

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**FASES ESTACIONÁRIAS DE POLI(METIL-3,3,3-
TRIFLUORPROPILSILOXANO) IMOBILIZADAS SOBRE
SUPORTES DE SÍLICA PARA CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA. PREPARO E
CARACTERIZAÇÃO.**

**Liane Maldaner
Tese de Doutorado**

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim

**Campinas - SP
Fevereiro de 2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
DA UNICAMP

M292f	<p>Maldaner, Liane. Fases estacionárias de poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) imobilizadas sobre suportes de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Preparo e caracterização / Liane Maldaner. -- Campinas, SP: [s.n], 2010</p> <p>Orientadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim.</p> <p>Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Fases estacionárias. 2. Poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano). 3. CLAE-FR. I. Jardim, Isabel Cristina Sales Fontes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	---

Título em inglês: Stationary phases of poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane) immobilized onto silica supports for reversed-phase high performance liquid chromatography. Preparation and characterization

Palavras-chaves em inglês: Stationary phases, Poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane), RP-HPLC

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (orientadora), Susanne Rath (IQ-Unicamp), Ivo Milton Raimundo Júnior (IQ-Unicamp), Martha Bohrer Adaime (DQ-UFSM), Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz (DQ-UFV)

Data de defesa: 25/02/2010

AGRADECIMENTOS

À minha família e ao Rafael,
por estarem sempre ao meu lado.
Obrigada!

À Prof^a. Isabel Jardim, pela oportunidade de realização desse trabalho, pela orientação segura, pelos ensinamentos deixados e pela confiança e liberdade para conduzir o meu trabalho. Em especial, pela amizade e pela torcida e incentivo no meu crescimento profissional.

À Prof^a. Carol Collins, pela colaboração, sugestões e envolvimento no desenvolvimento do meu trabalho.

À Lais e ao Anízio, pelas muitas discussões e contribuições ao longo do trabalho. Pela amizade e companheirismo.

Aos colegas e amigos do LabCrom: Ana Paula, Adriana, Bianca, Camila, Carla, Fernanda, Gizelle, Lucília, Louise, Mariza, Milena, Priscila, Patrícia e Rafael, pelo convívio e bons momentos.

À FAPESP pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

E, a todos os demais que contribuíram para a realização desse trabalho.

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

MESTRADO EM ENGENHARIA QUÍMICA – DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS - Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil. *Título:* Desenvolvimento e validação de método para determinação de agrotóxicos em grãos de soja. *Obtenção:* 2007. *Orientação:* Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana (orientador) e Prof^a. Dr^a. Isabel Cristina Sales Fontes Jardim (co-orientadora). *Bolsista:* FAPESP.

GRADUAÇÃO EM QUÍMICA INDUSTRIAL – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, RS, Brasil. *Obtenção:* 2004.

INICIAÇÃO CIENTÍFICA: *Título:* Imobilização de fases estacionárias polares, através do uso da radiação ultravioleta, para uso em cromatografia gasosa. *Orientação:* Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime. *Bolsista:* PIBIC/CNPq. *Período:* 12/2002 a 08/2004.

EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

MONITORA DA DISCIPLINA QUÍMICA III (Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas. *Período:* 02/2008 a 07/2008.

MONITORA DA DISCIPLINA QUÍMICA ANALÍTICA QUALITATIVA – Universidade Federal de Santa Maria. *Período:* 01/2002 a 04/2002.

INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS NACIONAIS: 14

TRABALHOS PUBLICADOS EM EVENTOS INTERNACIONAIS: 10

ARTIGOS CIENTÍFICOS

L. Maldaner, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, *submetido*.

L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim, Preparation and characterization of a microwave-immobilized fluorinated stationary phase for RP-HPLC, *submetido*.

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

L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim, O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência, *Quím. Nova* 32 (2009) 214 - 222.

L. Maldaner, C.C. Santana, I.C.S.F. Jardim, HPLC determination of pesticides in soybeans using matrix solid phase dispersion, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (2008) 972 - 983.

A.M. Faria, **L. Maldaner**, C.C. Santana, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, Poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto silica for extraction of multiclass pesticides from surface waters, *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 34 - 40.

RESUMO

FASES ESTACIONÁRIAS DE POLI(METIL-3,3,3-TRIFLUORPROPILSILOXANO) IMOBILIZADAS SOBRE SUPORTES DE SÍLICA PARA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA EM FASE REVERSA. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO. Novas fases estacionárias (FE) fluoradas foram preparadas a partir da imobilização do poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) (PMTFS) em partículas de sílica Kromasil de 5 μm , por tratamento térmico (TT) ou por radiação micro-ondas (RM). As condições de imobilização otimizadas através do emprego de planejamento de experimentos foram, 200 °C por 12 horas para o TT e 126 °C (760 W) por 50 minutos para a RM. A caracterização físico-química permitiu concluir que o polímero ficou fisicamente adsorvido e também quimicamente ligado à superfície do suporte cromatográfico, em ambos os procedimentos de imobilização, resultando em porcentagens de carbono de 9 % e 10 % para as FE obtidas por TT e por RM, respectivamente. A caracterização cromatográfica mostrou que as FE desenvolvidas apresentaram eficiências $> 70.000 \text{ N m}^{-1}$, características hidrofóbicas, seletividade estérica e metilênica e uma pequena interação entre os compostos básicos e os grupos silanóis residuais. Esta redução das interações indesejáveis pode estar associada com a presença dos átomos de flúor que promovem diferentes interações com os compostos básicos e, dessa forma, reduzem estes efeitos. As FE fluoradas foram seletivas para a separação de isômeros de posição e de fármacos, sendo uma alternativa atrativa às FE tradicionais.

ABSTRACT

STATIONARY PHASES OF POLY(METHYL-3,3,3-TRIFLUOROPROPYLSILOXANE) IMMOBILIZED ONTO SILICA SUPPORTS FOR REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. PREPARATION AND CHARACTERIZATION. New fluorinated stationary phases (SP) were prepared through thermal or microwave immobilization of poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane) (PMTFS) onto 5 μm Kromasil silica particles. The immobilization conditions were optimized employing experimental design and resulted in 200 $^{\circ}\text{C}$ for 12 hours for thermal treatment and 126 $^{\circ}\text{C}$ (760 W) for 50 minutes for microwave irradiation. Physical-chemical characterization showed that the polymer was both physically adsorbed and chemically bonded to the chromatographic support, in both immobilization procedures, resulting in a percent carbon load of 9 % and 10 % for the SP immobilized by thermal treatment and by microwave irradiation, respectively. Chromatographic characterization showed that the SP developed presented efficiencies $> 70\ 000\ \text{N}\ \text{m}^{-1}$, hydrophobic characteristics, steric and methylene selectivity and small interactions between the basic compounds and the residual silanol groups. This reduction of the undesirable interactions can be associated to the presence of the fluorine atoms that promote different interactions with the basic compounds and thus reduce these effects. The fluorinated SP were selective for the separation of positional isomers and pharmaceuticals and are an attractive alternative to the classical reversed stationary phases.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1 – Apresentação do Trabalho.....	1
CAPÍTULO 2 – Fases Estacionárias Modernas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa.....	5
CAPÍTULO 3 – A New Thermally Immobilized Fluorinated Stationary Phase for RP-HPLC.....	35
CAPÍTULO 4 – Preparation and Characterization of a Microwave-Immobilized Fluorinated Stationary Phase for RP-HPLC	55
CAPÍTULO 5 – Considerações Finais e Sugestões para Trabalhos Futuros.....	78
CAPÍTULO 6 – Conclusão	84

LISTA DE ABREVIATURAS

CLAE-FR – cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CL-EM – cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CLC – cromatografia líquida clássica
CLUE – cromatografia líquida de ultra eficiência
EFS – extração em fase sólida
FE – fase estacionária
FEQL – fase estacionária quimicamente ligada
FM – fase móvel
FN – fase normal
FR – fase reversa
GP – grupo polar
GPE – grupo polar embutido
GTI – grupo trocador iônico
HFD – ((heptadecafluordecil)dimetilsilil)
HILIC – do inglês, *hydrophilic interaction chromatography*
HMDS – hexametildissilazano
IR – do inglês, *infrared spectroscopy*
IR – índice de refração
IV – espectroscopia de absorção no infravermelho
PES – policondensação de polietoxissiloxano
PEEK – poli(éter-éter-cetona)
PVDF – do inglês, *polyvinylidene fluoride*
PTFE – do inglês, *polytetrafluorethylene*
PMTFS – poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano); do inglês, *poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane)*
PBD – polibutadieno; do inglês, *polybutadiene*
PMTDS – poli(metiltetradecilsiloxano); do inglês, *poly(methyltetradecylsiloxane)*
PMOS – poli(metiloctilsiloxano); do inglês, *poly(methyloctylsiloxane)*

PMODS – do inglês, *poly(methyloctadecylsiloxane)*

RP - HPLC – do inglês, *reversed phase – high performance liquid chromatography*

RM – radiação micro-ondas

RSD – do inglês, *relative standard deviation*

RMN ²⁹Si – ressonância magnética nuclear de ²⁹Si

²⁹Si NMR – do inglês, *²⁹Si nuclear magnetic resonance measurements*

SP – do inglês, *stationary phase*

Si-PMTFS – fase estacionária baseada em poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) imobilizada sobre sílica nua

(Si-PMTFS)TT – fase estacionária baseada em poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) imobilizada por tratamento térmico sobre sílica nua

(Si-PMTFS)RM – fase estacionária baseada em poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) imobilizada por radiação micro-ondas sobre sílica nua

(SiZr-PMTFS)TT – fase estacionária baseada em poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) imobilizada por tratamento térmico sobre sílica zirconizada

(SiZr-PMTFS)RM – fase estacionária baseada em poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) imobilizada por radiação micro-ondas sobre sílica zirconizada

TT – tratamento térmico

TEOS – tetraetoxissilano

TMCS – trimetilclorossilano

CAPÍTULO 1

Apresentação do Trabalho

A tese de doutorado intitulada “Fases estacionárias de poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) immobilizadas sobre suportes de sílica para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. Preparo e caracterização” será apresentada no formato alternativo, conforme Inf.-CPG 01/2008, no qual, três dos seis capítulos da tese correspondem a artigos científicos submetidos ou publicados, oriundos do trabalho desenvolvido.

Em vista disso, a tese está estruturada da seguinte forma:

Capítulo 1 – Apresentação do trabalho, enfatizando o objetivo e a sequência lógica do seu desenvolvimento.

Capítulo 2 – Artigo de revisão intitulado “Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa”, no qual estão descritos os desenvolvimentos mais recentes no que diz respeito a fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, englobando o tema principal da tese que é fases estacionárias fluoradas.

Capítulo 3 – Artigo de pesquisa intitulado “A new thermally immobilized fluorinated stationary phase for RP-HPLC”, no qual estão apresentados os resultados obtidos no preparo das fases estacionárias fluoradas immobilizadas por tratamento térmico.

Capítulo 4 – Artigo de pesquisa intitulado “Preparation and characterization of a microwave-immobilized fluorinated stationary phase for RP-HPLC”, no qual estão apresentados os resultados obtidos no preparo das fases estacionárias fluoradas immobilizadas por radiação micro-ondas.

Capítulo 5 – Apresentação das considerações finais sobre o trabalho desenvolvido, destacando as principais contribuições desta pesquisa e sugestões para trabalhos futuros. Também estão apresentados resultados adicionais a respeito da estabilidade química das fases estacionárias fluoradas desenvolvidas sobre suportes de sílica e sílica zirconizada.

Capítulo 6 – Conclusão.

A proposta deste trabalho, que visa o preparo de fases estacionárias (FE) fluoradas, está embasada nas pesquisas atuais relacionadas ao desenvolvimento de novas fases estacionárias, com ênfase em dois quesitos principais que regem as pesquisas neste campo: a seletividade e a estabilidade. A escolha por estudar e explorar as FE fluoradas é decorrente das características de seletividade diferenciada proposta para estas FE, com destaque para a separação de compostos halogenados, aromáticos e isômeros de posição. A seletividade dessas FE é derivada das propriedades específicas das ligações C-F que promovem um aumento no seu caráter dipolar, intensificando, conseqüentemente, a interação com os compostos polares. Assim, as separações não ocorrem por um mecanismo de interação simples de fase reversa.

O objetivo deste trabalho foi preparar novas FE fluoradas a partir da sorção de um polímero fluorado pré-sintetizado, o poli(metil-3,3,3-trifluorpropilsiloxano) - PMTFS, na superfície e nos poros da sílica, seguido de um processo de imobilização (tratamento térmico ou radiação micro-ondas) para promover uma maior interação do polímero com o suporte cromatográfico. Estas FE foram caracterizadas por métodos físico-químicos e avaliadas cromatograficamente para explorar as suas características de seletividade, com ênfase para compostos básicos e isômeros de posição.

As etapas envolvidas no desenvolvimento do trabalho foram:

1) Preparo das FE: As FE foram preparadas pelo método do recobrimento polimérico, o qual consiste na sorção e/ou imobilização de um polímero pré-sintetizado na superfície e nos poros do suporte cromatográfico, e que tem sido empregado há anos nas pesquisas envolvendo o preparo de FE desenvolvidas no Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida da Unicamp (LabCrom).

Antes de iniciar o preparo das FE propriamente dito, foi realizado um estudo preliminar para a escolha da melhor viscosidade do polímero a ser empregada no preparo das FE. Para isso, foram preparadas FE com PMTFS de três viscosidades diferentes, 80 - 100 cSt, 300 - 350 cSt e 1000 cSt. As FE que apresentaram os resultados mais satisfatórios, com eficiências de 66.000 N m^{-1} e fator de assimetria de 0,9 para o pico do naftaleno, foram as preparadas com o polímero de maior viscosidade que foi selecionado para ser utilizado no preparo das FE.

De forma sucinta, o preparo das FE consistiu da adição de uma solução 10 % (m/v) de PMTFS (1000 cSt) em diclorometano à sílica Kromasil de 5 μm , previamente ativada em estufa a 140 °C por 12 horas. Esta mistura foi agitada durante 3 horas e, em seguida foi deixada na capela por 6 dias para a completa evaporação do diclorometano. Após esse período, as FE foram imobilizadas por tratamento térmico (TT) ou por radiação micro-ondas (RM), sendo que as melhores condições de imobilização, tempo e temperatura, foram determinadas a partir de um planejamento composto central. Depois de imobilizadas, as FE foram transferidas para tubos de coluna que foram conectados a uma bomba cromatográfica para a extração do excesso de polímero. O solvente extrator empregado foi o diclorometano e este foi percolado através das FE, a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹, por um período de 4 horas. Para as FE preparadas por TT, este procedimento foi realizado logo após a etapa de imobilização e para as FE preparadas por RM a extração foi realizada 6 dias após a etapa de imobilização, período este definido experimentalmente. Com as FE extraídas foram preparadas suspensões em tetraidrofurano (10 % m/v), que ficaram sob agitação por um período mínimo de 12 horas, antes do procedimento de enchimento. As colunas cromatográficas foram recheadas com uma bomba Haskel a uma pressão de 38 MPa, empregando o método da suspensão a alta pressão e o metanol como solvente propulsor. Em seguida, as colunas foram condicionadas e as FE foram analisadas com uma série de misturas teste. Após cada estágio de preparo das FE, foram separadas amostras para a realização dos testes físico-químicos.

2) Caracterização físico-química das FE: As FE preparadas nas condições ótimas de imobilização por TT ou por RM foram caracterizadas através de análise elementar, para a determinação da porcentagem de carbono, de espectroscopia de absorção no infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear de ²⁹Si (RMN ²⁹Si), para a determinação da presença do PMTFS, presença e quantidade relativa de grupos silanóis residuais e das possíveis interações entre o PMTFS e o suporte cromatográfico.

3) Caracterização cromatográfica das FE: As FE preparadas nas condições ótimas de imobilização por TT ou por RM foram caracterizadas cromatograficamente a partir das análises de diferentes misturas teste, a fim de se obterem informações intrínsecas a

respeito das FE desenvolvidas e avaliar o potencial dessas FE para a separação de diferentes compostos. Para isso foram empregadas as misturas teste 1 (uracila, acetofenona, benzeno, tolueno e naftaleno) e 2 (uracila, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno), que são comumente utilizadas no LabCrom nos testes prévios de avaliação das FE, quanto a eficiência e a simetria de pico; as misturas teste protocoladas na literatura que fornecem informações mais específicas acerca das FE (mistura teste de Tanaka, de Neue e de Engelhardt e Jungheim, os resultados desta última não serão apresentados) e duas misturas teste específicas para caracterizar as FE fluoradas, uma mistura composta por fármacos (levofloxacin, bromazepam, nortriptilina, fluoxetina e diazepam) e uma por isômeros de posição (2,3 – difluorfenol, 2,4 – difluorfenol, 2,6 – difluorfenol, 3,4 – difluorfenol e 3,5 – difluorfenol).

4) Avaliação da estabilidade química das FE: As FE preparadas nas condições ótimas de imobilização por TT ou por RM foram avaliadas quanto a estabilidade química a partir do emprego de condições agressivas de análise que consistiram em: FM: metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ pH 10,0 (50:50 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹ e temperatura de 50 °C. A estabilidade química foi expressa em número de volumes de coluna (V_{col}) ($V_{col} = F_{(vazão\ da\ fase\ móvel)} \times t_M$ (tempo de retenção da uracila)) correspondente à FM eluída através da coluna cromatográfica até a perda de 50 % da eficiência inicial.

CAPÍTULO 2

Fases Estacionárias Modernas para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

ABSTRACT

Recent developments involving stationary phases for reversed phase high performance liquid chromatography are directed to improving their selectivity and stability. For this, several ways have been employed, such as improvements in chromatographic supports and novel strategies for the development of new types of stationary phases. These new stationary phases are called modern stationary phases.

Keywords: stationary phases, reversed phase, high performance liquid chromatography

1 – INTRODUÇÃO

O alto nível de desenvolvimento e expansão alcançado pela cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), ao longo das últimas décadas, deve-se principalmente a sua vasta aplicabilidade, que engloba o desenvolvimento de novos produtos, o controle da qualidade desses produtos e, também, as possíveis contaminações provenientes desses produtos e dos disponíveis no mercado há anos. Dentro deste contexto, estão envolvidas as indústrias farmacêuticas, alimentícias, agropecuárias e químicas, as agências reguladoras que tratam do meio ambiente e outras. A ampla aplicabilidade da CLAE-FR foi o que impulsionou e continua impulsionando as pesquisas em busca do aprimoramento desta técnica, principalmente referente ao desenvolvimento de novas fases estacionárias (FE). Hoje, a CLAE-FR pode ser considerada uma técnica de análise (separação, confirmação e quantificação)

bem difundida e empregada, em consequência das colunas cromatográficas e equipamentos de alta tecnologia que se encontram disponíveis.

As FE empregadas em CLAE-FR consistem de uma camada orgânica apolar ligada quimicamente ou imobilizada ou apenas sorvida a um suporte cromatográfico. A forma de obtenção dessas camadas apolares e a variedade de óxidos empregados como suportes cromatográficos resultam nos diferentes tipos de FE. O método mais comum e também o mais empregado para a obtenção das FE consiste na introdução de monocamadas orgânicas através de reações com reagentes apropriados, que dá origem as fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL).¹⁻⁴ As FEQL podem ser obtidas por diferentes processos, como, esterificação, cloração seguida por reação com reagente de Grignard ou com compostos organo-lítio e organossilanização. Uma forma alternativa de preparo de FE é o método de recobrimento do suporte com polímeros orgânicos, que pode ser realizado de duas maneiras (i) mistura de um polímero pré-sintetizado de composição química bem definida em solução com o suporte e posterior evaporação do solvente, e (ii) polimerização *in situ* de uma solução de monômeros ou oligômeros, iniciada ou propagada na superfície do suporte; geralmente seguida de uma etapa de imobilização.^{4,5} Entretanto, dentre as formas de preparo de FE, as FEQL obtidas pelo processo de organossilanização apresentam melhor reprodutibilidade e também melhor estabilidade hidrolítica e, hoje, dominam o preparo das FE comerciais.

Atualmente, a ênfase nas pesquisas e nos desenvolvimentos de novas FE para CLAE-FR está voltada para dois pontos principais: a estabilidade e a seletividade das FE, ou seja, o aumento do tempo de vida das FE em condições adversas, principalmente em pH altos, e o desenvolvimento de FE que possuam características específicas para um composto ou para uma classe de compostos, respectivamente. Associado a esses dois pontos principais está à busca por melhorias na repetibilidade de coluna para coluna e de lote para lote, na simetria de pico para compostos básicos e no desenvolvimento de materiais aptos para serem empregados em análises rápidas e em temperaturas mais elevadas.⁶

Muitas FE novas emergiram a partir das pesquisas direcionadas à produção de materiais mais estáveis, compreendendo e minimizando as interações silanol-analito, e

abordando a necessidade para separações mais seletivas. Estas FE emergentes foram designadas de fases estacionárias modernas e serão descritas a seguir.

2 - AVANÇOS NA ESTABILIDADE DAS FASES ESTACIONÁRIAS MODERNAS

2.1 - NOVOS SUPORTES CROMATOGRÁFICOS

São muitas as características requeridas para que um suporte cromatográfico seja considerado ideal para ser empregado no preparo de FE. Segundo Unger e Trudinger⁷ estas características são: o método de síntese das partículas deve ser altamente reprodutível; as partículas devem ter uma faixa estreita de distribuição de tamanho e alta área superficial; os poros devem ter um diâmetro apropriado para o tamanho do analito e boa conectividade para permitir uma rápida taxa de transferência de massa; deve resistir térmica, mecânica e quimicamente a degradação; possuir uma superfície que seja tanto energeticamente homogênea quanto quimicamente modificável e exibir o mínimo de intumescimento, no caso das FE poliméricas ou das FE preparadas por recobrimento polimérico.

Em vista das características citadas, a sílica continua sendo o material cromatográfico mais empregado e também o mais promissor para o desenvolvimento de novas FE. Entretanto, o uso da sílica como suporte cromatográfico “ideal” fica limitado em dois aspectos principais, a estabilidade química e térmica.⁸⁻¹⁴ A estabilidade química das FE baseadas em sílica é limitada ao uso de fases móveis (FM) com pH na faixa de 2 a 8. Em pH acima de 8 ocorre a dissolução da sílica e o colapso da FE e, em pH menores que 2 ocorre a hidrólise da ligação siloxano, ou seja, ocorre a quebra da ligação entre a fase ligada e o suporte cromatográfico, resultando em uma perda contínua de fase ligada, com subsequente perda de retenção do analito. A estabilidade térmica é limitada ao uso de temperaturas elevadas (acima de 60 °C) associado ao uso de alta porcentagem de solvente aquoso na composição da FM, sendo que nestas condições a sílica começa a hidrolisar e o tempo de vida da coluna é reduzido significativamente.

Dessa forma, estas limitações encorajam o desenvolvimento de novos suportes cromatográficos e modificações do suporte de sílica e/ou das FE. Dentre os desenvolvimentos recentes podem ser destacados as partículas de sílica moderna, que englobam as sílicas de alta pureza, as sílicas híbridas, as sílicas monolíticas e as sílicas superficialmente porosas, e os óxidos metálicos e mistos.

2.1.1 - SÍLICA MODERNA

A sílica foi o material empregado nas primeiras separações cromatográficas e evoluiu ao longo dos anos, devido as suas propriedades favoráveis, e hoje, com características muito mais avançadas, continua sendo o material cromatográfico mais apropriado para as separações cromatográficas.

No início da cromatografia líquida pressurizada, por volta dos anos 60,¹⁵⁻¹⁷ eram empregadas partículas de sílica porosa de forma irregular e com grande distribuição de tamanho, na faixa de 40 – 50 μm , com as quais se realizava a cromatografia em fase normal (FN). A forma de obtenção dessas partículas era basicamente a moagem de partículas maiores, como por exemplo, grumos de xerogel, e posterior classificação por tamanho com o uso de peneiras com abertura regulável. Essas partículas irregulares de diâmetro grande evoluíram para partículas menores, na faixa de tamanho de 30 – 40 μm , que ainda hoje são empregadas em cromatografia líquida clássica (CLC), depois para partículas na faixa de tamanho de 15 – 20 μm e de 10 – 3 μm , preparadas pela precipitação da sílica gel de uma solução de silicato, seguida por secagem, moagem e separação de tamanho por decantação.

Na segunda metade da década de 60,^{15,17} foram desenvolvidas as partículas de sílica superficialmente porosas, designadas de partículas peliculares, com o intuito de reduzir a dispersão da banda cromatográfica. Estas partículas, de aproximadamente 40 μm , eram compostas de um núcleo sólido de pérola de vidro revestido com uma camada de 1 μm de sílica porosa, que foram comercializadas pela DuPont Company com o nome de Zipax e pela Waters Corporation com o nome de Corasil. Estas partículas foram empregadas em colunas de 50 e 100 cm para separações em fase normal e em fase reversa (FR), esta última, inicialmente com uma camada de líquido adsorvido e na década de 70 com silanos ligados covalentemente.

Estas partículas caíram em desuso em CLAE devido ao surgimento das partículas esféricas porosas de 10 e de 5 μm , na década de 70 e de 80, respectivamente.¹⁵⁻¹⁹ A uniformidade da forma e o tamanho das partículas propiciaram colunas melhores recheadas que resultaram no aumento de eficiência e de resolução. Para a obtenção dessas partículas, diferentes rotas de síntese foram empregadas: (a) dispersões da sílica coloidal e geleificação num sistema de duas fases, (b) hidrólise e policondensação de polietoxissiloxano (PES) em esferas de sílica hidrogel por agitação, em um sistema de duas fases (processo sol-gel), (c) aglutinação de soluções coloidais de sílica na presença de polímero seguido de calcinação das esferas, (d) secagem por vaporização de suspensões coloidais de sílica e (e) formação e crescimento de nano partículas de sílica em suspensões. Nos dias atuais, a obtenção de partículas esféricas de sílica porosa se dá basicamente por variações no processo sol-gel.

Com o advento das partículas esféricas e porosas, no período de 1970 a 1995, as colunas analíticas recheadas com partículas irregulares foram substituídas por colunas recheadas com partículas esféricas e, a partir daí, a evolução vem ocorrendo no sentido de melhorar estas partículas de sílica para tornar a CLAE uma técnica de separação mais versátil e moderna.

