



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

FABIANE PIRES

**PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE COLUNAS CAPILARES MONOLÍTICAS À
BASE DE SÍLICA MODIFICADAS COM POLIDIMETILSILOXANO (PDMS) PARA
USO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CAPILAR**

CAMPINAS

2017

FABIANE PIRES

**PREPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE COLUNAS CAPILARES MONOLÍTICAS À
BASE DE SÍLICA MODIFICADAS COM POLIDIMETILSILOXANO (PDMS) PARA
USO EM CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CAPILAR**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Química da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra
em Química na área de Química Analítica.**

Orientadora: Prof^a Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA FABIANE PIRES, E ORIENTADA PELA PROF^a DRA. CARLA BEATRIZ
GRESPLAN BOTTOLI**

CAMPINAS

2017

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Danielle Dantas de Sousa - CRB 8/6490

P665p Pires, Fabiane, 1991-
Preparação e avaliação de colunas capilares monolíticas à base de sílica modificadas com polidimetilsiloxano (PDMS) para uso em cromatografia líquida capilar / Fabiane Pires. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Carla Beatriz Grespan Bottoli.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Cromatografia de fase reversa. 3. Fase estacionária (Cromatografia). 4. Sílica. 5. Monolitos. I. Bottoli, Carla Beatriz Grespan. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Preparation and evaluation of monolithic capillary columns based on silica modified with polydimethylsiloxane (PDMS) for use in capillary liquid chromatography

Palavras-chave em inglês:

High performance liquid chromatography

Chromatography, reverse-phase

Stationary phase (Chromatography)

Silica

Monoliths

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Carla Beatriz Grespan Bottoli [Orientador]

Álvaro José dos Santos Neto

José Alberto Fracassi da Silva

Data de defesa: 03-02-2017

Programa de Pós-Graduação: Química

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli (Orientadora)

Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto (USP-SC)

Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do(a) aluno(a).

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **FABIANE PIRES**, aprovada pela Comissão Julgadora em 03 de fevereiro de 2017.

Dedico esta dissertação à minha avó
Maria, meu pai José Luiz, minha tia Maria e
minha irmã Letícia, por todo o amor, apoio e
por sempre acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à professora Carla por ser uma orientadora maravilhosa e compreensiva. Sempre disposta a receber seus alunos com simpatia e entusiasmo. Obrigada por participar do meu desenvolvimento durante esses dois anos e meio de mestrado.

À todos os professores e colegas de laboratório, pela convivência e amizade. Em especial, à Julie, pelos conselhos valiosos e por ter me ajudado diretamente na minha pesquisa e me ensinado muito sobre monolitos.

À todos os técnicos de laboratório do Instituto de Química que ajudaram na realização das análises de caracterização dos monolitos (ou pelo menos na tentativa).

Ao CNPq e ao INCTBioanalítica pelo apoio financeiro ao projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e pela bolsa concedida a mim – processo nº 2014/21866-9.

À UNICAMP e ao Instituto de Química, pela oportunidade e estrutura que me proporcionaram para desenvolver este projeto.

RESUMO

A cromatografia líquida capilar (CLC) vem evoluindo nos últimos anos, seguindo a tendência de miniaturização dos sistemas cromatográficos e a constante pesquisa por separações mais rápidas e mais eficientes. Apesar de apresentar várias vantagens quando comparada com HPLC, como por exemplo, a redução drástica do consumo de solventes, esta técnica ainda não é tão difundida devido à necessidade de uma instrumentação totalmente redimensionada para volumes menores, além da limitação de fases estacionárias comercialmente disponíveis.

As colunas capilares que empregam como fase estacionária um monolito baseado em sílica, se apresentam como uma alternativa promissora frente às colunas particuladas de sílica, por apresentarem elevada permeabilidade e menor pressão de trabalho. Porém, esse tipo de fase estacionária ainda tem muito a ser aprimorado para alcançar a eficiência das colunas recheadas com partículas.

Portanto, esse trabalho teve como objetivo, primeiramente, otimizar o preparo das fases estacionárias monolíticas baseadas em sílica, dentro de capilares, com foco nas etapas do processo sol-gel e preenchimento do capilar. Na segunda parte deste trabalho, o objetivo foi o recobrimento e imobilização do polidimetilsiloxano (PDMS) no suporte monolítico de sílica para uso em CLC.

Na etapa de preparação dos monolitos foram avaliados parâmetros como: quantidade de precursor de sílica, agente porogênico (polietilenoglicol), solvente e proporção do reagente metiltrimetóxisilano (MTMS). Com as condições otimizadas, foi possível obter capilares bem preenchidos e com menor encolhimento, porém, uma porcentagem das colunas preparadas continuou apresentando encolhimento radial.

Na etapa de imobilização do PDMS sobre o monolito foram avaliados parâmetros como: tipo de suporte monolítico, massa molar e proporção de PDMS no solvente, tempo e temperatura na estufa. Observou-se que uma maior eficiência é obtida com o suporte de sílica pura, 50% de PDMS (6000 g/mol) em hexano, e tratamento térmico a 150 °C em estufa por 16 horas. Com essas condições, foi possível obter uma nova fase estacionária, com uma eficiência de 79500 pratos/m na separação de seis alquilbenzenos empregando um gradiente de fase móvel. Devido à alta eficiência obtida (para este tipo de coluna), ela pode ser considerada promissora para uso em CLC.

ABSTRACT

Capillary liquid chromatography (CLC) has evolved in recent years, following the miniaturization tendency in chromatographic systems and the continuous research for faster and more efficient separations. Despite the many advantages when compared to HPLC, for example, the drastic reduction of solvent consumption, this technique is not yet so widespread, due to the necessity of a totally resizing instrumentation to smaller volumes, and also to the limitations of commercially available stationary phases.

Capillary columns that employ as stationary phase a silica monolith, present promising alternatives to packed silica columns, because of their higher permeability and lower working pressure. However, this type of stationary phase still has a lot to be improved to reach the efficiency of packed columns.

Thus, this work aimed, first, to optimize the preparation of monolithic stationary phases based on silica inside capillaries, with focus on sol-gel steps and capillary filling. In the second step of this work, the objective was the coating and immobilization of polydimethylsiloxane (PDMS) onto the silica monolithic support for use in CLC.

In the step of monolith preparation, parameters such as: amount of silica precursor, porogenic agent (polyethylene glycol), solvent and proportion of the reagent methyltrimethoxysilane (MTMS) were evaluated. With the optimized conditions it was possible to obtain well filled capillaries and with less shrinkage. However, a percentage of the prepared columns still presented radial shrinkage.

In the step of PDMS immobilization onto the monolith, parameters such as: type of monolithic support, molar mass and PDMS proportion in the solvent, time and temperature in the oven were evaluated. It was observed that higher efficiency is obtained with the pure silica support, 50% of PDMS (6000 g/mol) in hexane with thermal treatment at 150 °C in the oven during 16 hours. With these conditions, it was possible to obtain a new stationary phase, with an efficiency of 79500 plates/m for the separation of six alkylbenzenes employing a mobile phase gradient. Due to the high efficiency obtained (for this type of column), it can be considered promising for use in CLC.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

As – Fator de assimetria a 10% da altura do pico

CLC – Cromatografia Líquida Capilar, do inglês “*Capillary Liquid Chromatography*”

DAD – Detector de arranjo de diodos, do inglês “*Diode array detector*”

d.i. – Diâmetro Interno

ETMOS – Etiltrimetoxisilano

FE – Fase Estacionária

FESEM – Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo, do inglês “*Field Emission Scanning Electron Microscopy*”

FM – Fase Móvel

GC – Cromatografia Gasosa, do inglês “*Gas Chromatography*”

HILIC – Cromatografia Líquida de Interações Hidrofílicas, do inglês “*Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*”

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”

k – Fator de retenção

LC – Cromatografia Líquida, do inglês “*Liquid Chromatography*”

MM – Massa molar

MTES – Metiltrietoxisilano

MTMS – Metiltrimetoxisilano

N – Número de pratos

PDMS – Polidimetilsiloxano

PEEK – Poli (éter-éter-cetona), do inglês “*Poly Ether Ether Ketone*”

PEG – Polietilenoglicol

PEO – Óxido de polietileno

PMHS – Poli (metil hidroxisilano)

PTFE – Politetrafluoretileno

SEM – Microscopia Eletrônica de Varredura, do inglês “*Scanning Electron Microscopy*”

SPME – Microextração em fase sólida, do inglês “*Solid Phase Microextraction*”

TEOS – Tetraetoxisilano

THF – Tetrahidrofurano

TMOS – Tetrametoxisilano

UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência, do inglês “*Ultra High Performance Liquid Chromatography*”

α – Fator de separação para picos adjacentes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Equipamento básico de HPLC a) reservatório da FM; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) sistema de processamento de dados [3].....	18
Figura 2 - Tipos de colunas utilizadas em CLC [12]	22
Figura 3 - Comparação das características estruturais de colunas capilares: a) particuladas e b) monolíticas [13].....	22
Figura 4 – Microscopias com as morfologias dos diferentes tipos de materiais monolíticos. A) Monolito polimérico orgânico baseado em octadecilmetacrilato, com escala na parte inferior central da imagem de 5 µm [24], B) Monolito baseado em sílica pura – TMOS (escala de 5 µm), C) Monolito híbrido baseado em sílica - [2-(metacrililoiloxi)etil]- dimetil-(3-sulfopropil) hidróxido de amônio (escala de 5 µm) [25].	24
Figura 5 –Microscopias de uma coluna monolítica capilar A) ilustrando a estrutura monolítica dentro do capilar, com escala na parte inferior direita da imagem de 50 µm. B) ilustrando a estrutura de domínios, composta por esqueletos de sílica e macroporos (escala de 20 µm).....	25
Figura 6 - Esquema das reações do processo sol-gel com alcóxisilanos $\text{Si}(\text{OR})_4$. (A) Reação de hidrólise, (B) e (C) Reações de condensação [37].....	27
Figura 7 - Relação entre a composição inicial do monolito e a morfologia do gel resultante em um sistema TMOS – PEG – Solvente. Adaptado da referência [14]...	29
Figura 8 - Etapas envolvidas no processo sol-gel, utilizando como exemplo a formação de um monolito dentro de um frasco aberto.	30
Figura 9 - Estrutura molecular do PDMS.....	31
Figura 10 – Cromatograma com as medidas relacionadas a determinação de alguns parâmetros cromatográficos. Onde: t_M = tempo gasto para a FM percorrer a coluna, t_R = tempo de retenção, ou seja, o tempo que cada analito demora para percorrer a coluna, w_b = largura do pico na linha de base, w_h = largura do pico a meia altura [43].	32
Figura 11 - Medidas relacionadas ao cálculo do fator de assimetria (A_s) [70].	33
Figura 12 - Bomba-seringa utilizada inicialmente para o preenchimento das colunas	36
Figura 13 - Coluna fechada com conector de vidro para passar por tratamento térmico	36
Figura 14 – Esquema do sistema de enchimento por pressurização com N_2 construído no laboratório.....	38
Figura 15 - Capilar vedado com borrachas	38
Figura 16 – Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal da coluna TP1.	44
Figura 17 - Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 40x) de uma seção longitudinal da coluna TP2.	44

Figura 18 - Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal da coluna P-A08/P0,5/Pr4,5/M10, mostrando seu interior totalmente vazio.	45
Figura 19 - Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal das colunas A) P-A08/P1,2/Pr4,5/M10, B) P-A10/P1,2/Pr4,5/M10, C) P-A08/P0,5/Pr4,5/M25 e D) P-A08/P1,2/Pr4,5/M25. As setas brancas destacam as estruturas encolhidas formadas dentro do capilar.	46
Figura 20 - A, B, C e D correspondem as microscopias das colunas P-A08/P0,5/Pr4,5/M10, P-A08/P1,2/Pr4,5/M10, P-A10/P1,2/Pr4,5/M10 e P-A08/P0,5/Pr4,5/M25 respectivamente (escala de 100 µm). Nas imagens é possível ver os capilares de sílica fundida vazios.	47
Figura 21 - Coluna P-A08/P1,2/Pr4,5/M25 A) escala de 100 µm e B) escala de 10 µm. A seta mostra a estrutura maciça e encolhida formada.	47
Figura 22 – Fotos tiradas do microscópio óptico (Aumento de 100x). A, B, C) e D) colunas P-A08/P0,5/Pr1,0/M10, P-A10/P0,5/Pr1,0/M10, P-A08/P0,5/Pr1,0/M25, e P-A10/P0,5/Pr1,0/M25 respectivamente.	48
Figura 23 – Microscopias das colunas A) P-A08/P0,5/Pr1,0/M10, B) P-A10/P0,5/Pr1,0/M10, C) P-A08/P0,5/Pr1,0/M25 e D) P-A10/P0,5/Pr1,0/M25, onde as setas apontam para as estruturas que se acumularam no fundo do capilar (escala de 100 µm). Estruturas de glóbulos nas colunas E) P-A10/P0,5/Pr1,0/M10 e F) P-A08/P0,5/Pr1,0/M25 (escala de 5 µm).	49
Figura 24 – Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal das colunas A) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 e B) P-A10/P0,5/Pr4,5/M25.	50
Figura 25 – Microscopias das colunas A) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 e B) P-A10/P0,5/Pr4,5/M25 (escala de 100 µm) e C) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 e D) P-A10/P0,5/Pr4,5/M25 (escala de 5 µm). A seta destaca o encolhimento radial.	50
Figura 26 – Microscopias das colunas A) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 B e B) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 C (escala de 100 µm)	51
Figura 27 – Fotos tiradas do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal das colunas A) CO-U180/P80/T810/M90: A seta branca mostra o espaço vazio relacionado ao encolhimento por gravidade, e B) CO-U100/P100/T810/M90.	52
Figura 28 - Microscopias das colunas A) CO-U180/P80/T810/M90 e B) CO-U100/P100/T810/M90 (escala de 100 µm). A seta branca mostra o ângulo onde a coluna foi observada no microscópio óptico, impedindo a visualização do encolhimento. A diferença entre as duas colunas foram as quantidades de ureia e PEG.	53
Figura 29 - Foto tirada do microscópio óptico de uma seção longitudinal da coluna CO-U180/P100/T900/M00 (Aumento de 100x)	53
Figura 30 – Microscopias das colunas A) CO-U180/P100/T900/M00 (escala de 100 µm), B) (escala de 5 µm); C) CO-U180/P120/T810/M90 (escala de 100 µm), D) (escala de 5 µm) e E) CO-U180/P140/T810/M90 (escala de 100 µm).	54
Figura 31 - Foto tirada do microscópio óptico de uma seção longitudinal da coluna A) CO-U120/P120/T800/M00/A1,6 A e B) CO-U120/P120/T800/M00/A1,6 B (Aumento de 100x).	55

Figura 32 – Microscopias da coluna CO-U120/P120/T800/M00/A1,6 A. Escala de A) 100µm, B) 10 µm e C) 5 µm.	55
Figura 33 - Colunas A) CO-U120/P120/T720/M80/A1,6 A; B) CO-U120/P120/T720/M80/A1,6 B; C) CO-U100/P100/T720/M80/A2 A e D) CO-U100/P100/T720/M80/A2 B (Aumento de 100x)	56
Figura 34 – Microscopias das colunas A) CO-U120/P120/T720/M80/A1,6 A e B) CO-U100/P100/T720/M80/A2 B (escala de 100 µm).	56
Figura 35 - Fotos tiradas no microscópio óptico (Aumento de 100x) das colunas A) CO-U120/P120/T800/M00/A1,6-100, B e C) CO-U180/P100/T800/M00/A1,6-100, D e E) CO-U180/P100/T720/M80/A2-100. As imagens C e E são as colunas que foram giradas 90º no sentido transversal em relação às figuras B e D, mostrando a área vazia na parte superior do capilar.	57
Figura 36 – Microscopia da coluna CO-U180/P256/T800/M00/A2 com menor tamanho de domínio. A) Escala de 50 µm e B) Escala de 5 µm.	58
Figura 37 - Microscopias com as medidas: A) Esqueletos de sílica, M1 (escala de 5 µm), B) Macroporos, M1 (escala de 20 µm), C) Esqueletos de sílica, M2 (escala de 10 µm), D) Macroporos, M2 (escala de 40 µm), E) Esqueletos de sílica, M3 (escala de 2 µm), F) Macroporos, M3 (escala de 10 µm).	60
Figura 38 - Alquilbenzenos utilizados como analitos na mistura teste: A) Benzeno, B) Tolueno, C) Etilbenzeno, D) Propilbenzeno, E) Butilbenzeno e F) Pentilbenzeno. ...	66
Figura 39 – Microscopias das colunas A) M1-2-30 (escala de 3 µm). B) M2-2-30 (escala de 5 µm).	67
Figura 40 - Cromatogramas das colunas que empregaram o M1 como suporte e PDMS com MM 2000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM ACN:H ₂ O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.	69
Figura 41 - Cromatogramas das colunas que empregaram o monolito 1 como suporte e PDMS com MM 6000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. Especificamente no cromatograma da coluna M1-6-50, a concentração de benzeno foi de 0,5 mg/mL. FM ACN:H ₂ O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.	70
Figura 42 - Cromatogramas das colunas que empregaram o monolito 2 como suporte e PDMS com MM 2000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM ACN:H ₂ O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.	71
Figura 43 - Cromatogramas das colunas que empregaram o monolito 2 como suporte e PDMS com MM 6000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM ACN:H ₂ O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.	72
Figura 44 – Comparação entre pares de colunas onde variou-se apenas a MM de PDMS. Os cromatogramas em preto correspondem as colunas onde empregou-se MM 2000 g/mol, e os cromatogramas em vermelho, MM 6000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM	

ACN:H ₂ O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.....	73
Figura 45 - Cromatogramas das 12 colunas preparadas nesta etapa do trabalho. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM ACN:H ₂ O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.....	74
Figura 46 - Medições dos A) Esqueletos de sílica (escala de 2 µm) e B) Macroporos (escala de 20 µm) da coluna 2-T120/t04.....	75
Figura 47 – Cromatogramas das colunas preparadas na última etapa do trabalho, de estudo das condições de imobilização térmica. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. Gradiente de FM 40-65% (v/v) ACN em meio aquoso com 40 minutos de corrida, vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.....	78
Figura 48 - Cromatograma da coluna 1-T150/t16, que apresentou a maior eficiência entre todas as preparadas nesse trabalho. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. Gradiente de FM 40-65% (v/v) ACN em meio aquoso com 40 minutos de corrida, vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nomenclaturas para a Cromatografia Líquida (CL) proposta por Chevert et al, considerando o d.i. da coluna e a vazão de FM empregados. [7]	20
Tabela 2 - Influência do d.i. da coluna no volume de solvente consumido em um dia típico de trabalho (8 horas): [9].....	20
Tabela 3 - Parâmetros e níveis testados	37
Tabela 4 – Parâmetros testados em cada coluna: 1. Quantidade de ácido acético, 2. PEG, 3. Precursor TMOS+MTMS e 4. Proporção de MTMS no precursor. Os sinais de + e – indicam qual o valor de cada parâmetro, conforme a tabela 2.	39
Tabela 5 - Condições empregadas nas colunas variando a concentração de PEG, ureia e MTMS.....	41
Tabela 6 - Condições empregadas nas colunas para analisar a influência da quantidade de solvente.	42
Tabela 7 - Condições empregadas nas colunas com as condições otimizadas em capilares de 100 µm d.i.	42
Tabela 8 – Médias das medidas dos esqueletos de sílica (E) e macroporos (M) (em µm) para cada tipo de monólito	59
Tabela 9 - Condições empregadas variando o tipo de suporte monolítico, proporção e massa molar de PDMS. Cada coluna foi simbolizada com uma sigla referente a sua composição.	63
Tabela 10 - Condições empregadas no tratamento térmico em duas etapas, variando tempo e temperatura. As colunas são identificadas com códigos referentes às condições utilizadas.	65
Tabela 11 – Parâmetros cromatográficos – Resolução (Rs), assimetria (As), fator de retenção (k) e eficiência (pratos/m) – das doze colunas preparadas na avaliação do tipo de suporte, MM e proporção de PDMS. Os valores foram calculados para o composto mais retido (pentilbenzeno).....	68
Tabela 12 – Médias dos tamanhos dos esqueletos de sílica e macroporos (em µm) de cada uma das duplicatas das colunas.....	76
Tabela 13 – Parâmetros cromatográficos – Resolução (Rs), assimetria (As), fator de retenção (k) e eficiência (pratos/m) – das colunas preparadas na parte final do trabalho: Variando tempo e temperatura de imobilização térmica. Os valores foram calculados para o composto mais retido (pentilbenzeno).....	77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
1.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	18
1.1.1. Modos de separação em HPLC	19
1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CAPILAR	19
1.2.1. Tipos de colunas capilares	21
1.3. COLUNAS MONOLÍTICAS	23
1.3.1. Histórico	23
1.3.2. Tipos	23
1.3.3. Descrição e estrutura	24
1.3.4. Vantagens e desvantagens	26
1.4. MÉTODO SOL-GEL	27
1.5. POLIDIMETILSILOXANO (PDMS)	30
1.6. AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA	31
2. OBJETIVOS	34
3. PARTE EXPERIMENTAL GERAL	34
3.1. MATERIAIS E REAGENTES	34
3.2. EQUIPAMENTOS	35
3.3. PRÉ-TRATAMENTO DOS CAPILARES DE SÍLICA FUNDIDA	35
4. PREPARAÇÃO DO MONOLITO	36
4.1. PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1.1. Teste preliminar	36
4.1.2. Otimizações nas condições de preparo	37
4.1.4. Testes com as condições otimizadas de preparo e composição dos monolitos	40
4.1.4.1. Repetitividade	40
4.1.4.2. Concentração de PEG, ureia e ausência de MTMS como coprecursor	40
4.1.4.3. Menor quantidade de solvente e tempo de secagem	41
4.1.4.4. Menor d.i. do capilar	42
4.1.4.5. Maior quantidade de PEG e menor temperatura de gelificação	43
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.2.1. Teste preliminar	43
4.2.2. Otimizações nas condições de preparo	44

4.2.4. Testes com as condições otimizadas de preparo e composição dos monolitos	51
4.2.4.1. Repetitividade.....	51
4.2.4.2. Concentração de PEG, ureia e ausência de MTMS como coprecursor	52
4.2.4.3. Menor quantidade de solvente e tempo de secagem	54
4.2.4.4. Menor d.i. do capilar.....	57
4.2.4.5. Maior quantidade de PEG e menor temperatura de gelificação (M3)	58
 5. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE MONOLÍTICA ATRAVÉS DA IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DO POLIDIMETILSILOXANO	 61
5.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	62
5.1.1.1.1. Suporte monolítico 1 (M1) – baseado em sílica pura	62
5.1.1.1.2. Suporte monolítico 2 (M2) baseado em híbrido orgânico-inorgânico.....	63
5.1.1.2. Avaliação dos parâmetros: tipo de suporte monolítico, massa molar e proporção de PDMS no solvente	63
5.1.1.3. Estudo das condições empregadas na imobilização térmica do PDMS – tempo e temperatura.....	64
5.1.2. Caracterização	65
5.1.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM).....	65
5.1.2.2. Avaliação cromatográfica	65
 5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.2.1. Avaliação dos parâmetros: tipo de suporte monolítico, massa molar e proporção de PDMS no solvente.....	66
5.2.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM).....	66
5.2.1.2. Avaliação Cromatográfica	67
5.2.1.2.1 Comparação entre colunas variando a proporção de polímero no solvente (10, 30 e 50%)	67
5.2.1.2.2 Comparação entre colunas variando as massas molares de PDMS (2000 e 6000 g/mol).....	72
5.2.2.3 Comparação entre colunas variando o tipo de suporte monolítico (monolitos 1 e 2)	73
5.2.2. Estudo das condições empregadas na imobilização térmica do PDMS – tempo e temperatura	74
5.2.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM).....	75
5.2.2.2. Avaliação Cromatográfica	76
 6 CONCLUSÕES.....	 79
 REFERÊNCIAS	 82

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) é a técnica de separação mais popular e bem consolidada para análises qualitativas e quantitativas de uma ampla gama de compostos [1]. Essa técnica tem como princípio a separação dos analitos de uma amostra através de suas diferentes interações entre uma fase móvel (FM) líquida e uma fase estacionária (FE), que estão contidas dentro de uma coluna cromatográfica. Como geralmente são utilizadas colunas preenchidas com partículas muito pequenas (da ordem de 5 μm de diâmetro) e que oferecem grande resistência à vazão de FM, em HPLC são empregadas bombas de alta pressão para bombear a FM através da coluna. O emprego dessas partículas muito pequenas resulta em alta eficiência de separação, quando compara-se esta técnica com a cromatografia clássica. Dependendo do nível de interação de cada analito com a FE ele fica mais ou menos tempo retido na mesma, ocorrendo a separação, e o resultado é visualizado através de picos em um cromatograma [2]. Um esquema com os principais componentes de um sistema HPLC pode ser visto abaixo, na figura 1.

