloctylsiloxane), *J. Chromatogr. A* **1030** (2004) 209.