O desenvolvimento de novos suportes cromatográficos de sílica e/ou o aprimoramento desses suportes está voltado para melhorar a estabilidade química e térmica, diminuir a acidez dos grupos silanóis superficiais e tornar os materiais aptos para a realização de análises mais rápidas. Dessa forma, pode-se dividir os suportes cromatográficos modernos baseados em sílica em dois segmentos, os que evoluíram para o aumento da estabilidade química e térmica e redução da acidez, a sílica de alta pureza e a sílica híbrida, e os que evoluíram para serem compatíveis com análises mais rápidas, porém mantendo as mesmas características dos anteriores, a sílica superficialmente porosa e a sílica monolítica.

2.1.1.1 - SÍLICA DE ALTA PUREZA

A denominação sílica de alta pureza ou, segundo alguns pesquisadores da área, sílica do tipo B, é empregada para partículas de sílica com baixo teor de metais.^{18,20} A

quantidade de traços de metais depende do processo de síntese e do material de partida, mas geralmente a sílica cromatográfica possui em torno de 0,1 a 0,3 % de metais. Dentre os metais comumente encontrados na sílica (Fe, Al, Na, K, Mg, Ca, La, Ti, Zr, Cu, Cr, Zn), a redução do teor de Al e Fe para quantidades inferiores a 3 µg/g e do teor de Ti, Zr e Zn para quantidades não detectáveis caracterizam a sílica como sendo de alta pureza. Os tratamentos usados para eliminar as impurezas metálicas após a obtenção das partículas de sílica, preparadas pelo processo sol-gel a partir de tetraetoxissilano (TEOS) previamente destilado, consistem basicamente em processos de lavagens ácidas e de reidroxilação da superfície após a desidratação a alta temperatura.^{18,19,21}

O grande inconveniente da presença de traços metálicos na sílica cromatográfica é o aumento da acidez dos grupos silanóis (Si-OH) provocado pela proximidade de átomos metálicos. Estima-se que a acidez desses grupos aumenta de tal forma que eles interagem 50 vezes mais fortemente com os compostos em análise que os grupos silanóis “normais” e, dessa forma, podem causar alargamento substancial da banda cromatográfica, principalmente dos compostos básicos, perda de resolução cromatográfica e reações químicas indesejáveis.²⁰ Dessa forma, a sílica cromatográfica deve ser de alta pureza para que as separações cromatográficas sejam mais eficientes e seletivas. Baseado neste conceito, as partículas de sílica e de sílica híbrida de diferentes tamanhos (5, 3, 2,5 e ≤ 2 µm) empregadas como suporte cromatográfico das FE modernas são de alta pureza.

2.1.1.2 - SÍLICA HÍBRIDA

As partículas de sílica híbrida são um híbrido inorgânico/orgânico.^{15,22} Estas partículas contêm componentes inorgânicos, como a sílica, e componentes orgânicos, como um organossiloxano, e reúnem as vantagens de ambos os elementos.

A síntese das partículas híbridas é realizada por uma reação de silanização, ou seja, pela mistura de dois monômeros altamente puros, na qual um vai gerar unidades de SiO₂ durante o processo de síntese e o outro vai formar unidades contendo um organossilano. As partículas resultantes contêm grupos organossilano incorporados na estrutura e na superfície da sílica. Os primeiros processos de síntese de partículas de

sílica híbrida resultaram em partículas de sílica com ligações silício-hidrogênio (Si-H) incorporadas e possuíam propriedades cromatográficas únicas, principalmente aumento da estabilidade química e redução das interações indesejáveis com os grupos silanóis residuais.²² A MicrosolvTM emprega estas partículas de sílica híbrida com ligações silício-hidrogênio na fabricação de suas colunas cromatográficas e as denomina de TYPE-C sílicaTM.^{23,24}

A tecnologia híbrida desenvolvida pela Waters Corporation consiste no uso de silanos com ligações silício-metil^{15,25} (Si-CH₃) e, posteriormente com pontes de etano^{26,27} (Si-CH₂-CH₂-Si), (Figura 1A) envolvendo o mesmo processo de síntese descrito acima, mais especificamente, a partir da reação de tetraetoxissilano e metiltrietoxissilano, e, tetraetoxissilano e bis(trietoxissililetano), respectivamente. As partículas de sílica híbrida com ligações silício-metil foram desenvolvidas em 1999 e foram denominadas de partículas de sílica híbrida de 1^a geração, e são empregadas nas colunas comercializadas como XTerra[®]. Estas partículas possuem maior resistência mecânica, produzem altas eficiências, possuem estabilidade na faixa de pH de 1-12 e geram picos simétricos para os compostos básicos. Em 2003, foram introduzidas as partículas de sílica híbrida com pontes de etano, denominadas de partículas de sílica híbrida de 2^a geração, que são empregadas nas colunas comercializadas como XBridgeTM. O desenvolvimento dessas partículas foi direcionado para análises rápidas, sendo que as primeiras partículas fabricadas com essa tecnologia foram de 1,7 µm e próprias para serem usadas na cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE).²⁸ Essas partículas XBridgeTM possuem ainda maior estabilidade mecânica, são resistentes a uma faixa de pH de 1-12 e fornecem boa simetria de pico e altas eficiências. Além disso, são estáveis em temperaturas mais elevadas, de acordo com o fabricante de até 60 °C, entretanto, já foram publicados trabalhos reportando que estas partículas são estáveis em temperaturas de 100 °C²⁹ e de até 150 °C.³⁰

Recentemente a Phenomenex,³¹ com a tecnologia TWINTM (*two in one*), e a Akzo Nobel,³² com a tecnologia EternityTM, estão desenvolvendo partículas de sílica com uma camada de um organossilano enxertada na sua superfície. (Figura 1B). Esse processo é realizado no estágio final da fabricação da sílica e, dessa forma, a partícula mantém a força mecânica e a rigidez da sílica, promovendo altas eficiências, enquanto

que a camada de sílica-orgânica protege a partícula do ataque químico. Estas partículas são estáveis em uma faixa de pH de 1-12, possuem tempo de vida mais longo e fornecem boa simetria de pico. Com o mesmo intuito a Selerity Technologies, Inc.^{33,34} vem desenvolvendo as partículas Blaze₂₀₀TM que consistem de partículas de sílica recobertas por um silano polidentado, com múltiplos pontos de ligação com a sílica e com alto grau de entrecruzamento, que conferem a essas partículas alta estabilidade térmica (até 200 °C), química (na faixa de pH de 1-12) e hidrolítica.

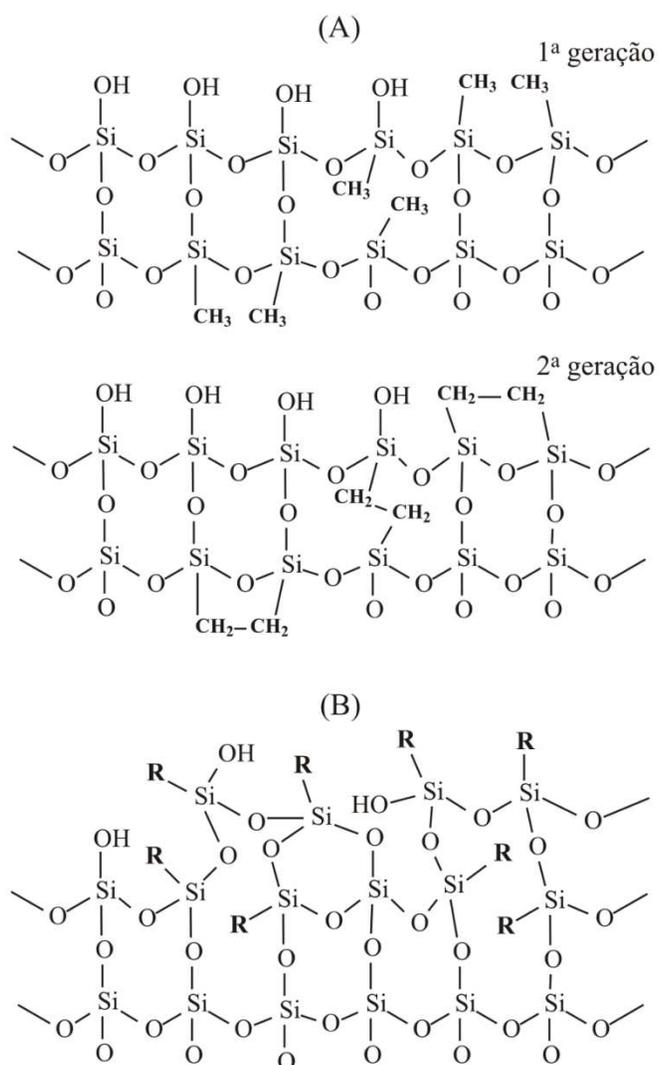


Figura 1 – Estruturas das partículas de sílica híbrida: (A) sílica híbrida típica, de 1^a e 2^a geração e (B) sílica híbrida com uma camada de um organossilano (R) na superfície.

2.1.1.3 - SÍLICA SUPERFICIALMENTE POROSA

As partículas superficialmente porosas modernas, denominadas de *Fused Core* (partículas de núcleo fundido), vêm sendo desenvolvidas baseadas na mesma teoria das partículas peliculares da década de 60.^{15,35,36} Entretanto, hoje estas partículas são constituídas somente de sílica e o processo de fabricação consiste basicamente de duas etapas. Na primeira, é formado o núcleo sólido através da sinterização de uma partícula de sílica porosa a alta temperatura e, em seguida, esse núcleo sólido é revestido por uma camada de sílica porosa (Figura 2)³⁷. As principais vantagens apresentadas por estas partículas são a baixa resistência a transferência de massa, permitindo análises rápidas sem gerar altas pressões, alta resistência mecânica, capacidade de amostra competitiva com as partículas totalmente porosas e eficiências mais altas quando comparadas com partículas porosas de mesmo tamanho. São geralmente empregadas para a separação de macromoléculas como os peptídeos e as proteínas.^{15,17}

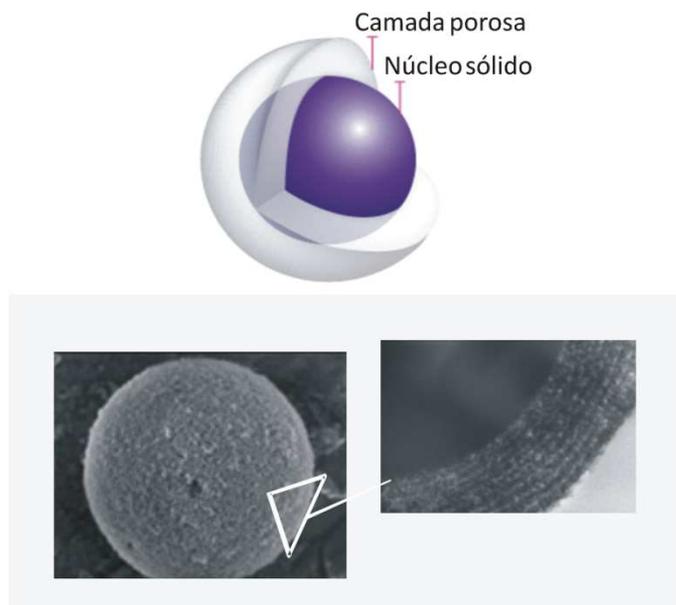


Figura 2 – Representação esquemática e micrografia de uma partícula de sílica superficialmente porosa. Adaptada da referência 37.

Estas partículas vêm sendo desenvolvidas pela (i) Agilent Technologies, denominadas de Poroshell,^{17,38,39} com tamanho de 2,7 μm , sendo o núcleo sólido de 1,7 μm e a camada porosa de 0,5 μm , e com tamanho de 5 μm , sendo o núcleo sólido de 4,5 μm e a camada porosa de 0,25 μm ; (ii) Advanced Materials Technology, denominadas de HaloTM,^{15,36,40} com tamanho de 2,7 μm , similares as Poroshell; (iii) Supelco, sendo denominadas de AscentisTM Express,^{36,41} com tamanho de 2,7 μm , similares as Poroshell e HaloTM e pela (iv) Phenomenex, denominadas de KinetexTM Core-Shell,³⁷ com tamanhos de 2,6 μm , sendo o núcleo sólido de 1,9 μm e a camada porosa de 0,35 μm e de 1,7 μm , sendo o núcleo sólido de 1,25 μm e a camada porosa de 0,23 μm .

2.1.1.4 - SÍLICA MONOLÍTICA

A sílica monolítica é um leito contínuo de sílica porosa,¹⁵ no formato de um bastão ou haste, que contém uma distribuição de tamanho de poro bimodal, composta por macro (2 μm) e mesoporos (13 nm) (Figura 3). As FE monolíticas são constituídas de sílica monolítica funcionalizada e descritas como um meio contínuo de separação, comumente em formato cilíndrico, que possui uma estrutura sólida e altamente porosa que fornecem alta permeabilidade e eficiência de coluna.⁴² A alta permeabilidade desses materiais permite o uso de vazões de FM altas, sem aumento da pressão no sistema cromatográfico, resultando em separações rápidas e sem perda de eficiência, devido à rápida taxa de transferência de massa, entretanto, esta alta permeabilidade reduz a capacidade de aceitação de amostra pela coluna. A eficiência das colunas monolíticas é comparável às colunas recheadas com partículas porosas de tamanho de 3-5 μm .^{15,18,42-44}

O preparo da sílica monolítica é realizado pelo processo sol-gel.^{15,42,44} As etapas comumente envolvidas neste processo são o preparo de uma solução coloidal inicial, a transferência dessa solução para um molde de policarbonato onde ocorrerá a geleificação, o envelhecimento e a secagem do monolito. Após a secagem, é realizado o revestimento do monolito pela transferência do mesmo para um tubo de PEEK (poli(éter-éter-cetona)), que se ajusta ao diâmetro do bastão obtido. A funcionalização do monolito pode ser realizada “on column” ou antes do revestimento.

As colunas de sílica monolítica disponíveis no mercado são a Chromolith® fabricada pela Merck⁴⁵ e a Onyx™ fabricada pela Phenomenex,⁴⁶ porém com tecnologia licenciada pela Merck. Em ambas as marcas, encontram-se colunas funcionalizadas com C8 e C18, com diferentes especificações de tamanho, inclusive com dimensões adequadas para serem empregadas em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM).^{35,45,46}

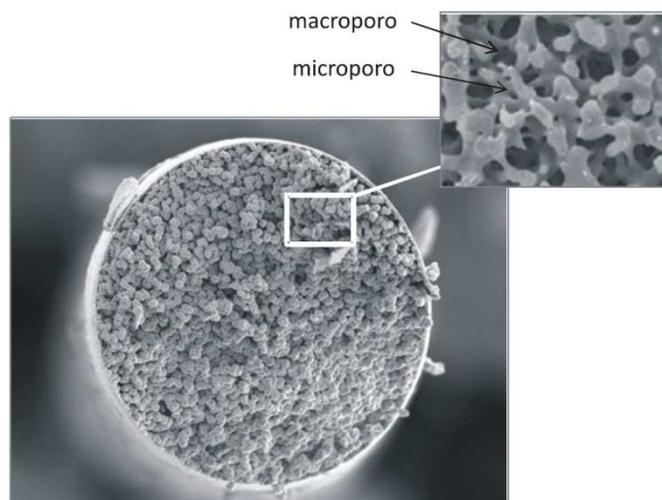


Figura 3 – Corte transversal do bastão ou haste de sílica monolítica e sua ampliação.

2.1.2 - ÓXIDOS METÁLICOS

O uso de óxidos metálicos, como os óxidos de alumina, titânia e zircônia e mais recentemente os óxidos de cério e tório, como suportes cromatográficos, deve-se a duas características principais, a estabilidade química e a excelente estabilidade térmica desses materiais.^{9,10,13,47} Além disso, os óxidos metálicos comportam-se como trocadores iônicos anfóteros, catiônicos ou aniônicos, dependendo do pH da FM. Outra diferença, a qual tem um grande impacto no uso das FE baseadas em óxidos metálicos, é a existência de sítios ácidos de Lewis na superfície dos óxidos, que são responsáveis pela habilidade de troca iônica dessas FE.^{48,49} Devido a combinação do mecanismo de retenção em fase reversa e troca iônica, as FE baseadas em óxidos metálicos, quase sempre, apresentam retenção de modo misto, e consequentemente,

seletividade variada. As variações na seletividade vão depender das características do analito, do pH da FM, do tipo de tampão, da força iônica e da quantidade de solvente orgânico presente na FM.

A alumina foi o primeiro óxido metálico empregado como suporte cromatográfico, primeiramente em separações em FN e posteriormente modificada por recobrimento polimérico para ser utilizada em separações em FR, impulsionada pela sua estabilidade química em uma extensa faixa de pH (1-12). Entretanto, devido as propriedades de retenção da alumina serem muito parecidas com as da sílica, e por apresentar desempenho cromatográfico inferior, estes materiais não evoluíram muito.^{48,50}

A zircônia é o óxido metálico mais estudado e difundido por apresentar maior estabilidade química e térmica, na faixa de pH de 1 a 14 e em temperaturas de até 200 °C, respectivamente, e, também, alta resistência mecânica.^{13,51,52} A coluna zirconizada mais popular disponível comercialmente é a ZirChrom[®]-PBD (zircônia recoberta com polibutadieno) da ZirChrom[®].^{47,49,53}

A titânia tende a ter propriedades e mecanismos de retenção similares a zircônia. Entretanto, existem poucas informações a respeito da titânia e das vantagens como suporte cromatográfico, e, até o momento, poucas aplicações envolvendo FE baseadas em titânia têm sido publicadas.⁴⁸ A ZirChrom[®] comercializa uma coluna de titânia recoberta com polietileno (TiO₂-PE), denominada de Sachtopore[®]-RP, que pode ser empregada como alternativa a ZirChrom[®]-PBD.

Entretanto, a dificuldade de obtenção das partículas dos óxidos metálicos com as propriedades requeridas para um suporte cromatográfico, e também a dificuldade de modificação química ou a organofuncionalização da sua superfície, devido a carência de grupos livres aptos a interagirem para formar ligações, levou ao desenvolvimento paralelo de óxidos mistos.⁸⁻¹⁰

2.1.3 - ÓXIDOS MISTOS

Os óxidos mistos são suportes cromatográficos obtidos pela mistura de sílica e de óxido metálico, e, desta forma, combinam as propriedades da sílica, como a área superficial alta, a boa estrutura de poros e a variedade de distribuição de tamanhos,

com as propriedades dos óxidos metálicos, como a estabilidade química e térmica.^{54,55} Como resultado obtém-se materiais cromatográficos baseados em sílica com estabilidade química e térmica aumentada. Entretanto, o desafio continua sendo o desenvolvimento de métodos de preparo que resultem em partículas com boas propriedades cromatográficas. Na literatura são reportados diversos estudos nos quais foram desenvolvidas FE baseadas em óxidos mistos, que apresentam maior estabilidade química e térmica, podendo-se destacar as pesquisas realizadas no LabCrom (Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida do Instituto de Química da Unicamp), onde vêm sendo desenvolvidas FE baseadas em óxidos mistos de sílica e zircônia e sílica e titânia recobertas por diferentes polímeros orgânicos, como o PBD, poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS) e poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) e também organofuncionalizadas com C18 e C18 uréia. A descrição detalhada desses materiais pode ser encontrada nas revisões publicadas por Faria *et al.*^{5,54} e Silva *et al.*⁵⁶ e nos trabalhos publicados por Collins *et al.*⁴ e Silva *et al.*^{57,58}

2.2 - ESTRATÉGIAS NO PREPARO DAS FASES ESTACIONÁRIAS

Além das alternativas descritas para o aumento da estabilidade e da seletividade das FE baseadas em novos suportes cromatográficos, novas estratégias têm sido empregadas no preparo das FE modernas, com destaque para as reações de capeamento, as fases estacionárias estericamente protegidas e as fases estacionárias bidentadas.

O capeamento consiste em uma reação de silanização com um ou mais reagentes organossilanos de tamanho reduzido, geralmente trimetilclorossilano (TMCS) e/ou hexametildissilazano (HMDS), após a qual se tem um aumento do recobrimento do suporte cromatográfico e uma redução do número de silanóis residuais.⁵⁹⁻⁶¹ Esta reação é realizada em uma etapa subsequente ao processo de preparo da FE. A melhora na seletividade ocorre devido a redução da interação analito-silanol e o aumento da estabilidade da FE em pH alto (> 8) é devida ao recobrimento mais homogêneo do suporte cromatográfico. O processo de capeamento tem sido extensivamente empregado no preparo das FE modernas, porque age como um

“complemento” para o desempenho cromatográfico dessas FE e, também, porque o emprego dessas reações independe do suporte cromatográfico e do tipo da fase ligada.

O artifício envolvido nas FE estericamente protegidas^{2,62,63} é o emprego de organossilanos que possuem grupos volumosos, como o isopropil ou o isobutil, ligados ao átomo de silício no início da cadeia de substituição. Estes grupos volumosos próximos a superfície da sílica fornecem uma maior proteção à ligação siloxano, evitando a quebra entre a fase ligada e suporte cromatográfico quando são empregadas FM com pH menores que 2. As FE estericamente protegidas disponíveis comercialmente são produzidas pela Agilent Technologies, denominadas de Zorbax StableBond[®].⁶⁴

As FE bidentadas^{2,62,65} são preparadas a partir de silanos bidentados formados por dois átomos de silício interligados entre si por um grupo etil ou propil. Estas FE possuem estabilidade química para serem empregadas com FM com pH acima de 8, uma vez que o acesso aos grupos silanóis é reduzido. Estas FE também são comercializadas pela Agilent Technologies, com o nome de Zorbax Extend-C18[®].⁶⁶

3 - AVANÇOS NA SELETIVIDADE DAS FASES ESTACIONÁRIAS MODERNAS

Na área de separações, a seletividade é o requisito de maior relevância no processo cromatográfico.⁶⁷ Mais especificamente, nas separações por CLAE, a seletividade é influenciada por quatro variáveis: (i) a fase estacionária, (ii) a composição da fase móvel, (iii) as condições físicas (temperatura e pressão) e (iv) a natureza dos compostos a serem analisados.

No caso da FE, que é a variável proeminente, a seletividade é influenciada por vários fatores, podendo serem destacados: as características da fase ligada, a presença de grupos silanóis residuais e a realização do capeamento. A forma e a distribuição das partículas do suporte cromatográfico, as dimensões da coluna e o processo de enchimento também exercem influência na seletividade.⁶⁸

Conforme mencionado, a seletividade da FE é dependente de um conjunto de fatores, entretanto, o principal motivador no desenvolvimento de FE com diferentes seletividades está relacionado com a dificuldade encontrada nas separações de

compostos polares, que englobam a maioria dos compostos básicos, por CLAE-FR, empregando FE puramente alifáticas.⁶⁹⁻⁷¹ Esta dificuldade é decorrente de dois fatores principais: (i) estes compostos são retidos insuficientemente na FE (que possui características hidrofóbicas), (ii) estes compostos interagem fortemente com os grupos silanóis residuais da FE (que possuem características ácidas), resultando em picos cromatográficos com cauda acentuada, podendo até ficarem retidos de forma irreversível. A retenção dos compostos polares pode ser aumentada com o uso de FM com altas quantidades de água, porém, o uso de FM com porcentagens de água acima de 95 % leva a falência da coluna cromatográfica, além de ser incompatível com a detecção por EM. A principal estratégia para diminuir as interações entre os compostos básicos e os grupos silanóis residuais é o uso de tampões inorgânicos em condições alcalinas ou ácidas. No entanto, conforme já discutido anteriormente, a estabilidade das FE baseadas em sílica é limitada a uma faixa estreita de pH (2 a 8) e, além disso, o uso de tampões inorgânicos implica numa série de cuidados tanto com o sistema quanto com as colunas cromatográficas, uma vez que a precipitação desses sais diminui significativamente o tempo de vida de ambos. O uso de sais inorgânicos é incompatível também com os detectores por EM.

Em vista disso, são buscadas alternativas a estas limitações, com o propósito de desenvolver FE que possuam as características necessárias para que as separações de compostos de diferentes naturezas sejam possíveis. Dentre estas, pode-se destacar as FE com grupo polar embutido, fenil, fluoradas, de modo misto e HILIC.

3.1 - FASES ESTACIONÁRIAS COM GRUPO POLAR EMBUTIDO

As FE denominadas de FE com grupo polar embutido (GPE) possuem um grupo polar inserido na cadeia alquila, geralmente após o terceiro grupo metileno ligado ao átomo de silício do organossilano. Na Figura 4A está exemplificada a estrutura de uma FE com GPE. Comumente os grupos polares empregados nestas FE incluem grupos capazes de estabelecer ligação de hidrogênio, como os grupos carbamato, amida, amina, uréia e éter, deixando estas FE com um caráter mais “básico”.^{2,62,72,73}

O primeiro trabalho que reporta o preparo de uma FE com um grupo amida embutido foi publicado por Nomura *et al.*⁷⁴ em 1987. Logo depois, Ascah e Feibush⁷⁵

também desenvolveram uma FE com um grupo amida embutido, que foi a primeira FE com GPE comercializada, com o nome de Supelcosil ABZ (Supelco). Hoje estes tipos de FE são comercializadas por praticamente todos os fabricantes de colunas e, devido às diferenças na seletividade, resultante da presença dos grupos polares, têm sido consideradas complementares as FE clássicas (C8 e C18) que são as FE mais difundidas e empregadas nas separações rotineiras por CLAE-FR.