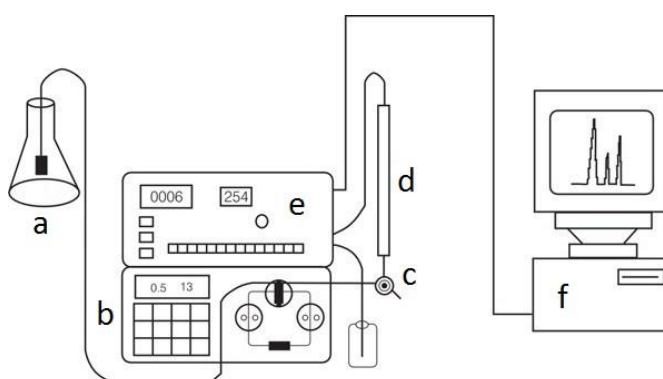


Figura 1 – Equipamento básico de HPLC a) reservatório da FM; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) sistema de processamento de dados [3]

1.1.1. Modos de separação em HPLC

Em HPLC existem modos de separação baseados nas polaridades das fases móvel e estacionária, que são empregados nas separações de diferentes tipos de analitos.

Tradicionalmente, a HPLC em fase normal era a mais utilizada, onde a FE é mais polar que a FM. Comumente empregavam-se tetrahidrofurano (THF) ou diclorometano (solventes orgânicos) como FM e sílica como FE.

Com o tempo, a HPLC em fase reversa foi sendo cada vez mais aplicada, e hoje em dia é a mais utilizada. Nesse modo de separação a FM é mais polar que a FE, e utilizam-se normalmente acetonitrila (ACN) ou metanol (MeOH) (solventes orgânicos com características polares) em meio aquoso, e fases estacionárias de sílica modificada com diferentes grupos (mais comumente C₈ ou C₁₈) [2].

Atualmente, vem ganhando espaço o modo de cromatografia líquida de interações hidrofílicas, do inglês *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* (HILIC), que pode ser considerado um híbrido entre os dois anteriores, devido à FE ser polar (característica do modo fase normal) e a FM ser também polar (característica do modo fase reversa), proporcionando uma boa separação de analitos polares ou ionizáveis que não são bem separados nos dois modos anteriores [4].

1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA CAPILAR

Com o desenvolvimento da HPLC - que emprega colunas de 3,2 a 4,6 mm de diâmetro interno (d.i.), recheadas com partículas da ordem de 3 a 5 µm de diâmetro [5] - houve uma tendência em diminuir o d.i. da coluna cromatográfica e o tamanho das partículas do seu recheio, com o intuito de se conseguir separações cada vez mais rápidas e eficientes.

Dentro deste contexto, desenvolveu-se a cromatografia líquida de ultra alta eficiência, do inglês *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) - que emprega colunas de 1 a 2,1 mm de d.i., recheadas com partículas de até 2 µm de diâmetro [6]; e a cromatografia líquida capilar (CLC) - que emprega colunas de 150 a 500 µm de d.i., segundo nomenclatura proposta por Chervet *et al* [7] (tabela 1), e que podem ser recheadas com diferentes tipos de fases estacionárias [5,8].

Tabela 1 - Nomenclaturas para a Cromatografia Líquida (CL) proposta por Chevert et al, considerando o d.i. da coluna e a vazão de FM empregados. [7]

Diâmetro interno da coluna	Vazão	Nomenclatura
3,2 a 4,6 mm	0,5 a 2 mL/min	HPLC convencional
1,5 a 3,2 mm	100 a 500 µL/min	HPLC microbore
0,5 a 1,5 mm	10 a 100 µL/min	Micro-CL
150 a 500 µm	1 a 10 µL/min	CL capilar
10 a 150 µm	10 a 1000 nL/min	Nano-CL

Algumas das vantagens da CLC incluem: menor consumo de FE e FM – o que permite o uso de fases diferenciadas e mais caras, pequena quantidade de amostra requerida, facilidade no acoplamento à diversos sistemas de detecção (principalmente espectrometria de massas), diminuição da vazão ótima de trabalho e possibilidade de utilização de colunas longas e curtas [9].

Dentre essas vantagens, uma das principais é o menor consumo de FM, que reflete na menor geração de resíduos, diminuindo o impacto ambiental. A tabela 1 ilustra essa característica de menor consumo de solvente em função da diminuição do d.i. do capilar. Em um ano, pode-se consumir 200 vezes menos solventes, que na maioria das vezes são tóxicos e que requerem estocagem e descarte especiais [8,10].

Tabela 2 - Influência do d.i. da coluna no volume de solvente consumido em um dia típico de trabalho (8 horas): [9]

d.i. da coluna	Vazão típica	Consumo de solvente
4,0 mm	1,0 mL/min	480 mL
2,0 mm	0,2 mL/min	96 mL
1,0 mm	50 µL/min	24 mL
0,5 mm	15 µL/min	7,2 mL
0,3 mm	5,0 µL/min	2,4 mL
0,2 mm	1,0 µL/min	0,5 mL

Porém, a instrumentação utilizada nesta técnica (conexões, bomba, cela do detector) deve ser totalmente redimensionada para volumes menores, da ordem de nanolitros [5]. Algumas das maiores barreiras no desenvolvimento da CLC são: a

menor disponibilidade de equipamentos comerciais [8], além da limitação de colunas comerciais disponíveis [9] (em comparação com HPLC).

O alargamento de banda extra coluna é um fator mais crítico em CLC do que em HPLC, devido aos baixos volumes internos do equipamento de CLC. Os volumes extra coluna que influenciam nesse alargamento de banda estão relacionados principalmente às tubulações e conexões pós coluna, além da cela de detecção. As consequências do alargamento de banda são perda de eficiência e resolução cromatográfica [11].

O comprimento das tubulações contribui de forma linear, enquanto o raio contribui na ordem da quarta potência, portanto o d.i. das tubulações deve ser extremamente baixo. As conexões empregadas para ligar as tubulações e a coluna também são importantes, e hoje em dia já existem conexões com zero volume morto [8].

1.2.1. Tipos de colunas capilares

A parte principal em um equipamento de CLC, assim como em qualquer técnica cromatográfica é a coluna. Nesta técnica geralmente empregam-se capilares de sílica fundida recobertos com uma camada externa de políimida que tem a função de conferir flexibilidade e resistência ao capilar. Existem três tipos de colunas que podem ser usadas em CLC:

(a) Colunas tubulares abertas: São constituídas de um tubo de sílica fundida com uma camada fina de FE recobrindo sua parede interna. Esse é o mesmo tipo de coluna utilizada em cromatografia gasosa [8]. Em teoria, elas podem apresentar eficiências maiores que as colunas particuladas, porém, seu diâmetro deveria ser menor que 5 μm [5]. A maior dificuldade do uso destas colunas deve-se à sua baixíssima capacidade de amostra, exigindo sistemas especiais de introdução da amostra e detectores com volume morto muito pequeno; e dificuldade em se obter uma camada fina e homogênea de FE no seu preparo [9].

(b) Colunas particuladas: São aquelas em que a FE apresenta-se na forma de partículas (de 1,7 a 5 μm de diâmetro) que estão dispostas de modo a preencher toda a extensão da coluna cromatográfica [5,12]. A técnica mais empregada para seu enchimento é o preparo de uma suspensão das partículas em um solvente apropriado,

a qual é pressurizada para dentro da coluna por uma bomba de alta pressão [9]. As fases estacionárias particuladas mais utilizadas em CLC são as quimicamente ligadas do tipo C_8 e C_{18} [5].

(c) Colunas monolíticas: São constituídas por uma peça única formada por estruturas interconectadas que conferem elevada permeabilidade e pressão de trabalho reduzidas. Podem ser fabricadas com polímeros, sílica ou materiais híbridos.

Os três tipos de colunas capilares são ilustrados abaixo na figura 2, e as estruturas do recheio das colunas particuladas e monolíticas são apresentadas na figura 3.

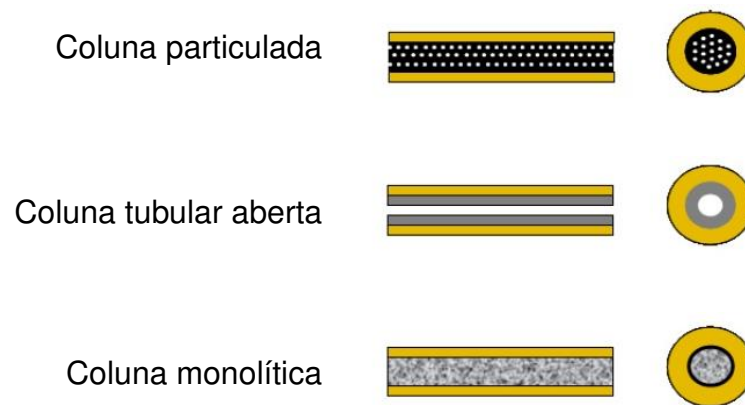


Figura 2 - Tipos de colunas utilizadas em CLC [12]

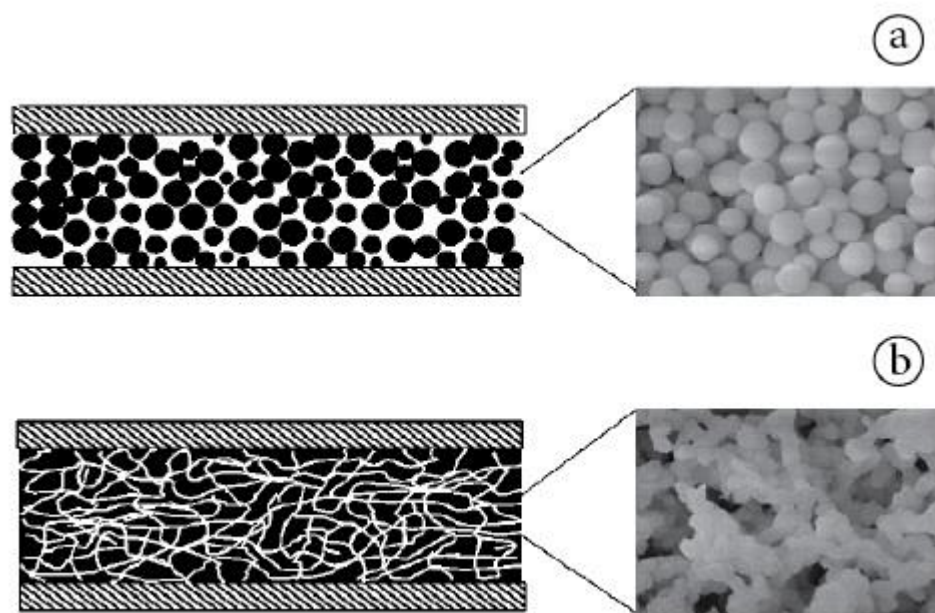


Figura 3 - Comparação das características estruturais de colunas capilares: a) particuladas e b) monolíticas [13]

1.3. COLUNAS MONOLÍTICAS

1.3.1. Histórico

Uma das primeiras aplicações dos monolitos foi ambiental, como material de suporte para redução catalítica dos gases de escapamentos automotivos [14]. A estrutura aberta destes monolitos permitia uma reação rápida dos gases de escapamento com os componentes catalíticos depositados na superfície dos canais monolíticos [15].

No ano de 1996, Tanaka e colaboradores aplicaram pela primeira vez os monolitos porosos de sílica em HPLC [16]. Eles foram preparados com o método sol-gel desenvolvido por Nakanishi e Soga, baseado na hidrólise e policondensação do tetrametóxisilano (TMOS) na presença de óxido de polietileno (PEO) [17–19]. Em 1998, Tanaka e colaboradores realizaram a preparação *in situ* de monolitos de sílica em capilares de 100 µm de d.i. [20].

O fato de as colunas monolíticas possibilitarem o controle do tamanho dos macro e mesoporos, e com isso, a permeabilidade e performance, fez Guiochon afirmar: “A invenção recente e desenvolvimento de colunas monolíticas é uma grande mudança tecnológica em tecnologia de colunas, de fato, o primeiro avanço original que ocorreu nesta área desde que Tsweet inventou a cromatografia, um século atrás” [21,22].

1.3.2. Tipos

Os monolitos podem ser classificados de acordo com os três diferentes tipos de materiais utilizados em seu preparo: os baseados em polímeros orgânicos, em polímeros inorgânicos, e os híbridos organo-inorgânicos, conforme a figura 4, que mostra um exemplo de suas morfologias.

O preparo de colunas monolíticas poliméricas orgânicas pode ser feito com diversos monômeros: acrilamidas, acrilatos, metacrilatos, estireno, entre outros[12]. Essas colunas apresentam como vantagem boa estabilidade em valores de pH mais drásticos, porém não são resistentes na presença de solventes orgânicos podendo inchar ou se deformar, não apresentando portanto boa estabilidade mecânica [23].

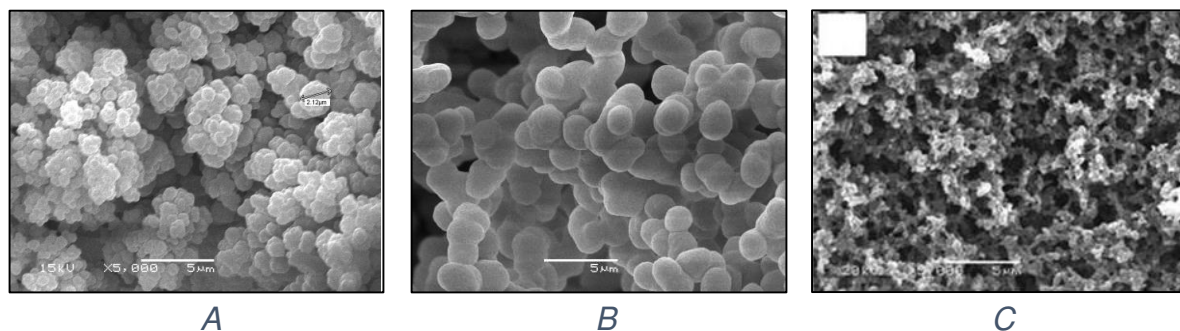


Figura 4 – Microscopias com as morfologias dos diferentes tipos de materiais monolíticos. A) Monolito polimérico orgânico baseado em octadecilmetacrilato, com escala na parte inferior central da imagem de 5 µm [24], B) Monolito baseado em sílica pura – TMOS (escala de 5 µm), C) Monolito híbrido baseado em sílica - [2-(metacriloiloxi)etil]- dimetil-(3-sulfopropil) hidróxido de amônio (escala de 5 µm) [25].

Já as colunas monolíticas inorgânicas são preparadas com alcóxidos metálicos, que podem ser de alumínio, zircônio e titânio, mas comumente utilizam-se os alcóxidos de silício. Os precursores mais utilizados são o TMOS ou o tetraetóxisilano (TEOS) [12]. Esse tipo de coluna apresenta boa estabilidade mecânica frente a solventes orgânicos, porém não apresenta boa estabilidade em pHs mais drásticos [23].

No processo sol-gel utilizado para obter materiais de sílica pura é empregado um precursor inorgânico do tipo ortossilicato de tetra-alquila, como por exemplo o TMOS. Porém, quando se deseja obter materiais híbridos, deve-se adicionar novos constituintes que aumentam a complexidade do sistema. Um dos métodos é empregar organossilanos polimerizáveis, ou seja, que apresentam um grupo orgânico ligado diretamente ao átomo de silício, em uma ligação Si-C não hidrolisável [23,26]. Portanto, pode-se empregar como coprecursores para um monolito híbrido: um trialcóxisilano como o MTMS ((MeO)₃-Si-Me) e um tetraalcóxisilano como o TMOS ((MeO)₄-Si) [25].

Além destes, também podem ser preparados monolitos híbridos baseados em sílica pura com um polímero orgânico incorporado, como acrilamidas, acrilatos e metacrilatos [23,25,27].

1.3.3. Descrição e estrutura

Os monolitos podem ser fabricados em diferentes formatos, como hastes porosas, dentro de finos capilares ou feitos como membranas ou discos [15]. Quando

aplicado como FE em cromatografia, o monolito é constituído por uma peça única e porosa, em formato cilíndrico [5].

A estrutura do monolito é formada por domínios. Estes domínios são constituídos pelo diâmetro do macroporo e seu esqueleto de sílica vizinho. Na estrutura monolítica podem existir poros de diferentes tamanhos, sendo que os macroporos são aqueles que tem mais de 50 nm, os microporos são aqueles com até 2 nm e os mesoporos são os que tem tamanhos intermediários [28].

Para ilustrar esses conceitos, a figura 5A mostra a estrutura do monolito dentro de um capilar de sílica fundida recoberto com uma camada externa de poliimida. Na figura 5B é possível observar as estruturas de domínios: os esqueletos de sílica e macroporos (espaços vazios). Os macroporos, que tem dimensões de 1 a 10 μm aproximadamente, permitem a passagem de maior vazão de FM com boa eficiência cromatográfica e diminuição no tempo de corrida nas colunas monolíticas [29], quando comparadas com colunas particuladas. Na superfície dos esqueletos de sílica ficam os mesoporos, que tem dimensões da ordem de 5 a 30 nm [14,30].

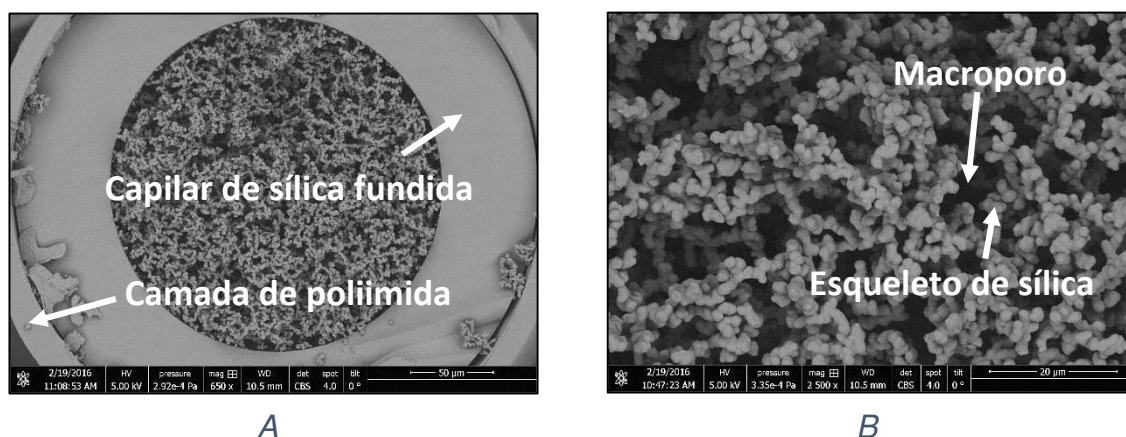


Figura 5 – Microscopias de uma coluna monolítica capilar A) ilustrando a estrutura monolítica dentro do capilar, com escala na parte inferior direita da imagem de 50 μm . B) ilustrando a estrutura de domínios, composta por esqueletos de sílica e macroporos (escala de 20 μm).

A distribuição e tamanho dos macroporos controlam a eficiência da coluna e resistência à vazão de FM. Por outro lado, os mesoporos dão origem a área superficial onde ocorre a interação com os analitos, e consequentemente controlam a resolução dos picos [31].

O preparo de uma FE monolítica pode ser realizado em um molde, ou *in situ*. A preparação em um molde é acompanhada de redução de volume de toda a

estrutura de sílica, sendo necessário cobri-la com um tubo de PTFE ou resina PEEK. Este tipo de preparo normalmente ocorre nas colunas usadas em HPLC. Já na preparação *in situ*, que é o modo usado para preparar as colunas em CLC, o monolito é formado no interior do tubo que o conterá e, portanto, ela é muito mais fácil do que em um molde, pois sua estrutura fica ligada à parede do capilar. No caso dos monolitos baseados em sílica, a interação ocorre através dos grupos silanóis do monolito e das paredes internas do capilar [32].

1.3.4. Vantagens e desvantagens

Uma das principais vantagens da utilização de monolitos como enchimento de colunas cromatográficas é evitar a necessidade de filtros de retenção, os quais são colocados para evitar a perda do material contido no interior da coluna e são comumente utilizados nas colunas particuladas. A preparação destes filtros de retenção apresenta baixa repetibilidade, o que compromete a confiabilidade dos resultados cromatográficos; adicionalmente, os filtros de retenção podem sofrer efeito-memória e alterar um cromatograma pelo surgimento de picos-fantasma. Outra vantagem, é que as colunas monolíticas de sílica apresentam boa eficiência de separação, além de permeabilidade, combinadas com menor pressão de trabalho, quando comparadas com uma coluna particulada [33].

Porém, a preparação de um domínio homogêneo do monolito continua sendo um desafio para os pesquisadores devido a possibilidade de encolhimentos e rachaduras em sua estrutura [14]. Esse encolhimento é inerente ao processo sol-gel, e ocorre devido a remoção do líquido de dentro dos canais dos macroporos durante o tratamento térmico [34], sendo que o gel se contrai enquanto o líquido evapora desses poros. Esse efeito se torna mais acentuado em capilares com d.i. $> 100 \mu\text{m}$, o que torna sua preparação mais difícil [35].