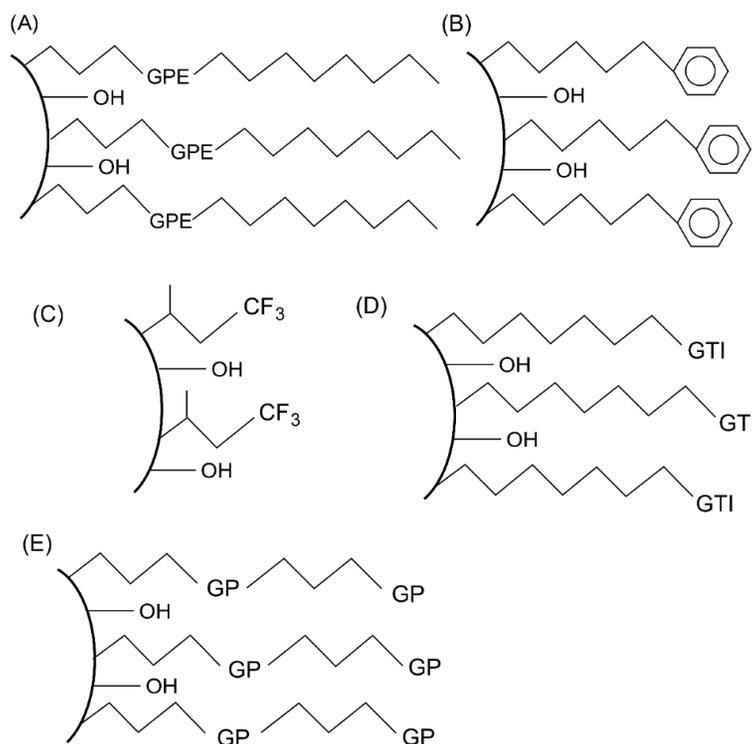


Figura 4 – Exemplos de estruturas de algumas FE (A) com grupo polar embutido (GPE), (B) fenil, (C) fluorada, (D) de modo misto, com grupo trocador iônico (GTI) e (E) HILIC com grupo polar (GP).

As principais características apresentadas pelas FE com GPE são: (i) mantêm o caráter de FR;^{76,77} (ii) fornecem uma seletividade diferenciada quando comparada com a FE alquila,^{73,76-78} pois os analitos polares e básicos ficam menos retidos nas FE com GPE, uma vez ocorre uma blindagem dos grupos silanóis residuais, pelo grupo polar, enquanto que os analitos passíveis de estabelecer ligação de hidrogênio, como os fenóis, as sulfonamidas, os ácidos carboxílicos não ionizados entre outros, ficam mais

retidos, devido as interações por ligações de hidrogênio entre estes compostos e o grupo polar presente na FE; (iii) são compatíveis com o uso de FM com altas porcentagens de solvente aquoso^{2,73,76,77,79-81} podendo serem usadas até mesmo com 100 % de água sem ocorrer o colapso da FE, ou seja, a perda da sustentação das cadeias da fase ligada. O fenômeno do colapso da FE é muito comum nas FE clássicas se não for usado pelo menos de 5 a 10 % de solvente orgânico na composição da FM, porque pode ocorrer a expulsão da FM dos poros, resultando em perda de retenção. Entretanto, nas FE com GPE isso não ocorre devido a maior solvatação da superfície da FE proveniente das interações, por ligações de hidrogênio, entre os grupos polares e as moléculas de água. Esta característica é especialmente útil para a retenção de compostos polares e promove uma melhora no desempenho cromatográfico (retenção reprodutível e estável) e um rápido re-equilíbrio da FE após a eluição por gradiente; (iv) a atividade silanofílica é suprimida^{73,76,77,79-81} e, dessa forma, os compostos básicos são eluídos em picos simétricos, particularmente em valores intermediários de pH. Tem sido proposto quatro mecanismos diferentes^{2,77,80} para explicar esta menor interação entre os compostos básicos e os grupos silanóis residuais: (a) interação, por ligações de hidrogênio, entre os grupos polares embutidos e os grupos silanóis, bloqueando o acesso dos analitos de interesse aos grupos silanóis residuais; (b) interação, por ligações de hidrogênio, entre o grupo polar embutido e as moléculas de água, criando uma camada de água firmemente ligada ao redor do grupo polar embutido, enfraquecendo as interações entre o analito e os grupos silanóis residuais; (c) interação preferencial do analito com os grupos polares embutidos ao invés da interação com os silanóis residuais e (d) interação, por ligações de hidrogênio, entre os grupos polares de cadeias adjacentes, blindando o acesso aos grupos silanóis.

Em vista destas características, as FE com GPE podem ser consideradas uma alternativa as FE clássicas, especialmente para a separação de compostos polares e básicos.

3.2 - FASES ESTACIONÁRIAS FENIL

Estas FE contém grupos fenil inseridos na sua estrutura. As FE fenil diferenciam-se entre si pelos níveis de aromaticidade e de hidrofobicidade decorrentes

de modificações na sua estrutura.^{82,83} Estas modificações incluem: (i) o espaço entre o átomo de silício e o anel aromático pode variar de 0 a 6 grupos metilênicos; (ii) a FE pode possuir um ou dois anéis aromáticos e (iii) a FE pode conter um heteroátomo no espaço entre o suporte cromatográfico e o anel aromático. Na Figura 4B está exemplificada a estrutura de uma FE fenil.

Neimark e Chertov⁸⁴ foram os primeiros a tentar ligar grupos fenil na superfície da sílica usando feniltriclorossilano e difenildiclorossilano e hoje, encontram-se disponíveis uma série de FE fenil com características diferenciadas, como etil, propil ou hexil-fenil, flúor-fenil e bifenil, dentre outras.^{85,86}

O aumento da popularidade das FE fenil reside em seu potencial de seletividade cromatográfica ortogonal quando comparada com as FE alquila tradicionais, atribuído a sua capacidade de formar ligações π - π com os compostos aromáticos.^{85,86}

A interação π - π é um tipo de interação elétron doador – aceptor, proveniente de sistemas com elétrons π , quer através de interações intermoleculares ou intramoleculares.^{82,87} No caso das separações cromatográficas, estas interações podem acontecer entre os elétrons π da FE, que é a fonte doadora de elétrons, e os elétrons π dos compostos em análise, que são os receptores dos elétrons. Isto torna essas FE muito seletivas para a separação de compostos aromáticos, com destaque para os compostos aromáticos polinucleares e nitroaromáticos.^{86,88}

Uma observação interessante a respeito dessas FE refere-se a influência exercida pelo modificador orgânico da FM na seletividade de separação.^{72,83,87} A retenção dos compostos aromáticos varia conforme o solvente orgânico empregado na FM: tetraidrofurano < acetonitrila < metanol. A menor seletividade apresentada pela acetonitrila, quando comparada com o metanol, é devido a presença de elétrons π provenientes da ligação tripla, $C\equiv N$ e, desta forma, pode formar complexos elétron doador – aceptor com a FE ou com os compostos em análise, dependendo de qual é a contra-parte mais deficiente em elétrons, suprimindo as interações entre os compostos em análise e a FE.

3.3 - FASES ESTACIONÁRIAS FLUORADAS

As FE fluoradas, assim denominadas por possuírem átomos de flúor ligados à cadeia alquila ou aos grupos fenil, são mais uma alternativa às FE tradicionais C8 e C18, por apresentarem uma seletividade única proveniente das propriedades específicas das ligações C-F que promovem um aumento no caráter dipolar da FE, o que intensifica a interação com compostos polares, e, dessa forma, as separações não ocorrem por um mecanismo de interação simples de FR.⁸⁹⁻⁹² Na Figura 4C está exemplificada a estrutura de uma FE fluorada.

O primeiro trabalho sobre FE fluoradas a base de sílica para CLAE-FR foi publicado no início dos anos 80 por Berendsen *et al.*,⁹³ no qual foi preparada uma FE ((heptadecafluordecil)dimetilsilil) (HFD) que foi comparada com as FE *n*-propil e *n*-decil, na separação de compostos fluorados e não-fluorados. O resultado deste estudo mostrou que a FE fluorada apresentou maior interação com os compostos fluorados que as FE não fluoradas. Estes resultados despertaram o interesse em investigar estas FE e uma série de estudos⁹⁴⁻¹⁰⁰ está sendo realizada em vista da especificidade destas FE, principalmente comparando as FE fluoradas com as FE não fluoradas.

As principais características apresentadas pelas FE fluoradas^{92,94} quando comparadas com as FE C8 e C18 são: (i) a maioria dos hidrocarbonetos apresenta menor retenção; (ii) muitos compostos fluorados apresentam igual ou maior retenção; (iii) ésteres e cetonas são mais retidos; (iv) misturas contendo compostos fluorados e não fluorados são melhores separadas; (v) altas quantidades de solvente orgânico podem aumentar a retenção de muitos compostos, incluindo as bases orgânicas, sendo esta composição de FM muito útil para análises por CL-EM, na qual o aumento da quantidade de solvente orgânico aumenta a detectabilidade.

Os mecanismos que regem as separações nas FE fluoradas ainda não foram claramente definidos, entretanto, muitos mecanismos têm sido propostos como também outras características têm sido atribuídas às FE fluoradas. Yamamoto e Rokushika⁹⁵ avaliaram o comportamento de retenção de compostos aromáticos em FE fluoradas e verificaram que (a) em altas concentrações de metanol na composição da FM ocorre a inversão da ordem de eluição do antraceno e do benzeno; (b) existem interações moleculares exclusivas entre as moléculas aromáticas e a FE fluorada, que

são mais fortes para a retenção de compostos planares e rígidos que para compostos não planares e aumentam conforme aumenta o número de anéis aromáticos e (c) a menor retenção dos compostos aromáticos nas FE fluoradas, quando comparadas com as FE alquila, é devido a menor energia necessária para a formação da ligação entre o composto aromático e a FE fluorada. É sugerido nesse estudo que a ligação entre os compostos aromáticos e a FE fluorada se dá por interações eletrostáticas entre os elétrons π dos anéis aromáticos e um dos pares de elétrons disponíveis no átomo de flúor, que aumentam conforme aumenta o número de elétrons π nos anéis aromáticos.

Marchand *et al.*⁹⁰ sugerem que a seletividade das FE fluoradas comparadas com as FE alquila pode ser explicada, pelo menos em parte, como consequência da baixa polarizabilidade dos ligantes fluorados, como mensurado pelos seus baixos valores de índices de refração (IR) comparados com os ligantes alquila. Menor polarizabilidade significa interações via forças dispersivas reduzidas, com consequências para a retenção que pode ser interpretada qualitativamente em termos dos parâmetros do modelo de solubilidade, ou seja, compostos e FE com IR similares exibem interação e retenção preferencial. Os IR aumentam nesta ordem: compostos fluorados < compostos alifáticos < compostos aromáticos < compostos poliaromáticos, sugerindo que a retenção relativa destes compostos nas FE alquila (mais altos IR) *versus* as FE fluoradas (mais baixos IR) tendem a aumentar na mesma ordem.

Bell e Daniel Jones⁹⁶ sugerem que as FE fluoradas apresentam o mecanismo de retenção *U-Shape*, ou seja, apresentam mecanismo de retenção de fase reversa e de fase normal para compostos polares, dependendo da quantidade de modificador orgânico na composição da FM. À medida que se aumenta a quantidade de solvente orgânico na composição da FM, ocorre uma diminuição da retenção dos compostos polares (FR) e, após certo ponto, ocorre o aumento da retenção dos compostos polares (FN). Uma possível explicação para o mecanismo de *U-Shape* nas FE fluoradas é que em altas quantidades de solvente orgânico, a FE está solvatada e um número maior de silanóis residuais estão acessíveis para interagirem por mecanismos de troca iônica com os compostos polares. Estes autores verificaram também que compostos básicos ficam mais retidos nas FE fluoradas quando comparadas com as FE alquila e de sílica. Eles sugerem que ocorrem simultaneamente interações eletrostáticas entre os

compostos e os grupos silanóis ionizados e interações hidrofóbicas com as cadeias alquila da FE ou polares com os átomos de flúor, que resultam nessa maior retenção.

Cabe ressaltar ainda, que alguns estudos apontaram as FE fluoradas como sendo muito úteis para a separação de compostos isoméricos.⁹⁷⁻¹⁰⁰

Em vista de todos estes estudos, pode-se verificar que as FE fluoradas apresentam interações diferenciadas com diversos tipos de compostos e, hoje, estas FE estão em ascensão e em 2008 já eram comercializadas, por pelo menos seis fabricantes, colunas recheadas com diferentes tipos de FE fluoradas.⁹⁴

3.4 - FASES ESTACIONÁRIAS DE MODO MISTO

As FE denominadas de modo misto possuem grupos trocadores iônicos inseridos nas cadeias alquila e, desta forma, combinam os princípios de separação ortogonal de fase reversa e de troca iônica, oferecendo um potencial de otimização de separação de misturas complexas (por exemplo, formadas por compostos orgânicos altamente polares, ionizáveis ou iônicos e compostos hidrofóbicos) muito maior que as FE reversas clássicas.^{85,101-104} Os grupos trocadores iônicos podem ser grupos catiônicos ou aniônicos. De uma forma geral, os compostos neutros interagem com a FE de modo misto por mecanismo de FR, enquanto que os compostos básicos interagem por mecanismo de troca iônica, de exclusão iônica ou de interação hidrofílica nas FE com grupos trocadores catiônicos, aniônicos ou hidrofílicos, respectivamente. Similarmente, os compostos ácidos podem interagir por interações de troca iônica ou exclusão iônica nas FE com grupos trocadores aniônicos ou catiônicos, respectivamente, além das interações hidrofóbicas.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Na Figura 4D está exemplificada a estrutura de uma FE de modo misto.

O grande diferencial dessas FE de modo misto é que a seletividade ou a força das interações entre os compostos e os sítios trocadores iônicos pode ser ajustada pela ativação ou desativação destes grupos, através da variação de alguns parâmetros, como: a natureza e a quantidade do modificador orgânico na FM, o tipo e a concentração do tampão, adição de aditivos na FM e variações no pH e na temperatura.^{101,104,105,107}

Apesar dos sorventes de extração em fase sólida (EFS) de modo misto serem bastante conhecidos¹⁰² e o primeiro trabalho reportando o preparo de uma coluna cromatográfica de modo misto baseada em sílica ter sido publicada no início dos anos 60,¹⁰⁸ somente recentemente as FE de modo misto começaram a ganhar destaque em CLAE, ao serem introduzidas comercialmente pela SIELC Technologies, com o nome de Primesep.¹⁰⁹ Em seguida a Dionex também desenvolveu fases estacionárias de modo misto, denominadas de Acclaim[®],¹¹⁰ e hoje, estes dois fabricantes dominam o mercado deste tipo de FE.

As principais vantagens apontadas para as FE de modo misto são: (i) capacidade superior para separar compostos iônicos; (ii) controle total da seletividade; (iii) múltiplos modos de separação, incluindo fase reversa, fase normal e troca iônica; e (iv) uma extensa gama de aplicações que inclui a separação de aminoácidos, ácidos nucleicos, peptídeos, proteínas e também a separação de compostos farmacêuticos. Estas FE vêm sendo também usadas com sucesso como a segunda coluna em cromatografia líquida bidimensional.^{103,105,106,111}

Cabe ressaltar que existe uma controvérsia entre os fabricantes referente a denominação das FE de modo misto e das HILIC, que serão apresentadas a seguir, uma vez que ambas podem ser empregadas no modo de separação HILIC. Entretanto, a diferença básica entre elas reside no fato que as FE de modo misto são empregadas principalmente para a separação de compostos ionizáveis, enquanto que as FE HILIC são aplicadas na análise de compostos moleculares.

3.5 - FASES ESTACIONÁRIAS HILIC

As FE denominadas de HILIC são empregadas em cromatografia de interação hidrofílica (HILIC, do inglês *hydrophilic interaction chromatography*). A cromatografia de interação hidrofílica é uma modalidade de separação na qual é empregada uma FE polar e uma FM menos polar.¹¹²⁻¹¹⁵ Entretanto, ao contrário da cromatografia líquida em fase normal, a FM em HILIC é composta por uma mistura contendo uma porcentagem alta de solvente orgânico (geralmente acetonitrila, podendo também ser usado metanol ou acetona) e uma porcentagem relativamente pequena de água, uma vez que neste caso, a água é o solvente mais forte. O fato da HILIC ser uma variação da

cromatografia líquida em fase normal, na qual também se empregam FE polares, porém com FM constituídas apenas por solventes orgânicos de baixa polaridade (geralmente hexano, com pequenas quantidades de solventes menos apolares), ela também tem sido definida como cromatografia líquida de “fase reversa reversa” ou de “fase normal aquosa”.^{112,115}

O principal mecanismo de interação que rege as separações em HILIC é o de partição.¹¹²⁻¹¹⁵ A alta polaridade da FE associada ao uso de uma FM contendo água leva a formação de uma camada de água que fica imobilizada na superfície da FE, e, por causa disso, o composto em análise estabelece um equilíbrio com esta camada de água e a FM que possui caráter mais hidrofóbico (Figura 5).

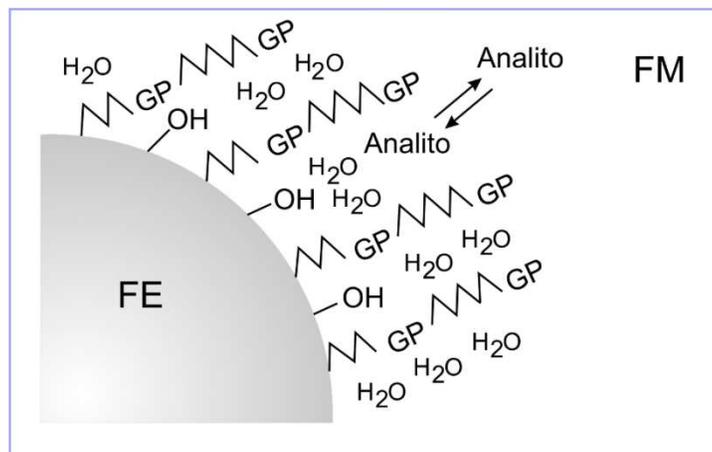


Figura 5 – Mecanismo de partição em HILIC.

Desta forma, as FE HILIC possuem necessariamente características polares, podendo ser constituídas de sílica ou outros suportes cromatográficos modificados ou não.¹¹²⁻¹¹⁴ No caso dos suportes modificados, os principais grupos que são ligados às cadeias alquila são: amino, amida, diol, ciano, sulfobetaina e ciclodextrina. Na Figura 4E está exemplificada a estrutura de uma FE HILIC.

Embora esta modalidade de separação tenha sido usada pela primeira vez em 1975, por Linden e Lawhead¹¹⁶ na separação de carboidratos, empregando uma FE baseada em sílica com grupos amino e uma FM composta de uma mistura de

acetonitrila e água, foi somente em 1990 que esta modalidade de separação recebeu a denominação de HILIC, proposta por Alpert.¹¹⁷ Segundo Alpert, o termo HILIC deve ser empregado se (i) o solvente de eluição forte for a água e (ii) o mecanismo de retenção for a partição. Somente recentemente, a HILIC vem ganhando aceitação e sendo empregada para a separação de compostos polares em diferentes áreas de aplicação, como a química farmacêutica, agrícola, alimentícia, medicinal, proteômica e metabolômica.^{112-114,118}

Essa grande ascensão da HILIC nos últimos anos para análise de compostos polares se deve as vantagens que esta modalidade de separação apresenta em relação a cromatografia líquida em FN e FR e também ao desenvolvimento de um grande número de FE HILIC, que vêm sendo comercializadas por praticamente todos os fabricantes de colunas cromatográficas.^{112,113,119,120} Em relação as separações em FN, as principais vantagens apresentadas são: (i) melhor solubilidade dos compostos polares, que usualmente possuem baixa solubilidade nos solventes apolares empregados em FN e (ii) possibilidade de ser empregada em análises com detecção por EM, uma vez que a ionização de uma FM orgânica e apolar não é facilmente alcançada. Em relação as separações em FR, pode-se citar: (i) a ordem de eluição dos compostos em HILIC é mais ou menos oposta a ordem de eluição em FR, o que indica que a HILIC retém melhor os compostos que são problemáticos de se analisar em FR; (ii) alta detectabilidade nas análises com detecção por EM devido a alta porcentagem de solvente orgânico polar empregada nas FM para HILIC e (iii) separações mais rápidas devido a menor viscosidade da FM.

4 - CONCLUSÕES E TENDÊNCIAS FUTURAS

As FE modernas são o resultado de anos de pesquisa em busca de FE que permitam a separação de misturas complexas com seletividade, eficiência, resolução e rapidez. Para isso, foram necessários os desenvolvimentos de novos suportes cromatográficos e/ou o melhoramento dos já existentes, de novas estratégias no preparo de FE e também a criação de FE com diferentes funcionalidades.

Conforme a revisão apresentada, que traz os desenvolvimentos mais recentes a respeito de FE para CLAE-FR, pode-se concluir que muitos avanços já foram alcançados e que a disponibilidade dessas novas FE, que possuem características de seletividade e estabilidade superiores as FE existentes até então, vem permitindo a expansão do uso da CLAE-FR, bem como facilitando a separação de compostos difíceis de serem analisados, como os compostos básicos. A tendência é que esta expansão aumente conforme o emprego dessas FE se torne usual.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

5 - REFERÊNCIAS

1. Tonhi, E.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 616.
2. Silva, C. R.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; Airoidi, C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 270.
3. Silva, C. R.; Collins, C. H.; *LCGC North Am. LC Column Technology Supplement* **2008**, *26*, 47.
4. Collins, C. H.; Silva, C. R.; Faria, A. M.; Collins, K. E.; Jardim, I. C. S. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 604.
5. Faria, A. M.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20*, 1385.
6. Borges, E. M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; *Quim. Nova*, no prelo.
7. Unger, K. K.; Trudinger, U. Em *High Performance Liquid Chromatography*; Brown, P.R.; Hartwick, R.A., eds.; Wiley: New York, 1989, cap. 3.
8. Dun, H.; Zhang, W.; Wey, Y.; Xiuqing, S.; Li, Y.; Chen, L.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5016.
9. Nawrocki, J.; Dunlap, C.; McCormick, A.; Carr, P. W.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 1
10. Nawrocki, J.; Dunlap, C.; Li, J.; Zhao, J.; McNeff, C. V.; McCormick, A.; Carr, P. W.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1028*, 31.
11. Luo, H.; Carr, P. W.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 919.
12. Zizkovsky, V.; Kucera, R.; Klimes, J.; Dohnal, J.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1189*, 83.

13. Wenclawiak, B. W.; Giegold, S.; Teutenberg, T.; *Anal. Lett.* **2008**, *41*, 1097.
14. Meyer, V. R.: *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 4th ed., Wiley: New York, 2004.
15. Unger, K. K.; Skudas, R.; Schulte, M. M.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 393.
16. Guiochon, G.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1126*, 6.
17. Kirkland, J. J.; Truszkowski, F. A.; Ricker, R. D.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *965*, 25.
18. Stella, C.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L.; Tchapla, A.; *Chromatographia Suppl.* **2001**, *53*, S113.
19. Nawrocki, J.; *J. Chromatogr. A* **1997**, *779*, 29.
20. Nawrocki, J.; Moir, D. L.; Szczepaniak, W.; *Chromatographia* **1989**, *28*, 143.
21. Lesellier, E.; West, C.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1158*, 329.
22. Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1845.
23. Gritti, F.; Perdu, C.; Guiochon, G.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1180*, 73.
24. http://www.microsolvttech.com/hplc/typec_about3.asp, acessada em Agosto 2009.
25. Cheng, Y. F.; Walter, T. H.; Lu, Z.; Iraneta, P.; Alden, B. A.; Gandreau, C.; Grassi, J. M.; Carmody, J. L.; O'Gara, J. E.; Fisk, R. P.; *LC-GC North Am.* **2000**, *18*, 1162.
26. Wyndham, K. D.; O'Gara, J. E.; Walter, T. H.; Glose, K. H.; Lawrence, N. L.; Alden, B. A.; Izzo, G. S.; Hudalla, C. J.; Iraneta, P. C.; *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6781.
27. Liu, Y.; Grinberg, N.; Thompson, K. C.; Wenslow, R. M.; Neue, U. D.; Morrison, D.; Walter, T. H.; O'Gara, J. E.; Wyndham K. D.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *554*, 144.
28. Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 214.
29. Vanhoenacker, G.; Sandra, P.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 245.
30. Teutenberg, T.; Hollebekkers, K.; Wiese, S.; Boergers, A.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 1262.
31. <http://www.phenomenex.com/products/industry.aspx?id=206>, acessada em Agosto 2009.
32. <http://www.kromasil.com/kromasil/opencms/eternity/about.html>, acessada em Agosto 2009.
33. http://www.selerity.com/main/main_products_hplc_acc.html, acessada em Outubro 2009.

34. <http://www.selerity.com/main/Documents/TechNote811.pdf>, acessada em Outubro 2009.
35. Fekete, S.; Fekete, J.; Ganzler, K.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *50*, 703.
36. Cunliffe, J. M.; Maloney, T. D.; *J. Sep.Sci.* **2007**, *30*, 3104.
37. <http://www.phenomenex.com/Phen/EM/ws63990808/technology.html>, acessada em Outubro 2009.
38. Kirkland, J. J.; Truszkowski, F. A.; Dilks Jr., C. H.; Engel, G. S.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *890*, 3.
39. <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/consumables/columns/lcandlc-ms/pages/default.aspx>, acessada em Agosto 2009.
40. <http://www.advanced-materials-tech.com/halo.html>, acessada em Agosto 2009.
41. <http://www.sigmaaldrich.com/express>, acessada em Agosto 2009.
42. Faria, A. M.; Bottoli, C. B. G.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, C. H.; *Quim. Nova* **2006**, *29*, 300.
43. Miller, S.; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 99A.
44. Ikegami, T.; Tanaka, N.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 527.
45. http://www.merck-chemicals.com.br/colunas-de-hplc-chromolith-/c_oUeb.s1LrkgAAEWq.fVhTl, acessada em Outubro de 2009.
46. http://www.phenomenex.com/products/brands/view.aspx?id=174&ekmense=10_submenu_185_link_3, acessada em Outubro 2009.
47. Zizkovsky, V. Kucera, R.; Klimes, J.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *44*, 1048.
48. Zizkovsky, V.; Kucera, R.; Klimes, J.; Dohnal, J.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1189*, 83.
49. Dunlap, C. J.; McNeff, C. V.; Stoll, D.; Carr, P. W.; *Anal. Chem.* **2001**, *1*, 599.
50. Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *952*, 1.
51. Baldean-Galea, M. S.; Jandera, P.; Hodisan, S.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, *31*, 807.
52. Ovens, C.; Sievwright, D.; Silcock, A. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1137*, 56.
53. Yang, Y., *LCGC North Am. LC Column Technology Supplement* **2006**, *24*, 53.
54. Faria, A. M.; Jardim, I. C. S. F.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 782.
55. Ge, J.; Zhao, L.; Shi, Y.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, *31*, 151.

56. Silva, C. R.; Collins, C. H.; Collins, K. E.; Airoidi, C.; *J. Sep.Sci.* **2006**, *29*, 790.
57. Silva, C. R.; Airoidi, C.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1087*, 29.
58. Silva, C. R.; Airoidi, C.; Collins, K. E.; Collins, C. H.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1073*, 155.
59. Lochmüller, C. H.; Marshall, D. B.; *Anal. Chim. Acta* **1982**, *142*, 63.
60. Sudo, Y.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *737*, 139.
61. Pesek, J. J.; Matyska, M. T.; Yu, R. J.; *J. Chromatogr. A* **2002**, *947*, 195.
62. Kirkland, J. J.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 9.
63. Naváková, L.; Solich, P.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1088*, 24.
64. <http://www.chem.agilent.com/enUS/products/consumables/columns/lcandlcm/zorbaxstablebond80a/pages/default.aspx>, acessada em Novembro 2009.
65. Kirkland, J. J.; Adams Jr., J. B.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4344.
66. <http://www.chem.agilent.com/en-us/products/consumables/columns/lcandlcm/zorbaxextend-c18/pages/default.aspx>, acessada em Novembro 2009.
67. Neue, U. D.; O’Gara, J. E.; Méndez, A., *J. Chromatogr. A* **2006**, *1127*, 161.
68. Németh, T.; Haghedooren, E.; Noszál, B.; Hoogmartens, J.; Adams, E.; *J. Chemom.* **2008**, *22*, 178.
69. Luo, H.; Ma, L.; Paek, C.; Carr, P. W.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1202*, 8.
70. Wang, Y.; Harrison, M.; Clark, B. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1005*, 77.
71. Pellati, F.; Benvenuti, S.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *48*, 254.
72. Snyder, L. R.; Dolan, J. W.; Carr, P. W.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1060*, 77.
73. Rimmer, C. A.; Sander, L. C.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 285.
74. Nomura, A.; Yamada, J.; Tsunoda, K.; *Anal. Sci.* **1987**, *3*, 209.
75. Ascah, T. L.; Feibush, B.; *J. Chromatogr.* **1990**, *506*, 357.
76. Neue, U. D.; Cheng, Y. F.; Lu, Z.; Alden, B. A.; Iraneta, P. C.; Phoebe, C. H.; Van Tran, K.; *Chromatographia* **2001**, *54*, 169.
77. Majors, R. E.; *LCGC North Am.* **2002**, *20*, 584.
78. Neue, U. D.; O’Gara, J. E.; Méndez, A.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1127*, 161.

79. Jing, L. L.; Jiang, R.; Liu, P.; Wang, P. A.; Shi, T. Y.; Sun, X. L.; *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 212.
80. O’Gara, J. E.; Walsh, D. P.; Phoebe Jr., C. H.; Alden, B. A.; Bouvier, E. S. P.; Iraneta, P. C.; Capparella, M.; Walter, T. H.; *LCGC North Am.* **2001**, *19*, 632.
81. Coyn, J. W.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1712.
82. Euerby, M. R.; Petersson, P.; Campbell, W.; Roe, W.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1154*, 138.
83. Horak, J.; Maier, N. M.; Lindner, W.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1045*, 43.
84. Neimark, I. E.; Chertov, V. M.; Dokl. Akad. Nauk SSSR. **1961**, *139*, 977.
85. Przybyciel, M.; *LCGC North Am. LC Column Technology Supplement* **2006**, *24*, 49.
86. Stevenson, P. G.; Kayllo, S.; Dennis, G. R.; Shalliker, R. A.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, *31*, 324.
87. Yang, M.; Fazio, S.; Munch, D.; Drumm, P.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1097*, 124.
88. Kayllo, S.; Dennis, G. R.; Shalliker, R. A.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1126*, 283.
89. Euerby, M. R.; McKeon, A. P.; Petersson, P.; *J. Sep. Sci.* **2003**, *26*, 295.
90. Marchand, D. H.; Croes, K.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R.; Henry, R. A.; Kallury, K. M. R.; Waite, S.; Carr, P. W.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1062*, 65.
91. Wang, Y.; Harrison, M.; Clark, B. J.; *J. Chromatogr. A* **2006**, *1105*, 77.
92. Przybyciel, M.; *LCGC North Am.* **2005**, *23*, 554.
93. Berendsen, G. E.; Pikaart, K. A.; Galan, L.; *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 1990.
94. Zhang, W.; *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 910.
95. Yamamoto, F. M.; Rokushika, S.; *J. Chromatogr. A* **2000**, *898*, 141.
96. Bell, D. S.; Daniel Jones, A.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1073*, 99.
97. Monde, T.; Kamiyuki, T.; Kuroda, T.; Mikumo, K.; Ohkawa, T.; Fukube, H.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *722*, 273.
98. Kamiyuki, T.; Monde, T.; Yano, K.; Yoko, T.; Konakahara, T.; *Chromatographia* **1999**, *49*, 649.
99. Lanina, S. A.; Toledo, P.; Sampels, S.; Kamal-Eldin, A.; Jastrebova, J. A.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1157*, 159.
100. Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F.; *J. Sep. Sci.* **2009**, no prelo.
101. Bicker, W.; Lämmerhofer, M.; Linder, W., *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 263.

102. Gilar, M.; Yu, Y. Q.; Ahn, J.; Fournier, J.; Gebler, J. C.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1191*, 162.
103. Li, J.; Shao, S.; Jaworsky, M. S.; Kurtulik, P. T.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1185*, 185.
104. Mclaughlin, L. W.; *Chem. Rev.* **1989**, *89*, 309.
105. Venkatramani, C. J.; Zelechonok, Y.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1066*, 47.
106. Davies, N. H.; Euerby, M. R.; McCalley, D. V.; *J. Chromatogr. A* **2007**, *1138*, 65.
107. Walshe, M.; Kelly, M. T.; Smyth, M. R.; Ritchie, H.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *708*, 31.
108. Mandell, J. D.; Hershey, A. D.; *Anal. Biochem.* **1960**, *1*, 66.
109. http://www.sielc.com/Products_Primesep.html, acessada em Novembro 2009.
110. <http://www.dionex.com/en-us/products/columns/lc/mixed-mode/lp-71735.html>, acessada em Novembro 2009.
111. Nesterenko, E. P.; Nesterenko, P. N.; Paull, B.; *Anal. Chim. Acta* **2009**, *652*, 3.
112. Hemström, P.; Irgum, K.; *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1784.
113. Ikegami, T.; Tomomatsu, K.; Takubo, H.; Horie, K.; Tanaka, N.; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 474.
114. Naidong, W.; *J. Chromatogr. B* **2003**, *796*, 209.
115. Persson, J.; Hemström, P.; Irgum, K.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1504.
116. Linden, J. C.; Lawhead, C. L.; *J. Chromatogr.* **1975**, *105*, 125.
117. Alpert, A. J.; *J. Chromatogr.* **1990**, *499*, 177.
118. Olsen, B. A.; *J. Chromatogr. A* **2001**, *913*, 113.
119. Guo, Y.; Gaiki, S.; *J. Chromatogr. A* **2005**, *1074*, 71.
120. Grumbach, E. S.; Diehl, D. M.; Neue, U. D.; *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1511.

CAPÍTULO 3

A New Thermally Immobilized Fluorinated Stationary Phase for RP-HPLC

ABSTRACT

A new fluorinated stationary phase was prepared through thermal immobilization of poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane) onto 5 μm Kromasil silica particles. The best conditions of immobilization time and temperature were determined through a central composite design and response surface methodologies. Physical-chemical characterization using solid-state ^{29}Si NMR measurements, infrared spectroscopy and elemental analysis showed that the immobilization process was effective to promote a coating of the support that corresponds to a monolayer of polymer. The stationary phase presents selectivity for positional isomers and good peak shape for basic compounds.

Keywords: experimental design, poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane), RP-HPLC, stationary phases, thermal immobilization

1 - INTRODUCTION

The continuous development of new types of stationary phases (SP) for reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) is a consequence of the wide use of this technique for the analyses of foods, pharmaceuticals, environmental pollutants and biological samples. These developments are focused principally on the novel selectivities of stationary phases that is required for the separation of complex mixtures, and on improving the peak shapes of basic compounds. This still remains a challenge in developing SP for HPLC [1-3].

Many SP, modified with different groups or different alkyl chain lengths, have been developed to improve chromatographic selectivity [4-8]. Recently, fluorinated

stationary phases have been explored due to their promising characteristics for the separation of halogenated and aromatic compounds as well as positional isomers. This selectivity is derived from specific properties of C-F bonds that promote increases in the dipole character of the SP, and increased interactions with polar compounds. Thus, the separation mechanism is somewhat different from that which operates for the more commonly used C18 columns [9-15].

The preparation of more selective SP can easily be made by sorption and subsequent immobilization of liquid polymers onto an appropriate chromatographic support. These SP present higher coverage of the active sites of the support and the selectivity depends fundamentally on the functional groups present in the immobilized polymer. Due the availability of a wide range of polymers with different functionalities the preparation of coated SP with new selectivities depends principally on the choice of a suitable polymer for the specific separation [16]. In recent years, several SP were prepared based on pure and metalized silicas, with polymers immobilized by thermal treatment, gamma radiation and microwave irradiation. The polymers include poly(methyloctylsiloxane) (PMOS) [17-23], poly(methyloctadecylsiloxane) (PMODS) [24], polybutadiene (PBD) [25-28] and poly(methyltetradecylsiloxane) PMTDS [29-33].

In the present work a new fluorinated stationary phase, based on poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane) (PMTFS), was prepared by thermal immobilization of this polymer onto silica, optimized using a central composite design and response surface methodology. The optimized SP was characterized by physical-chemical tests and chromatographic evaluation using several test mixtures and applied for the separation of polyfluorinated aromatic compounds.

2 - EXPERIMENTAL

2.1 - MATERIALS

Kromasil silica from Akzo Nobel (Bohus, Sweden), with a mean particle size of 5 μm , mean pore diameter of 11.1 nm and a specific surface area of 308 m^2/g was used as support for preparation of the stationary phase. The poly(methyl-3,3,3-

trifluoropropylsiloxane) (PMTFS) polymer, average molar mass (M) 4600, was obtained from Gelest (Morrisville, PA, USA).

Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) and HPLC-grade methanol and acetonitrile (Tedia, Rio de Janeiro, Brazil) were used to prepare the mobile phases and were filtered using 0.45 μm Nylon membrane filters from Millipore. HPLC-grade dichloromethane and tetrahydrofuran, obtained from Tedia, were used after filtration with 0.45 μm PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane filters from Millipore. The buffered mobile phases were prepared with potassium salts, KH_2PO_4 and K_2HPO_4 , purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil). The compounds used for the chromatographic tests were analytical reagent grade and were not further purified.

2.2 - PREPARATION OF PMTFS COATED SILICA

The SP was prepared with a 53 % loading of PMTFS ($1.13 \text{ g}_{\text{PMTFS}}/\text{g}_{\text{Si}}$). To load the PMTFS into the silica pore system, a 10 % (w/v) solution of PMTFS in dichloromethane was added to the appropriate quantity of Kromasil silica, previously dried at 140 °C for 12 hours. This mixture was slowly stirred at room temperature for 3 hours, and then placed in a fume hood for evaporation of the dichloromethane at room temperature (6 days).

2.3 - OPTIMIZATION OF THERMAL IMMOBILIZATION

Portions (~3 g) of the stationary phase obtained after the evaporation of solvent were placed in stainless steel tubes (150 mm x 10 mm i.d.) fitted with frits and connectors and then submitted to different conditions of thermal treatment in a model EDG 10P FT-20 tubular oven under a nitrogen atmosphere.

The optimal time and temperature for immobilization of PMTFS onto the silica were determined by a central composite design with response surface methodology. The central composite design with two factors evaluated the efficiency and asymmetry factor of the naphthalene peak. The different conditions of time and temperature evaluated in this study are shown in Table 1.

2.4 - SOLVENT EXTRACTION OF EXCESS POLYMER

After each thermal immobilization, the stainless steel tube containing the stationary phase was connected to a Waters 510 pump (Milford, MA, USA) for extraction of non-immobilized PMTFS by passing dichloromethane at 0.5 mL/min for 4 hours. After extraction, the stationary phase contained in the tube was removed and dried with nitrogen.

2.5 - COLUMN PACKING

Columns (60 mm x 3.1 mm i.d.) were made from type 316 stainless steel tubing. The internal surface was polished using a technique developed in our laboratory [34]. The columns were slurry packed using 10 % slurries (w/v) of the stationary phase in tetrahydrofuran. A constant packing pressure of 38 MPa (Haskel packing pump, Burbank, CA, USA) was used with methanol as propulsion solvent. Columns were conditioned for 1 hour with mobile phase at 0.3 mL/min prior to the chromatographic tests. The same conditions were used to pack a column with a commercial phase, LiCrosphere[®] 60 RP-select B (Merck, Darmstadt, Germany).

2.6 - PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION

The immobilized stationary phases (Si-PMTFS) after the extraction procedure were submitted to elemental analysis on a Model CHN-2400 Perkin-Elmer Analyzer (Shelton, CT, USA). From these data, the mass of PMTFS per gram of silica (\bar{m} , the specific mass of PMTFS) was calculated, using the formula: $\bar{m}_{PMTFS} = \%C / (31 - \%C)$, where 31 refers to the percent of carbon in PMTFS. From the specific mass data the PMTFS layer thickness (τ) was calculated using the equation: $\tau = -\left(\sqrt{d^2 - Fd^2} - d/2\right)$ where the F is the immobilized fraction, $F = \bar{m}_{immobilized} / \bar{m}_{fullpores}$, and d is the mean pore diameter. It is assumed for this calculation that the pores of the silica have a constant diameter and that the immobilized PMTFS is characterized by a layer of constant thickness on the pore wall [35]. The specific pore volume (v_p) of Kromasil silica is 0.88 mL/g and the density of PMTFS is 1.28 g/mL. From this pore volume, the mass of polymer ($\bar{m}_{fullpores} = v_p \times \rho_{PMTFS}$) that fills the pore system is 1.13 g_{PMTFS}/g_{Si}.

The thermal stability of the PMTFS was evaluated by thermogravimetric analysis with a TA model TGA-2050 instrument (New Castle, USA). For this, approximately 10 mg of sample were used, which were heated from 25 to 1000 °C at 10 °C/min in an air atmosphere.

The presence of PMTFS and residual silanols on the modified particles was evaluated by infrared spectroscopy (IR) with a Bomem MB-102 FTIR spectrometer (Hartmann & Braun, St-Laurent, Canada). The samples were prepared using potassium bromide (KBr) pellets with a KBr:sample ratio of 10:1. The FTIR spectrum background was corrected using a freshly prepared pure KBr pellet. The IR spectral range was evaluated from 400 to 4000 cm^{-1} using a resolution of 4 cm^{-1} and a scan rate of 20 scans/min.

Solid-state ^{29}Si NMR measurements, using cross polarization and magic angle spinning (CP/MAS), for Si-PMTFS were recorded on a Bruker AC 300 NMR spectrometer (Rheinstetten, Germany). Magic angle spinning was carried out with 7 mm double bearing ZrO_2 rotors at 3500 Hz. The contact time was 5 ms and the pulse interval was 1.5 s. The transmitter frequencies of ^{29}Si were 59.6 MHz. The line broadening was 30 Hz and the spectral width for all spectra was about 25 kHz.

2.7 - CHROMATOGRAPHIC EVALUATION

Chromatographic evaluations were performed using a modular HPLC system from Shimadzu (Kyoto, Japan) equipped with a LC-10AD liquid chromatographic pump, a SPD-10A UV-VIS (254 nm) detector with 8 μL cell, a CTO-10A column oven and a Rheodyne 8125 injector (Cotati, USA) with 5 μL loop. Data were acquired and processed using Chrom Perfect for Windows, version 3.52 and Report-Write Plus software from Justice Innovations (Mountain View, USA). All the separations were carried out at room temperature with flow-rates of 0.3 mL/min, the optimal flow rate determined by a van Deemter curve.

The initial evaluations of the stationary phases were carried out using two test mixtures (1 and 2). The first contained neutral compounds with different polarities (acetophenone (200 mg/L), benzene (1700 mg/L), toluene (1700 mg/L) and naphthalene (129 mg/L)) and the second contained acidic, basic and neutral

compounds (phenol (220 mg/L), N,N-dimethylaniline (40 mg/L), naphthalene (129 mg/L) and acenaphthene (200 mg/L)). The column dead time, t_M , was determined using uracil (12 mg/L) as the unretained compound. The mobile-phase was methanol:water (50:50 v/v) and was prepared volumetrically from previously filtered individually measured amounts of each solvent and degassed before the use. Chromatographic performance was evaluated by means of efficiency (N/m), retention factor (k), resolution (R_s) and asymmetry factor (A_s) measured at 10 % of the peak height.

The optimized Si-PMTFS stationary phase was also chromatographically characterized with respect to hydrophobicity, silanophilic activity, ion-exchange capacity and shape selectivity by two test mixtures, those of Tanaka and co-workers [36] and Neue *et al.* [37, 38]. The Tanaka test uses three test mixtures: (A) uracil (12 mg/L), butylbenzene (1000 mg/L), pentylbenzene (1100 mg/L), *o*-terphenyl (80 mg/L) and triphenylene (50 mg/L), with which the methylene selectivity (α_{CH_2}) and steric selectivity ($\alpha_{T/O}$), were evaluated, using methanol:water (80:20 v/v) as mobile phase; (B) uracil (12 mg/L), phenol (220 mg/L) and caffeine (135 mg/L), with which the hydrogen bonding capacity ($\alpha_{C/P}$) was determined using methanol:water (30:70 v/v) as mobile phase; (C) uracil (12 mg/L), phenol (220 mg/L) and benzylamine (100 mg/L), with which the ion exchange capacities ($\alpha_{B/P}$), using methanol:0.020 mol/L phosphate buffer (30:70 v/v) as

Notas: A caracterização de uma coluna cromatográfica através das misturas teste protocoladas fornece informações de variáveis que refletem diferentes propriedades cromatográficas. As variáveis envolvidas são: (a) Seletividade hidrofóbica: é a medida do recobrimento superficial da FE (densidade de ligante) que é medida pelo fator de seletividade entre alquilbenzenos não polares de uma série homóloga, diferindo apenas por um grupo metileno. Os pares tipicamente usados para essa medida são: etilbenzeno/tolueno ou pentilbenzeno/butilbenzeno. (b) Atividade silanofílica: é a medida da quantidade de silanóis remanescentes, devido a derivatização incompleta ou o recobrimento insuficiente do suporte, e é um fator importante no mecanismo de retenção. Pode ser determinada por diferentes métodos: simetria de pico ou fator de retenção de compostos básicos, separação de *o*, *m* e *p*-toluidina ou pelos fatores de seletividade para os pares anilina/fenol ou cafeína/fenol. (c) Capacidade de troca iônica: é também uma avaliação da atividade silanofílica e pode ser caracterizada pela medida da diferença da seletividade entre um composto básico e um composto neutro em pH relativamente altos e baixos. Geralmente, emprega-se o par benzilamina e fenol. (d) Seletividade estérica: é a medida da capacidade da FE distinguir compostos que diferem apenas na sua configuração e pode ser determinada usando-se dois hidrocarbonetos aromáticos, sendo um planar e o outro não-planar, como por exemplo, o par trifenileno e *o*-terfenil.

mobile phase at pH 7.60 and pH 2.70, was obtained. With the Neue test the interactions of polar compounds with the surface of the packing were evaluated by the separation factor between the hydrophobic compounds and the compounds with polar functional groups and the silanophilic interactions were evaluated by the separation factor between the basic and the hydrophobic compounds. This mixture is composed of: uracil (12 mg/L), butylparaben (26 mg/L), naphthalene (129 mg/L), dipropylphthalate (420 mg/L), acenaphthene (200 mg/L), propranolol (400 mg/L) and amitriptyline (110 mg/L). The compounds are separated using methanol:0.020 mol/L phosphate buffer at pH 7.0 (65:35 v/v) as mobile phase.

Finally, the Si-PMTFS stationary phase was evaluated for its ability to separate positional isomers. The mixture employed was a mixture of difluorophenols (2,3 – difluorophenol, 2,4 – difluorophenol, 2,6 – difluorophenol, 3,4 – difluorophenol, 3,5 – difluorophenol) at concentrations of 10 mg/L. The compounds were separated using acetonitrile:water (20:80 v/v) as mobile phase.

3 - RESULTS AND DISCUSSION

3.1 - OPTIMIZATION OF THE THERMAL IMMOBILIZATION OF THE STATIONARY PHASE

The thermal immobilization of the stationary phase was carried out according to Table 1. The conditions of immobilization time and temperature were selected after prior univariate tests and are based on the thermal stability of the PMTFS, up to 230 °C, determined by thermogravimetric analysis (Figure 1).

The chromatographic parameters of the Si-PMTFS stationary phases immobilized under different conditions are shown in Table 1. Better chromatographic performances were obtained in experiments 2, 4 and 9, where columns with high efficiencies (higher than 70 000 N/m) and symmetrical peaks were obtained for naphthalene, a neutral compound, as well as for N,N-dimethylaniline, a basic compound. In these experiments the highest carbon percentage was also obtained, as a result of the higher immobilization temperatures employed. As a consequence of the

percent carbon, the polymeric film thickness (τ) of these stationary phases was approximately 1.0 nm, which corresponds to a monolayer coating of the support by the polymer. All these results show that the coating of the support is uniform and homogeneous, probably due a better distribution of the polymer onto the chromatographic support, which results in reduced interactions between the basic compound and the residual silanol groups.

Table 1 - Different conditions of thermal immobilization time and temperature evaluated, the corresponding central composite design matrix for two variables and the respectively chromatographic parameters of these SP.

Experiment	Temperature (°C)	Time (h)	Coded variable levels ^{a)}		Chromatographic parameters					% C	τ (nm)
			x_1	x_2	N/m ^{b)}	As ^{b)}	As ^{c)}	k ^{b),d)}	Rs ^{e)}		
1	130	7	-1	-1	48 000	1.4	1.5	1.6	2.8	5.41	0.50
2	210	7	+1	-1	70 000	1.1	1.2	7.3	5.1	8.39	0.90
3	130	17	-1	+1	57 000	1.4	1.7	2.1	3.2	4.93	0.44
4	210	17	+1	+1	74 000	1.0	1.1	6.7	5.2	8.78	0.97
5	170	12	0	0	64 000	1.5	1.9	4.9	4.7	7.54	0.79
6	170	12	0	0	66 000	1.3	1.5	5.0	4.6	7.55	0.79
7	170	12	0	0	65 000	1.5	1.7	5.3	4.8	7.58	0.79
8	114	12	-1.4	0	43 000	1.3	-	-	-	3.07	0.26
9	226	12	+1.4	0	77 000	1.2	1.4	8.3	5.6	9.20	1.06
10	170	5	0	-1.4	47 000	2.5	2.9	2.8	2.8	4.95	0.44
11	170	19	0	+1.4	69 000	1.1	1.4	6.1	5.0	6.10	0.58

a) Equations used to convert the coded variable level to the normal variable level are: $x_1 = \frac{(T-170)}{40}$ and

$x_2 = \frac{(t-12)}{5}$, where T= temperature (°C) and t=time (hours).

b) calculated for the naphthalene peak.

c) calculated for the N,N-dimethylaniline peak.

d) t_M was measured with uracil.

e) calculated for the toluene-naphthalene pair.

- insufficient separation.

Experiments 1, 3, 8 and 10, in which the lowest immobilization temperatures and/or the lowest immobilization times were employed, resulted in stationary phases with the worst chromatographic performances, without complete separation of the compounds. The immobilization temperatures and times employed were not sufficient to promote immobilization of PMTFS onto the chromatographic support. This is confirmed

by the lower percent carbon of these stationary phases, between 3 and 6 %, which resulted in a polymer layer with equal or less than 0.5 nm thickness.

The repeatability of the preparation of these stationary phases was evaluated from the triplicate experiments performed at the center point (experiments 5, 6 and 7). The estimated relative standard deviation (RSD) was 2 % for column efficiency and 0.3 % for polymer coating (in terms of percent carbon). This result is quite satisfactory.

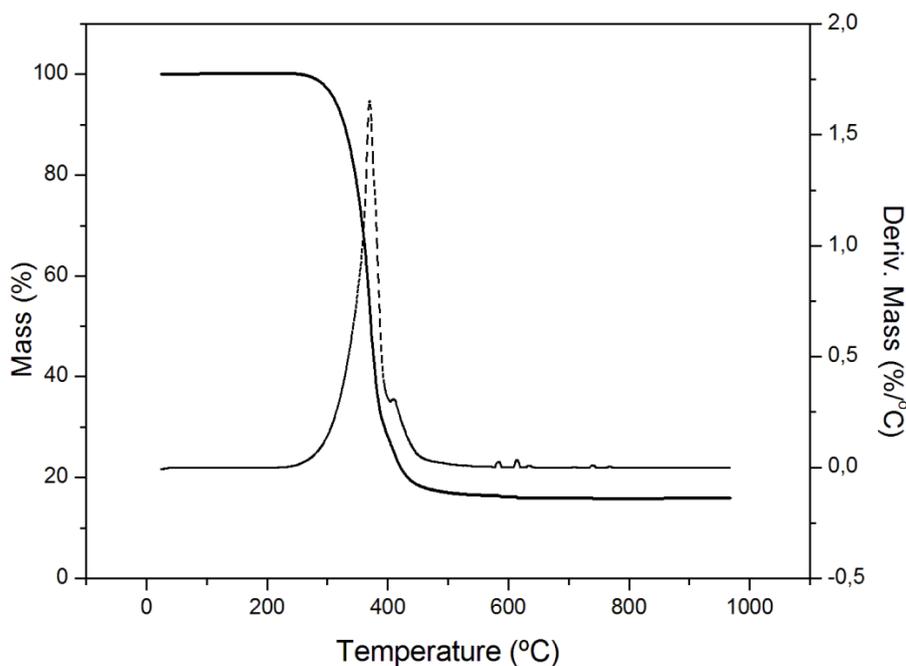


Figure 1 – Thermogram of PMTFS polymer.