Outro problema é a reprodutibilidade no preparo desse tipo de FE. Para a produção de monolitos altamente reprodutíveis e com um alto nível de eficiência, uma maior otimização é necessária para parâmetros como composição inicial, temperatura de reação e condições de preparo, visto que fatores como a homogeneidade do leito e a reprodutibilidade em sua preparação são fundamentais para o desenvolvimento das aplicações cromatográficas dessas colunas [1].

1.4. MÉTODO SOL-GEL

O método mais empregado e que também foi utilizado neste trabalho para preparar os monolitos baseados em sílica é o sol-gel. O termo sol é utilizado para definir uma dispersão de partículas com diâmetro entre 1-100 nm em um líquido, enquanto o termo gel é caracterizado como um sistema bifásico, formado por estruturas rígidas de partículas ou de cadeias poliméricas que imobiliza a fase líquida nos seus interstícios [13,36].

Para que ocorra o processo sol-gel, os seguintes reagentes são misturados: precursor de sílica (um alcóxisilano, como por exemplo o TMOS), indutor de separação de fases e agente porogênico (PEG), catalisador e solvente (solução de ácido acético), indutor de formação de mesoporos (ureia).

As reações envolvidas nesse processo são de hidrólise e condensação [26]. A hidrólise ocorre quando o precursor reage com um solvente aquoso, na presença de um catalisador, produzindo um álcool e um grupo silanol, conforme a reação A da figura 6. Já a policondensação ocorre quando um grupo silanol Si-OH e um alcóxido Si-OR, ou dois grupos silanóis Si-OH, se unem formando a ligação siloxano Si-O-Si, conforme as reações B e C da figura 6 [14]. A reação é exotérmica, então a temperatura do meio reacional deve ser controlada e constante, através da utilização de um banho de gelo.

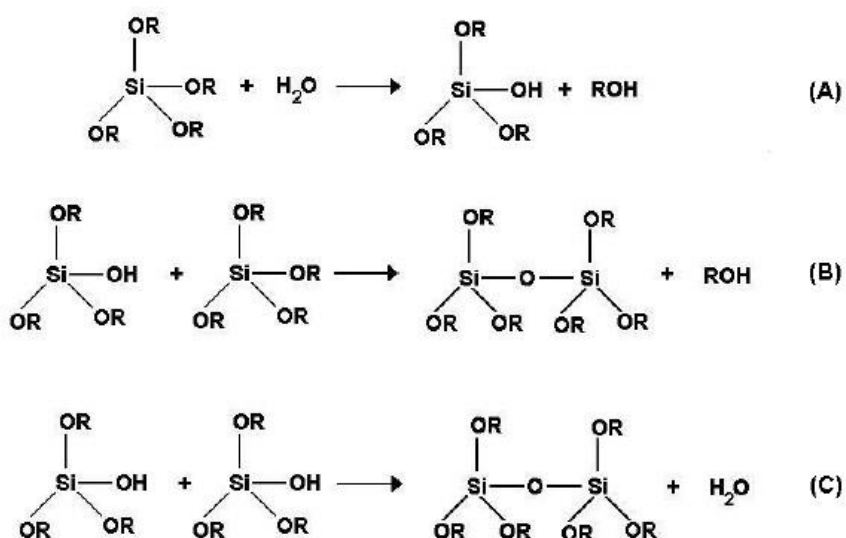


Figura 6 - Esquema das reações do processo sol-gel com alcóxisilanos $\text{Si}(\text{OR})_4$. (A) Reação de hidrólise, (B) e (C) Reações de condensação [37].

A cinética das reações de hidrólise e condensação é controlada pelo pH do meio (concentração de catalisador), concentração de água e tipo de grupos alcóxidos do precursor, portanto, esses fatores também afetam o tempo de gelificação [14].

A solução inicial se converte em um sistema sol-gel através da separação de fases pode ocorrer através de dois mecanismos: por nucleação e crescimento - que ocorre em meio básico e dá origem a partículas esféricas - e decomposição espinodal - que ocorre em meio ácido e dá origem a estrutura de domínios monolítica.

Na decomposição espinodal, acontece uma variação de composição no meio, formando uma estrutura específica composta de duas fases. No decorrer do processo, há um aumento de contraste entre as duas fases, juntamente com um aumento no tamanho da estrutura do domínio, terminando em separação macroscópica de fases nos estágios finais. Esse mecanismo ocorre pela ação do indutor de separação de fases (PEG) [14,31].

No processo de separação de fases, o PEG fica distribuído na fase rica em sílica. Com isso, a superfície da fase gelificada torna-se hidrofóbica, como resultado da adsorção das cadeias de PEG sobre os grupos silanóis na superfície da sílica [38], promovendo dessa forma, a separação de fases (solvente e esqueleto de sílica). Um aumento de PEG diminui o tamanho do domínio, pois ele controla a cinética da separação de fases e contribui para determinar o momento da transição sol-gel [39]. Foi observado na literatura que quanto maior a quantidade de PEG usada, menor deve ser a temperatura de gelificação empregada [35,40]

Geralmente, emprega-se o MTMS na síntese sol-gel quando ela é realizada dentro de capilares com d.i. maior que 100 μm , com o objetivo de minimizar encolhimentos. A incorporação de grupos metil na sílica dificulta a condensação dos grupos hidroxila e reduz o encolhimento, devido ao impedimento estérico oferecido pelo grupo metila [1,25,41]. Além disso, o MTMS confere à estrutura monolítica uma certa flexibilidade, que permite o gel suportar o stress gerado pelo encolhimento [41].

Depois do processo de separação de fases e gelificação, com a formação da estrutura monolítica, o sistema é mantido em uma temperatura específica durante várias horas, num processo chamado envelhecimento, onde ocorre a formação dos mesoporos. O tamanho dos mesoporos é definido pela temperatura empregada e pH da solução. Com a hidrólise da ureia a amônia, o pH fica básico. Na superfície do esqueleto de sílica existem microporos, que nessa etapa se reorganizam em

mesoporos (com tamanho acima de 5 nm), em um mecanismo de dissolução e reprecipitação chamado de Ostwald Ripening [14,42].

Para sintetizar todos esses conceitos envolvendo o processo sol-gel, a figura 7 ilustra a contribuição de cada componente para a morfologia final do monolito, e a figura 8 resume as etapas envolvidas nesse processo.

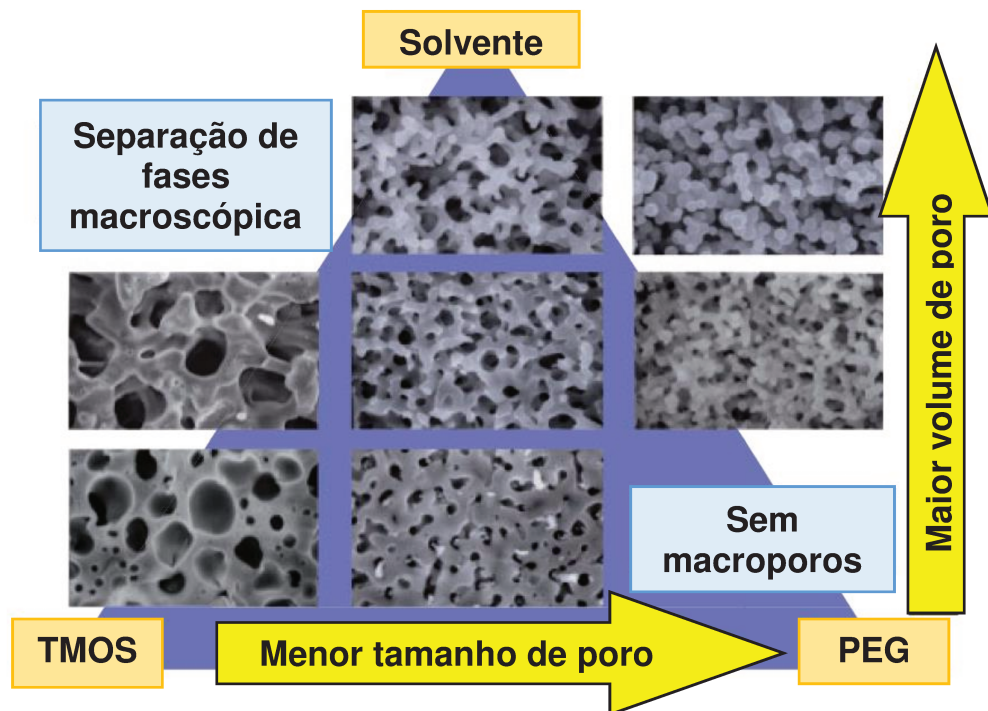


Figura 7 - Relação entre a composição inicial do monolito e a morfologia do gel resultante em um sistema TMOS – PEG – Solvente. Adaptado da referência [14] com autorização da Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

No eixo vertical, variando a quantidade de solvente, pode-se controlar o *volume* dos macroporos, que é representado pela fase fluída. No eixo horizontal, tem-se que o *tamanho* dos macroporos é controlado pela razão PEG/TMOS, e que quanto maior a quantidade de TMOS, mais espesso é o esqueleto de sílica, que é representado pela fase gel. Na parte inferior direita da figura pode-se observar que quanto maior a quantidade de PEG, menores são os poros até chegar em um ponto onde não há mais macroporos - somente uma fase maciça - e que ao contrário, quanto menos PEG, maiores são os macroporos até ocorrer separação completa da fase fluída e da fase gel. O formato de triângulo mostra que os três componentes não contribuem isoladamente, mas sim de forma combinada para formar os domínios monolíticos na transição sol-gel.

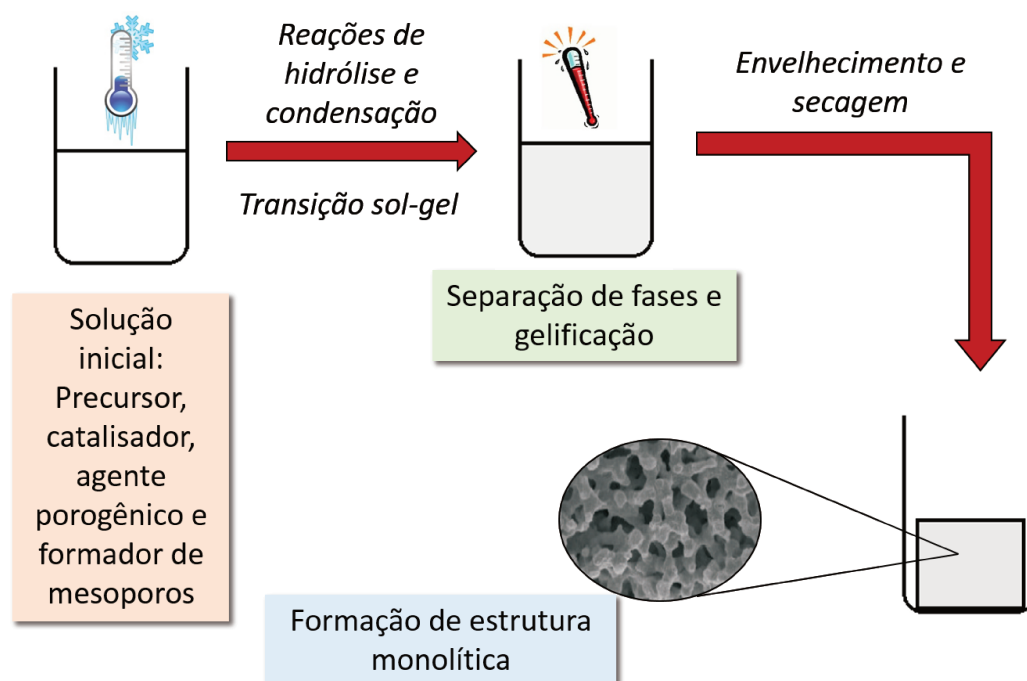


Figura 8 - Etapas envolvidas no processo sol-gel, utilizando como exemplo a formação de um monólito dentro de um frasco aberto.

1.5. POLIDIMETILSILOXANO (PDMS)

O polidimetilsiloxano (PDMS), é um polímero de cadeia lateral curta (C_1) [43] que pertence à classe dos silicones, e tem sido extensivamente usado no campo da química analítica devido as suas propriedades físico-químicas. Seu uso nessa área ganhou importância com sua aplicação como FE em cromatografia gasosa. Desde então, tem sido usado em várias técnicas de preparo de amostras, como por exemplo microextração em fase sólida (SPME), além da confecção de dispositivos *lab-on-a-chip*, que tem revolucionado a bioanálise [44].

A imobilização, especialmente de polissiloxanos, em suportes de sílica particulada e sílica modificada com zircônia [45–49] e titânia [49–55], tem sido extensivamente empregada em HPLC, utilizando diferentes polímeros: como poli (metiloctilsiloxano) (PMOS) [56–60], PDMS [56,61,62], poli (metiltetradecilsiloxano) (PMTDS) [46,56], poli (metiloctadecilsiloxano) (PMODS) [55,60], poli (metilfenilsiloxano) (PMPS) [63], e polibutadieno (PBD) [54,64]. Este processo tem o objetivo de aumentar a estabilidade química da FE e reduzir a atividade dos grupos silanóis residuais, devido a esses grupos interagirem fortemente com analitos básicos

e causarem alargamento de pico [65]. Entretanto, o processo de recobrimento de polissiloxanos em colunas monolíticas nunca havia sido investigado.

A caracterização do tipo de interação formada entre o PDMS e a sílica, e a descrição das propriedades físicas do material resultante, é uma tarefa bastante complicada, e que se torna mais difícil ainda em escala capilar. Essa dificuldade está relacionada à determinação do mecanismo de interação das unidades monoméricas com a superfície do material, sendo que, tanto a atividade como a morfologia da superfície estão envolvidas nessa interação. Na literatura, encontra-se que o principal mecanismo de interação é através da formação ligações de hidrogênio entre os grupos silanóis da superfície da sílica e os átomos de oxigênio da cadeia polimérica [66].

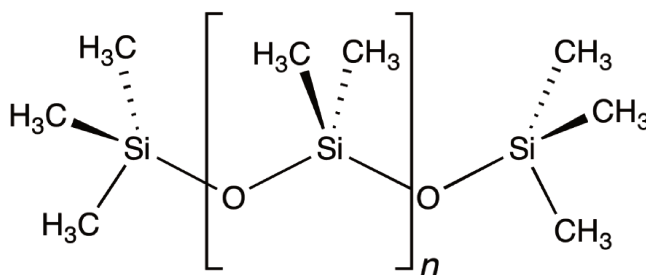


Figura 9 - Estrutura molecular do PDMS

1.6. AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Os resultados de uma análise cromatográfica são expressos através de picos em um cromatograma. A linha de base representa a passagem de FM pelo detector, e os picos são registrados quando os componentes da amostra eluem, com um perfil proporcional às concentrações dos analitos [2].

Para avaliar as fases estacionárias preparadas, utilizou-se alguns parâmetros cromatográficos. As medidas empregadas para o cálculo desses parâmetros são ilustradas na figura 10, sendo que, atualmente, elas são realizadas diretamente pelo software de operação do equipamento.

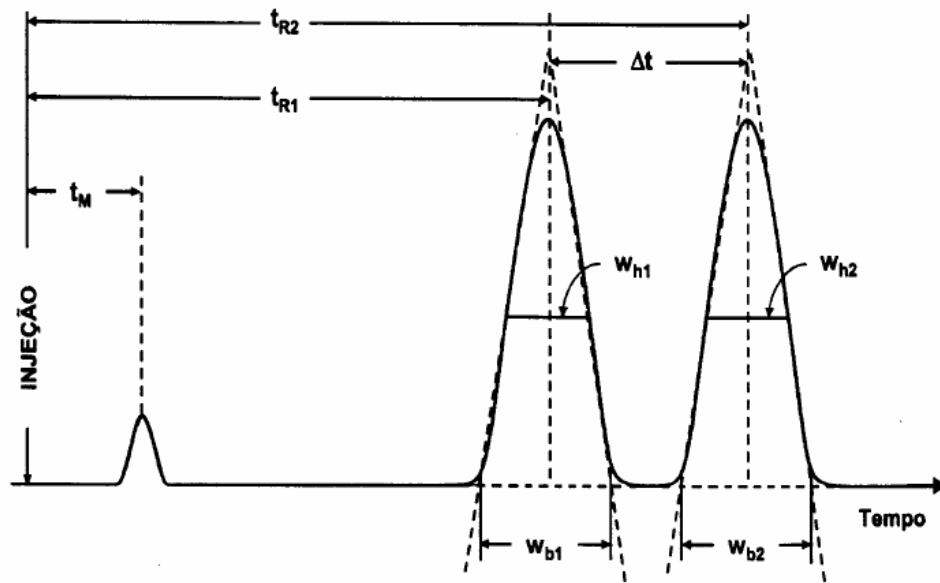


Figura 10 – Cromatograma com as medidas relacionadas a determinação de alguns parâmetros cromatográficos. Onde: t_M = tempo gasto para a FM percorrer a coluna, t_R = tempo de retenção, ou seja, o tempo que cada analito demora para percorrer a coluna, w_b = largura do pico na linha de base, w_h = largura do pico a meia altura [43].

A eficiência da coluna é representada em termos de números de pratos. Um prato é uma etapa de equilíbrio entre a FM e a FE. Quanto maior o número de pratos, mais eficiente é a separação. O cálculo para o número de pratos de um determinado pico pode ser realizado empregando o valor da largura do pico na linha de base (w_b) (Equação 1), ou a meia altura (w_h) (Equação 2) [2].

$$(Eq. 1) \quad N = 16(t_R/w_h)^2$$

$$(Eq. 2) \quad N = 5,545(t_R/w_h)^2$$

A eficiência da coluna pode ser afetada por uma série de fatores, dentre eles, o comprimento da coluna. Para comparar a eficiência de colunas com diferentes comprimentos (L), emprega-se a altura de prato (H) (Equação 3), ou a eficiência em pratos por metro (Equação 4).

$$(Eq. 3) \quad H = L/N$$

$$(Eq. 4) \quad \text{Pratos/m} = N/L_{(\text{em metros})}$$

A medida da resolução é utilizada para avaliar a separação de dois componentes consecutivos, conforme as equações 4 e 5, que ilustram o cálculo da resolução empregando a largura do pico na linha de base e a meia altura, respectivamente. Um valor de resolução igual a 1,5 indica que o vale entre os picos quase toca a linha de base. Valores de resolução considerados minimamente aceitáveis para quantificação estão entre 1,75 a 2 [2,67,68].

$$(Eq. 4) \quad R_S = 2 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{b2} + w_{b1})$$

$$(Eq. 5) \quad R_S = 1,177 (t_{R2} - t_{R1}) / (w_{h2} + w_{h1})$$

O fator de assimetria (A_s) mede a simetria dos picos, ou possíveis distorções frontais e caudas, o que indica a qualidade da coluna. Conforme o tempo de uso, a coluna vai se deteriorando, e isso acarreta em distorções nos picos [69]. As medidas para o cálculo do fator de assimetria são realizadas a 10 % da altura de pico, conforme a equação 6 e a figura 11.

$$(Eq. 6) \quad A_s = b/a$$

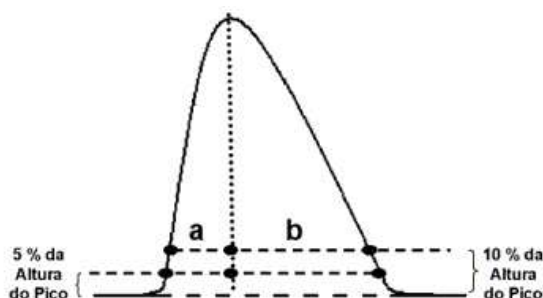


Figura 11 - Medidas relacionadas ao cálculo do fator de assimetria (A_s) [70].

O fator de retenção (k) indica o nível de interação do analito com a FE, em relação ao tempo que ele fica retido na mesma. É a razão entre o tempo de retenção do analito na FE, também chamado de tempo de retenção ajustado t_R' ($t_R - t_M$) e o t_M (tempo que o analito ficou na FM) [71].

$$(Eq. 7) \quad k = (t_R - t_M) / t_M$$

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo otimizar a preparação *in situ* (dentro de capilares) de monolitos baseados em sílica via síntese sol-gel, e recobri-los com polidimetilsiloxano (PDMS), usando tratamento térmico para sua imobilização no suporte monolítico, para uso como fase estacionária em CLC.

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

- Síntese do suporte monolítico baseado em sílica ou organo-sílica, com enfoque na obtenção de um preenchimento homogêneo e completo do capilar. Foram avaliados parâmetros como: quantidade de precursor de sílica, agente porogênico (polietilenoglicol), solvente e proporção do reagente metiltrimetóxisilano (MTMS).
- Recobrimento e imobilização térmica do PDMS sobre o suporte monolítico. Foram avaliados parâmetros como: tipo de suporte monolítico, massa molar e proporção de PDMS no solvente, tempo e temperatura na estufa.
- Caracterização das fases estacionárias com microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliação cromatográfica das fases estacionárias com mistura teste.

3. PARTE EXPERIMENTAL GERAL

3.1. MATERIAIS E REAGENTES

Hidróxido de sódio (1 mol/L) foi adquirido da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha); ácido acético glacial da Synth (Diadema, Brasil); ureia da Riedel-deHaën (Seelze, Alemanha); PEG MM 10000 da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha); TMOS (pureza $\geq 99\%$) da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha); MTMS 97% da Acrós Organics (Geel, Bélgica); diclorometano da Synth (Diadema, Brasil); PDMS MM 2000 e 6000 da Alfa Aesar (Ward Hill, USA); benzeno, tolueno, etilbenzeno, propilbenzeno, butilbenzeno e pentilbenzeno da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha); água deionizada proveniente de sistema Milli-Q filtro 0,22 μm da Millipore (Bedford, USA). Acetonitrila, n-hexano 95% e tolueno foram adquiridos da

Tedia (Fairfield, USA); metanol da AppliChem Panreac ITW Company (Barcelona, Espanha); capilares de sílica fundida recobertos com poliimida (com 200 μm de diâmetro interno e 360 μm de diâmetro externo) da Agilent Technologies (Waldbronn, Alemanha).

3.2. EQUIPAMENTOS

Cromatógrafo capilar a líquido Dionex UltiMate 3000 da Thermo Scientific, equipado com software Chromeleon v. 6.80SR14; microscópio de polarização série BA300 da Motic; microscópio eletrônico de varredura (*scanning electron microscopy* - SEM) modelo JSM-6360LV da Jeol; microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (*field emission scanning electron microscope* - FESEM) modelo Quanta 250 da FEI; balança analítica mod. A-250 da Fisher Scientific; agitador magnético mod. 752 da Fisatom; estufa à vácuo mod. LSDZF-6021 da LS Logen Scientific; bomba à vácuo mod. 1C da Vacuubrand; bomba-seringa mod. KDS-100 da kd Scientific; bomba HPLC mod. LC-10AD da Shimadzu; bomba peristáltica mod. 520 Bp da Watson Marlow; ultrassom com aquecimento mod. LSUC2-120-3,0 da Logen Scientific.

3.3. PRÉ-TRATAMENTO DOS CAPILARES DE SÍLICA FUNDIDA

Antes de serem preenchidos com a solução para formação do monolito, os capilares de sílica (200 μm d.i.) passaram por um pré-tratamento com NaOH para ativar os grupos silanóis de sua superfície interna, com o objetivo de promover a ligação química entre o capilar e o monolito.