The experimental results, efficiency and asymmetry factor for the naphthalene peak, were used to construct a response surface to determine the optimal region for both time and temperature to be used for the subsequent preparation of the optimized Si-PMTFS stationary phase (Figure 2). In order to represent the surface responses, a quadratic model for both the efficiency and asymmetry factor was used. The equations are given by:

$$\text{Efficiency} : 65,064 + 10,980x_1 + 5,595x_2 - 1,757x_1^2 - 2,513x_2^2 - 1,108x_1x_2$$

$(\pm 726.60) \quad (\pm 444.95) \quad (\pm 444.95) \quad (\pm 529.59) \quad (\pm 529.59) \quad (\pm 629.25)$

$$\text{Asymmetry} : 1.42 - 0.096x_1 - 0.245x_2 - 0.154x_1^2 + 0.118x_2^2 - 0.0025x_1x_2$$

$(\pm 0.061) \quad (\pm 0.037) \quad (\pm 0.037) \quad (\pm 0.044) \quad (\pm 0.044) \quad (\pm 0.053)$

The brighter region of Figure 2 (A) corresponds to column efficiencies higher than 70 000 N/m. Higher column efficiencies were obtained when the immobilization step was carried out at higher temperatures and with medium to long immobilization times. These results are in agreement with the significance of effects in which both time and temperature are significant.

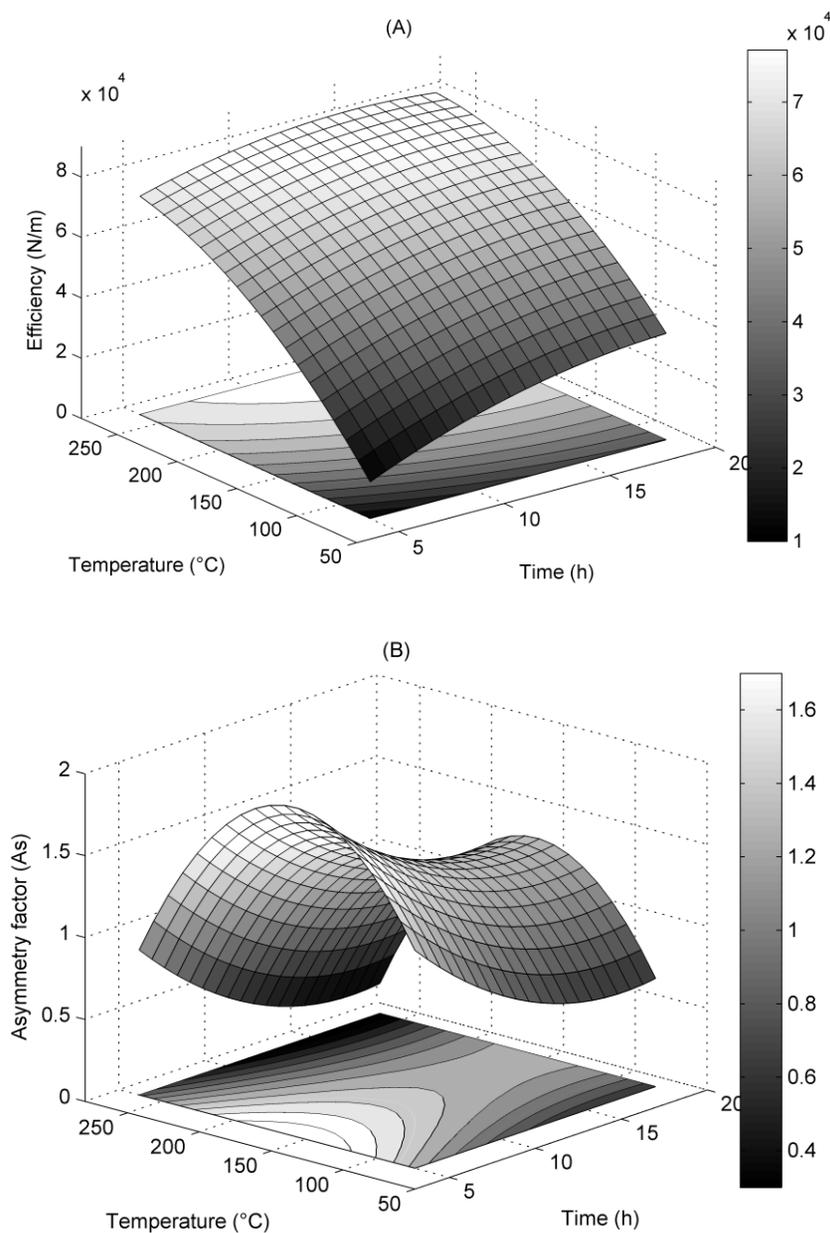


Figure 2 – Response surfaces for thermal immobilization of the PMTFS onto silica. (A) efficiency and (B) asymmetry factor.

The medium gray regions of the Figure 2 (B) correspond to asymmetry factors between 0.9 and 1.2. These values of asymmetry factors were obtained when the immobilization was carried out at intermediate times but at both high and low temperatures. Again, these results are in agreement with the significance of effects in which only the time is significant.

The optimal region was determined by superposition of these two response surfaces and the result obtained by superposition of the response surfaces show that the optimal region for both immobilization time and temperature, which should result in SP with column efficiencies above 70 000 N/m and asymmetry factors for the naphthalene peak between 0.9 and 1.2, are delimited by the real values of immobilization time and temperature in the range 9.5 - 19 h and 197 - 226 °C, respectively. As any value inside of this region should result in a stationary phase with similar chromatographic performance, the thermal immobilization conditions were defined as heating at 200 °C for 12 hours.

3.2 - PHYSICAL CHARACTERIZATION OF Si-PMTFS

Infrared spectroscopy was used to verify the presence of the PMTFS immobilized onto the silica particles and also the presence of residual silanol groups. The IR spectra of the silica before and after the immobilization of PMTFS are shown in Figure 3 (A). The presence of the PMTFS is confirmed by the bands in the range of 1100 and 1400 cm^{-1} that correspond to C-F stretching. More specifically, the bands at 1150 and 1400 cm^{-1} are characteristic of C-F₃ stretching. The silanol groups appear in two regions of the spectra. The band at 980 cm^{-1} corresponds of the free silanol groups and this band diminishes when the chromatographic support is coated with the polymer. The wide band in the range between 3900-3000 cm^{-1} is characteristic of OH stretching derived from silanol groups and from water molecules. This band is also reduced after the immobilization step suggesting that most silanol groups are coated.

The ²⁹Si NMR spectra for pure silica and the Si-PMTFS stationary phases are shown in Figure 3 (B). The Qⁿ species, where *n* is related to the number of Si-O-Si bonds [39], are identified as Q⁴ (siloxanes), Q³ (free and vicinal silanols) and Q² (geminal silanols) at -110, -101 and -94 ppm, respectively. The Q² species diminished

significantly in Si-PMTFS and the ratio of the Q^3/Q^4 species is also reduced, indicating that total quantity of silanol groups was reduced after immobilization. The signals in the range of $-22,5$ ppm ($D^{2''}$) and -20 ppm (D^1_H and D^2') indicate the formation of new silicon species and can be attributed to PMTFS adsorbed and chemically bonded onto the silica particles, respectively.

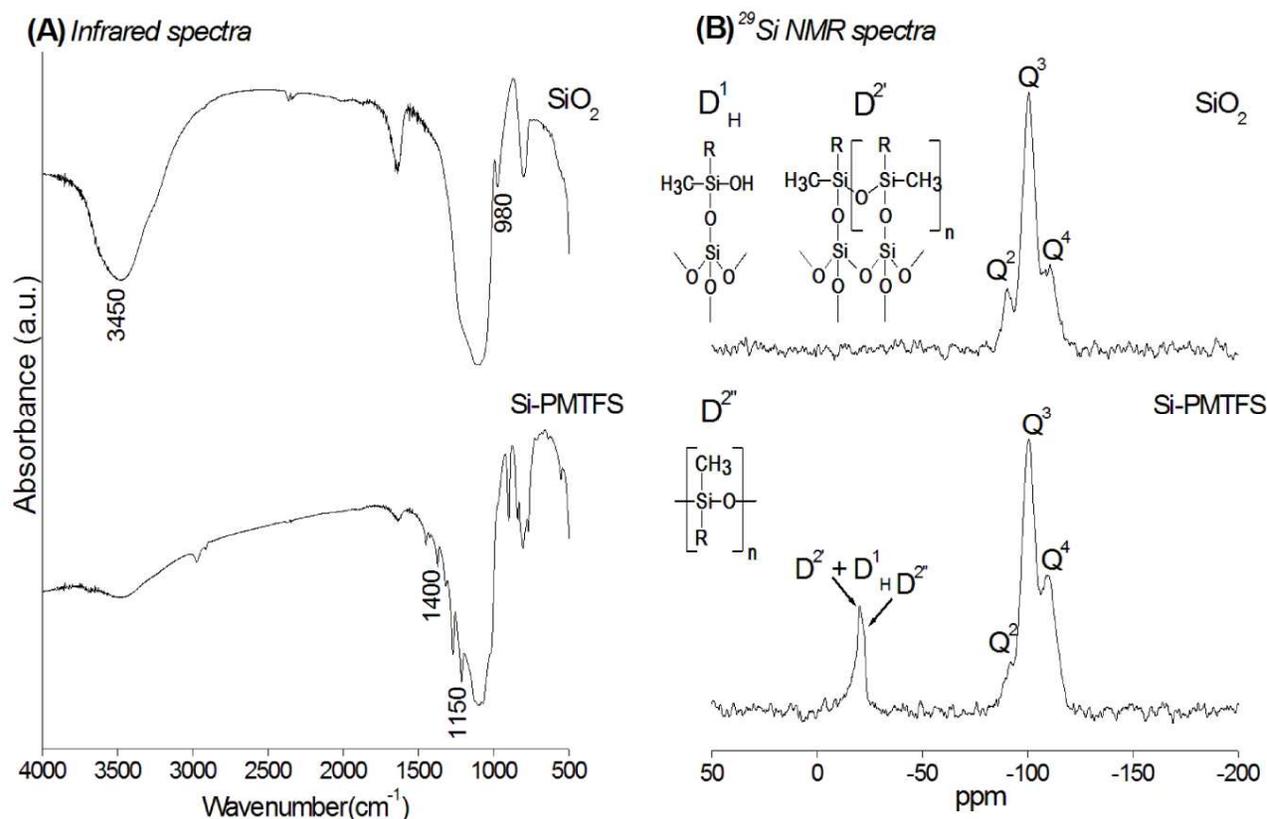


Figure 3 – Infrared spectra (A) and ^{29}Si NMR spectra (B) of pure silica and the optimized thermally immobilized Si-PMTFS stationary phase.

3.3 - CHROMATOGRAPHIC CHARACTERIZATION OF Si-PMTFS

The optimized Si-PMTFS stationary phase was chromatographically characterized with respect to hydrophobicity, silanophilic activity, ion-exchange capacity and shape selectivity by two test mixtures, those of Tanaka and co-workers [36] and Neue *et al.* [37,38] and also with a mixture of difluorophenols that provide specific information about the fluorinated stationary phases.

The Tanaka mixture test (A) (Figure 4 A) evaluates the hydrophobic selectivity of the SP by the separation factor for pentylbenzene and butylbenzene (α_{CH_2}) and the shape selectivity ($\alpha_{T/O}$) by the separation factor of non-planar *o*-terphenyl and highly planar triphenylene. The value calculated for the methylene selectivity (α_{CH_2}) was 1.5 and indicates that the Si-PMTFS SP has capacity for the separation of compounds that differ only by a methylene group. This value is superior to the value encountered in the literature [40] for an octyl fluorinated stationary phase ($\alpha_{CH_2} = 1.23$) and similar to a Kromasil C18 stationary phase ($\alpha_{CH_2} = 1.48$). The value calculated for steric selectivity ($\alpha_{T/O}$) was 1.33 and indicates that the Si-PMTFS stationary phase has capacity to differentiate compounds that differ only by their spatial configuration. This value is somewhat higher than the value of the octyl fluorinated stationary phase ($\alpha_{T/O} = 0.63$) [40], even with a shorter alkyl chain, and may be a consequence of the good distribution of the polymer and the arrangement of the fluorinated chains on the silica.

The Tanaka test mixture (B) shows possible hydrogen bonding interactions between phenol and caffeine and the residual silanol groups on the silica surface. The good separation of these two compounds can be seen in Figure 4 B, but the elution of caffeine after the phenol and the value of the separation factor ($\alpha_{C/P} = 1.6$) indicate that there are some residual silanol groups on the Si-PMTFS stationary phase. This value is somewhat higher than the values of the octyl fluorinated and Kromasil C18 stationary phases [40], although their lower values may be attributed to the endcapping process to which these stationary phases were submitted.

The Tanaka test C (a) and (b) characterizes the stationary phase with respect to the presence and acidity of the accessible silanol groups, using buffered mobile phase at two different pH, 2.7 and 7.6, respectively, with benzylamine as a strong base (pKa = 9.4). At the conditions of evaluation of mixture C (a) the silanol groups are not dissociated while the benzylamine is protonated and positively charged. Analyzing Figure 4 C (a) it is possible to conclude that ion-exchange interactions do not occur and that protonated benzylamine elutes together with the uracil used as the mobile phase volume marker. Under the conditions of evaluation of mixture C (b) the silanol groups are dissociated while benzylamine is protonated, favoring ion-exchange interactions.

The results of this test show that an interaction occurs between benzylamine and the SP, since the retention time increased, but, nevertheless, benzylamine elutes with a symmetrical peak ($A_s = 0.96$) (Figure 4 C (b)). The value calculated for ion-exchange interactions ($\alpha_{B/P}$) was 6.8, higher than the value for the octyl fluorinated stationary phase ($\alpha_{B/P} = 4.12$) [40].

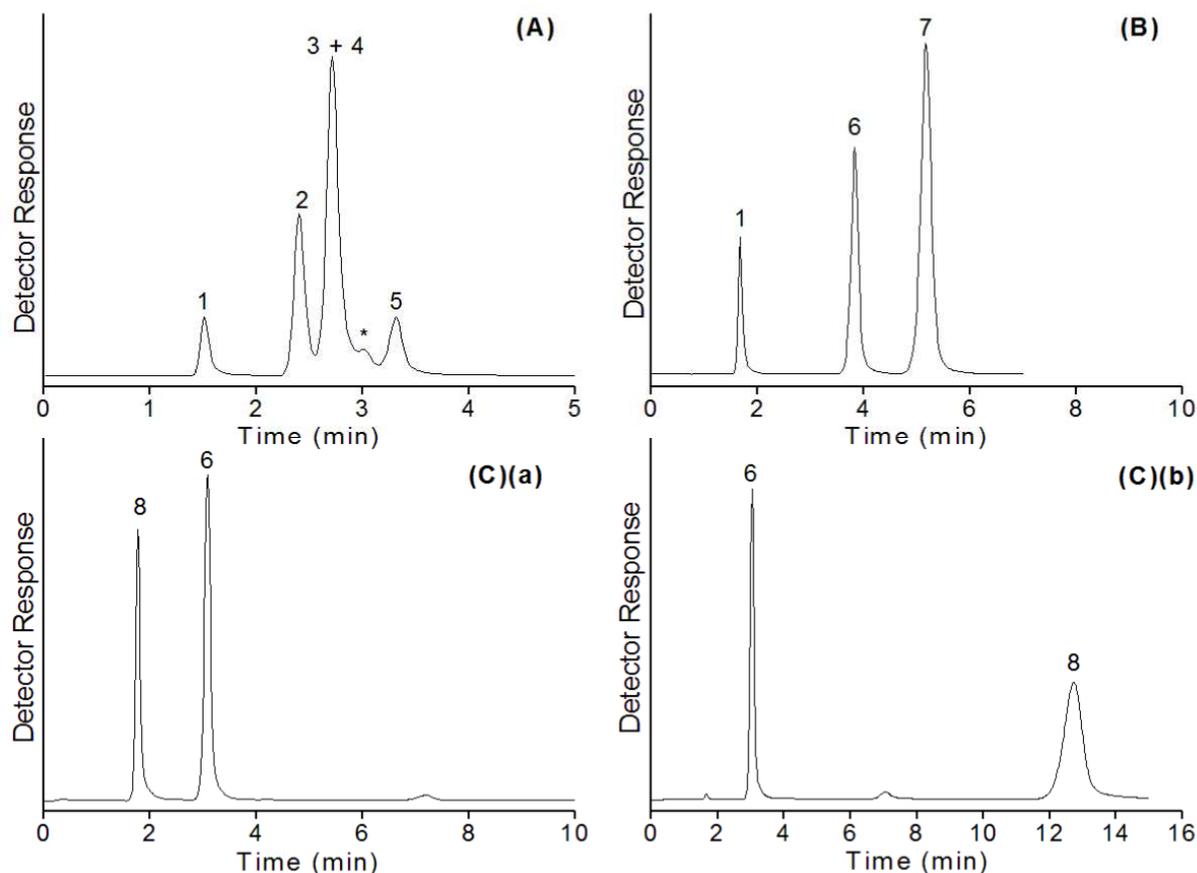


Figure 4 – Chromatograms showing the separation of the compounds of the Tanaka test mixtures with the optimized Si-PMTFS stationary phase thermally immobilized at 200 °C for 12 hours. Chromatographic conditions: injection volume: 5 μ L, flow-rate: 0.3 mL/min, temperature: 40 °C and UV detection: 254 nm, except for test mixtures (C)(a) and (C)(b) that were detected at 214 nm. Mobile-phases: (A) methanol:water (80:20 v/v), (B) methanol:water (30:70 v/v), (C)(a) methanol:0.020 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2.7 (30:70 v/v) and (C)(b) methanol:0.020 mol/L $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.6 (30:70 v/v). Peak identification: 1 – uracil, 2 – *o*-terphenyl, 3 – triphenylene, 4 – butylbenzene, 5 – pentylbenzene, 6 – phenol, 7 – caffeine, 8 – benzylamine and * impurity of butylbenzene.

The interactions of polar compounds with the surface of the packing, measured by the separation factor between hydrophobic compounds and compounds with polar functional groups and the silanophilic activity measured by the retention time and asymmetry factor of a highly basic compound (amitriptyline), were evaluated with the Neue test mixture (Figure 5).

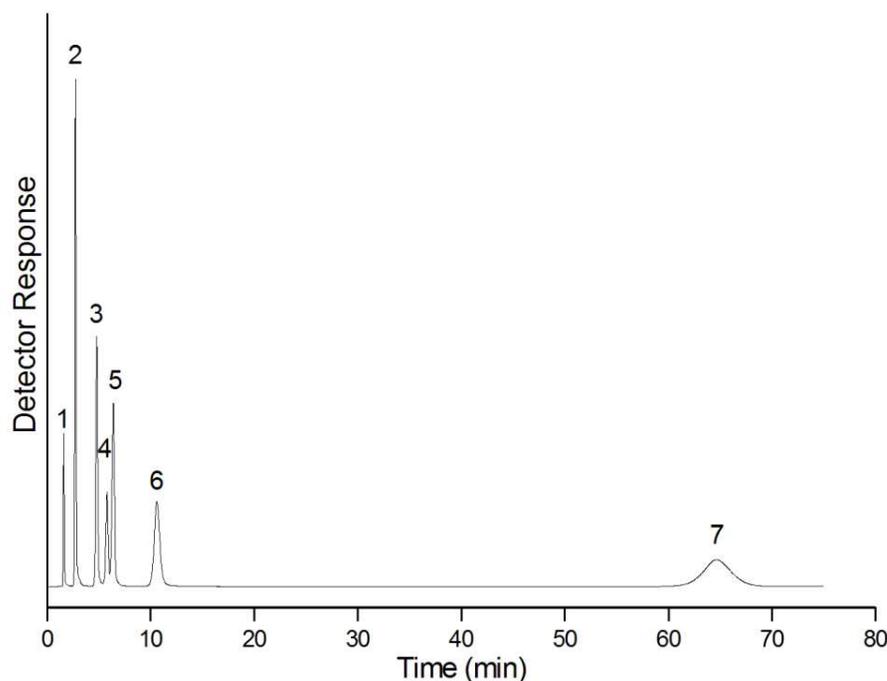


Figure 5 – Chromatogram showing the separation of the compounds of the Neue test mixture with the optimized Si-PMTFS stationary phase thermally immobilized at 200 °C for 12 hours. Chromatographic conditions: injection volume: 5 μ L, mobile phase: methanol:0.020 mol L⁻¹ KH₂PO₄/KH₂PO₄ pH 7.0 (65:35 v/v), flow-rate: 0.3 mL/min, UV detection: 254 nm, room temperature. Peak identification: 1 – uracil, 2 – butylparaben, 3 – naphthalene, 4 – dipropylphthalate, 5 – acenaphthene, 6 – propranolol and 7 – amitriptyline.

The values calculated for the separation factor between acenaphthene and butylparaben ($\alpha_{A/B}$) and acenaphthene and dipropylphthalate ($\alpha_{A/D}$) were 4.4 and 1.1, respectively. The elution of these two compounds before acenaphthene (the more hydrophobic compound) and with symmetrical peaks indicates that polar interactions are negligible. The long retention times presented by the basic compounds, propranolol and amitriptyline, can be explained based on studies of Bell and Jones [41], which suggest that the long retention times of basic compounds on fluorinated SP is due to

simultaneous electrostatic interactions of the analyte with the ionized silanols and hydrophobic or polar interactions with the poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane) moiety, which would be consistent with a hydrophobically assisted ion-exchange mechanism [42,43]. The symmetrical peaks obtained for the basic compounds show that the fluorinated SP can be a promising one for the analysis of basic compounds, when compared with the peak shapes for these compounds on classical reversed phases [44].

The last characterization of the Si-PMTFS stationary phase was made with a specific test mixture for the fluorinated stationary phases, used to evaluate its potential for separating positional isomers. For this, a mixture of difluorophenols was analyzed with the optimized Si-PMTFS SP and with a commercial C8 SP (LiCrosphere® 60 RP-select B, Merck). The chromatograms are presented in Figure 6 and show that a complete separation of all compounds was only obtained with the Si-PMTFS SP and, furthermore, with a shorter analysis time. This fact confirms the selectivity described in the literature for fluorinated stationary phases [9-13].

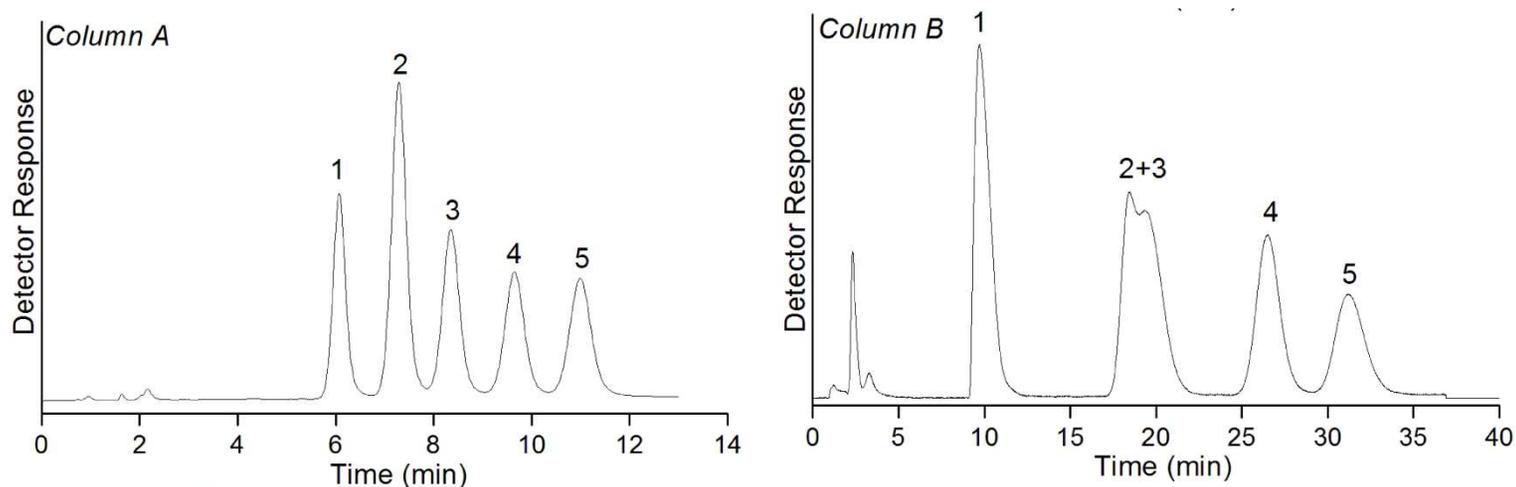


Figure 6 – Chromatograms showing the separation of a mixture of difluorophenols with the optimized Si-PMTFS stationary phase thermal immobilized at 200 °C for 12 hours, 5 µm (60 mm x 3.1 mm i.d.) (Column A) and LiCrosphere® 60 RP-select B, Merck, 5 µm (60 mm x 3.1 mm i.d.)

(Column B). Chromatographic conditions: injection volume: 5 µL, mobile phase: acetonitrile:water (20:80 v/v), flow-rate: 0.3 mL/min, UV detection: 254 nm, room temperature. Peak identification: 1 – 2,6 - difluorophenol, 2 – 2,4 - difluorophenol, 3 – 2,3 - difluorophenol, 4 – 3,4 – difluorophenol and 5 – 3,5 – difluorophenol.

4 - CONCLUDING REMARKS

The use of experimental design to define the best conditions for thermal immobilization time and temperature was relevant to prepare Si-PMTFS stationary phases with high efficiencies, symmetrical peaks for basic compounds and with a monolayer of polymer. The physical characterization by IR and ^{29}Si NMR confirm that the quantity of residual silanol groups was reduced after the thermal immobilization and that the PMTFS chains are both physically adsorbed and chemically bonded to the chromatographic support. The chromatographic characterization showed that the Si-PMTFS stationary phase exhibits good properties for application in reversed phase chromatography, selectivity for the separation of positional isomers and that the fluorine atoms play an essential role to reduce the undesirable interactions between basic compounds and residual silanol groups. Thus, these fluorinated SP present different characteristics and can be employed for the separation of basic compounds and fluorinated positional isomers.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support and fellowships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors also thank C.H. Collins for helpful discussions and suggestions.