Para cada metro de capilar, injetou-se 1,5 mL da solução de NaOH 1 mol/L com o auxílio de uma bomba-seringa. As extremidades do capilar foram vedadas com pedaços de borracha e o capilar foi aquecido a 95 °C por 2 horas. O excesso de NaOH foi lavado com água até alcançar valor de pH próximo de 7, e por fim, o capilar foi seco com fluxo de N_2 .

4. PREPARAÇÃO DO MONOLITO

4.1. PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1. Teste preliminar

Nesta etapa, as colunas foram representadas com a sigla TP (de Teste Preliminar) seguida pelo número da coluna. Para o preparo da coluna TP1, empregou-se um procedimento descrito previamente na literatura [72] para monolitos baseados em sílica: 900 mg de ureia e 850 mg de PEG foram dissolvidos em 10 mL de ácido acético (HAc) 0,01 mol/L por 10 minutos. Em seguida, 1 mL de TMOS foi adicionado. Após 5 minutos de agitação, o capilar pré-tratado foi preenchido utilizando bomba-seringa (figura 12). As extremidades do capilar foram fechadas com conectores de vidro (figura 13), em seguida, o frasco com o restante da solução e o capilar foram levados à estufa e aquecidos a 45 °C por 20 horas e a 120 °C por 2 horas.



Figura 12 - Bomba-seringa utilizada inicialmente para o preenchimento das colunas



Figura 13 - Coluna fechada com conector de vidro para passar por tratamento térmico

4.1.2. Otimizações nas condições de preparo

Para o preparo da coluna TP2, adicionou-se os mesmos reagentes e nas mesmas quantidades da etapa anterior. Porém, empregou-se um aquecimento gradual de 45 °C a 120 °C, e para isso, a temperatura foi aumentada manualmente numa taxa de 15 °C/h. Por fim, o tempo de secagem a 120 °C foi aumentado de 2 horas para 4 horas e meia.

Foi utilizado um planejamento experimental, com o objetivo de se obter a composição otimizada da solução inicial que proporcionasse um preenchimento completo e homogêneo dos capilares. As respostas do planejamento foram qualitativas e avaliadas através de microscopia eletrônica de varredura, com relação ao preenchimento do capilar e tipo de estrutura obtida dentro dos capilares.

Para isso, dissolveu-se 900 mg de ureia e PEG (conforme a tabela 2) em ácido acético 0,01 mol/L, empregando banho de gelo durante todo o processo. Após 10 minutos de agitação e dissolução completa dos reagentes, adicionou-se TMOS.

Um dos componentes principais para que ocorresse o processo sol-gel é o precursor, pois é ele que forma os esqueletos de sílica. Nesse trabalho, como foram utilizados capilares de 200 µm d.i., foi utilizada uma mistura de TMOS junto com MTMS, e também o TMOS puro como precursor. Essa combinação de precursores é descrita na literatura quando se empregam capilares com d.i. maiores que 100 µm, que apresentam problemas de encolhimentos e rachaduras com mais frequência.

Tabela 3 - Parâmetros e níveis testados

Parâmetros	Níveis	
	-	+
1. Ácido acético 0,01 mol/L (mL)	8	10
2. PEG (g)	0,5	1,2
3. Precursor TMOS+MTMS (mL)	4,5	1,0
4. Proporção MTMS no precursor (%)	10	25

Após mais 10 minutos de agitação, adicionou-se MTMS. A agitação foi mantida por 30 minutos e a solução do monolito foi inserida nos capilares de sílica

com 20 cm de comprimento, utilizando pressurização por de N_2 . As condições empregadas para cada coluna são descritas na tabela 3.

Para o enchimento das colunas, montou-se no laboratório um sistema empregando pressurização com N_2 , conforme o esquema da figura 14. Para isso, colocou-se a solução preparada para a formação do monolito em um frasco de vidro vedado com tampa de rosca e septo de silicone, sendo que neste septo se fez dois furos pequenos: um para inserir o capilar (até a sua extremidade inferior ficar submersa na solução), e outro para a mangueira conectada à linha de N_2 (que ficou posicionada fora da solução).

Para o processo de inserção da solução no capilar, abriu-se a válvula da linha de N_2 até o manômetro atingir a pressão de 0,6 bar, forçando o líquido a sair pela abertura do capilar que estava fora do frasco. Vedou-se a extremidade superior do capilar com um pedaço de borracha, de forma que ele pudesse ser retirado do frasco sem a perda do líquido, então vedou-se também a outra extremidade com pedaço de borracha (figura 15).

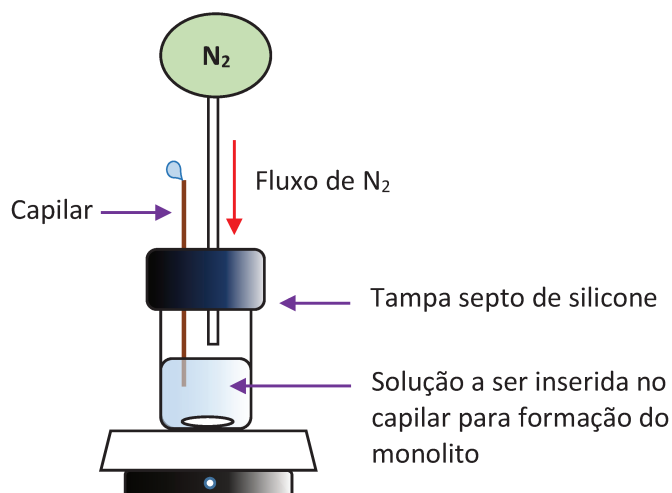


Figura 14 – Esquema do sistema de enchimento por pressurização com N_2 construído no laboratório

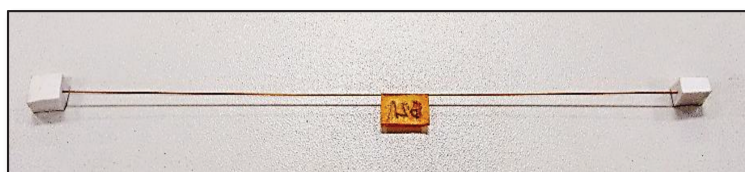


Figura 15 - Capilar vedado com borrachas

As colunas preparadas no planejamento experimental foram indicadas com a letra P no início, seguida das condições empregadas em cada nível, separadas por uma barra: a inicial de cada reagente e sua quantidade. Por exemplo: P-A08/P0,5/Pr4,5/M10 significa que foram empregados 8 mL de ácido acético, 0,5 g de PEG, 4,5 mL de precursor e 10% de MTMS no precursor.

Tabela 4 – Parâmetros testados em cada coluna: 1. Quantidade de ácido acético, 2. PEG, 3. Precursor TMOS+MTMS e 4. Proporção de MTMS no precursor. Os sinais de + e – indicam qual o valor de cada parâmetro, conforme a tabela 2.

Colunas	Parâmetros			
	1	2	3	4
P-A08/P0,5/Pr4,5/M10	-	-	-	-
P-A10/P0,5/Pr4,5/M10	+	-	-	-
P-A08/P1,2/Pr4,5/M10	-	+	-	-
P-A10/P1,2/Pr4,5/M10	+	+	-	-
P-A08/P0,5/Pr1,0/M10	-	-	+	-
P-A10/P0,5/Pr1,0/M10	+	-	+	-
P-A08/P1,2/Pr1,0/M10	-	+	+	-
P-A10/P1,2/Pr1,0/M10	+	+	+	-
P-A08/P0,5/Pr4,5/M25	-	-	-	+
P-A10/P0,5/Pr4,5/M25	+	-	-	+
P-A08/P1,2/Pr4,5/M25	-	+	-	+
P-A10/P1,2/Pr4,5/M25	+	+	-	+
P-A08/P0,5/Pr1,0/M25	-	-	+	+
P-A10/P0,5/Pr1,0/M25	+	-	+	+
P-A08/P1,2/Pr1,0/M25	-	+	+	+
P-A10/P1,2/Pr1,0/M25	+	+	+	+

** A=Ácido acético, P=PEG, Pr=Precursor e M=MTMS*

Realizou-se um tratamento térmico colocando os capilares em estufa, empregando as seguintes etapas de aquecimento: Deixou-se as colunas a 43 °C por 20 horas, aumentou-se a temperatura a 60 °C e deixou-se por 1 hora. Depois aumentou-se 15 °C/h até atingir a temperatura de 90 °C; e 5 °C/h até a temperatura de 105 °C. Por fim, aumentou-se a 120 °C e deixou-se por 4 horas.

Depois da etapa de tratamento térmico, as colunas passaram por um processo de lavagem com água por 6 horas e secagem com N₂. O processo de lavagem e secagem foi necessário para retirar os resíduos adjacentes nos poros do monolito. Esse processo é de extrema importância pois, se não for realizado adequadamente, podem se acumular resíduos no detector do cromatógrafo, danificando o equipamento.

4.1.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM)

Foram cortadas pequenas porções (de aproximadamente 5 mm de comprimento) na seção transversal das colunas, com o auxílio de um cortador de cerâmica. Estas foram coladas a um porta amostra do tipo fratura através de uma fita dupla face de carbono e fixadas com uma fita de cobre. As amostras foram analisadas no equipamento SEM JEOL 6360LV com metalização 10 nm Au/Pd.

4.1.4. Testes com as condições otimizadas de preparo e composição dos monolitos

Os seguintes testes foram realizados de forma a avaliar melhor alguns parâmetros específicos a partir das condições otimizadas.

4.1.4.1. Repetitividade

Foram feitas duas repetições da coluna P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 com a finalidade de verificar a repetitividade das condições otimizadas: As colunas P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 B e C (pois essa foi a condição que apresentou melhor preenchimento do capilar).

4.1.4.2. Concentração de PEG, ureia e ausência de MTMS como coprecursor

Esses testes foram realizados com o objetivo de verificar como a variação na quantidade de alguns reagentes afetariam a morfologia da estrutura formada e preenchimento do capilar (tabela 4). Nesta etapa do trabalho, as colunas foram identificadas com as letras CO no início (de Condições Otimizadas), seguida das

iniciais e quantidades empregadas de cada reagente (separados por uma barra), na seguinte ordem: ureia, PEG, TMOS, MTMS e ácido acético. Portanto, CO-U180/P80/T810/M90 significa que se empregou 180 mg de ureia, 80 mg de PEG, 810 µL de TMOS, 90 µL de MTMS.

As quantidades dos reagentes utilizados anteriormente foram reduzidas 5 vezes para evitar o gasto excessivo dos mesmos, mas sempre respeitando a proporção previamente utilizada.

Da primeira a última coluna, a proporção de PEG foi aumentada. Na coluna CO-**U100/P100**/T810/M90, a proporção ureia/PEG utilizada foi 1:1 e na coluna CO-U180/P100/T900/**M00** não foi adicionado o MTMS como precursor. As demais etapas de preparo foram iguais às utilizadas anteriormente.

Tabela 5 - Condições empregadas nas colunas variando a concentração de PEG, ureia e MTMS.

Coluna	Ureia (mg)	PEG (mg)	TMOS (µL)	MTMS (µL)
CO-U180/P80/T810/M90	180	80	810	90
CO-U100/P100/T810/M90	100	100	810	90
CO-U180/P100/T900/M00	180	100	900	0
CO-U180/P120/T810/M90	180	120	810	90
CO-U180/P140/T810/M90	180	140	810	90

** U=Ureia, P=PEG, T=TMOS e M=MTMS*

4.1.4.3. Menor quantidade de solvente e tempo de secagem

Foram testadas também condições para verificar a influência da quantidade de solvente e tempo de secagem a 120 °C, empregando uma composição diferente da testada anteriormente: com e sem MTMS e uma menor quantidade de ureia. As condições foram as descritas na tabela 5:

Tabela 6 - Condições empregadas nas colunas para analisar a influência da quantidade de solvente.

Coluna	Ureia (mg)	PEG (mg)	TMOS (μL)	MTMS (μL)	HAc (mL)
CO-U120/P120/T800/M00/A1,6	120	120	800	0	1,6
CO-U120/P120/T720/M80/A1,6	120	120	720	80	1,6
CO-U100/P100/T720/M80/A2	100	100	720	80	2

** U=Ureia, P=PEG, T=TMOS, M=MTMS e A=Ácido Acético*

As demais etapas de preparo foram iguais às utilizadas anteriormente, com exceção do tempo de secagem a 120 °C. Cada tipo de coluna foi preparado duas vezes, seguindo as seguintes condições: Colunas A – 2 horas a 120 °C. Colunas B – 4 horas a 120 °C.

4.1.4.4. Menor d.i. do capilar

De acordo com a literatura [73], a utilização de colunas capilares de sílica com menor d.i. (50, 75 e 100 μ m) produziriam melhores resultados, minimizando os encolhimentos. Dessa forma, foram testadas três diferentes misturas empregando colunas com d.i. de 100 μ m, com o objetivo de verificar se realmente é conseguido um melhor preenchimento. Foram testadas diferentes quantidades de solvente e proporção de ureia/PEG, além da adição ou não de MTMS como precursor. As condições foram as descritas na tabela 6:

Tabela 7 - Condições empregadas nas colunas com as condições otimizadas em capilares de 100 μ m d.i.

Coluna	Ureia (mg)	PEG (mg)	TMOS (μL)	MTMS (μL)	HAc (mL)
CO-U120/P120/T800/M00/A1,6-100	120	120	800	0	1,6
CO-U180/P100/T800/M00/A1,6-100	180	100	800	0	2
CO-U180/P100/T720/M80/A2-100	180	100	720	80	2

As demais etapas de preparo foram iguais as utilizadas anteriormente.

4.1.4.5. Maior quantidade de PEG e menor temperatura de gelificação

Testou-se uma composição de monolito baseada em um trabalho prévio da literatura [35], para a obtenção de um menor tamanho de domínio, utilizando uma quantidade maior de PEG e menor temperatura de gelificação, com o objetivo de verificar se as condições de preparo otimizadas eram efetivas para evitar a ocorrência de encolhimentos em diferentes composições e morfologias monolíticas.

Para a coluna CO-U180/P256/T800/M00/A2 foram utilizadas as mesmas condições de preparo anteriores, mas com a seguinte composição: 180 mg de ureia, 2 mL de HAc 0,01 mol/L; 256 mg de PEG e 800 μ L de TMOS. A temperatura de gelificação empregada foi de 30 °C e a rampa de aquecimento foi de 7,5 °C a cada 15 minutos, até 120 °C.

4.1.5. Caracterização do tamanho dos esqueletos de sílica e macroporos

Para a caracterização do tamanho dos esqueletos de sílica e macroporos, as amostras foram analisadas no equipamento FEI QUANTA 250 FESEM com metalização 10 nm Au/Pd. O modo de preparo de amostra foi o mesmo descrito no item 4.1.3.1.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.2.1. Teste preliminar

Inicialmente foi avaliado um procedimento descrito na literatura para a síntese do monolito dentro do capilar. Após o preenchimento dos capilares, estes foram avaliados através de técnicas de microscopia, com imagens *in situ*, para avaliação do preenchimento dos capilares e estrutura monolítica.

Com este procedimento observou-se um acúmulo de água sob o material de aspecto gelatinoso dentro do frasco do *bulk* aberto na estufa, com separação macroscópica de fases seguida de ebulição, juntamente com a expulsão do gel para fora do frasco. Isso pode ter sido causado pelo aumento de temperatura ao fim da etapa de gelificação (de 45 °C a 120 °C) sem uma rampa intermediária de aquecimento. Além disso, não foi observada a formação de estrutura monolítica no

interior do capilar, o que é indicado pelas áreas mais claras, que são áreas vazias dentro do capilar (Figura 16).



Figura 16 – Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal da coluna TP1.

4.2.2. Otimizações nas condições de preparo

Como o monolito não foi adequadamente formado dentro do capilar, as condições de preparo foram otimizadas. O tempo de agitação após a adição do TMOS foi aumentado para 20 minutos, a fim de permitir uma maior homogeneização do meio reacional. Foi implementado um aumento de temperatura mais gradual, de 15 °C/h, após a etapa de gelificação. Como resultado, não foi mais observada a ebulição do solvente com expulsão da amostra do frasco. Um maior tempo de secagem foi empregado a fim de promover uma secagem mais adequada para a quantidade de solvente utilizada. Como resultado, a amostra do frasco deixou de ter aspecto gelatinoso e passou a ter aspecto seco.

Entretanto, ao observar o capilar no microscópio óptico, verificou-se que o mesmo não ficou bem preenchido, com um acúmulo de material na sua parte inferior (parte debaixo quando posicionado na estufa), conforme pode ser observado pela área mais clara (vazia) na parte superior do capilar (figura 17).

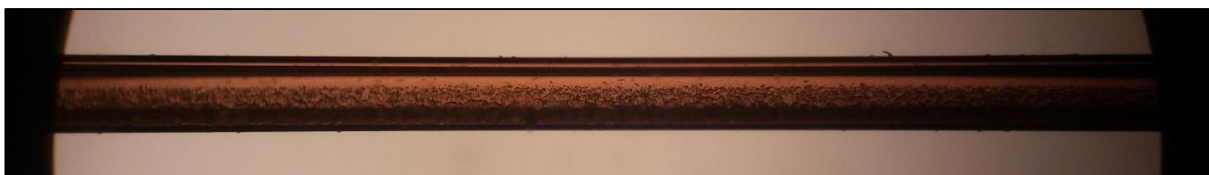


Figura 17 - Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 40x) de uma seção longitudinal da coluna TP2.

A partir desta etapa, empregou-se banho de gelo durante toda a reação, com o objetivo de manter a temperatura constante, devido ao fato da reação de hidrólise ser exotérmica. Também se empregaram borrachas ao invés de conectores de vidro para fechar as extremidades dos capilares, que se mostraram efetivas para impedir o vazamento da solução do interior do capilar.

Através do microscópio óptico, verificou-se que na coluna P-A08/P0,5/Pr4,5/M10¹ a estrutura formada apresentou encolhimento radial, com algumas rachaduras e estrutura transparente. No processo de lavagem e secagem, a estrutura se desprendeu totalmente das paredes internas do capilar e foi expelida, o que é indicado pela área clara no interior de todo o capilar, mostrando que ele ficou vazio (figura 18). A única diferença entre as colunas P-A08/P0,5/Pr4,5/M10 e P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 (onde observou-se bom preenchimento do capilar) foi a quantidade de solvente empregada.



Figura 18 - Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal da coluna P-A08/P0,5/Pr4,5/M10, mostrando seu interior totalmente vazio.

Nas colunas P-A08/P1,2/Pr4,5/M10, P-A10/P1,2/Pr4,5/M10, P-A08/P0,5/Pr4,5/M25 e P-A08/P1,2/Pr4,5/M25 (figura 19) observou-se um padrão: estrutura com encolhimento radial e maciça dentro do capilar. Essa aparência é relacionada a maior quantidade de PEG (1,2 g) utilizada nas colunas P-A08/P1,2/Pr4,5/M10, P-A10/P1,2/Pr4,5/M10 e P-A08/P1,2/Pr4,5/M25. De acordo com a literatura, quanto maior a quantidade de PEG, menor o tamanho dos macroporos; neste caso, a quantidade de PEG atingiu um limite onde não houve formação de macroporos.

Para a coluna P-A08/P0,5/Pr4,5/M25, essa aparência é atribuída a quantidade de solvente utilizada (8 mL), já que esse foi o único parâmetro que a diferiu

¹ As colunas foram indicadas com a letra P no início (de Planejamento), seguida das condições empregadas em cada nível (separadas por uma barra): a inicial de cada reagente e sua quantidade A=Ácido acético, P=PEG, Pr=Precursor e M=MTMS.

da coluna P-A10/P0,5/Pr4,5/M25, que apresentou bom preenchimento do capilar e empregou 10 mL de solvente.

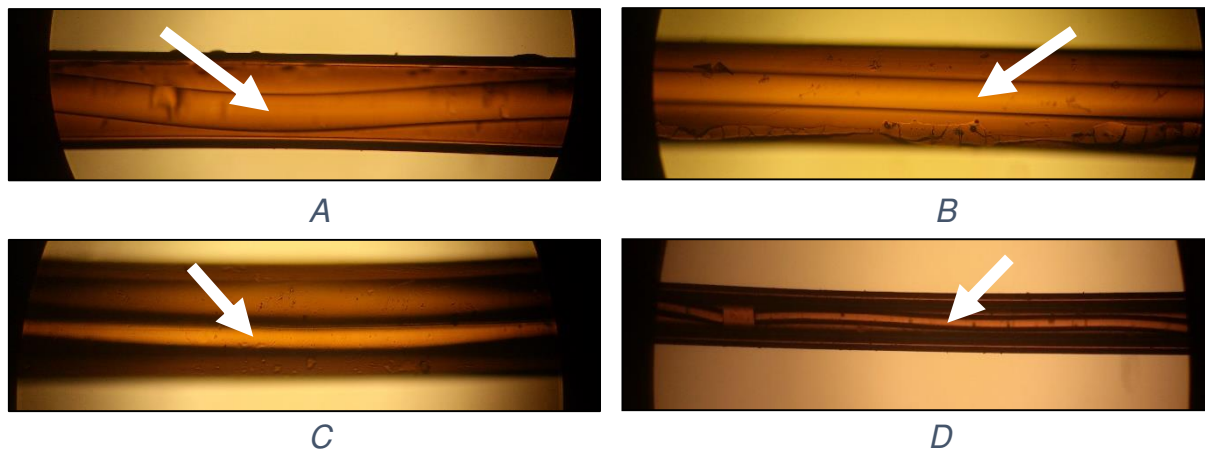


Figura 19 - Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal das colunas A) P-A08/P1,2/Pr4,5/M10, B) P-A10/P1,2/Pr4,5/M10, C) P-A08/P0,5/Pr4,5/M25 e D) P-A08/P1,2/Pr4,5/M25. As setas brancas destacam as estruturas encolhidas formadas dentro do capilar.

Através da análise por SEM foi possível verificar que as amostras das colunas P-A08/P0,5/Pr4,5/M10, P-A08/P1,2/Pr4,5/M10, P-A10/P1,2/Pr4,5/M10 e P-A08/P0,5/Pr4,5/M25 ficaram todas vazias. Isso ocorreu devido a encolhimento radial (em toda a circunferência externa do monolito), com perda da amostra de dentro do capilar durante a preparação para as microscopias (figura 20).

Para a coluna P-A08/P1,2/Pr4,5/M25, foi observada na microscopia a mesma estrutura observada no microscópio óptico para as colunas anteriores, com a formação de estrutura maciça e com encolhimento radial (figura 21). Para essa amostra específica, foi possível visualizar a estrutura através da microscopia, onde não ocorreu a perda de material de dentro do capilar.

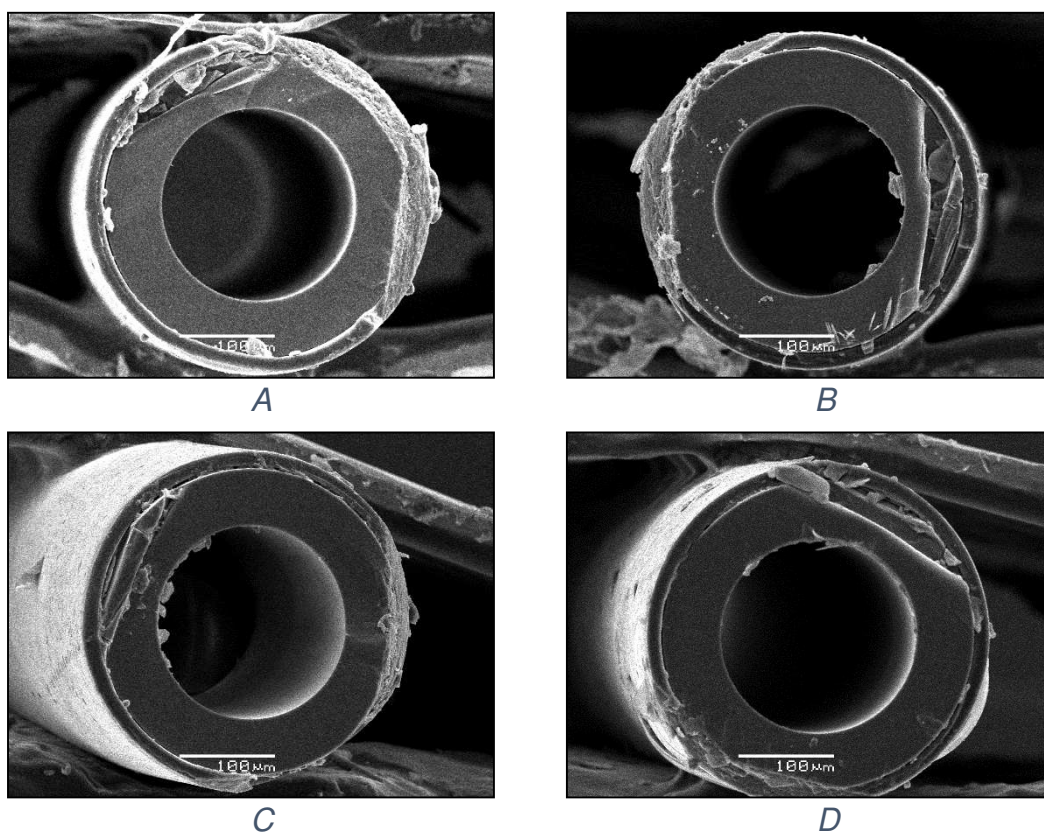


Figura 20 - A, B, C e D correspondem as microscopias das colunas P-A08/P0,5/Pr4,5/M10, P-A08/P1,2/Pr4,5/M10, P-A10/P1,2/Pr4,5/M10 e P-A08/P0,5/Pr4,5/M25 respectivamente (escala de 100 µm). Nas imagens é possível ver os capilares de sílica fundida vazios.

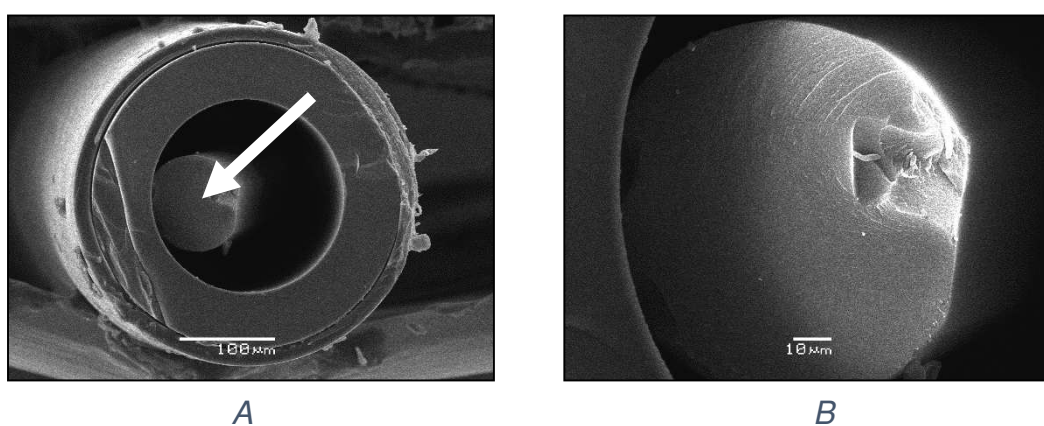


Figura 21 - Coluna P-A08/P1,2/Pr4,5/M25 A) escala de 100 µm e B) escala de 10 µm. A seta mostra a estrutura maciça e encolhida formada.

Nas colunas P-A08/P0,5/Pr1,0/M10, P-A10/P0,5/Pr1,0/M10, P-A08/P0,5/Pr1,0/M25 e P-A10/P0,5/Pr1,0/M25, observou-se outro padrão nos resultados: um acúmulo de material na parte inferior da coluna (parte de baixo do capilar quando colocado na estufa), como pode ser observado nas figuras 22 e 23.

Elas possuem em comum a mesma quantidade de PEG (0,5 g) e precursor (1 mL). Não houve bom preenchimento do capilar, devido a baixa quantidade de precursor adicionado. No microscópio óptico, somente a coluna P-A10/P0,5/Pr1,0/M25 apresentou cor escura e uniforme, sem áreas vazias (figura 22D).

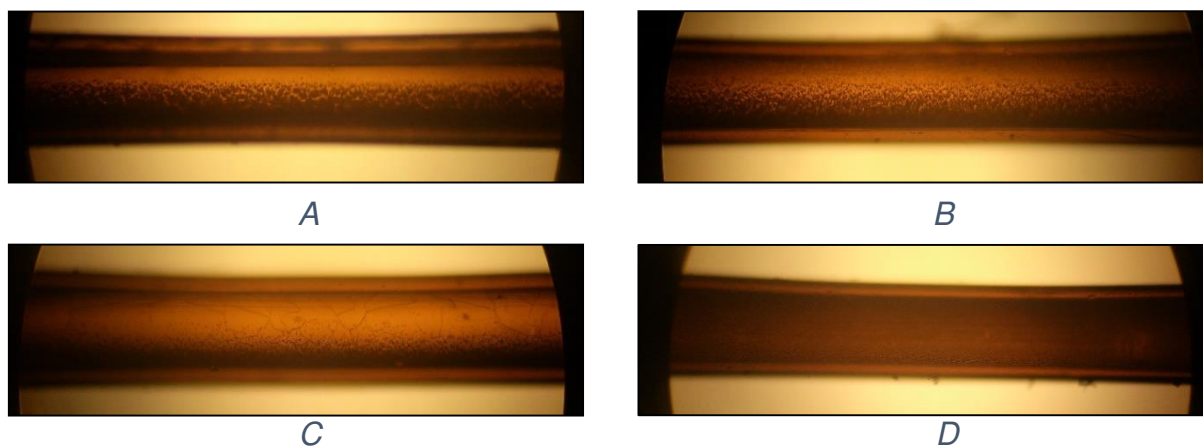


Figura 22 – Fotos tiradas do microscópio óptico (Aumento de 100x). A, B, C) e D) colunas P-A08/P0,5/Pr1,0/M10, P-A10/P0,5/Pr1,0/M10, P-A08/P0,5/Pr1,0/M25, e P-A10/P0,5/Pr1,0/M25 respectivamente.

Com as microscopias foi possível confirmar que essas colunas não formaram o esqueleto tridimensional característico em todo o interior do capilar, e o material se acumulou numa fina camada em sua parte inferior (figura 23). Todas elas tinham em comum a quantidade de precursor adicionada (1 mL). Nas figuras 24 E e F, pode-se observar os glóbulos formados no processo sol-gel que se acumularam no fundo do capilar.

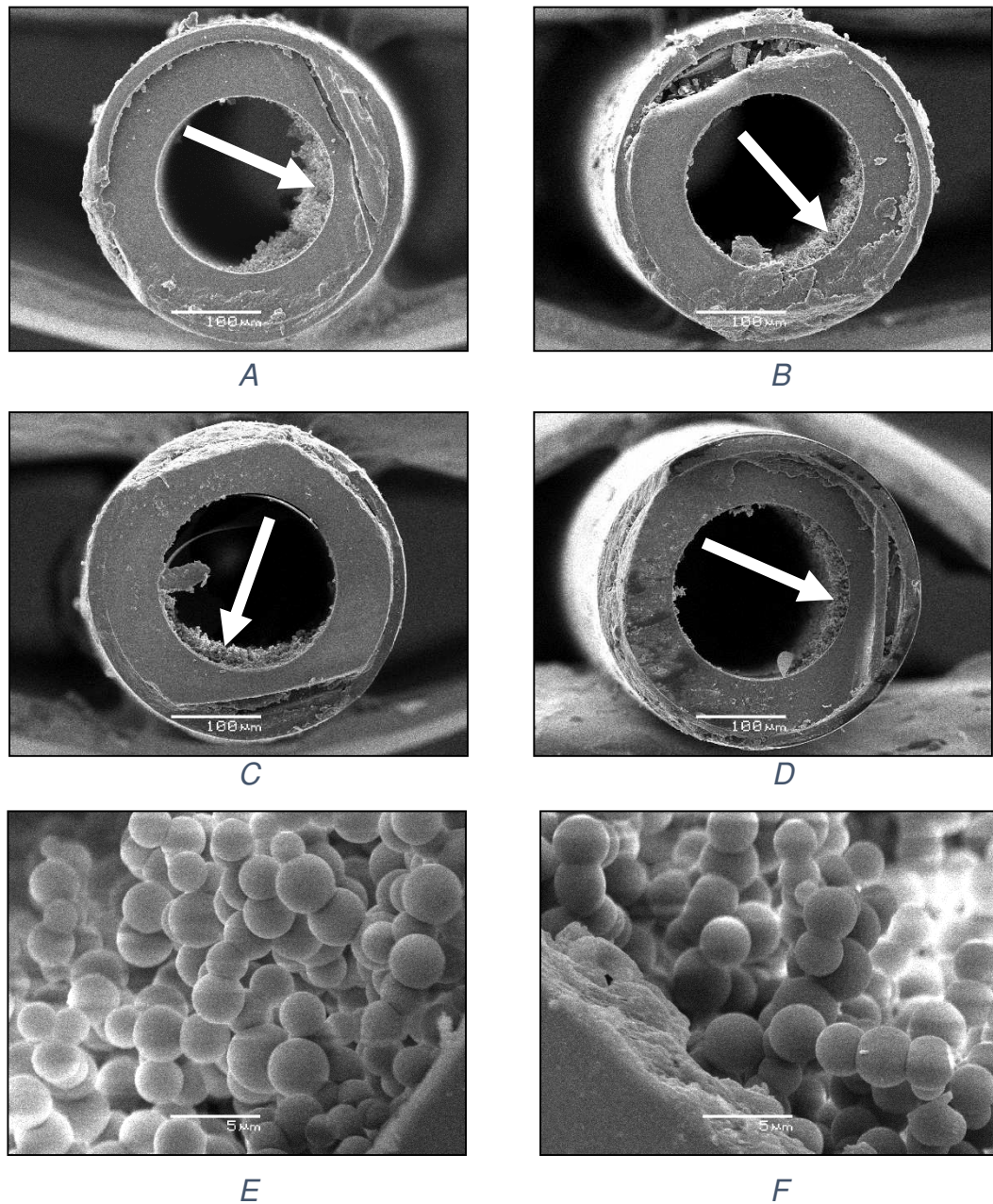


Figura 23 – Microscopias das colunas A) P-A08/P0,5/Pr1,0/M10, B) P-A10/P0,5/Pr1,0/M10, C) P-A08/P0,5/Pr1,0/M25 e D) P-A10/P0,5/Pr1,0/M25, onde as setas apontam para as estruturas que se acumularam no fundo do capilar (escala de 100 μm). Estruturas de glóbulos nas colunas E) P-A10/P0,5/Pr1,0/M10 e F) P-A08/P0,5/Pr1,0/M25 (escala de 5 μm).

O bom preenchimento dos capilares P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 e P-A10/P0,5/Pr4,5/M25 é verificado no microscópio óptico pela estrutura escura e sem espaços vazios (figura 24).

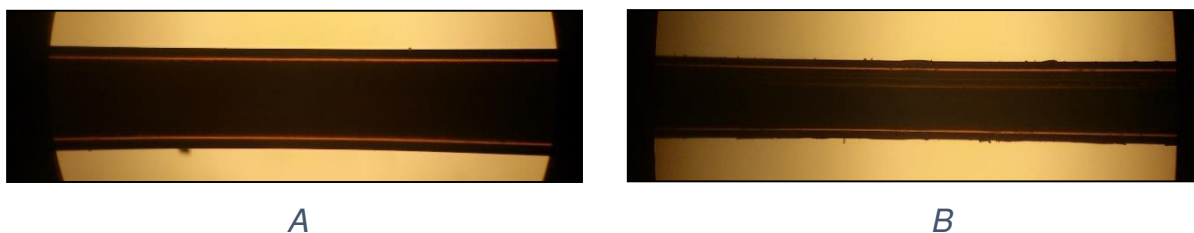


Figura 24 – Foto tirada do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal das colunas A) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 e B) P-A10/P0,5/Pr4,5/M25.

Com as microscopias também se verificou que as colunas P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 e P-A10/P0,5/Pr4,5/M25 (figura 25), foram as que apresentaram melhor preenchimento. Elas só diferiram na proporção de MTMS no precursor: 10 e 25% respectivamente. Esta variação fez com que elas apresentassem estruturas de domínios bem diferentes uma da outra. Com menor proporção de MTMS, as estruturas do monolito são esféricas e uniformes, enquanto que com maior proporção elas são mais irregulares. Porém, ambas as colunas apresentaram ligeiro encolhimento radial, conforme pode ser observado nas figuras 25 A e B.

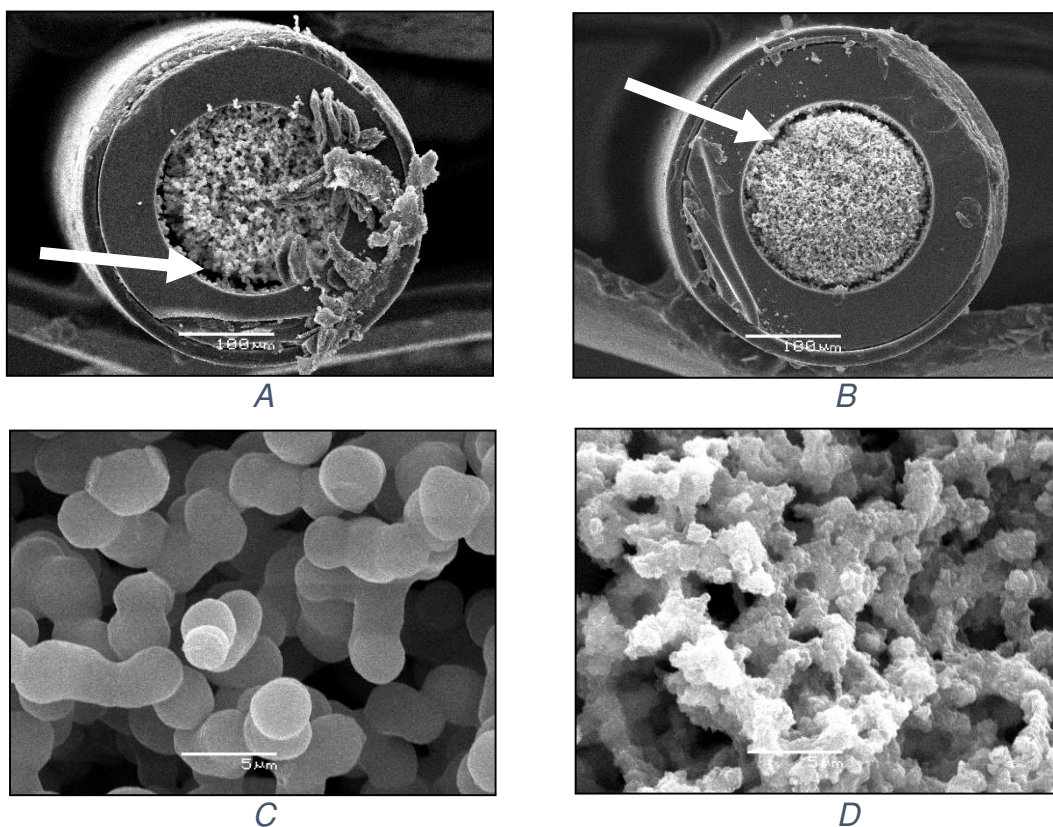


Figura 25 – Microscopias das colunas A) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 e B) P-A10/P0,5/Pr4,5/M25 (escala de 100 μm) e C) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 e D) P-A10/P0,5/Pr4,5/M25 (escala de 5 μm). A seta destaca o encolhimento radial.

As colunas P-A08/P1,2/Pr1,0/M10, P-A10/P1,2/Pr1,0/M10, P-A10/P1,2/Pr4,5/M25, P-A08/P1,2/Pr1,0/M25 e P-A10/P1,2/Pr1,0/M25 não foram preparadas, sendo que todas elas empregam 1,2 g de PEG. Com os resultados obtidos com as colunas P-A08/P1,2/Pr4,5/M10, P-A10/P1,2/Pr4,5/M10 e P-A08/P1,2/Pr4,5/M25, foi constatado que a quantidade de 1,2 gramas de PEG é muito alta e que não ocorre a formação de estrutura monolítica com a temperatura de gelificação utilizada.

4.2.4. Testes com as condições otimizadas de preparo e composição dos monolitos

4.2.4.1. Repetitividade

Com a melhor condição obtida anteriormente, foram feitas replicatas para avaliar a repetitividade do processo sol-gel no preparo dos monolitos e se obtinha-se um bom preenchimento do capilar em outras colunas com aquelas condições. A figura 26 mostra a diferença observada em relação ao encolhimento radial entre as colunas P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 B e C. Isso indica que o encolhimento radial pode variar de uma coluna para a outra, mesmo com as mesmas condições de preparo. Esse comportamento indica a limitada repetibilidade na preparação de colunas capilares monolíticas baseadas em sílica, sendo que este tipo de encolhimento foi observado em mais da metade das colunas preparadas.

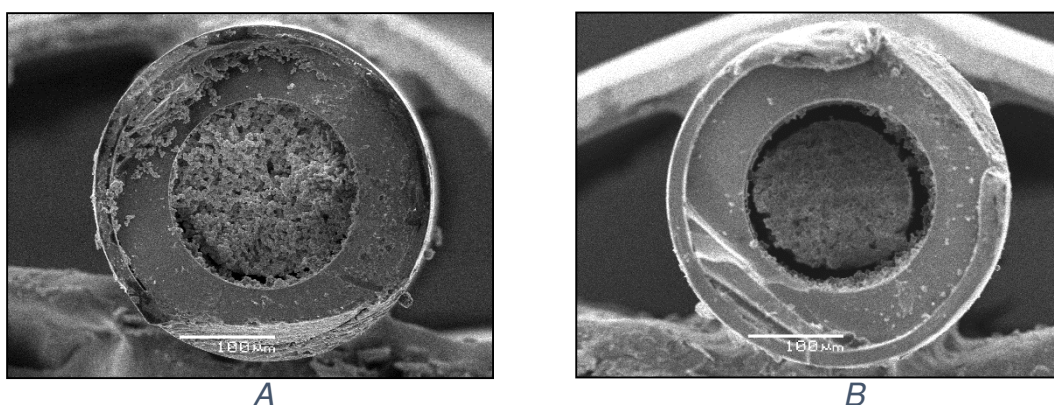


Figura 26 – Microscopias das colunas A) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 B e B) P-A10/P0,5/Pr4,5/M10 C (escala de 100 µm)

4.2.4.2. Concentração de PEG, ureia e ausência de MTMS como coprecursor

Com estes testes, esperava-se verificar se um aumento na quantidade de PEG diminuiria o tamanho dos macroporos; se a ausência do MTMS resultaria em mais encolhimento do monolito; e se uma proporção de ureia e PEG diferentes acarretariam em mudanças morfológicas, conforme informações obtidas na literatura [25,39,41]

Observando no microscópio óptico, a coluna CO-U180/P80/T810/M90² apresentou encolhimento por gravidade (o monolito se acumulou na parte inferior) devido a formação de um espaço vazio ao longo de todo o capilar, conforme pode ser visto na área mais clara; enquanto que a coluna CO-U100/P100/T810/M90 apresentou uma cor escura e uniforme ao longo do capilar, de acordo com a figura 27.

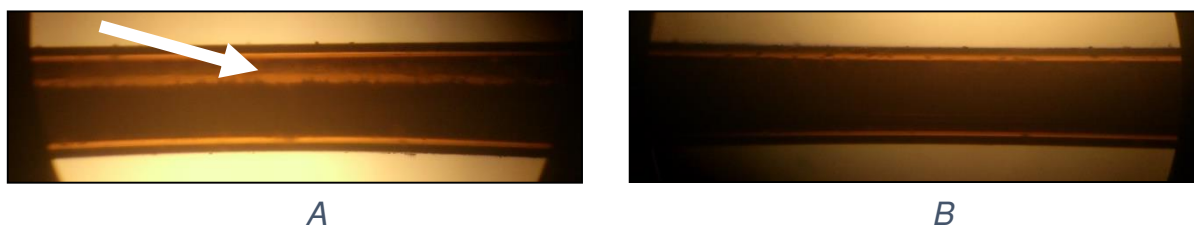


Figura 27 – Fotos tiradas do microscópio óptico (Aumento de 100x) de uma seção longitudinal das colunas A) CO-U180/P80/T810/M90: A seta branca mostra o espaço vazio relacionado ao encolhimento por gravidade, e B) CO-U100/P100/T810/M90.

Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura foi possível confirmar o encolhimento por gravidade devido à presença de espaço vazio, em ambas as colunas, sendo que na coluna CO-U180/P80/T810/M90 o espaço vazio foi maior (figura 28A). Na imagem do microscópio óptico, a coluna CO-U100/P100/T810/M90 aparece sem espaços vazios, levando a crer que estaria completamente preenchida, porém, isso não foi confirmado na microscopia. A explicação para esse resultado é o ângulo da coluna no momento em que a fotografia foi tirada no microscópio óptico, conforme está descrito na legenda da figura 28.