5 - REFERENCES

- [1] Luo, H., Ma, L., Paek, C., Carr, P.W., *J. Chromatogr. A* 2008, 1202, 8-18.
- [2] Németh, T., Haghedooren, E., Noszál, B., Hoogmartens, J., Adams, E., *J. Chromatogr. A* 2008, 22, 178-185.
- [3] Neue, U.D., O'Gara, J.E., Méndez, A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1127, 161-174.
- [4] Przybyciel, M., *LCGC North Am. LC Column Technology Supplement* 2006, 24 (4), 49-52.
- [5] Silva, C.R., Jardim, I.C.S.F., Airoidi, C., *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 127-138.

- [6] Stevenson, P.G., Kayillo, S., Dennis, G.R., Shalliker, R.A., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2008, 31, 324-347.
- [7] Kayillo, S., Dennis, G.R., Shalliker, R.A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1126, 283-297.
- [8] Kamiusuki, T., Monde, T., Yano, K., Yoko, T., Konakahara, T., *Chromatographia* 1999, 49 (11/12), 649-656.
- [9] Scully, N.M., Healy, L.O., O'Mahony, T., Glennon, J.D., Dietrich, B., Albert, K., *J. Chromatogr. A* 2008, 1191, 99-107.
- [10] Havlíková, L., Matysová, L., Hájková, R., Satínský, D., Solich, P., *Talanta* 2008, 76, 597-601.
- [11] Yamamoto, F.M., Rokushita, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 898, 141-151.
- [12] Euerby, M.R., McKeon, A.P., Petersson, P., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 295-306.
- [13] Pellati, F., Benvenuti, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 254-263.
- [14] Lebrón-Aguilar, R., Quintanilla-López, J.E., Tello, A.M., Pérez-Parajón, J.M., Santiuste, J.M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1100, 208-217.
- [15] Lebrón-Aguilar, R., Quintanilla-López, J.E., Tello, J.M., Santiuste, J.M., *J. Chromatogr. A* 2007, 1160, 276-288.
- [16] Faria, A.M., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., *J. Braz. Chem. Soc.* 2009, 20, 604 – 612.
- [17] Tonhi, E., Bachmann, S., Albert, K., Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2002, 948, 97-107.
- [18] Tonhi, E., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2002, 948, 109-119.
- [19] Tonhi, E., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2003, 987 (1/2), 93-101.
- [20] Fonseca, D.A., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030 (1/2), 209-215.
- [21] Bottoli, C.B.G., Vigna, C.R.M., Fischer, G., Albert, K., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030 (1/2), 217-223.
- [22] Bottoli, C.B.G., Silva, C.R., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2004, 27, 407-423.
- [23] Vigna, C.R.M., Bottoli, C.B.G., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2007, 1156 (1/2), 60-67.

- [24] Pinto, G.M.F., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2002, 25 (2), 205-216.
- [25] Lopes, N.P., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., *J. Chromatogr. A* 2003, 987 (1/2), 77-85.
- [26] Lopes, N.P., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030 (1/2), 225-229.
- [27] Lopes, N.P., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030 (1/2), 231-236.
- [28] Morais, L.S.R., Jardim, I.C.S.F., *J. Chromatogr. A* 2005, 1073 (1/2), 127-135.
- [29] Faria, A.M., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2006, 1122 (1/2), 114-122.
- [30] Faria, A.M., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2007, 1156, 51-59.
- [31] Faria, A.M., Tonhi, E., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Sep. Sci.* 2007, 30, 1844-1851.
- [32] Faria, A.M., Silva, C.R., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., *J. Sep. Sci.* 2008, 31, 953-960.
- [33] Faria, A.M., Collins, K.E., Collins, C.H., *Chromatographia* 2008, 67, 357-363.
- [34] Collins, K.E., Franchon, A.C., Jardim, I.C.S.F., Radanovic, E., Gonçalves, M.C., *LCGC North Am.* 2000, 18, 106-117.
- [35] Collins, K.E., Sá, A.L.A., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., *Chromatographia* 2001, 53 (11/12), 661-664.
- [36] Kimata, K., Iwaguchi, K., Onishi, S., Eksteen, R., Hosoya, K., Araki, M., Tanaka, N., *J. Sep. Chromatogr.* 1989, 27, 721-727.
- [37] Neue, U.D., Serowik, E., Iraneta, P., Alden, B.A., Walter, T.H., *J. Chromatogr. A* 1999, 849, 87-100.
- [38] Neue, U.D., Alden, B.A., Walter, T.H., *J. Chromatogr. A* 1999, 849, 101-116.
- [39] Bachmann, S., Melo, L.F.C., Silva, R.B., Anazawa, T.A., Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Collins, C.H., Albert, K., *Chem. Mater.* 2001, 13 (5), 1874-1879.
- [40] Euerby, M.R., Petersson, P., *J. Chromatogr. A* 2003, 994, 13-36.
- [41] Bell, D.S., Jones, A.D., *J. Chromatogr. A* 2005, 1073, 99-109.
- [42] Neue, U.D., Phoebe, C.H., Tran, K., Cheng, Y., Lu, Z., *J. Chromatogr. A* 2001, 925, 49-67.
- [43] Yang, X., Dai, J., Carr, P.W., *J. Chromatogr. A* 2003, 996, 13-31.

[44] Silva, R.B., Silva, C.R., Airoidi, C., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., *Microchem. J.* 2006, 82, 150-158.

CAPÍTULO 4

Preparation and Characterization of a Microwave-Immobilized Fluorinated Stationary Phase for RP-HPLC

ABSTRACT

A fluorinated stationary phase was prepared through the immobilization of poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane) (PMTFS) onto 5 μm Kromasil silica by microwave irradiation. The best conditions of immobilization time and temperature were determined by experimental design and resulted in stationary phases with efficiencies higher than 70 000 N/m and with asymmetry factors for the naphthalene peak in the range of 0.9 to 1.2. The effectiveness of the microwave immobilization was evaluated by physical-chemical characterizations (IR, ^{29}Si NMR and elemental analysis) which confirmed that the polymer was attached onto the chromatographic support by different mechanisms that resulted in a percent carbon loading of 10 %. Some pharmaceuticals were completely separated with the fluorinated stationary phase using a simple mobile phase while the same separation was not possible with a traditional C18 stationary phase and, thus, the selectivity and capacity of the fluorinated stationary phase for separation of basic compounds can be emphasized.

Keywords: poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane), microwave immobilization, experimental design, stationary phases, RP-HPLC

1 - INTRODUCTION

The C18 stationary phases (SP) (based on octadecylsilane) remain the most widely used SP for reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). This can be explained mainly by the tradition that this SP has achieved over the years, since the first chromatographic materials were based on C18 and, in recent

years, by the developments that have improved stability and reduced undesirable interactions with residual silanol groups, such as the preparation of SP using hybrid supports or higher purity type B silica particles, the use of bifunctional or monofunctional silanes containing bulky groups and the end-capping process [1-3]. However, for the separation of complex mixtures and/or compounds with similar characteristics, such as basic compounds, peptides, aromatic compounds and some positional isomers, especially when milder chromatographic conditions are required, more selective SP are needed.

Stationary phases that present different interaction mechanisms have also been developed, with emphasis on: (i) alkyl phases with polar embedded groups [4-6], that present improved peak shapes for some basic analytes and permit the use of highly aqueous mobile phases with different selectivities, such as lower hydrophobicity and enhanced selectivity towards low molar mass acids when compared with the traditional SP; (ii) phenyl type stationary phases [7-9] that introduce additional molecular interactions such as π - π interactions, which make the SP very selective for separation of aromatic compounds; (iii) alkyl C30 stationary phases [10-12], which are the SP with the longest alkyl chain commercially available, and present a unique selectivity for geometrical isomers and can also be used with highly aqueous mobile phases; (iv) mixed-mode stationary phases [4, 13-15] that are composed of a hydrophobic alkyl chain and either a hydrophilic acid group or a protonated basic group. In this case the retention mechanism can be adjusted by activating or deactivating the ion-exchange group, varying some parameters, such as the nature and amount of organic modifier in the eluent as well as the buffer type and concentration, additives, pH and temperature. This SP has been very selective for the separation of ionic compounds (by two-dimensional HPLC), polar analytes and geometrical isomers.

Beyond the SP described above, fluorinated SP have recently been exploited as alternative to traditional C18 and C8 SP. The fluorinated SP present unique selectivities that can be attributed to the large dipole moment and/or small polarizability of the fluoro group, so the separations do not occur with a simple RP mechanism [15-17]. The first report of fluorinated SP was presented by Berendsen *et al.* [18] in the early 80's, in which a comparative study between a fluorinated SP,

(heptadecafluorodecyl)dimethylsilyl, and SP with different alkyl chain lengths, such as n-propyl and n-decyl were described. The principal conclusion was that fluorinated compounds were more retained by the fluorinated SP and that both fluorinated and non-fluorinated compounds were well separated on fluorinated SP. Following this, other investigations about the specificity of the fluorinated SP have been published, such as that of Sadek and Carr [19] that compared fluorinated and perfluorinated SP with a C10 SP, and observed that the fluorinated and perfluorinated SP, respectively, were less hydrophobic than the alkyl phase, and that the perfluorinated and fluorinated SP, respectively, were useful for the separations of polar and non polar compounds due to the different retentions. Hirayama *et al.* [20] prepared a perfluoroalkyl polymeric SP and observed that the resulting SP successfully separated fluorinated compounds as well as hydrophobic compounds. Jinno and Nakamura [21] compared fluorinated SP with alkyl SP and observed that fluorinated SP have the ability to retain polar compounds more than alkyl SP and that fluorinated SP have specific selectivity for non-planar molecules. Yamamoto and Rokushita [22] observed that some aromatic compounds invert their elution order with high organic modifier content mobile phases, when comparing a fluorinated SP with an alkyl SP, and that planar and nonplanar polycyclic aromatic compounds exhibit different interactions with the fluorinated SP. Monde *et al.* [23] and Kamiyuki *et al.* [24] also compared fluorinated SP with alkyl SP and showed that hydrocarbon compounds were less retained on fluorinated SP and that positional isomers were well separated. Many applications using fluorinated SP were performed, such as the analyses of tocopherols in food [25,26], the separation of taxanes [27], the separation of alkaloids [28] (basic compounds that are often difficult to separate) and the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons [17]. Moreover, fluorinated SP are promising for the analysis of non-halogenated compounds, such as some natural products, positional isomers of pharmaceuticals, herbicides and peptides [15,22,29,30].

In the present work a new fluorinated SP was prepared by the adsorption of a presynthesized fluorine-containing polymer ((poly(methyl-3,3,3-trifluoropropyl)siloxane) - PMTFS) into the silica pore system, followed by an immobilization step using microwave radiation for promotion greater interaction between the polymer and the chromatographic support [31]. The preparation of this SP was optimized using a central

composite design and response surface methodology. The optimized SP was physical-chemically characterized and chromatographically evaluated to explore its selectivity characteristics, with emphasis on basic compounds.

2 – EXPERIMENTAL

2.1 - MATERIALS

Kromasil silica from Akzo Nobel (Bohus, Sweden), with a mean particle size of 5 μm , mean pore diameter of 11.1 nm and a specific surface area of 308 m^2/g was used as support for preparation of the stationary phases. The poly(methyl-3,3,3-trifluoropropylsiloxane) (PMTFS) polymer (Figure 1), average molar mass (M) 4600, was obtained from Gelest (Morrisville, PA, USA).

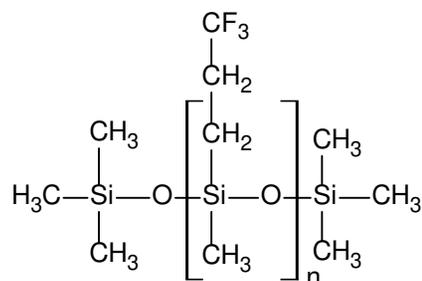


Figure 1 – Molecular structure of the PMTFS.

The mobile phases were prepared volumetrically from individually measured volumes of each solvent and were filtered using 0.45 μm Nylon membrane filters from Millipore. For this, Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) and HPLC-grade methanol (Tedia, Rio de Janeiro, Brazil) were used. HPLC-grade dichloromethane and tetrahydrofuran, obtained from Tedia, were used after filtration with 0.45 μm PVDF (polyvinylidene fluoride) membrane filters from Millipore for preparation of the stationary phases. The inorganic buffered mobile phases were prepared with potassium salts, KH_2PO_4 and K_2HPO_4 , and the organic buffered mobile phase was prepared with HCO_2NH_4 and HCO_2H , all purchased from Synth (Diadema, SP, Brazil). The

compounds used for the chromatographic tests were analytical grade reagents and not further purified.

2.2 - PREPARATION OF THE STATIONARY PHASE – Si-PMTFS

2.2.1 - PREPARATION OF PMTFS COATED SILICA

For preparation of the SP, a 10% (w/v) solution of PMTFS in dichloromethane to give a specific mass (\bar{m}_{PMTFS}) of 1.13 g_{PMTFS}/g_{Si} was added to Kromasil silica, previously dried at 140 °C for 12 hours. This mixture was slowly stirred at room temperature for 3 hours, and then placed in a fume hood for evaporation of the dichloromethane at room temperature.

2.2.2 - MICROWAVE IRRADIATION OF THE STATIONARY PHASE – PRELIMINARY TESTS AND OPTIMIZATION OF THE IMMOBILIZATION PROCEDURE

The immobilization procedure of the SP by microwave irradiation was carried out using a Milestone Start E System (Soriso (BG), Italy). The variables evaluated during the immobilization process were the immobilization time and temperature. It was necessary to evaluate the temperature instead of the power because of some particularities of the microwave system: the power is associated with the temperature, so it was necessary to define the temperature and then stipulate a period of time and a minimum power to the equipment to reach the desired temperature. Furthermore, the temperature sensor needs a minimum volume of 8 mL of a liquid sample to measure the temperature. Thus, the immobilization procedure was as follows: 10 mL of deionized water was put into a polytetrafluorethylene (PTFE) flask that contained the temperature sensor. The adsorbed SP (~ 2 g) were put into other PTFE flasks and stirred throughout the irradiation. For each immobilization temperature the power in order to obtain the required temperature within 10 minutes was defined. The immobilization was carried out in two cycles, each with half the desired total time, with a cooling time of 10 minutes between the two cycles [32, 33].

Preliminary tests were carried out aiming to evaluate the ranges of time and temperature in which the immobilization of the SP occurs. After these experiments,

some SP were immobilized at 150 °C (1000 W) for 30 minutes to evaluate the influence of the storage time of the coated SP before the immobilization step and the storage time of the SP after the immobilization step (Table 1).

After the initial tests, the optimal time and temperature for immobilization of PMTFS onto the silica were determined by a central composite design with response surface methodology. A central composite design with two factors was used to optimize the preparation of the stationary phases, evaluating the efficiency and asymmetry factor of the naphthalene peak. The different conditions of time and temperature evaluated in this study are shown in Table 2.

2.2.3 - SOLVENT EXTRACTION OF EXCESS POLYMER

After each microwave immobilization, the SP was placed in stainless steel tubes (150 mm x 10 mm i.d.) fitted with frits and connectors and then connected to a Waters 510 pump (Milford, MA, USA) for extraction of non-immobilized PMTFS by passing dichloromethane at 0.5 mL/min for 4 hours, which corresponds to the optimized conditions. The control of the extraction procedure was performed by measuring the percent of carbon. After the extraction, the stationary phase contained in the tube was removed and dried with nitrogen.

2.3 - COLUMN PACKING

Columns (60 mm x 3.1 mm i.d.) were made from type 316 stainless steel tubing. The internal surface was polished using a technique developed in our laboratory [34].

Notas: A imobilização das FE por radiação micro-ondas foi realizada empregando-se um forno micro-ondas industrial específico para extração e digestão de amostras. Quando utilizado como fonte de radiação para imobilização de FE foram encontradas algumas limitações: (i) para o funcionamento do equipamento é necessário que o sensor de temperatura esteja mergulhado na amostra, sendo o volume mínimo de 8 mL e o máximo de 30 mL; (ii) o equipamento possui apenas controle de temperatura e não possui controle de potência. A partir da temperatura selecionada o equipamento fornece a potência necessária para atingir essa temperatura dentro do intervalo de tempo requisitado. Os intervalos de temperatura e de potência do equipamento são de 0 a 260 °C e 0 a 1200 W, respectivamente; (iii) é necessária a construção de uma rampa de temperatura de no mínimo 10 minutos para o equipamento atingir a temperatura definida. Em vista destas limitações, foram feitas as adaptações descritas no texto para a imobilização das FE por RM.

The columns were slurry packed using 10% slurries (w/v) of the stationary phase in tetrahydrofuran. A constant packing pressure of 38 MPa (Haskel packing pump, USA) was used with methanol as propulsion solvent. Columns were conditioned for 1 hour with mobile phase at 0.3 mL/min prior the chromatographic tests.

2.4 - PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE STATIONARY PHASE

The percent carbon of the immobilized stationary phases (Si-PMTFS) was obtained through elemental analysis after the extraction procedure to evaluate the loading of each stationary phase. These determinations were made with a Model CHN-2400 Perkin-Elmer Analyzer (Shelton, CT, USA). From these data, the mass of PMTFS per gram of silica (\bar{m} , the specific mass of PMTFS) was calculated, using the equation: $\bar{m}_{PMTFS} = \%C / (31 - \%C)$, where 31 refers to the percent of carbon in PMTFS. From the specific mass data the PMTFS layer thickness (τ) was calculated using the equation: $\tau = -\left(\sqrt{d^2 - Fd^2} - d/2\right)$ where the F is the immobilized fraction, $F = \bar{m}_{immobilized} / \bar{m}_{fullpores}$, and d is the mean pore diameter. It is assumed for this calculation that the pores of the silica have a constant diameter and that the immobilized PMTFS is characterized by a layer of constant thickness on the pore wall [35]. The specific pore volume (v_p) of Kromasil silica is 0.88 mL/g and the density of PMTFS is 1.28 g/mL. From this pore volume, the mass of polymer ($\bar{m}_{fullpores} = v_p \times \rho_{PMTFS}$) that fills the pore system is 1.13 g_{PMTFS}/g_{Si}.

The characterization of the Si-PMTFS stationary phases with respect to the presence of PMTFS, presence and relative quantity of residual silanols and the possible interactions between the PMTFS and the chromatographic support were made by infrared spectroscopy (IR) and by solid-state ^{29}Si nuclear magnetic resonance measurements (^{29}Si NMR) using cross polarization and magic angle spinning (CP/MAS), for Si-PMTFS. These determinations were made with a Bomem MB-102 FTIR spectrometer (Hartmann & Braun, St-Laurent, Canada) and a Bruker AC 300 NMR spectrometer (Rheinstetten, Germany), respectively.

2.5 - CHROMATOGRAPHIC EVALUATION OF THE STATIONARY PHASE

Chromatographic evaluations were performed using a modular HPLC system from Shimadzu (Kyoto, Japan) equipped with a LC-10AD liquid chromatographic pump, a SPD-10A UV-VIS (254 nm) detector with 8 μ L cell, a CTO-10A column oven and a Rheodyne 8125 injector (Cotati, USA) with 5 μ L loop. Data were acquired and processed using Chrom Perfect for Windows, version 3.52 and Report-Write Plus software from Justice Innovations (Mountain View, USA). All the separations were carried out at room temperature with flow-rates of 0.3 mL/min, using uracil to determine the column dead time (t_M). The chromatographic performance was evaluated by means of efficiency (N/m), retention factor (k), resolution (R_s) and asymmetry factor (A_s) measured at 10% of the peak height.

The chromatographic evaluations of the stationary phases were carried out in three steps: (i) Initial tests with all prepared SP to evaluate the chromatographic performance of the SP. For this two test mixtures were used: (1) neutral compounds with different polarities (acetophenone, benzene, toluene and naphthalene) and (2) acidic, basic and neutral compounds (phenol, N,N-dimethylaniline, naphthalene and acenaphthene). The compounds were separated using methanol:water (55:45 v/v) as mobile phase; (ii) Chromatographic tests with optimized SP for the chromatographic characterization of the SP with respect to hydrophobic selectivity, silanophilic activity, ion-exchange capacity and shape selectivity. For this Tanaka and co-workers [36] test mixtures were used: (A) uracil, butylbenzene, pentylbenzene, *o*-terphenyl and triphenylene using methanol:water (80:20 v/v) as mobile phase, (B) uracil, phenol and caffeine using methanol:water (30:70 v/v) as mobile phase, (C) uracil, phenol and benzylamine using methanol:0.020 mol/L phosphate buffer (30:70 v/v) as mobile phase at two different pH, 7.60 and 2.70; (iii) Separation of some pharmaceutical compounds with the optimized SP to evaluate the applicability of the fluorinated SP for analysis of basic compounds. This evaluation was performed with a mixture of pharmaceutical compounds (levofloxacin, bromazepam, nortriptyline, fluoxetine and diazepam) at concentrations of 10 mg/L, using methanol:0.010 mol/L $\text{HCO}_2\text{NH}_4/\text{HCO}_2\text{H}$ pH 3.0 (55:45 v/v) as mobile phase.

3 - RESULTS AND DISCUSSION

3.1- MICROWAVE IRRADIATION OF THE STATIONARY PHASE – PRELIMINARY TESTS AND OPTIMIZATION OF THE IMMOBILIZATION PROCEDURE

In recent years, microwave radiation has attracted a great deal of attention due its molecular-level heating, which leads to homogeneous and quick thermal reactions and has, thus, been applied in several different fields. The principle of heating using microwave radiation is based on the direct effect of microwaves on molecules by ionic conduction and dipole rotation. An important attribute of microwave radiation is the direct absorption of energy by the material to be heated, contrary to what occurs when the heating is accomplished by convection, in which the energy is slowly transferred from the recipient to the sample [37- 40]. The use of microwave radiation to prepare SP seems interesting, since the principle of heating differs greatly from conventional thermal treatment, often used for preparation of SP [35, 41-45], and thus can promote new and/or different interactions between the polymer and the chromatographic support.

Table 1 – Conditions of the preliminary tests to evaluate the influence of the period of time before and after the immobilization procedure and the respective chromatographic results for these SP.

Experiment	Time before immobilization step (days)	Time after immobilization step (days)	Chromatographic Parameters ^{a)}				% C	τ (nm)
			N/m ^{b)}	As ^{b)}	k ^{b),c)}	Rs ^{d)}		
1	6	0	33 000	0.9	6.0	3.3	7.5	0.9
2	6	6	78 000	1.2	10.5	5.6	10.4	1.4
3	3	1	67 000	1.4	7.2	5.0	8.5	1.0
4	3	6	73 000	1.4	11.3	5.7	10.5	1.5

^{a)} chromatographic conditions: injection volume: 5 μ L; mobile phase: methanol:water (50:50 v/v); flow-rate: 0.3 mL/min; UV detection at 254 nm.

^{b)} calculated for the naphthalene peak.

^{c)} t_M was measured with uracil.

^{d)} calculated for the toluene-naphthalene pair.

Based on this, some initial tests were necessary to define the immobilization procedure. The “aggressive” heating from microwaves makes it necessary to cool the SP during the immobilization process, as previously reported [32,33], to prevent possible degradation of the polymer. A storage time after the immobilization step is also useful for the complete accommodation of the polymer onto the chromatographic support. The results presented in Table 1, principally the values of efficiencies and percent carbon loading, show that, for complete interaction and better accommodation of the polymer onto the silica particles, a storage time of 6 days after the immobilization procedure (and before the extraction procedure) was necessary. In the usual preparation procedure of SP the time before the immobilization step is 6 days. In this work, because of the need for 6 days after the immobilization procedure, a reduction of this time to 3 days was evaluated. The results obtained (Table 1) show that the efficiencies were lower and the asymmetry factors were higher when the time employed was 3 days instead of six. Thus, the periods before and after the immobilization procedure were 6 days.

After the preliminary tests, experiments were carried out according to Table 2, to define the best conditions of microwave immobilization time and temperature that result in SP with high efficiencies and symmetrical peaks. The chromatographic parameters of these SP are shown in Table 2 and the chromatograms of the two test mixtures (1 and 2) employed in this evaluation are shown in Figure 2.

The similar percent carbon loading of all SP indicate that all conditions of time and temperature evaluated were sufficient to promote the immobilization of the polymer onto the chromatographic support. Consequently, the polymeric thickness (τ) was also similar and corresponds to a thickness slightly larger than a monolayer. This did not interfere in the mass transfer of the compounds between the stationary phase and the mobile phase, as seen by the high efficiencies and the retention factor of naphthalene. On the other hand, the efficiencies and the asymmetry factors depend on the microwave immobilization time and temperature. The SP that present the higher efficiencies and more symmetrical peaks for both neutral and basic compounds (naphthalene and N,N-dimethylaniline) were immobilized with lower temperatures and also shorter immobilization times. This affirmation can be seen clearly in Figures 3 (A)

and (B), that correspond to the surface responses of the efficiency and asymmetry factor for the naphthalene peak, respectively, constructed by adjusting the experimental results to quadratic models.

Table 2 - Different conditions of thermal immobilization time and temperature evaluated, the corresponding central composite design matrix for two variables and the respective chromatographic parameters for these SP.

Experiment	Temperature (°C) and Power (W)	Time (min)	Coded variable levels ^{a)}		Chromatographic parameters ^{b)}					% C	τ (nm)
			x_1	x_2	N/m ^{c)}	As ^{c)}	As ^{d)}	k ^{c),e)}	Rs ^{f)}		
1	130 (800 W)	40	-1	-1	75 000	1.2	0.8	6.6	3.8	10.5	1.45
2	150 (1000 W)	40	+1	-1	65 000	1.5	1.3	6.6	3.8	10.5	1.45
3	130	60	-1	+1	66 000	1.5	1.1	7.0	3.9	10.7	1.52
4	150	60	+1	+1	60 000	1.4	1.3	6.2	3.4	10.1	1.39
5	140 (900 W)	50	0	0	76 000	1.2	0.7	6.2	3.9	10.6	1.50
6	140	50	0	0	74 000	1.2	0.9	6.8	3.6	10.0	1.35
7	140	50	0	0	72 000	1.3	1.2	6.5	3.8	9.9	1.33
8	126 (760 W)	50	-1.4	0	79 000	1.1	1.0	6.6	4.1	10.4	1.45
9	154 (1040 W)	50	+1.4	0	65 000	1.5	1.3	6.8	3.7	9.9	1.33
10	140	36	0	-1.4	66 000	1.2	1.0	6.4	3.7	10.2	1.39
11	140	64	0	+1.4	61 000	1.5	1.2	6.4	3.4	10.4	1.45

a) Equations used to convert the coded variable level to the normal variable level are: $x_1 = \frac{(T - 140)}{10}$ and

$x_2 = \frac{(t - 50)}{10}$, where T = temperature (°C) and t = time (minutes).

b) chromatographic conditions: injection volume: 5 μ L; mobile phase: methanol:water (55:45 v/v); flow-rate: 0.3 mL/min; UV detection at 254 nm.

c) calculated for the naphthalene peak.

d) calculated for the N,N-dimethylaniline peak.

e) t_M was measured with uracil.

f) calculated for the toluene-naphthalene pair.