² Nesta etapa do trabalho, as colunas foram identificadas com as letras CO no início (de Condições Otimizadas), seguida das iniciais e quantidades empregadas de cada reagente (separados por uma barra), na seguinte ordem: U=Ureia, P=PEG, T=TMOS, M= MTMS e A=ácido acético

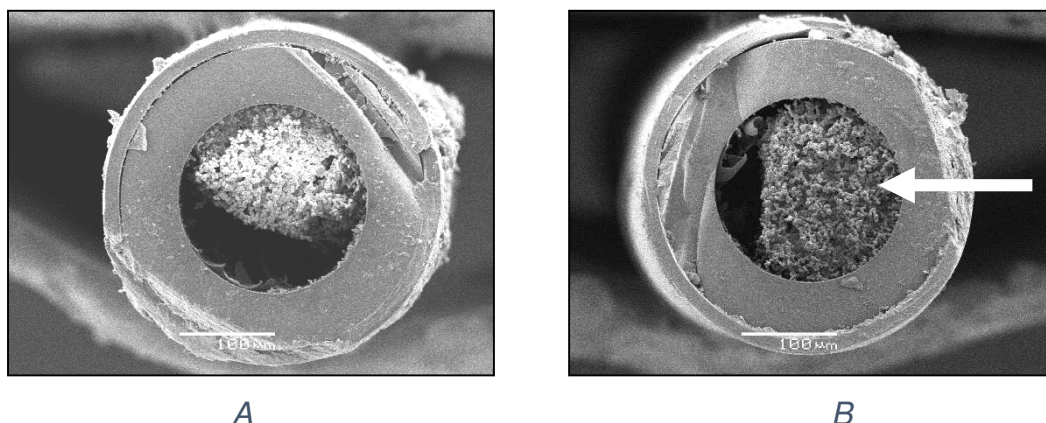


Figura 28 - Microscopias das colunas A) CO-U180/P80/T810/M90 e B) CO-U100/P100/T810/M90 (escala de 100 µm). A seta branca mostra o ângulo onde a coluna foi observada no microscópio óptico, impedindo a visualização do encolhimento. A diferença entre as duas colunas foram as quantidades de ureia e PEG.

As colunas CO-U180/P100/T900/M00, CO-U180/P120/T810/M90 e CO-U180/P140/T810/M90 apresentaram encolhimento radial (figura 29). Isso fez com que o material formado se posicionasse abaixo da superfície transversal da coluna no momento da microscopia (figuras 30A, C e E). Com uma maior aproximação, foi possível visualizar a estrutura formada nas colunas CO-U180/P100/T900/M00 e CO-U180/P120/T810/M90, conforme as figuras 30B e D.



Figura 29 - Foto tirada do microscópio óptico de uma seção longitudinal da coluna CO-U180/P100/T900/M00 (Aumento de 100x)

Ao final destes testes, verificou-se que podem ocorrer dois tipos de encolhimentos dos monolitos baseados em sílica formados dentro de capilares: radial e por ação da gravidade, independente da variação da quantidade de PEG, da proporção ureia/PEG e da presença ou não de MTMS como coprecursor. Não foi possível avaliar o motivo da ocorrência destes encolhimentos com esse tipo de análise visual.

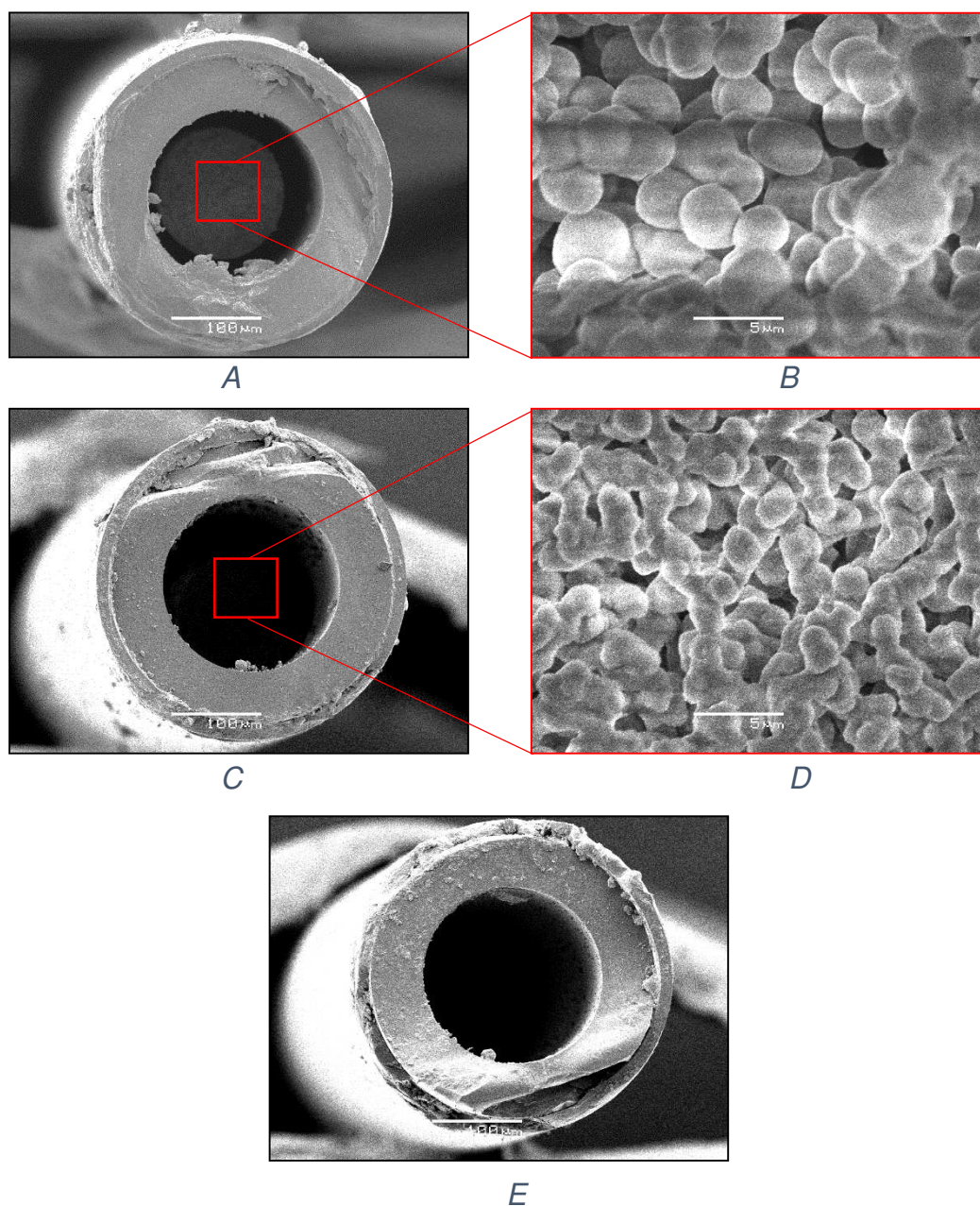


Figura 30 – Microscopias das colunas A) CO-U180/P100/T900/M00 (escala de 100 μm), B) (escala de 5 μm); C) CO-U180/P120/T810/M90 (escala de 100 μm), D) (escala de 5 μm) e E) CO-U180/P140/T810/M90 (escala de 100 μm).

4.2.4.3. Menor quantidade de solvente e tempo de secagem

Através das fotos tiradas no microscópio óptico, observou-se na coluna CO-U120/P120/T800/M00/A1,6 A (2 h a 120 °C) a cor escura e uniforme, que é indicativo da formação de estrutura monolítica com bom preenchimento do capilar (figura 31A). Já a coluna B (4 h a 120 °C) apresentou encolhimento radial, conforme pode ser observado pelas áreas mais claras na figura 31B, que são áreas vazias.

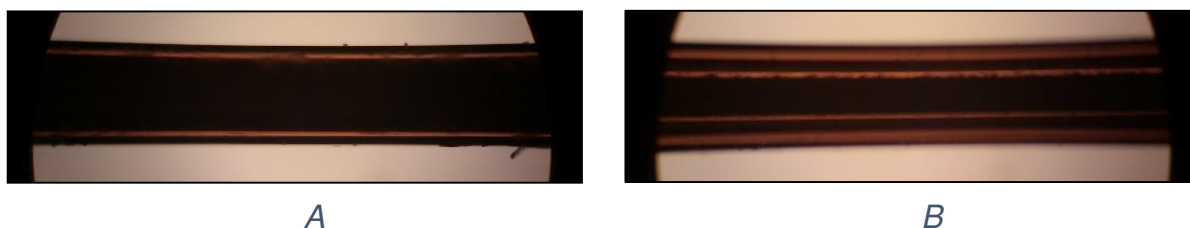


Figura 31 - Foto tirada do microscópio óptico de uma seção longitudinal da coluna A) CO-U120/P120/T800/M00/A1,6 A e B) CO-U120/P120/T800/M00/A1,6 B (Aumento de 100x).

Nas microscopias, a coluna CO-U120/P120/T800/M00/A1,6 A apresentou bom nível preenchimento, porém com encolhimento radial da estrutura monolítica (figura 32A). Houve formação de uma estrutura bem diferente das observadas anteriormente. Com uma maior aproximação (figuras 32B e C), foi possível ver uma rede tridimensional interconectada com um esqueleto fino de sílica e sem os glóbulos observados anteriormente. Essas características foram obtidas com a seguinte composição: HAc 1,6 mL, ureia 120 mg, PEG 120 mg, TMOS 800 μ L, com ausência de MTMS no meio reacional.

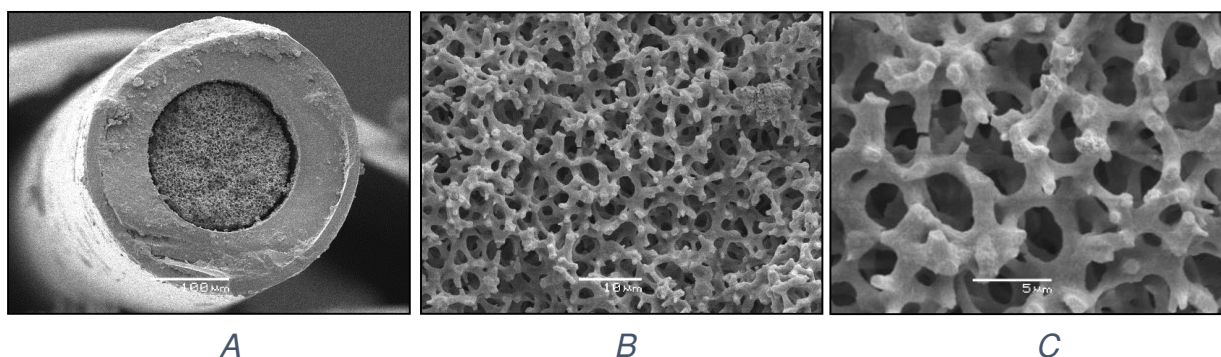


Figura 32 – Microscopias da coluna CO-U120/P120/T800/M00/A1,6 A. Escala de A) 100 μ m, B) 10 μ m e C) 5 μ m.

Em ambas as colunas CO-U120/P120/T720/M80/A1,6 A e B foi observado encolhimento radial (figuras 33A e B). Para as colunas CO-U100/P100/T720/M80/A2 A e B houve diferença na morfologia observada: enquanto a coluna CO-U100/P100/T720/M80/A2 A apresentou aparência úmida no seu centro assim que saiu da estufa (figura 33C), a coluna CO-U100/P100/T720/M80/A2 B ficou bem seca, mostrando que o tempo de 2 horas de secagem a 120°C não foi suficiente quando 2 mL de solvente são utilizados (figura 33 D).

Confirmando o que havia sido observado no microscópio óptico, a coluna CO-U120/P120/T720/M80/A1,6 A aparece vazia na microscopia (figura 34A) devido a perda de material de dentro da coluna, causada pelo encolhimento radial. A coluna CO-U100/P100/T720/M80/A2 B apresentou encolhimento por gravidade (figura 34B).

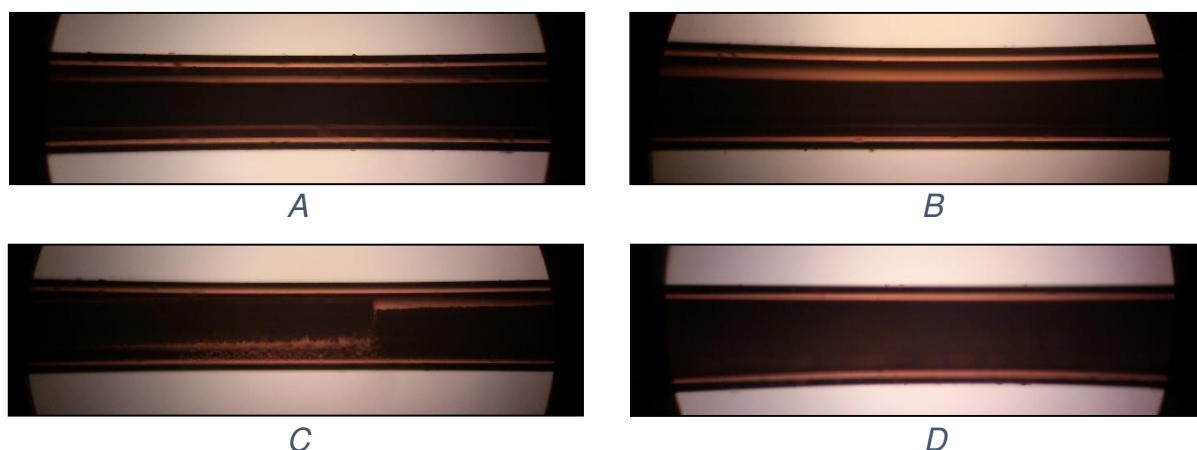


Figura 33 - Colunas A) CO-U120/P120/T720/M80/A1,6 A; B) CO-U120/P120/T720/M80/A1,6 B; C) CO-U100/P100/T720/M80/A2 A e D) CO-U100/P100/T720/M80/A2 B (Aumento de 100x)

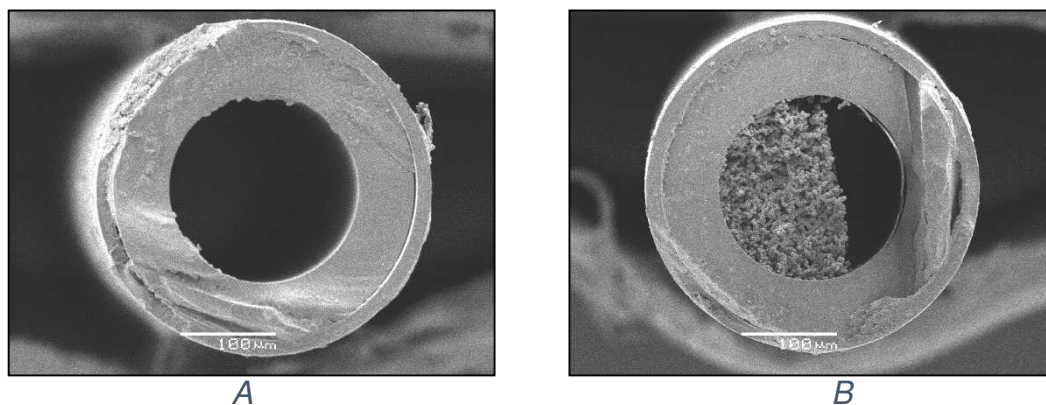


Figura 34 – Microscopias das colunas A) CO-U120/P120/T720/M80/A1,6 A e B) CO-U100/P100/T720/M80/A2 B (escala de 100 µm).

Com esses testes pôde-se observar que o tempo de aquecimento necessário para a temperatura de 120 °C depende da proporção de solvente empregada. Na coluna CO-U100/P100/T720/M80/A2 A, que empregou 1,6 mL de HAc 0,01 mol/L, 2 horas a 120°C foi o suficiente. Já para a coluna CO-U100/P100/T720/M80/A2 B, onde foram adicionados 2 mL de solvente, o tempo de 4

horas foi mais apropriado para permitir uma melhor secagem, conforme observou-se no microscópio óptico.

A avaliação das colunas foi prejudicada devido a presença de encolhimentos (radial e por ação da gravidade) nos monolitos. Esse comportamento mostra a baixa reprodutibilidade no processo de preparo deste tipo de coluna.

4.2.4.4. Menor d.i. do capilar

No microscópio óptico pôde ser observado que a coluna CO-U120/P120/T800/M00/A1,6-100 apresentou encolhimento radial (figura 35A), enquanto que as colunas CO-U180/P100/T800/M00/A1,6-100 (figuras 35B e C) e CO-U180/P100/T720/M80/A2-100 (figuras 35D e E) apresentaram encolhimento por gravidade. Em todas elas, foi utilizado capilar de 100 μm de d.i.

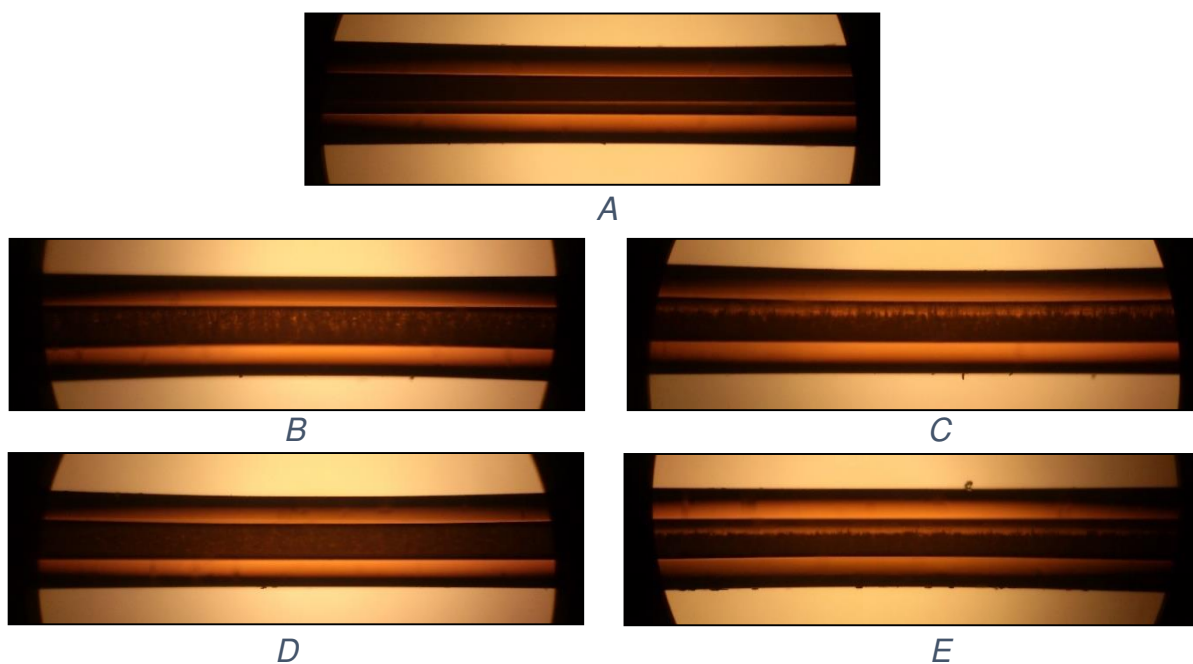


Figura 35 - Fotos tiradas no microscópio óptico (Aumento de 100x) das colunas A) CO-U120/P120/T800/M00/A1,6-100, B e C) CO-U180/P100/T800/M00/A1,6-100, D e E) CO-U180/P100/T720/M80/A2-100. As imagens C e E são as colunas que foram giradas 90° no sentido transversal em relação às figuras B e D, mostrando a área vazia na parte superior do capilar.

Esses resultados mostram que mesmo utilizando colunas com um diâmetro interno menor, ainda são observados encolhimentos de diferentes tipos. Portanto

escolheu-se continuar trabalhando com colunas de d.i. de 200 μm , pois essas colunas minimizam o alargamento de banda quando acopladas com o cromatógrafo capilar.

4.2.4.5. Maior quantidade de PEG e menor temperatura de gelificação (M3)

A coluna CO-U180/P256/T800/M00/A2 empregou a seguinte composição: 180 mg de ureia, 2 mL de HAc 0,01 mol/L, 256 mg de PEG e 800 μL de TMOS. A temperatura de gelificação foi de 30 $^{\circ}\text{C}$. Essa composição de monolito foi chamada de monolito 3 (M3). Observando essa coluna pela técnica de SEM, a morfologia foi completamente diferente das observadas anteriormente, com um menor tamanho de domínio, como esperado, macroporos menores e morfologia superficial irregular (figura 36). Confirmou-se que com uma maior quantidade de PEG e uma temperatura de gelificação mais baixa é possível obter domínios menores. Os resultados mostram um bom preenchimento do capilar, sem encolhimentos, utilizando uma maior quantidade de PEG na solução inicial.

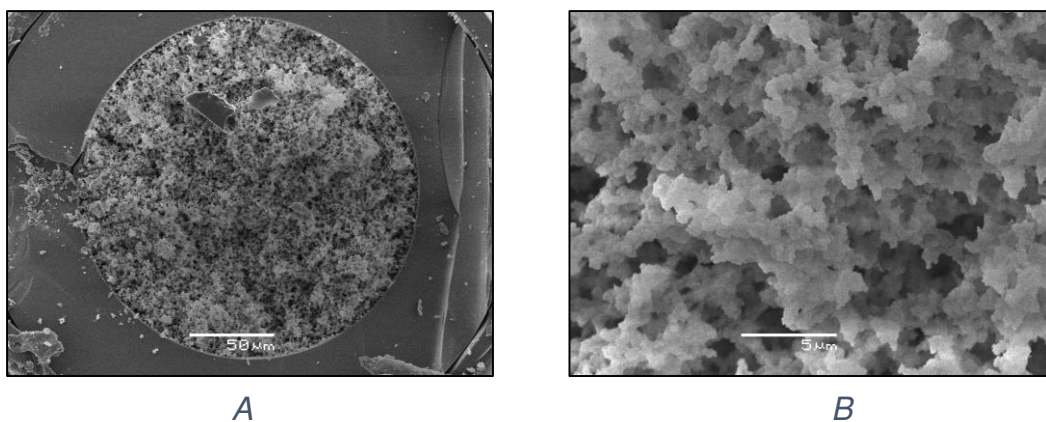


Figura 36 – Microscopia da coluna CO-U180/P256/T800/M00/A2 com menor tamanho de domínio. A) Escala de 50 μm e B) Escala de 5 μm .

Ao fim desta etapa de otimização na confecção dos monolitos de sílica, foi observado que uma das principais dificuldades encontradas foram os encolhimentos dos monolitos dentro dos capilares. Com o objetivo de evitar a ocorrência de encolhimentos por gravidade, as colunas foram mantidas na posição vertical a partir desta etapa, presas na parede da estufa durante o processo de gelificação e secagem do monolito.

4.2.5. Caracterização do tamanho dos esqueletos de sílica e macroporos

Foram realizadas medidas dos esqueletos de sílica e macroporos (domínios) empregando a técnica FESEM (que permite obter uma imagem com maior nível de aproximação em relação à SEM), para caracterização dos tamanhos das estruturas nos diferentes tipos de monolitos preparados. Para cada tipo de monolito foi obtida uma imagem com a medição dos esqueletos e uma imagem para a medição dos macroporos (figura 37). As medições foram realizadas com o auxílio do software do equipamento.

Os valores encontrados apresentam incertezas, devido ao fato de a microscopia ser realizada apenas em uma seção de um corte transversal da coluna, não sendo possível avaliar a coluna como um todo, por isso foram calculadas as médias das medições realizadas em cada microscopia. Os resultados são mostrados na tabela 7.

Tabela 8 – Médias das medidas dos esqueletos de sílica (E) e macroporos (M) (em μm) para cada tipo de monolito

Tipo de Monolito	Tamanho das estruturas em μm					
	M1		M2		M3	
	<i>E</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>M</i>
Média	2,0	7,4	3,8	13,3	0,9	2,3

O tamanho de domínio é a soma do tamanho do esqueleto de sílica mais o macroporo adjacente. O monolito 1 apresentou tamanho de domínio médio de 9,4 μm , o monolito 2 de 17,1 μm e o monolito 3 de 3,2 μm . Portanto, observou-se que os resultados foram bem diferentes, e a ordem crescente de tamanhos de domínios foi $M3 < M1 < M2$.

Quanto menor o tamanho do domínio da estrutura monolítica, maior a pressão de trabalho durante a separação cromatográfica. Além disso, espera-se que com domínios menores a eficiência seja maior devido à maior homogeneidade do leito, o que está relacionado com a redução de alargamento de banda devido à presença de caminhos múltiplos na FE. Ou seja, a permeabilidade e a eficiência da coluna são inversamente proporcionais ao tamanho do domínio [31].

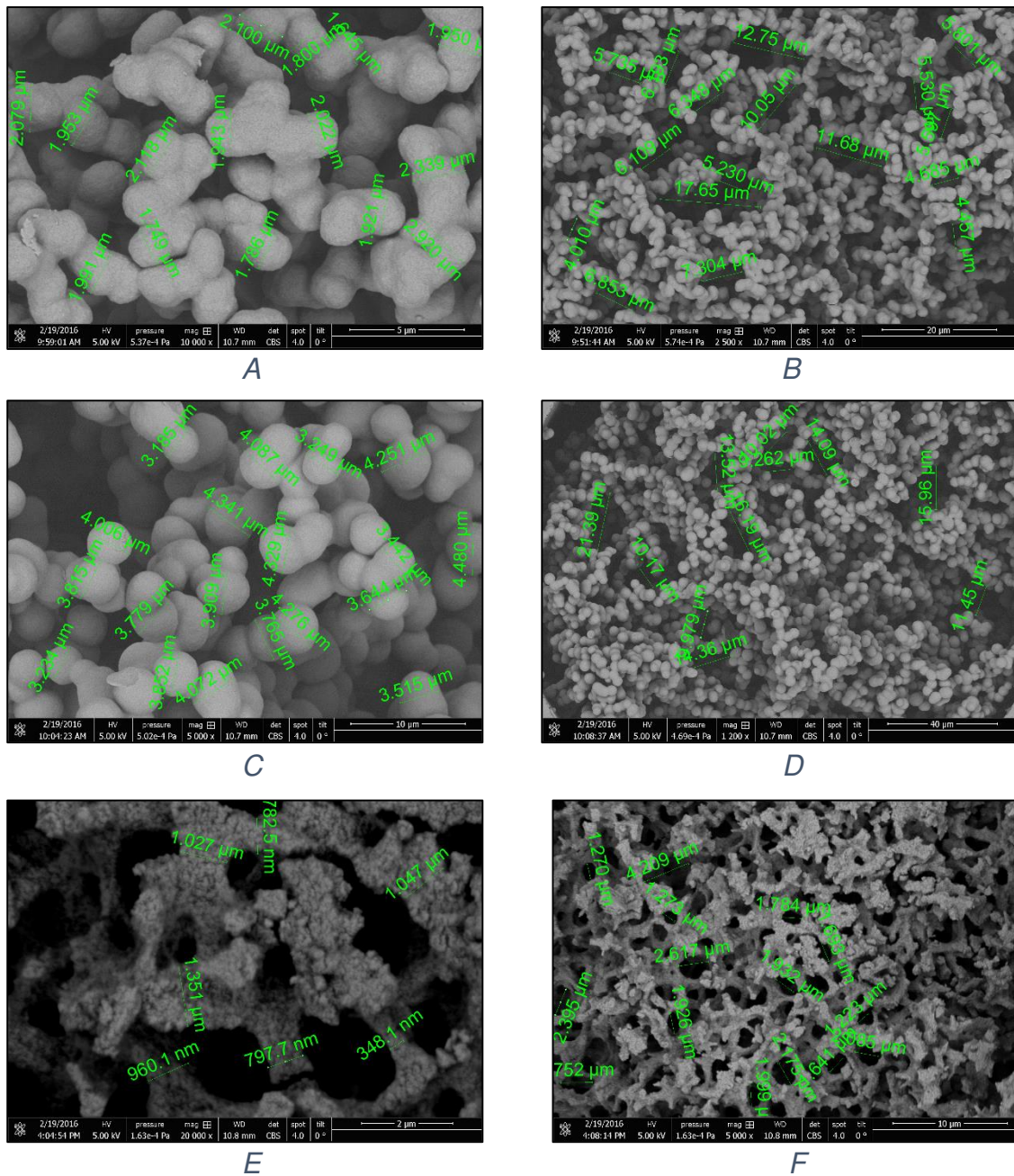


Figura 37 - Microscopias com as medidas: A) Esqueletos de sílica, M1 (escala de 5 μm), B) Macroporos, M1 (escala de 20 μm), C) Esqueletos de sílica, M2 (escala de 10 μm), D) Macroporos, M2 (escala de 40 μm), E) Esqueletos de sílica, M3 (escala de 2 μm), F) Macroporos, M3 (escala de 10 μm).

5. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE MONOLÍTICA ATRAVÉS DA IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DO POLIDIMETILSILOXANO

Até esta etapa do trabalho, as colunas capilares preparadas empregaram monolito de sílica ou organo-sílica nua, sem modificação da superfície. Nas próximas etapas, realizou-se a modificação da superfície monolítica com o polímero polidimetilsiloxano (PDMS) para aplicação da FE obtida em CLC no modo fase reversa. Como este é o primeiro trabalho que avalia o recobrimento dos monolitos de sílica com polímeros do tipo polissiloxanos para uso como fase estacionária em CLC, foi empregado o PDMS, que possui cadeias laterais mais curtas, do tipo C1, além de ser largamente empregado como fase estacionária para cromatografia gasosa.

Antes do recobrimento do PDMS sobre o suporte monolítico, foi realizado previamente um tratamento térmico do capilar contendo o monolito, a 150 °C por 24 horas em estufa para ativação da sílica, com a finalidade de remover toda a água que pudesse estar adsorvida na superfície monolítica através dos grupos silanóis, e deixá-los livres para que pudessem interagir com o polímero.

Na sequência, o monolito foi preenchido com a solução de PDMS e foi realizado o processo de autoimobilização do polímero no monolito. Esse processo ocorre devido ao contato entre a sílica e o polímero, sem nenhum tratamento específico, sendo isso suficiente para promover uma interação resultante da adsorção física das cadeias poliméricas sobre os poros da sílica [74]. A autoimobilização ocorre deixando a fase estacionária em repouso, por alguns dias ou até meses, em temperatura ambiente, após o recobrimento do polímero na superfície do monolito.

Com o aquecimento da fase estacionária, etapa denominada de imobilização térmica, a intensidade da interação entre o polímero e o suporte aumenta. Além disso, o tratamento térmico acelera a distribuição e rearranjo do polímero sobre a sílica, sendo que podem ocorrer ligações intercadeia ou ligações químicas diretamente sobre o suporte [75].

Após a etapa de imobilização, nem todo o PDMS que foi adicionado inicialmente é adsorvido na superfície monolítica. Esta quantidade não imobilizada deve ser removida antes da caracterização cromatográfica para evitar problemas de entupimento e contaminação da cela de detecção. Além disso, esse processo otimiza o condicionamento da coluna antes de seu uso e melhora a performance

cromatográfica através da obtenção de uma camada polimérica mais fina, permitindo transferência de massa mais rápida entre o soluto e a FM e FE.

Nos estudos de imobilização de polímeros realizados previamente com sílica particulada, é descrito que o tipo de sílica influencia a adsorção polimérica devido a disponibilidade de grupos silanóis; também é descrito que a massa molar e a proporção de polímero no solvente afetam o processo de adsorção polimérica; além disso, aumentando o tempo e a temperatura empregados na imobilização térmica, a espessura da camada polimérica também aumenta [56,74]. Devido a isso, esses parâmetros foram escolhidos para serem avaliados neste trabalho.

5.1. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

5.1.1. Sínteses das fases estacionárias

5.1.1.1. Síntese dos suportes monolíticos

Dois tipos diferentes de suportes monolíticos foram avaliados: baseado em sílica pura (M1) e baseado em um híbrido organo-inorgânico (M2), com grupos metila em sua estrutura.

5.1.1.1.1. Suporte monolítico 1 (M1) – baseado em sílica pura

As condições utilizadas no preparo do suporte monolítico 1 foram baseadas em trabalhos anteriores da literatura [39,76]. Essa composição havia sido testada previamente no grupo de pesquisa, porém não havia apresentado bons resultados sem as otimizações adotadas neste trabalho.

Uma solução com 180 mg de ureia e 2 mL de ácido acético 0,01 mol/L foi preparada. A esta solução adicionou-se 180 mg de PEG, sob agitação e em banho de gelo durante todo o processo. Após 10 minutos, adicionou-se 800 µL de TMOS. A solução foi mantida sob agitação por 30 minutos, e inserida nos capilares de sílica pré-tratados com 20 cm de comprimento, através de pressurização com N₂, empregando uma pressão de 0,6 bar.

As extremidades dos capilares preenchidos foram vedadas com borrachas e os capilares foram deixados na estufa a 43 °C por 20 horas. Aumentou-se a

temperatura até 45 °C, e depois até 120 °C, com incrementos de 7,5 °C a cada 15 minutos. Por fim, deixou-se na temperatura de 120 °C por 4 horas. Após o tratamento térmico, os monolitos formados dentro dos capilares foram lavados com água por 6 horas, utilizando uma bomba peristáltica, e secos com N₂.

5.1.1.1.2. Suporte monolítico 2 (M2) baseado em híbrido orgânico-inorgânico

As condições empregadas para o preparo do monolito 2 foram as mesmas obtidas anteriormente neste trabalho, com a coluna P-A10/P0,5/Pr4,5/M10. Dissolveu-se 180 mg de ureia em 2 mL de ácido acético 0,01 mol/L. A esta solução adicionou-se 100 mg de PEG, sob agitação e em banho de gelo durante todo o processo. Após 10 minutos, adicionou-se 810 µL de TMOS. Depois de mais 10 minutos de agitação, adicionou-se 90 µL de MTMS. Após 30 minutos de agitação, os capilares de sílica pré-tratados foram preenchidos através do sistema de pressurização com N₂. As etapas seguintes são as mesmas utilizadas na preparação do monolito 1.

5.1.1.2. Avaliação dos parâmetros: tipo de suporte monolítico, massa molar e proporção de PDMS no solvente

Os capilares já preenchidos com os monolitos de sílica pura (M1) e híbrido orgânico-inorgânico (M2) passaram por um tratamento térmico a 150 °C por 24 horas em estufa para ativação da sílica. Logo em seguida, uma solução com proporção definida de hexano e PDMS foi preparada misturando os dois reagentes por 10 minutos com agitador magnético, e esta foi introduzida nas colunas com bomba peristáltica devido à viscosidade da solução. As proporções de polímero, massa molar e tipo de monolito empregado em cada coluna são descritas na tabela 8.

Tabela 9 - Condições empregadas variando o tipo de suporte monolítico, proporção e massa molar de PDMS. Cada coluna foi simbolizada com uma sigla referente a sua composição.

Proporção de PDMS (v/v)	Monolito 1		Monolito 2	
	MM 2000	MM 6000	MM 2000	MM 6000
10%	M1-2-10	M1-6-10	M2-2-10	M2-6-10
30%	M1-2-30	M1-6-30	M2-2-30	M2-6-30
50%	M1-2-50	M1-6-50	M2-2-50	M2-6-50

Os capilares foram vedados com borrachas e ficaram repousando por 3 dias a temperatura ambiente para que ocorresse o processo chamado “autoimobilização” do polímero sobre o suporte de sílica.

As borrachas foram então retiradas das extremidades dos capilares, para permitir a evaporação do solvente. Após mais 1 dia de repouso sem as borrachas, foi realizada a imobilização térmica do polímero. Como nenhum estudo foi feito para otimizar o tempo de autoimobilização nas colunas monolíticas, baseou-se no período utilizado para as colunas convencionais particuladas.

Após a etapa de autoimobilização do PDMS no monolito, os materiais foram submetidos ao procedimento de imobilização por tratamento térmico utilizando estufa. Inicialmente, as condições empregadas foram: 24 horas a 100 °C, seguido por 4 horas a 120 °C.

Para a extração do excesso de polímero, as colunas foram conectadas a uma bomba tipo peristáltica e lavadas com hexano por 6 horas, na sequência, as colunas foram lavadas com MeOH por 3 horas e condicionadas com FM.

5.1.1.3. Estudo das condições empregadas na imobilização térmica do PDMS – tempo e temperatura

Utilizando as melhores condições obtidas na etapa anterior, uma solução de 50% (v/v) de PDMS (MM 6000 g/mol) em hexano foi inserida nos capilares preenchidos com o M1 (previamente tratados a 150 °C por 24 horas), através de uma bomba peristáltica. Os capilares foram vedados com borrachas e ficaram repousando por aproximadamente 6 horas a temperatura ambiente. Após desse período, as borrachas foram retiradas para evaporação do solvente e os capilares ficaram repousando por mais 4 dias para o processo de autoimobilização do PDMS na superfície da sílica. Em relação à etapa anterior, o período de repouso sem as borrachas foi aumentado em 3 dias.

Os capilares foram colocados em estufa para a realização do tratamento térmico e imobilização do PDMS. As condições testadas foram as descritas na tabela 9:

Tabela 10 - Condições empregadas no tratamento térmico em duas etapas, variando tempo e temperatura. As colunas são identificadas com códigos referentes às condições utilizadas.

1ª etapa			2ª etapa	
Coluna	T (°C)	t (h)	T (°C)	t (h)
2-T120/t04	100	24	120	4
2-T120/t16	100	24	120	16
1-T120/t16			120	16
2-T150/t04	100	24	150	4
2-T150/t16	100	24	150	16
1-T150/t16			150	16

Foi testado o tratamento térmico empregando uma ou duas etapas. Com e sem uma etapa prévia a 100 °C por 24 horas (chamada de imobilização por adsorção, onde ocorre a adsorção e rearranjo do polímero nos poros do monolito) e em todas as colunas foi empregada uma etapa a uma temperatura mais elevada, conforme a tabela 9 (onde podem ocorrer quebra de ligações do polímero e formação de ligações com o suporte) [75].

Após o tratamento térmico, realizou-se a extração do PDMS e condicionamento com FM, como descrito na etapa anterior.

5.1.2. Caracterização

5.1.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM)

O preparo de amostra foi o mesmo descrito para o item 4.1.3.1. As amostras foram analisadas no equipamento FEI QUANTA 250 FESEM com metalização 10 nm Au/Pd.

5.1.2.2. Avaliação cromatográfica

As conexões do equipamento foram de 20 µm d.i., modo de injeção parcial, com loop de 1 µL e agulha de 2,4 µL. A seringa de injeção foi de 25 µL, empregando

como solvente de lavagem uma solução de isopropanol:água 10:90. O volume de injeção foi 50 nL.

As colunas foram avaliadas cromatograficamente utilizando uma mistura teste de seis alquilbenzenos: 1) Benzeno (2 mg/mL), 2) Tolueno, 3) Etilbenzeno, 4) Propilbenzeno, 5) Butilbenzeno e 6) Pentilbenzeno (todos na concentração de 0,5 mg/mL) (figura 38) em uma solução de ACN:H₂O 80:20. Como FM foi utilizada ACN:H₂O 40:60 (v/v) - na primeira etapa - e gradiente 40-65% (v/v) ACN em meio aquoso com 40 minutos de corrida – na segunda etapa - vazão de 1,2 µL/min, detecção com cela de 3 nL em 215 nm. O comprimento das colunas variou entre 15 e 18,5 cm. Para o valor de tempo morto (t_m) foi considerado o tempo de retenção do composto menos retido (benzeno).

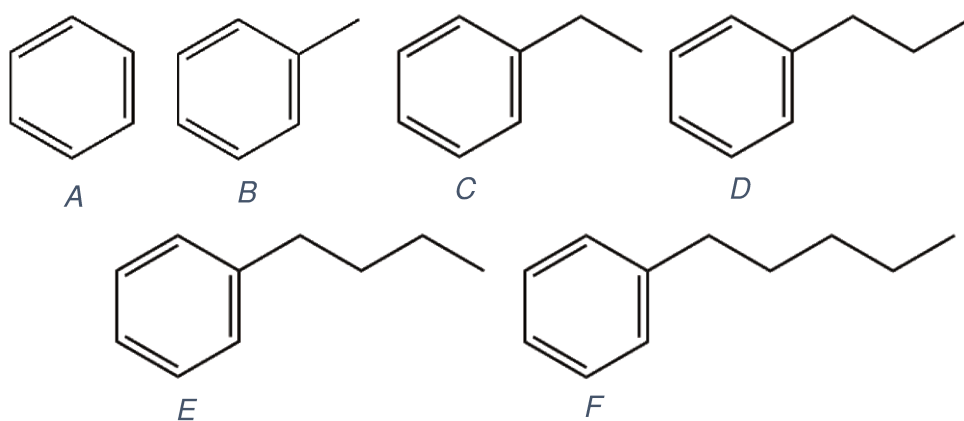


Figura 38 - Alquilbenzenos utilizados como analitos na mistura teste: A) Benzeno, B) Tolueno, C) Etilbenzeno, D) Propilbenzeno, E) Butilbenzeno e F) Pentilbenzeno.

5.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1. Avaliação dos parâmetros: tipo de suporte monolítico, massa molar e proporção de PDMS no solvente

5.2.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM)

Nesta etapa, empregou-se a técnica de FESEM, que permite obter uma imagem com maior nível de aproximação, quando comparada com SEM. Ela foi

realizada com o objetivo de complementar a análise cromatográfica para avaliar a morfologia das fases estacionárias obtidas.

Comparando os dois tipos de suportes monolíticos (M1 e M2) após o processo de imobilização térmica – 30 % de PDMS em hexano com MM 2000 g/mol – é possível observar que o M1 (figura 39 A) apresentou uma morfologia irregular na superfície dos esqueletos de sílica, com estrutura dos esqueletos interconectada, também irregular. Já o M2 apresentou uma estrutura diferente, com glóbulos interconectados e de superfície lisa (figura 39 B).

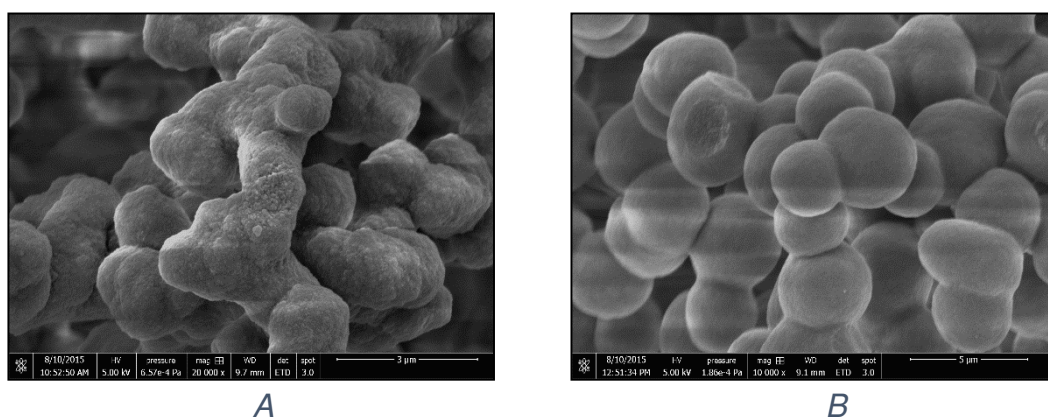


Figura 39 – Microscopias das colunas A) M1-2-30 (escala de 3 μm). B) M2-2-30 (escala de 5 μm).

5.2.1.2. Avaliação Cromatográfica

5.2.1.2.1 Comparação entre colunas variando a proporção de polímero no solvente (10, 30 e 50%)

Fez-se uma comparação entre as colunas que utilizaram as mesmas condições de preparo - exceto pela proporção de PDMS - começando pelas que empregaram M1 como suporte e PDMS com MM 2000 g/mol (figura 40). Observou-se que a coluna M1-2-10 foi a única entre todas onde não houve separação entre nenhum pico, indicando que essas condições não foram adequadas para promover a formação de uma camada polimérica para que houvesse uma boa interação da FE com os analitos.

Para as colunas M1-2-30 e M1-2-50, foi possível observar os seis picos - ainda que com sobreposição parcial dos primeiros. A melhor separação foi obtida com

a coluna M1-2-30, onde os analitos também eluíram mais rapidamente e os picos foram mais estreitos, com uma eficiência de 8000 pratos/m para o composto mais retido (tabela 10). Já para a M1-2-50 a eficiência foi de 900 pratos/m. Essa eficiência está muito abaixo do esperado para esta coluna - sendo que ela possui a maior carga de PDMS entre as três primeiras - o que pode estar relacionado com alguma deformação presente na estrutura monolítica ao longo do capilar e não com a camada polimérica formada, já que os monolitos capilares de sílica podem com facilidade apresentar heterogeneidades referentes ao processo sol-gel.

Tabela 11 – Parâmetros cromatográficos – Resolução (Rs), assimetria (As), fator de retenção (k) e eficiência (pratos/m) – das doze colunas preparadas na avaliação do tipo de suporte, MM e proporção de PDMS. Os valores foram calculados para o composto mais retido (pentilbenzeno).

Monolito	PDMS		Parâmetros cromatográficos				
	Massa Molar (g/mol)	Proporção no solvente (%)	Coluna	Rs	As	k	Pratos/m
1	2000	10	M1-2-10	-	-	-	-
		30	M1-2-30	2,9	1,7	2,2	8000
		50	M1-2-50	1,3	1,2	3,0	900
	6000	10	M1-6-10	4,7	1,1	4,2	12400
		30	M1-6-30	4,9	1,2	5,2	9800
		50	M1-6-50	4,4	1,4	2,7	15200
2	2000	10	M2-2-10	1,4	1,4	1,4	2000
		30	M2-2-30	1,6	1,1	2,5	1800
		50	M2-2-50	2,2	1,2	2,1	4000
	6000	10	M2-6-10	1,2	1,1	4,0	500
		30	M2-6-30	2,4	1,0	5,0	1800
		50	M2-6-50	3,5	1,2	3,6	7500

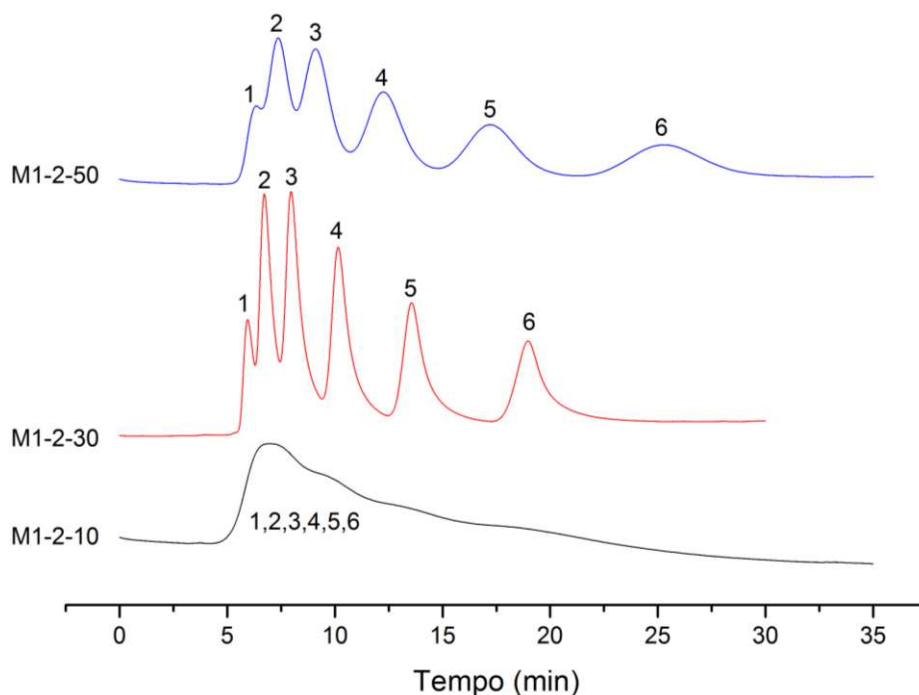


Figura 40 - Cromatogramas das colunas que empregaram o M1 como suporte e PDMS com MM 2000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM ACN:H₂O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 μ L/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 μ L.