The optimal region for both immobilization time and temperature that should result in SP with column efficiencies higher than 70 000 N/m (clearer region of Figure 3 (A)) and asymmetry factors for the naphthalene peak between 0.9 and 1.2 (darker grey region of Figure 3 (B)) was determined by the superposition of these response surfaces. The real values of immobilization time and temperature that corresponds to this delimited region are in the range of 36 – 50 minutes and 96 – 137 °C, respectively. As any value inside of this region should result in a stationary phase with similar

chromatographic performance, the microwave immobilization conditions were defined as heating at 126 °C for 50 minutes.

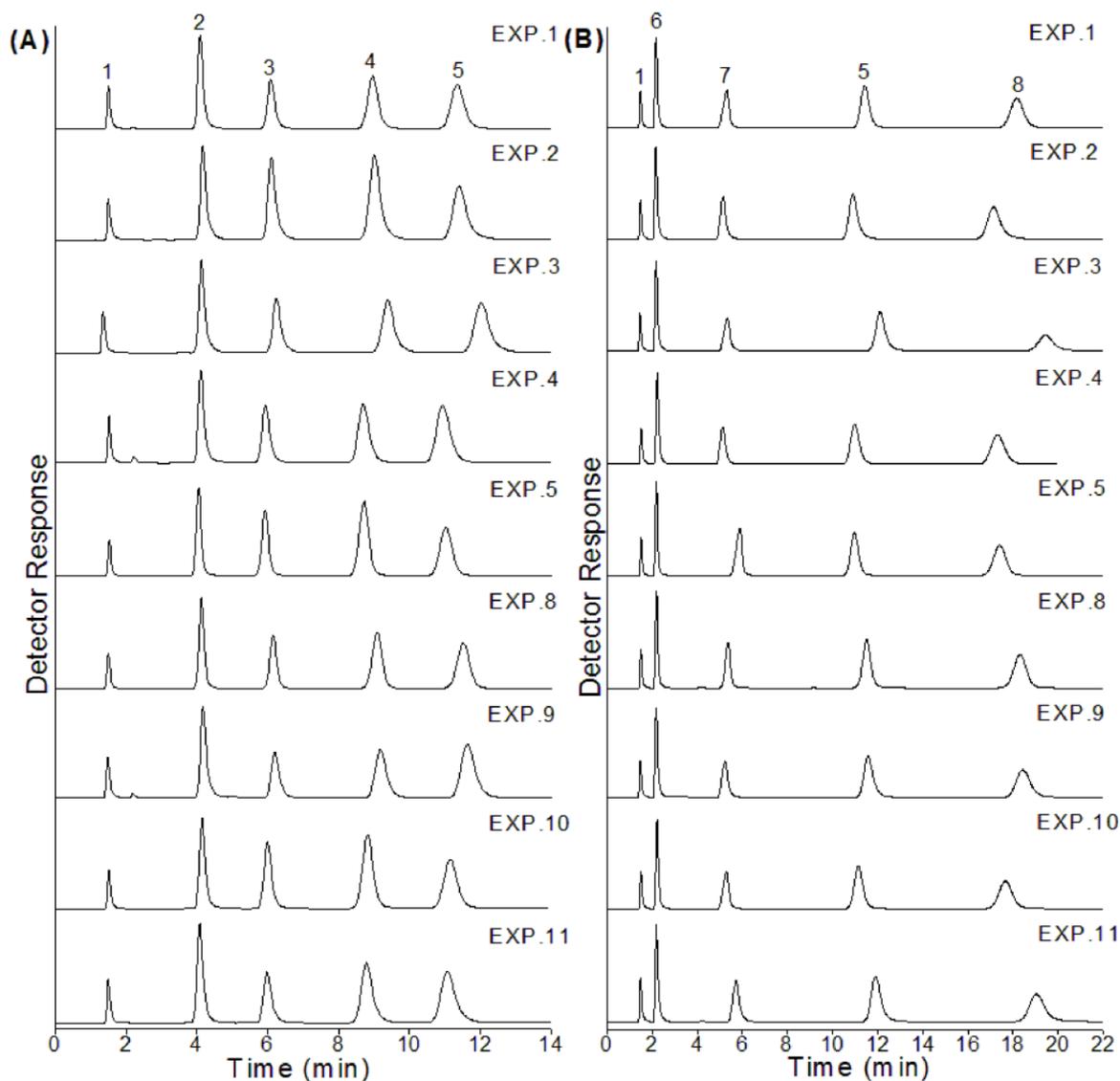


Figure 2 – Chromatograms obtained with different conditions of microwave immobilization time and temperature of the Si-PMTFS stationary phase, (A) Test Mixture 1 and (B) Test Mixture 2. Chromatographic conditions: injection volume: 5 μ L; mobile phase: methanol:water (55:45 v/v); flow-rate: 0.3 mL/min; UV detection at 254 nm. Peak identification 1 – uracil, 2 – acetophenone, 3 – benzene, 4 – toluene, 5 – naphthalene, 6 – phenol, 7 – N,N-dimethylaniline and 8 – acenaphthene.

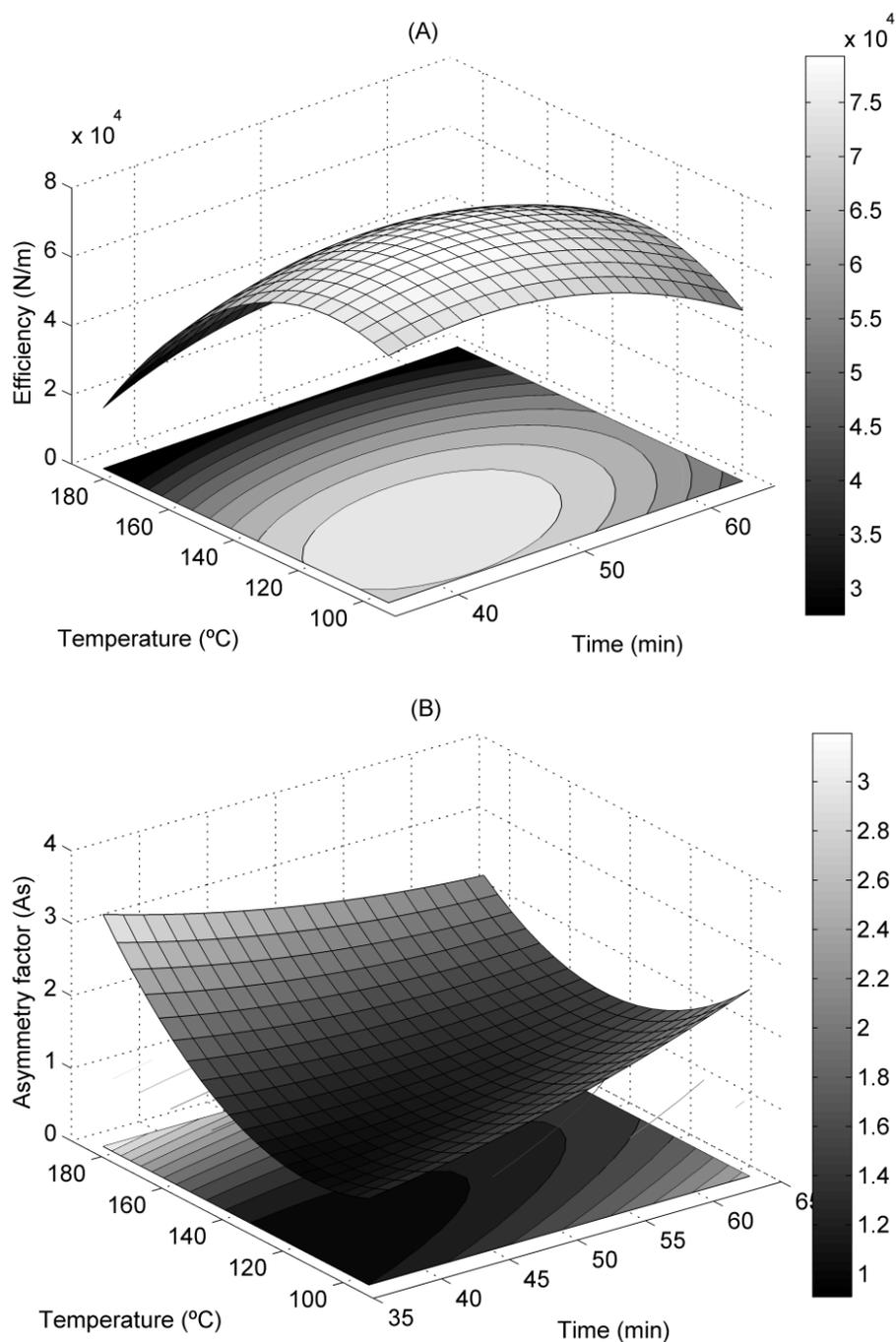


Figure 3 – Response surfaces for microwave immobilization of the PMTFS onto silica. (A) efficiency and (B) asymmetry factor.

Triplicate experiments performed at the center point were used to estimate the repeatability of the preparation of these stationary phases. The results were quite

satisfactory, since the relative standard deviations (RSD) were 2.8% for column efficiency and 3.7% for polymer coating.

3.2 - PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE STATIONARY PHASE

The IR spectra of the silica and of the optimized Si-PMTFS stationary phase are shown in Figure 4 (A). The Si-PMTFS spectrum presents two main regions that characterize the PMTFS: the bands in the range of 1100 and 1400 cm^{-1} correspond to the C-F stretching and more specifically, the bands at 1150 and 1400 cm^{-1} correspond to the C-F₃ stretching. The pure silica is characterized by three principal regions: the band at 3400 cm^{-1} , characteristic of the hydroxyl groups having a hydrogen bridge to physically adsorbed water; the band around 1100 cm^{-1} , attributed to the siloxane groups and the band at 980 cm^{-1} , which corresponds to the free silanol groups [46]. Comparing the two spectra, the characteristic bands of the silanol groups were significantly reduced after the immobilization process, indicating that the polymer was attached onto the support and coated most silanol groups.

The ²⁹Si NMR spectra of the pure silica and of the optimized Si-PMTFS stationary phase are shown in Figure 4 (B). The pure silica shows resonances of Q² (dihydroxysiloxane), Q³ (hydroxysiloxane) and Q⁴ (tetrasiloxane) groups [47, 48]. After the immobilization of the PMTFS onto the silica particles, different silicon species appear. At - 22 ppm a strong signal shows the resonances of the polysiloxane backbone (D^{2''}) and the signals around - 20 ppm (D^{1_H} and D^{2'}) correspond to the formation of new silicon species. Some of the PMTFS chains are only loosely attached or physically bonded (D^{2''}) while others are chemically bonded (D^{2'} and D^{1_H}). The Q² and Q³ species decreased when compared with the spectrum of pure silica, indicating that some of the silanol groups have interacted with the adsorbed polysiloxane.

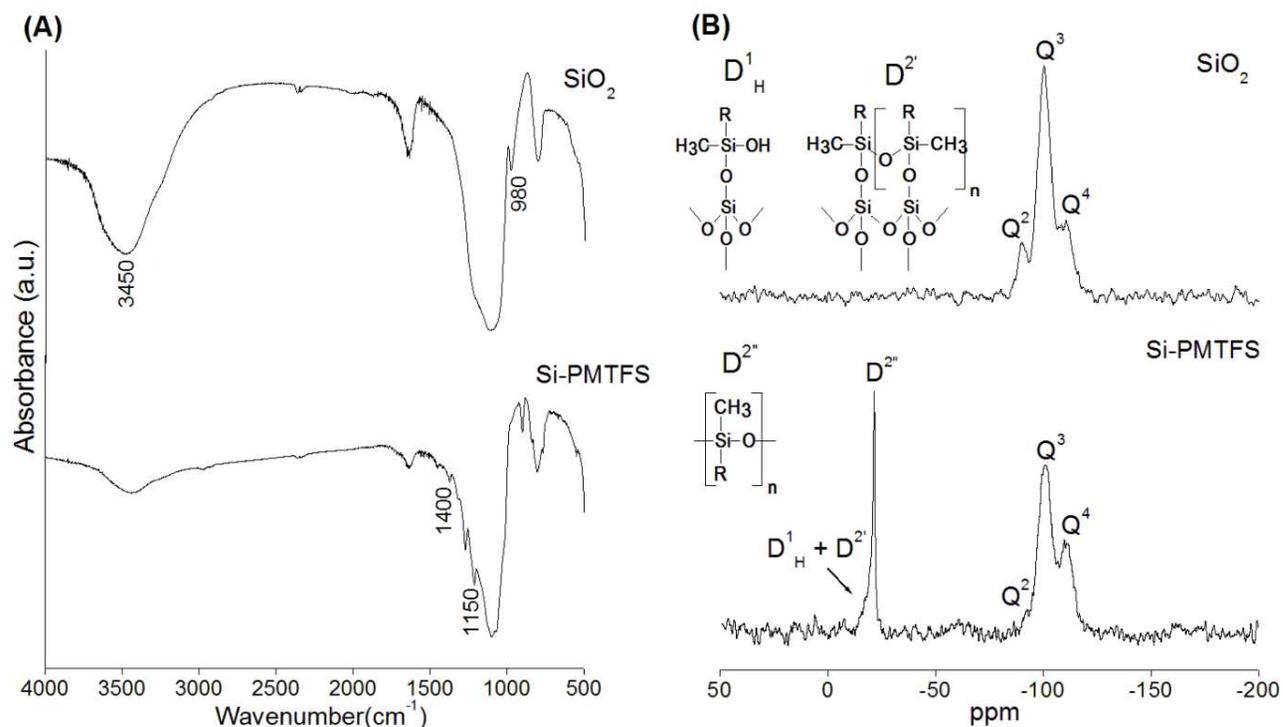


Figure 4 – Infrared spectra (A) and ²⁹Si NMR spectra (B) of pure silica and a microwave immobilized Si-PMTFS stationary phase.

3.3 - CHROMATOGRAPHIC CHARACTERIZATION OF THE STATIONARY PHASE

A more specific chromatographic characterization was performed with the optimized Si-PMTFS stationary phase microwave immobilized at 126 °C for 50 minutes, giving an efficiency of 75 000 N/m and an asymmetry factor of 1.1 for the naphthalene peak. This new characterization provides information about hydrophobic selectivity, silanophilic activity, ion-exchange capacity and shape selectivity of the SP [36]. The first test mixture of Tanaka and co-workers (Figure 5 (A)) evaluates the SP with respect to hydrophobic selectivity using the separation factor for pentylbenzene and butylbenzene (α_{CH_2}) and with respect to shape selectivity ($\alpha_{T/O}$) from the separation factor of non-planar *o*-terphenyl and highly planar triphenylene. The values calculated, 1.2 and 1.3, for hydrophobic and shape selectivity, respectively, show that the Si-PMTFS has capacity for the separation of compounds that differ only by a methylene group and capacity to differentiate compounds that differ only by their spatial configuration.

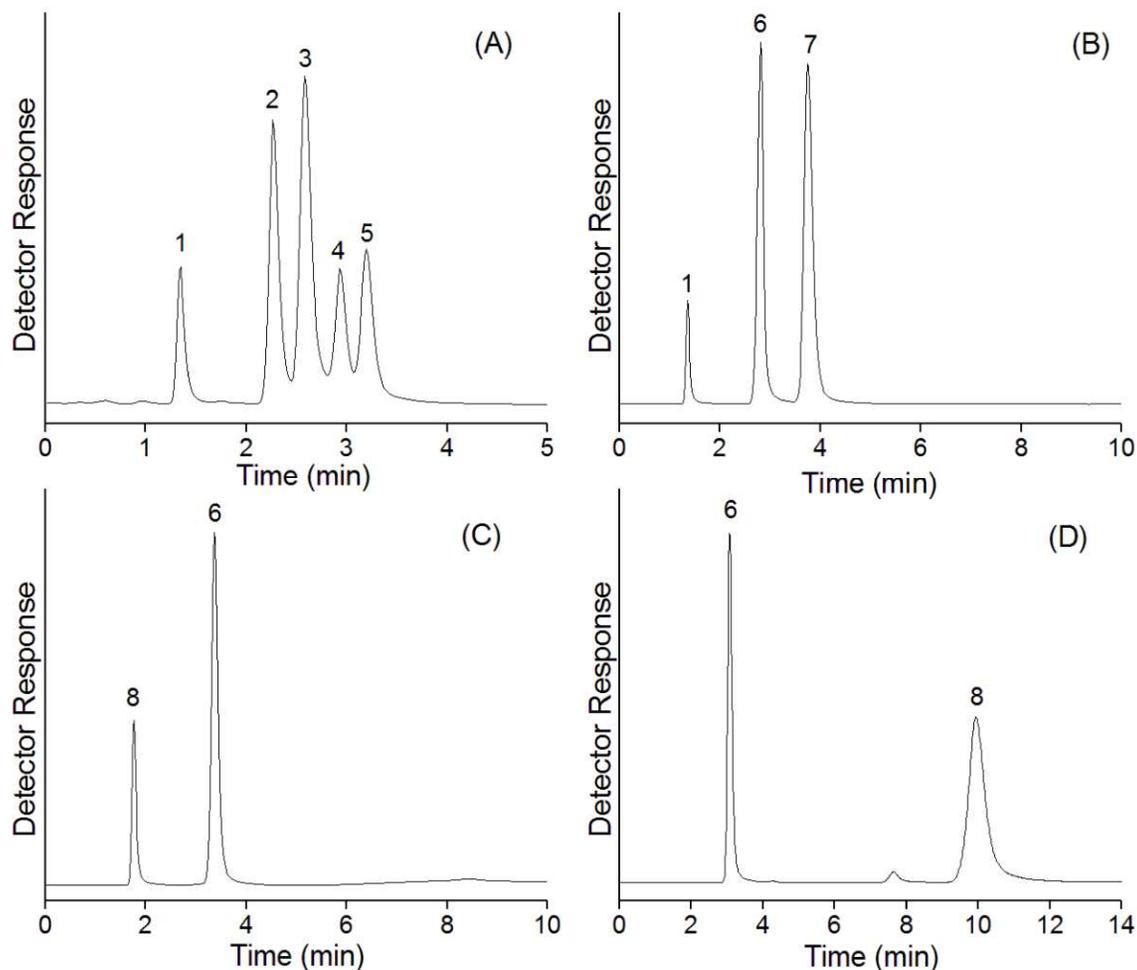


Figure 5 – Chromatograms showing the separation of the compounds of Tanaka test mixtures with the Si-PMTFS stationary phase microwave immobilized at 126 °C for 50 minutes. Chromatographic conditions: injection volume: 5 μ L; flow-rate: 0.3 mL/min; temperature: 40 °C; UV detection: (A) and (B) at 254 nm and (C) and (D) at 214 nm. Mobile-phases: (A) methanol:water (80:20 v/v), (B) methanol:water (30:70 v/v); (C) methanol:0.020 mol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$, pH 2.7 (30:70 v/v); and (D) methanol:0.020 mol/L $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7.6 (30:70 v/v). Peak identification: 1 – uracil, 2 – *o*-terphenyl, 3 – triphenylene, 4 – butylbenzene, 5 – pentylbenzene, 6 – phenol, 7 – caffeine and 8 – benzylamine.

The chromatogram of the separation of compounds of the second test mixture (Figure 5 (B)) composed of basic and acidic compounds (caffeine and phenol), shows possible hydrogen bonding interactions between caffeine and the residual silanol groups on the silica surface. The value calculated for the separation factor for caffeine

and phenol ($\alpha_{C/P} = 1.6$) shows that the compounds were well separated with low retention times in the unbuffered mobile phase, but the elution of caffeine after phenol indicates that hydrogen bonding interactions occur between caffeine and residual silanol groups. The third test mixture characterizes the SP with respect to the presence and acidity of the accessible silanol groups by ion-exchange interactions, using buffered mobile phase at two different pH, 2.7 and 7.6, respectively, with benzylamine as a strong base (pKa = 9.4). When the separation is carried out at pH 2.7, the silanol groups are not dissociated while the benzylamine is protonated. Figure 5 (C) shows that the retention time of benzylamine is very close to the retention time of uracil, and so ion-exchange interactions do not occur. At pH 7.6 the silanol groups are dissociated while benzylamine is protonated, favoring ion-exchange interactions. The chromatogram presented in Figure 5 (D) shows that the retention time of benzylamine increases, when compared with Figure 5 (C), and also the values ($\alpha_{B/P}$) increase from 0.12 to 5.3. This shows that under these conditions some interactions occur between benzylamine and the silanol groups. But, the asymmetry factor of benzylamine ($A_s = 1.6$) suggests that the interactions between the benzylamine and the SP occur preferentially with the fluorine atoms and so decrease the intensity of the undesirable interactions with the silanol groups.

Comparing the results of the Tanaka tests presented in the literature for some commercial fluorinated alkyl SP [15] with the results obtained with the Si-PMTFS SP it is possible to make some comments. In terms of (i) hydrophobic selectivity: all the fluorinated SP, both the commercial and the Si-PMTFS, present similar values; (ii) shape selectivity: the Si-PMTFS SP presented the highest value, possibly as a consequence of the good distribution of the polymer and the arrangement of the fluorinated chains on the silica; (iii) hydrogen bonding interactions and (iv) ion exchange interactions at pH 7.6: the Si-PMTFS SP shows the highest values. This fact shows that this SP presents more free residual silanol groups than the commercial fluorinated SP, that are commonly endcapped.

The potential presented by the Si-PMTFS SP for the separation of basic compounds based on the relevant influence of the fluorine atoms in reducing undesirable interactions with the silanol groups was investigated by the separation of

some pharmaceuticals. The separation of these compounds was performed using a mobile phase (methanol:0.010 mol/L $\text{HCO}_2\text{NH}_4/\text{HCO}_2\text{H}$ pH 3.0 (55:45 v/v)) commonly used in liquid chromatography coupled to mass spectrometry. To better elucidate the characteristics of the Si-PMTFS SP, the separations were also carried out with three commercial SP, a traditional C18 and two C18 SP having polar embedded groups, of different brands, using the same mobile phase. As shown in Figure 6 (Column A), the new SP completely separated all compounds, indicating that fluorinated SP have potential for separating highly basic compounds. Furthermore, all compounds eluted in a short analysis time and with relatively good peak shapes, considering the difficulty often observed when analyzing these compounds.

Comparing the chromatographic performance presented by the fluorinated SP in the separation of the basic compounds with the chromatographic performance of the commercial SP (Figure 6 – Columns B, C and D) it is possible to verify that: C18 SP with polar embedded groups (Column D) show a similar chromatographic performance; C18 SP (Column B) presents a poorer chromatographic performance since it did not separate nortriptyline and fluoxetine; and C18 SP with polar embedded groups (Column C) only partially separated nortriptyline and fluoxetine and, furthermore, with a long analysis time. Another interesting consideration that can be made by observing the chromatograms shown in Figure 6 is with respect to the different elution orders of the compounds with the three different types of SP. The different elution order of the compounds from the Si-PMTFS SP and from the C18 SP with embedded polar groups (for both the elution order was the same), compared to the C18 SP, can be associated with the different interactions deriving from the fluorine atoms and from the polar embedded groups, respectively. These characteristics are also responsible for the lower asymmetry factors presented for the compounds.

Moreover, it should be noted that the new fluorinated SP presented good chromatographic performance, even though the column length and internal diameter were lower than the commercial columns, which will lead to lower cost analyses, since lower quantities of both stationary and mobile phases will be needed to carry out the analysis.

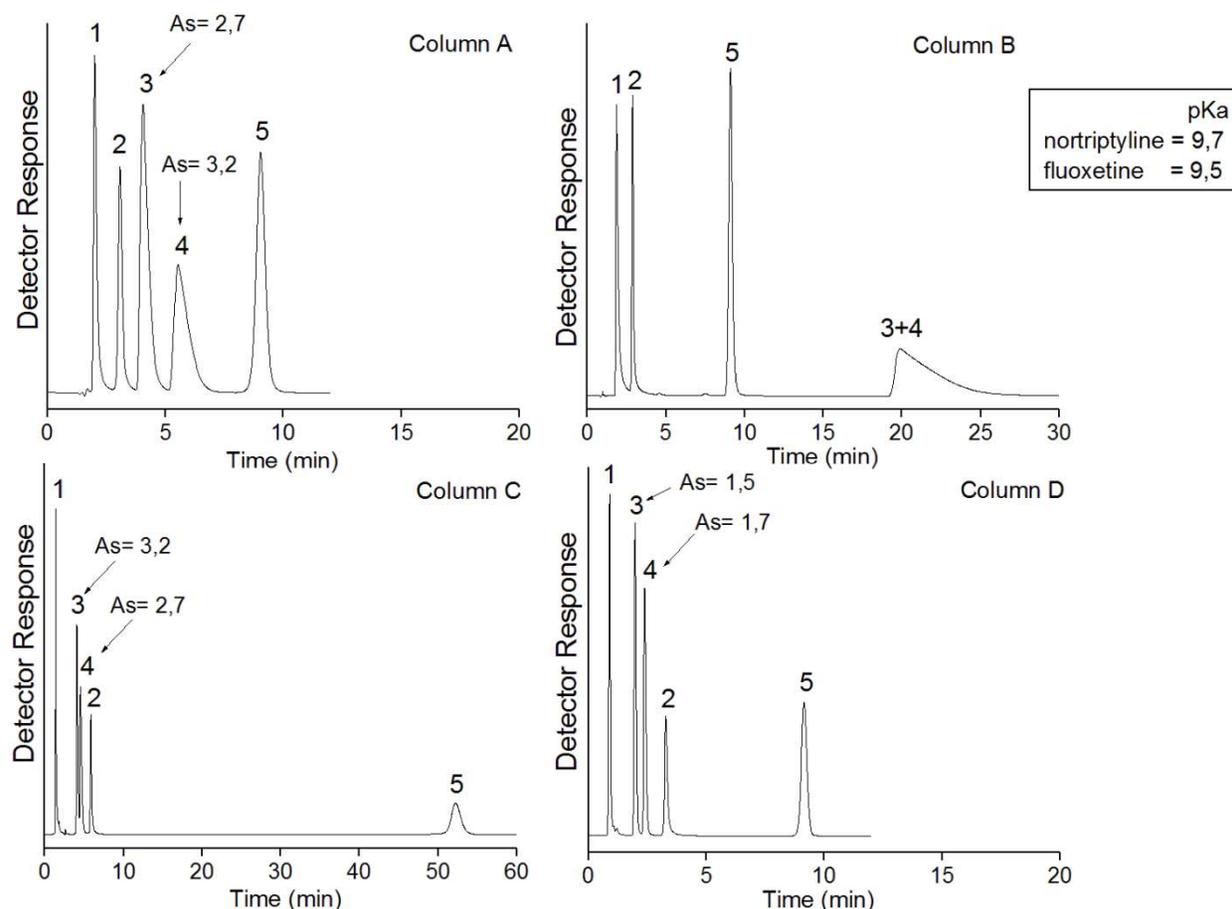


Figure 6 – Chromatograms showing the separation of several pharmaceuticals with the Si-PMTFS stationary phase microwave immobilized at 126 °C for 50 minutes, 5 μm (60 mm x 3.1 mm i.d.) (Column A); Waters Nova Pak C18, 4 μm (150 mm x 3.9 mm i.d.) (Column B); Phenomenex Synergi™ Fusion-RP, 4 μm (150 mm x 4.6 mm i.d.) (Column C); and Waters Symmetry Shield™ RP18, 5 μm (150 mm x 3.9 mm i.d.) (Column D). Chromatographic conditions: injection volume: 5 μL ; mobile phase: methanol:0.010 mol/L $\text{HCO}_2\text{NH}_4/\text{HCO}_2\text{H}$ pH 3.0 (55:45 v/v); flow-rates: 0.3 mL/min (column A) and 1.0 mL/min (columns B, C and D); UV detection at 220 nm; temperature: room temperature. Peak identification: 1 – levofloxacin, 2 – bromazepam, 3 – nortriptyline, 4 – fluoxetine and 5 – diazepam.

4 - CONCLUDING REMARKS

The high molecular-level heating of the microwave radiation promotes different types of interactions with different intensities between the adsorbed PMTFS and silica particles, as seen by the IR and ^{29}Si NMR. The use of microwave radiation also requires

some care in preparation of the Si-PMTFS stationary phases, as the time of cooling during the immobilization process and, principally, the storage time after the immobilization procedure, to provide a complete accommodation of the polymer onto the chromatographic support and, consequently, highly efficiencies, must be carefully monitored.

The optimization of the microwave immobilization time and temperature through experimental design resulted in SP with high efficiencies and with symmetrical peaks for both neutral and basic compounds. The chromatographic characterization showed that the Si-PMTFS stationary phase developed presents hydrophobic characteristics, steric selectivity and less interaction between basic compounds and the residual silanol groups. The reduction in undesirable interactions presented by the fluorinated SP can be associated with the presence of the fluorine atoms that promotes different interactions with the basic compounds and thus reduces these effects.

The application of the Si-PMTFS stationary phase for the separation of some pharmaceuticals showed that the fluorinated stationary phase is a promising one to be used in liquid chromatography coupled to mass spectrometry and can be used for the analysis of highly basic compounds. The low asymmetry factors and the different selectivity for separation of these compounds suggest that the fluorine atoms provide unique characteristics to the Si-PMTFS stationary phase.

Based on all these considerations, is it also possible to conclude that the preparation of fluorinated SP by the adsorption of the PMTFS followed by a immobilization step results in SP with similar characteristics to those prepared by the classical method, besides being simpler and of lower cost.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support and fellowships from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors also thank C.H. Collins for helpful discussions and suggestions.

5 - REFERENCES

- [1] Gritti, F., Perdu, C., Guiochon, G., *J. Chromatogr. A* 2008, 1180, 73-89.
- [2] Kirkland, J.J., *J. Chromatogr. A* 2004, 1060, 9-21.
- [3] Davies, N.H., Euerby, M.R., McCalley, D.V., *J. Chromatogr. A* 2008, 1178, 71-78.
- [4] Przybyciel, M., *LCGC North Am. LC Column Technology Supplement* 2006, 24 (4), 49-52.
- [5] Silva, C.R., Jardim, I.C.S.F., Airoidi, C., *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 127-138.
- [6] Silva, R.B., Silva, C.R., Airoidi, C., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., *Microchem. J.* 2006, 82, 150-158.
- [7] Stevenson, P.G., Kayillo, S., Dennis, G.R., Shalliker, R.A., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2008, 31, 324-347.
- [8] Yang, M., Fazio, S., Munch, D., Drumm, P., *J. Chromatogr. A* 2005, 1097, 124-129.
- [9] Kayillo, S., Dennis, G.R., Shalliker, R.A., *J. Chromatogr. A* 2006, 1126, 283-297.
- [10] Emenhiser, C., Sander, L.C., Schwartz, J., *J. Chromatogr. A* 1995, 707, 205-216.
- [11] Sander, L.C., Sharpless, K.E., Pursch, M., *J. Chromatogr. A* 2000, 880 (1/2), 189-202.
- [12] Ohta, H., Saito, Y., Nagae, N., Pesek, J.J., Matyska, M.T., Jinno, K., *J. Chromatogr. A* 2000, 883 (1/2), 55-66.
- [13] Venkatramani, C.J., Zelechonok, Y., *J. Chromatogr. A* 2005, 1066, 47-53.
- [14] Bicker, W., Lämmerhofer, M., Linder, W., *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 263-266.
- [15] Euerby, M.R., McKeon, A.P., Petersson, P., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 295-306.
- [16] Marchand, D.H., Croes, K., Dolan, J.W., Snyder, L.R., Henry, R.A., Kallury, K.M.R., Waite, S., Carr, P.W., *J. Chromatogr. A* 2005, 1062, 65-78.
- [17] Wang, Y., Harrison, M., Clark, B.J., *J. Chromatogr. A* 2006, 1005, 77-86.
- [18] Berendsen, G.E., Pikaart, K.A., Galan, L., *Anal. Chem.* 1980, 52, 1990-1993.
- [19] Sadek, P.C., Carr, P.W., *J. Chromatogr.* 1984, 288, 25-41.
- [20] Hirayama, C., Ihara, H., Nagaoka, S., Hamada, K., *J. Chromatogr.* 1989, 465, 241-248.
- [21] Jinno, K., Nakamura, H., *Chromatographia* 1994, 39 (5/6), 285-293.
- [22] Yamamoto, F.M., Rokushita, S., *J. Chromatogr. A* 2000, 898, 141-151.

- [23] Monde, T., Kamiusuki, T., Kuroda, T., Mikumo, K., Ohkawa, T., Fukube, H., *J. Chromatogr. A* 1996, 722, 273-280.
- [24] Kamiusuki, T., Monde, T., Yano, K., Yoko, T., Konakahara, T., *Chromatographia* 1999, 49 (11/12), 649-656.
- [25] Richeimer, S.L., Kent, M.C., Bernart, M.W., *J. Chromatogr.* 1994, 677, 75-80.
- [26] Lanina, S.A., Toledo, P., Sampels, S., Kamal-Eldin, A., Jastrebova, J.A., *J. Chromatogr. A* 2007, 1157, 159-170.
- [27] Shao, L.K., Locke, D.C., *Anal. Chem.* 1997, 69, 2008-2016.
- [28] Pellati, F., Benvenuti, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 254-263.
- [29] Danielson, N.D., Beaver, L.G., Wangsa, J., *J. Chromatogr.* 1991, 544, 187-199.
- [30] Scully, N.M., Healy, L.O., O'Mahony, T., Glennon, J.D., Dietrich, B., Albert, K., *J. Chromatogr. A* 2008, 1191, 99-107.
- [31] Faria, A.M., Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 782-789.
- [32] Lopes, N.P., Collins, K.E., Jardim, I.C.S.F., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030 (1/2), 225-229.
- [33] Morais, L.S.R., Jardim, I.C.S.F., *J. Chromatogr. A* 2005, 1073 (1/2), 127-135.
- [34] Collins, K.E., Franchon, A.C., Jardim, I.C.S.F., Radanovic, E., Gonçalves, M.C., *LCGC North Am.* 2000, 18, 106-117.
- [35] Collins, K.E., Sá, A.L.A., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., *Chromatographia* 2001, 53 (11/12), 661-664.
- [36] Kimata, K., Iwaguchi, K., Onishi, S., Jinno, K., Eksteen, R., Hosoya, K., Araki, M., Tanaka, N., *J. Chromatogr. Sci.* 1989, 27, 721-727.
- [37] Eskilsson, C.S., Bjorklund, E., *J. Chromatogr. A* 2000, 902, 227-250.
- [38] Lin, L., Yuan, S., Chen, J., Xu, Z., Xiaohua, L., *J. Hazard. Mater.* 2009, 161, 1063-1068.
- [39] Tao, Y., Gong, F.H., Wang, H., Wu, H.P., Tao, G.L., *Mater. Chem. Phys.* 2008, 112, 973-976.
- [40] Appleton, T.J., Colder, R.I., Kingman, S.W., Lowndes, I.S., Read, A.G., *Appl. Energy* 2005, 81, 85-113.

- [41] Bottoli, C.B.G., Chauhry, Z.F., Fonseca, D.A., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2002, 948, 121-128.
- [42] Bottoli, C.B.G., Vigna, C.R.M., Fischer, G., Albert, K., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2004, 1030, 217-223.
- [43] Tonhi, E., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2006, 1119, 135-139.
- [44] Faria, A.M., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2006, 1122 (1/2), 114-122.
- [45] Vigna, C.R.M., Bottoli, C.B.G., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2007, 1156 (1/2), 60-67.
- [46] Nawrocki, J., *J. Chromatogr. A* 1997, 779, 29-71.
- [47] Bachmann, S., Melo, L.F.C., Silva, R.B., Anazawa, T.A., Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Collins, C.H., Albert, K., *Chem. Mater.* 2001, 13 (5), 1874-1879.
- [48] Tonhi, E., Bachmann, S., Albert, K., Jardim, I.C.S.F., Collins, K.E., Collins, C.H., *J. Chromatogr. A* 2002, 948, 97-107.

CAPÍTULO 5

Considerações Finais e Sugestões para Trabalhos Futuros

Considerações Finais

√ As FE, (Si-PMTFS)TT e (Si-PMTFS)RM, preparadas nas condições ótimas de imobilização, tempo e temperatura, determinadas a partir do planejamento composto central (planejamento fatorial 2^2 + triplicata no ponto central + planejamento estrela), apresentaram altas eficiências ($> 70.000 \text{ N m}^{-1}$) e boa simetria de pico para compostos neutros, ácidos e básicos, comprovando que os dois procedimentos de imobilização foram capazes de promover a interação do PMTFS com a sílica, resultando em espessuras de camada que proporcionaram uma boa cobertura dos grupos silanóis residuais e taxa de transferência de massa adequada entre o analito e a FE;

√ A caracterização físico-química das FE, através da análise elementar, espectroscopia de IV e RMN ^{29}Si , permitiu concluir que o PMTFS ficou fisicamente adsorvido e também quimicamente ligado à superfície da sílica, sendo que estas interações foram mais intensas nas FE imobilizadas empregando-se a RM, por ser uma forma de aquecimento mais “agressiva” que o TT e provocar um aquecimento a nível molecular, o que resultou em uma porcentagem de carbono de 9 % e 10 % para as FE (Si-PMTFS)TT e (Si-PMTFS)RM, respectivamente;

√ A caracterização cromatográfica mostrou que as FE desenvolvidas apresentaram características hidrofóbicas, seletividade estérica e uma pequena interação entre os compostos básicos e os grupos silanóis residuais. Essa redução das interações indesejáveis pode estar associada a presença dos átomos de flúor que promovem diferentes interações com os compostos básicos e, dessa forma, reduzem esses efeitos. As FE fluoradas foram seletivas para a separação de isômeros de posição e de fármacos e, dessa forma, são uma alternativa atrativa às FE tradicionais e podem ser

empregadas em separações por cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massas, devido a compatibilidade das FM empregadas nestas separações;

√ As FE foram avaliadas também quanto à estabilidade química (resultados não apresentados nos capítulos anteriores) em condições drásticas de análise (FM: metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ pH 10,0 (50:50 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹ e temperatura de 50 °C) para acelerar o processo de colapso e evitar gasto excessivo de fase móvel. Nestas condições de análise, a FE (Si-PMTFS)TT resistiu a aproximadamente 150 volumes de coluna, enquanto que a FE (Si-PMTFS)RM resistiu a aproximadamente 200 volumes de coluna, que corresponde a perda de 50 % da sua eficiência inicial (Figura 1). Baseado nestes valores e no perfil da perda de eficiência, pode-se verificar que a maior interação entre o polímero e o suporte cromatográfico provocada pela RM, mostrada nos espectros de RMN ²⁹Si, também melhora a estabilidade da coluna, uma vez que a perda de eficiência não foi tão rápida quanto na FE (Si-PMTFS)TT. A estabilidade química apresentada pelas FE desenvolvidas é similar a apresentada pelas FE baseadas em sílica nua desenvolvidas no LabCrom, FE Si-PMTDS (poli(metiltetradecilsiloxano))¹ e Si-PMOS (poli(metiloctilsiloxano))² que resistiram a aproximadamente 200 e 250 volumes de coluna, respectivamente;

[1] A.M. Faria, K.E. Collins, C.H. Collins, *J. Chromatogr. A* 2006, 1122 (1/2), 114 - 122.

[2] D.A. Fonseca, H.R. Gutiérrez, K.E. Collins, C.H. Collins, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 149 - 155.

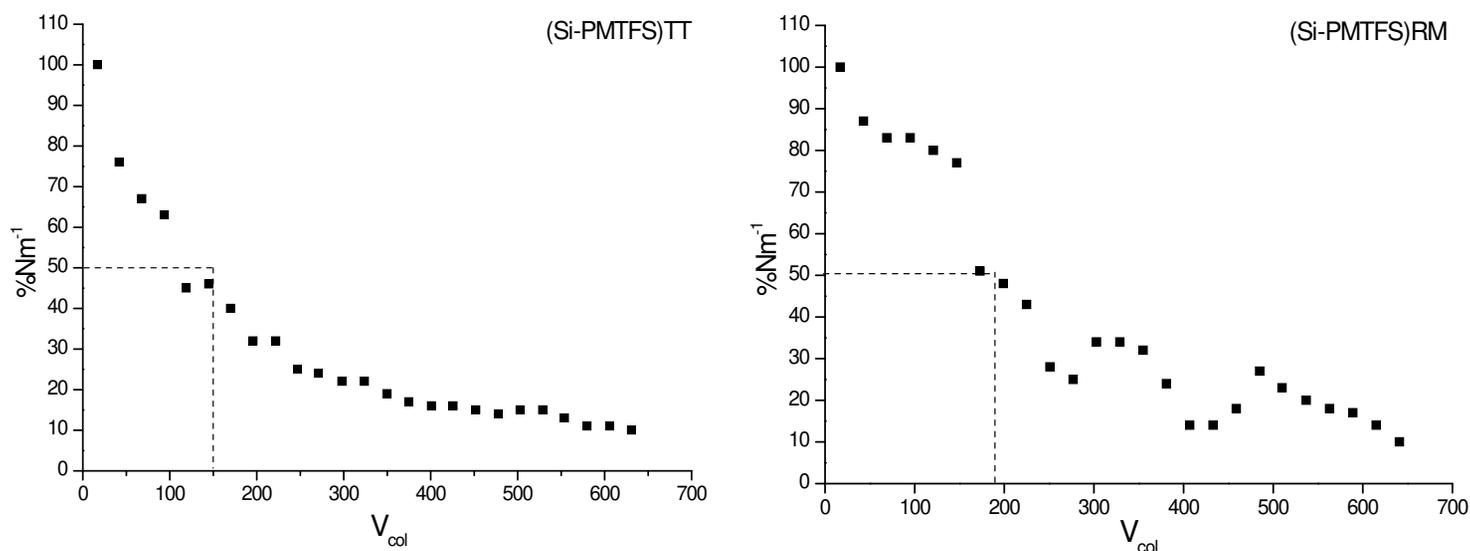


Figura 1 – Avaliação da estabilidade química das FE (Si-PMTFS)TT e (Si-PMTFS)RM medida a partir da porcentagem de perda de eficiência da coluna em função da passagem da fase móvel, medida em termos de volumes de coluna. Condições Cromatográficas: fase móvel: metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ pH 10,0 (50:50 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, temperatura de 50 °C e detecção a 254 nm.

√ Em termos de preparo das FE, a FE imobilizada por RM requer um tempo total de preparo maior que a FE imobilizada por TT, devido a necessidade do tempo de descanso de 6 dias após a etapa de imobilização, entretanto, isso não pode ser considerado uma desvantagem em relação ao TT, uma vez que estas FE apresentaram uma maior resistência a degradação com a passagem de FM, além do tempo de imobilização ser bem mais curto e também pela possibilidade de se imobilizar várias FE ao mesmo tempo.

Sugestões para Trabalhos Futuros

√ Dentre as misturas teste protocoladas na literatura mais comumente empregadas para a caracterização das FE, misturas testes de Tanaka, de Neue e Engelhardt e Jungheim, verificou-se que as informações dadas pela análise da mistura teste de

Engelhardt e Jungheim são idênticas as da primeira mistura teste (uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, *o*-terfenil e trifenileno) que compõem o teste de Tanaka. Desta forma, quando houver a possibilidade da realização do teste de Tanaka para a caracterização de uma FE, não há a necessidade da realização conjunta da mistura teste de Engelhardt e Jungheim;

√ O planejamento experimental tem sido uma ferramenta muito utilizada, principalmente em Química Analítica, no sentido de “*otimizar*”, ou seja, determinar as condições a serem empregadas em um procedimento que resultarão na melhor resposta possível. Na grande maioria dos casos, o emprego de um planejamento experimental, além de reduzir o número de experimentos, que implica também em redução de custos e de tempo, é fundamental para determinação da melhor resposta, já que permite a visualização da interação entre as variáveis. Em um planejamento de experimentos, as variáveis escolhidas para serem avaliadas, são aquelas que influenciam diretamente o sistema e que são passíveis de serem controladas. Em se tratando de preparo de FE, tem-se a influência de uma variável “externa”, a etapa do enchimento da coluna cromatográfica, que inevitavelmente faz parte do processo e não pode ser completamente controlada, porque é dependente de uma série de fatores (vazão do nitrogênio, transferência da suspensão da FE para o sistema, vazamentos, conexões da coluna, tubo da coluna e etc.) e varia de forma aleatória; mas que é considerada pelo planejamento de experimentos como se fosse constante. Dessa forma, todas as respostas avaliadas no planejamento de experimentos são influenciadas pelas variáveis avaliadas e também pela variável “externa”, que embute um percentual de variação “indesejado” nas respostas. Uma alternativa para minimizar a influência da variável “externa” é repetir inúmeras vezes o procedimento de enchimento da coluna com a FE resultante de um determinado ponto do planejamento experimental, entretanto, isso implica em um grande volume de trabalho e de consumo de reagentes. Além disso, na maioria dos casos, os testes prévios de imobilização que são realizados antes de se iniciar o planejamento de experimentos, permitem concluir quais as condições de imobilização irão resultar em FE com bom desempenho cromatográfico. Este fato permite sugerir que no preparo de FE o emprego de

planejamento experimental não é uma ferramenta recomendável, devido as variações decorrentes do enchimento de colunas, exigindo que um número elevado de repetições sejam realizadas, acarretando em um volume muito grande de trabalho e alto custo.

√ Conforme a revisão apresentada no Capítulo 2, existem várias alternativas para aumentar a estabilidade química das FE. As alternativas comumente empregadas nas pesquisas do LabCrom são o emprego de óxidos mistos (sílica zirconizada ou sílica titanizada) como suporte cromatográfico e as reações de capeamento. Preparou-se o suporte de sílica zirconizada a partir do método desenvolvido por Faria *et al*^β, que resultou em 21 % de zircônio, determinado por fluorescência de raio X, o qual foi testado como suporte cromatográfico no preparo de FE fluoradas. As FE obtidas apresentaram eficiências $> 70.000 \text{ N m}^{-1}$, porém, resultaram em alta retenção para a N,N-dimetilanilina (Figura 2) e mostraram estabilidade química inferior à apresentada pelas FE baseadas em sílica nua (Figura 3), perdendo 50 % da sua eficiência inicial após a passagem de 120 volumes de coluna de FM, demonstrando que não é viável o preparo destas FE. Dessa forma, a sugestão para trabalhos futuros para o aumento da estabilidade química, seria a realização da reação de capeamento das FE.

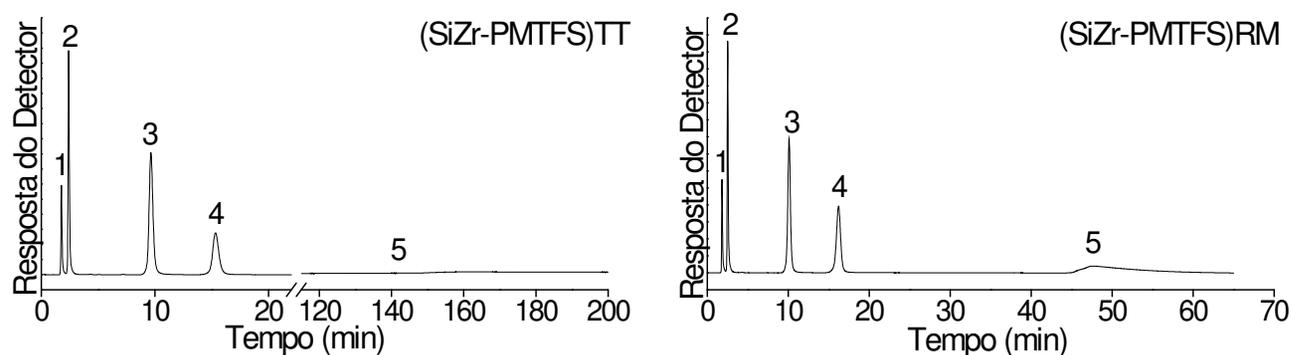


Figura 2 – Cromatogramas da separação da mistura teste 2 nas FE baseadas em sílica zirconizada immobilizadas nas condições ótimas por TT (200 °C por 12 h) e RM (126 °C por 50 min). Condições Cromatográficas: volume de injeção: 5 μL , fase móvel: metanol:água (50:50 v/v), vazão: 0,3 mL min^{-1} , detecção por UV a 254 nm. Identificação dos picos: 1 – uracila, 2 – fenol, 3 – naftaleno, 4 – acenafteno e 5 – N,N-dimetilanilina.

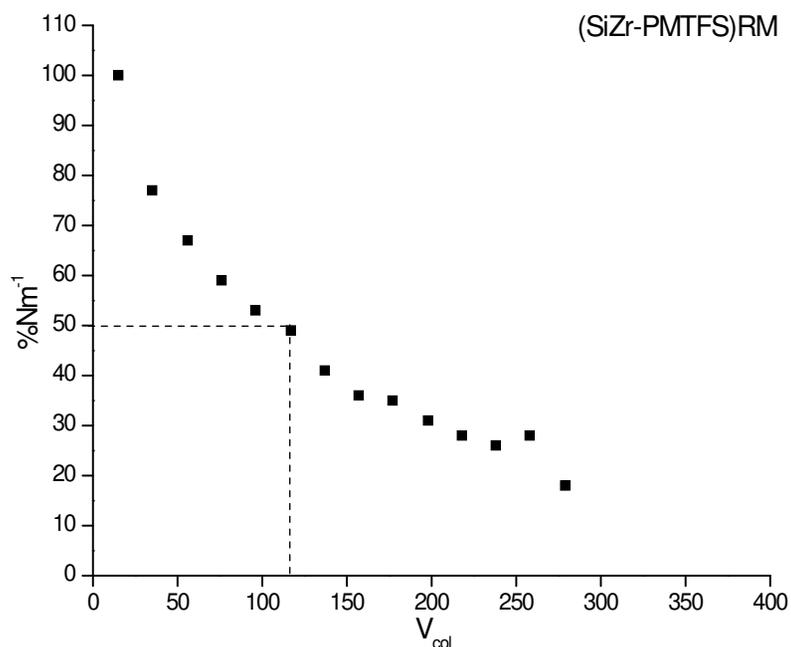


Figura 3 – Avaliação da estabilidade química da FE (SiZr-PMTFS)RM (126 °C por 50 min) medida a partir da porcentagem de perda de eficiência da coluna em função da passagem da fase móvel, medida em termos de volumes de coluna. Condições Cromatográficas: fase móvel: metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ pH 10,0 (50:50 v/v), vazão: 1 mL min⁻¹, temperatura de 50 °C e detecção UV a 254 nm.

CAPÍTULO 6

Conclusão

As fases estacionárias fluoradas preparadas por tratamento térmico ou por radiação micro-ondas apresentaram altas eficiências ($> 70.000 \text{ N m}^{-1}$) e picos simétricos para compostos neutros, ácidos e básicos, mostrando que ambos os procedimentos de imobilização foram capazes de promover a interação do polímero com o suporte cromatográfico e também uma boa distribuição das cadeias do polímero no suporte cromatográfico, que resultaram numa camada polimérica de 1-1,5 μm , próxima da ideal. A seletividade diferenciada proporcionada pelas FE fluoradas foi confirmada pela superioridade apresentada na separação de compostos isoméricos e de fármacos, quando comparada com colunas comerciais tradicionais. A estabilidade química apresentada pela FE (Si-PMTFS)RM foi um pouco superior a da FE (Si-PMTFS)TT, sendo esta, a característica a prevalecer na escolha por uma das FE fluoradas desenvolvidas.