Para as colunas que também empregaram o M1 como suporte, porém com MM do PDMS de 6000 g/mol, foi possível observar nos cromatogramas da figura 41 que em todas elas houve separação total entre os seis picos, e a coluna M1-6-30 apresentou o maior fator de retenção dos analitos. Essas três colunas foram as que apresentaram os valores mais altos de eficiência e resolução entre as doze, mostrando que essas foram as melhores condições no preparo das fases estacionárias, empregando as condições de sorção e imobilização utilizadas.

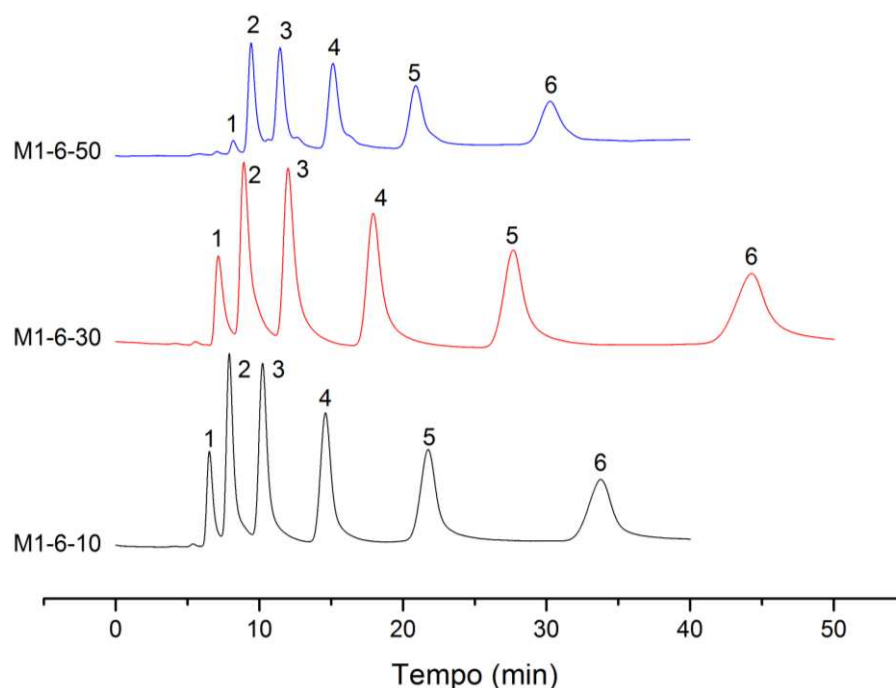


Figura 41 - Cromatogramas das colunas que empregaram o monolito 1 como suporte e PDMS com MM 6000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. Especificamente no cromatograma da coluna M1-6-50, a concentração de benzeno foi de 0,5 mg/mL. FM ACN:H₂O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 μ L/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 μ L.

Para as colunas que empregaram o M2 como suporte (com grupos metila em sua estrutura) e PDMS com massa molar 2000 g/mol, observou-se sobreposição dos três primeiros picos, além de alargamento de banda, mostrando que as condições empregadas nessas colunas não proporcionaram boa seletividade para compostos mais polares (figura 42). A coluna M2-2-50 teve a maior eficiência entre as três mencionadas acima, com um valor de 4000 pratos/m, apesar de a M2-2-30 ter o maior fator de retenção dos analitos.

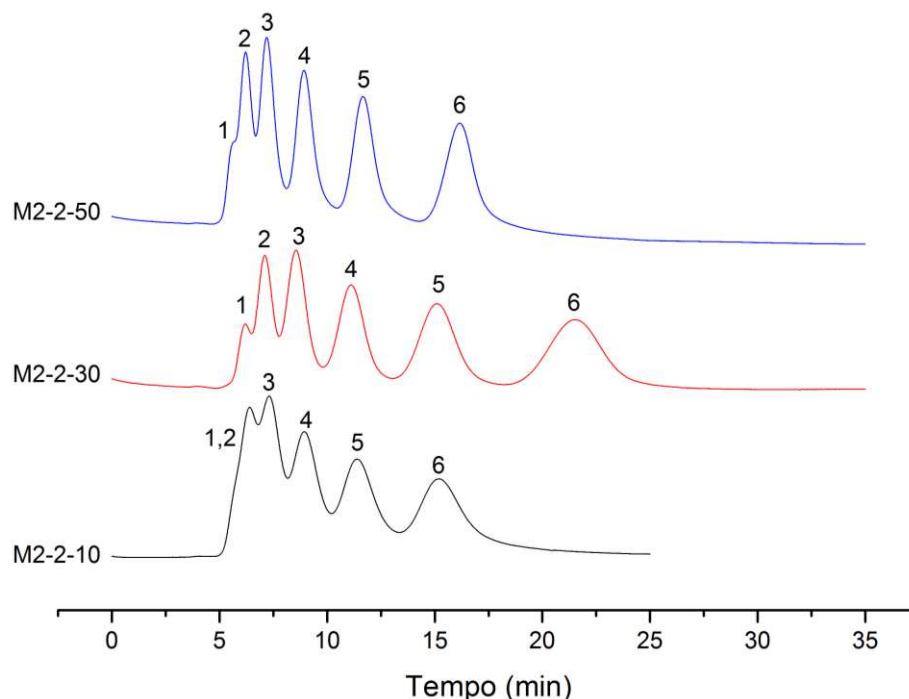


Figura 42 - Cromatogramas das colunas que empregaram o monólito 2 como suporte e PDMS com MM 2000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM ACN:H₂O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 μ L/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 μ L.

Para as colunas que empregaram o M2 como suporte e PDMS com MM de 6000 g/mol, foram observados valores crescentes de eficiência. Dentre elas, a coluna M2-6-10 foi a única com sobreposição dos três primeiros picos e maior alargamento de banda. Ela apresentou uma eficiência de apenas 500 pratos/m, que foi a menor entre as doze preparadas nesta etapa, conforme a tabela 10 e a figura 43. Assim como para a coluna M1-2-50, essa baixa eficiência pode estar relacionada a alguma deformação na estrutura monolítica, que causa queda drástica de eficiência.

Dentre cada um desses grupos de três colunas apresentados, onde variou-se apenas a proporção de PDMS no solvente, foi observado que: excluindo o primeiro grupo, que continha uma coluna onde não houve separação e uma com eficiência muito abaixo do esperado, as colunas que empregaram 30% de PDMS no solvente apresentaram o maior fator de retenção de cada grupo, sendo que o esperado era que as com 50% de PDMS apresentassem o maior fator de retenção, devido a maior carga polimérica.

Pode-se concluir que, com exceção da M1-2-50, as colunas com proporção de 50% apresentaram as maiores eficiências.

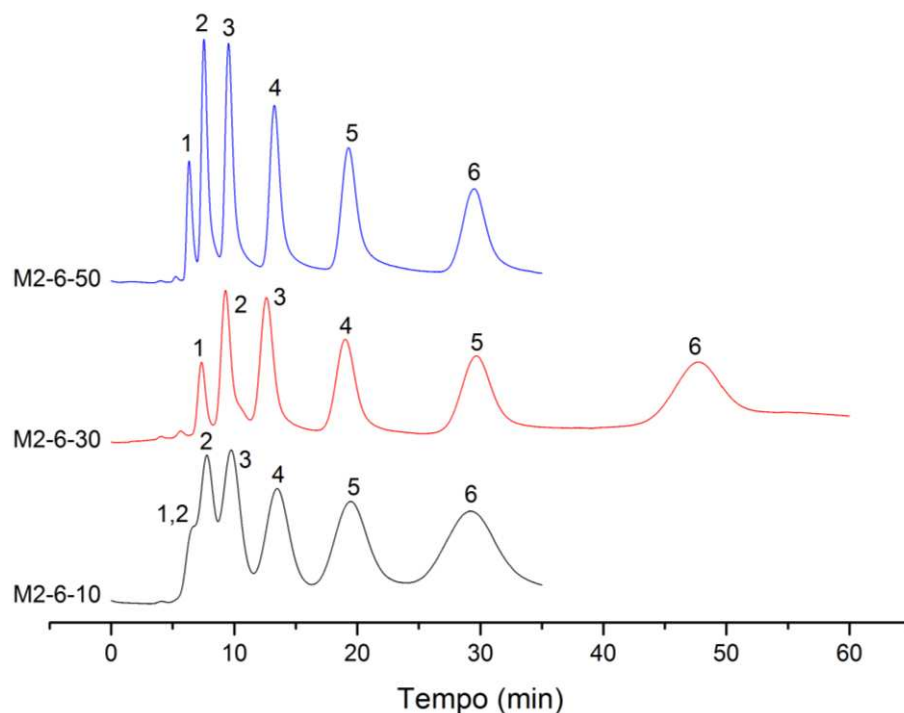


Figura 43 - Cromatogramas das colunas que empregaram o monólito 2 como suporte e PDMS com MM 6000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM ACN:H₂O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.

5.2.1.2.2 Comparação entre colunas variando as massas molares de PDMS (2000 e 6000 g/mol)

Dentre os pares de colunas com as mesmas condições - exceto pela massa molar de PDMS - pôde-se verificar através da figura 44 e da tabela 10, que a maioria das colunas onde foi empregado o PDMS com massa molar 6000 g/mol apresentou maior eficiência e maior fator de retenção dos analitos.

Esse comportamento não foi observado para o par de colunas M2-2-10 e M2-6-10, onde a coluna com MM de PDMS 6000 g/mol apresentou menor eficiência (Como mencionado antes, essa foi a coluna com a menor eficiência entre todas as testadas); e para o par de colunas M1-2-50 e M1-6-50, onde a coluna com MM de PDMS 6000 g/mol apresentou menor fator de retenção (Isso pode ter ocorrido devido a coluna M1-6-50 ter sido analisada três meses antes das demais, e levando em conta que o processo de autoimobilização do polímero sobre o suporte aumenta com o tempo).

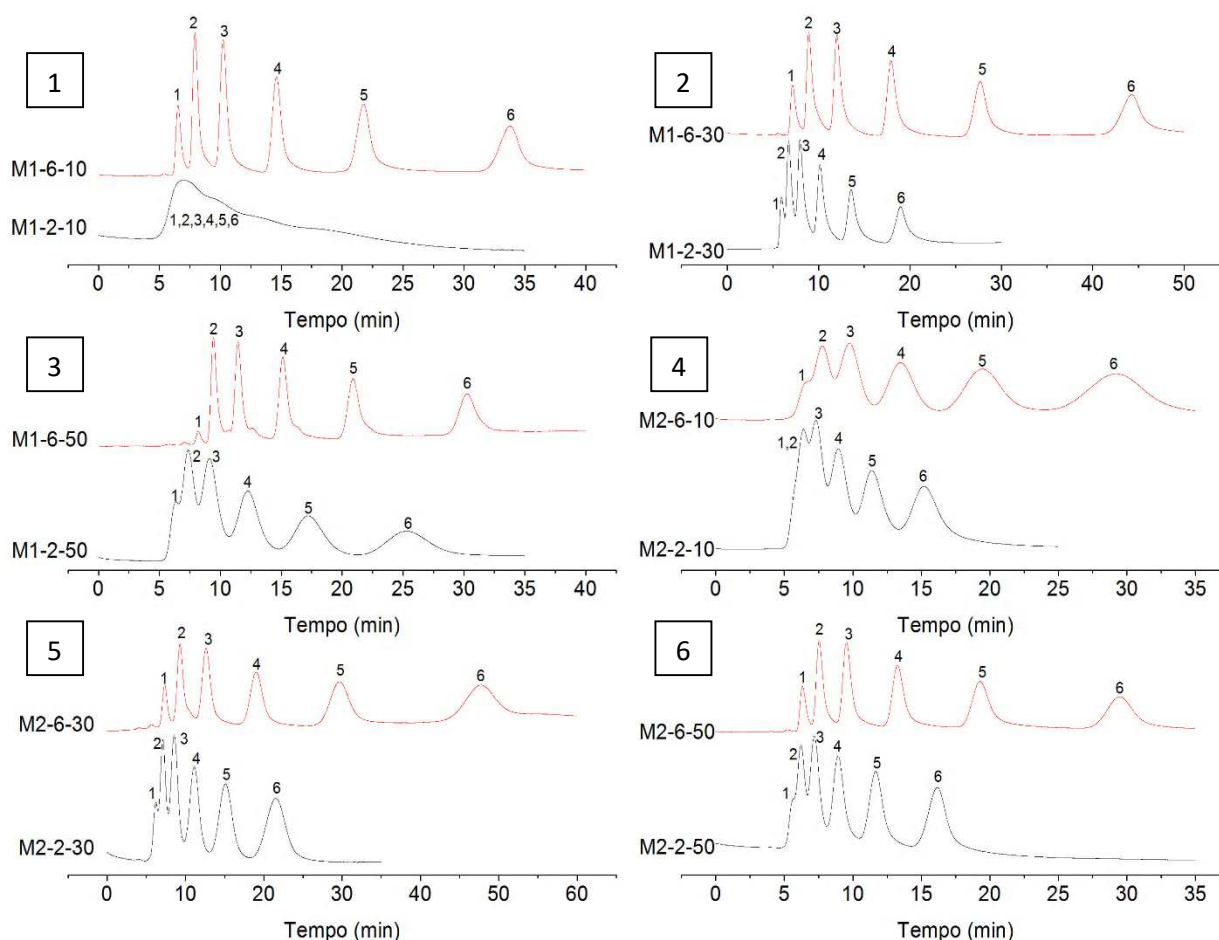


Figura 44 – Comparação entre pares de colunas onde variou-se apenas a MM de PDMS. Os cromatogramas em preto correspondem as colunas onde empregou-se MM 2000 g/mol, e os cromatogramas em vermelho, MM 6000 g/mol. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM ACN:H₂O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 μ L/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 μ L.

5.2.2.3 Comparação entre colunas variando o tipo de suporte monolítico (monolitos 1 e 2)

Observa-se que a maioria das colunas que empregaram o M1 como suporte foram as que tiveram as maiores eficiências. As colunas M1-2-10 e M1-2-50 foram as únicas onde não se observou isso. Para a M1-2-10 não ocorreu separação entre nenhum dos seis analitos, devido as demais condições empregadas. Para a M1-2-50, a eficiência foi muito menor do que a esperada.

Ao final dos testes, foi possível observar que o fator de assimetria do pico mais retido para todas as colunas foi maior ou igual a 1. Isso indica que os picos apresentaram cauda. A coluna M1-50-6 foi a que apresentou a maior eficiência entre

as doze testadas. Portanto, concluiu-se que a melhor condição no preparo deste tipo de fase estacionária foi utilizando o suporte de sílica pura (M1), o PDMS com massa molar de 6000 g/mol e na proporção de 50% (v/v) na solução inicial com hexano. As doze colunas preparadas nesta etapa do trabalho podem ser comparadas através dos cromatogramas sobrepostos na figura 45.

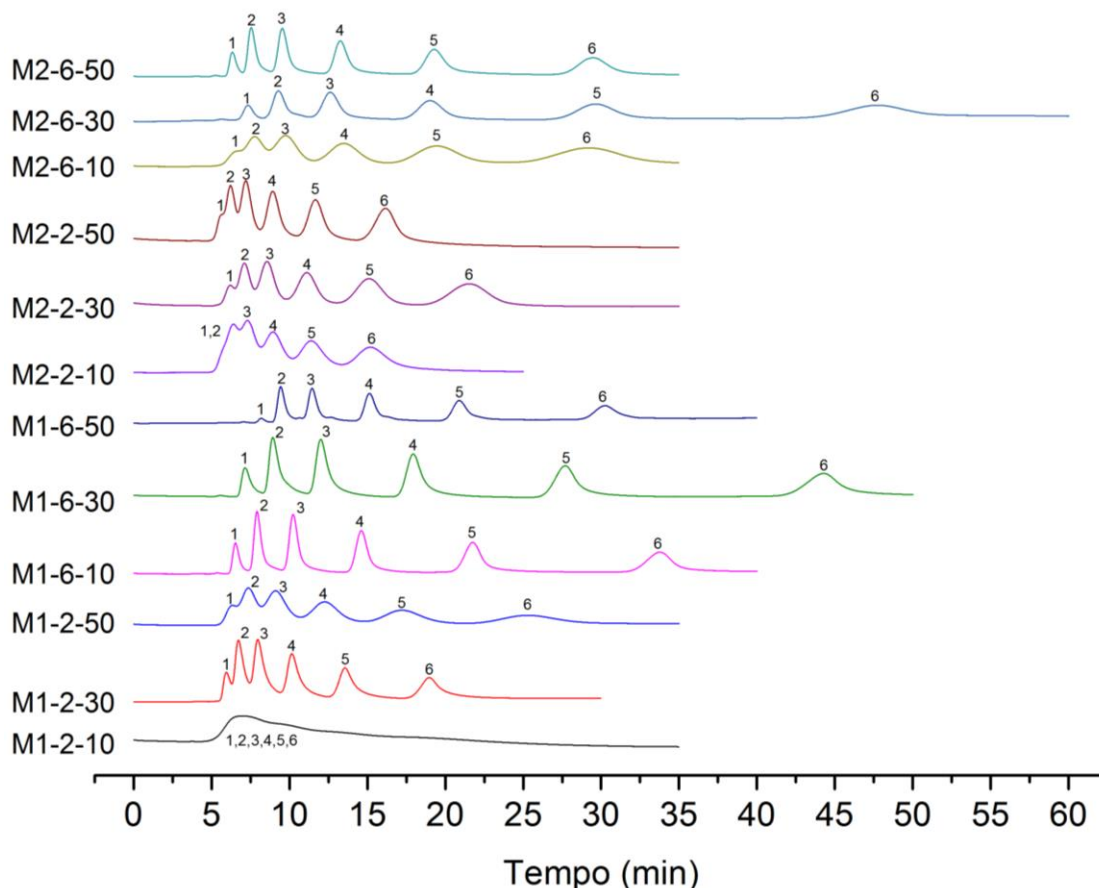


Figura 45 - Cromatogramas das 12 colunas preparadas nesta etapa do trabalho. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. FM ACN:H₂O 40:60 (v/v), vazão de 1,2 µL/min, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 µL.

5.2.2. Estudo das condições empregadas na imobilização térmica do PDMS – tempo e temperatura

Nesta etapa do trabalho, verificou-se a necessidade de aumentar a interação dos analitos com a fase imobilizada, visto que a força cromatográfica necessária para se obter separação mínima dos picos na etapa anterior foi fraca (maior proporção aquosa), tratando-se de uma fase estacionária para ser utilizada no modo fase reversa. Para isso, testaram-se maiores tempos e temperaturas de imobilização.

5.2.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (FESEM)

Realizou-se a análise por FESEM para a avaliação do tamanho dos esqueletos de sílica e macroporos (domínios) das colunas preparadas nesta etapa do trabalho. As colunas foram preparadas em duplicata, e para cada uma delas foi realizada uma microscopia com a medição dos esqueletos, além de uma microscopia para a medição dos macroporos. Os tamanhos dos esqueletos de sílica foram medidos em uma escala de 2 μm e os macroporos em uma escala de 20 μm , com o auxílio do software do equipamento (figura 46). Os resultados são apresentados na tabela 11:

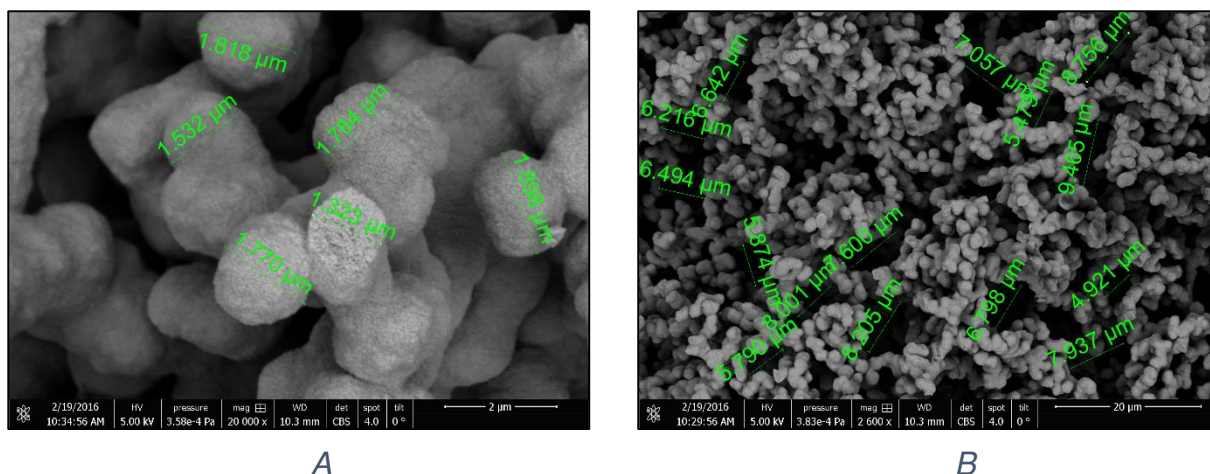


Figura 46 - Medições dos A) Esqueletos de sílica (escala de 2 μm) e B) Macroporos (escala de 20 μm) da coluna 2-T120/t04.

Tabela 12 – Médias dos tamanhos dos esqueletos de sílica e macroporos (em μm) de cada uma das duplicatas das colunas

Médias das estruturas em μm		
Colunas em duplicata	Esqueletos	Macroporos
2-T120/t04 A	1,7	7,0
2-T120/t04 B	1,7	8,1
2-T120/t16 A	1,7	4,9
2-T120/t16 B	1,7	5,3
1-T120/t16 A	1,7	4,2
1-T120/t16 B	1,8	6,2
2-T150/t04 A	1,8	8,5
2-T150/t04 B	1,8	7,7
2-T150/t16 A	1,6	6,8
2-T150/t16 B	1,5	9,5
1-T150/t16 A	2,0	9,9
1-T150/t16 B	1,9	7,8

Entre todas as colunas, que empregaram o mesmo suporte monolítico (M1) e variaram apenas nas condições de imobilização térmica de PDMS, não houve diferença significativa no tamanho das estruturas, sendo que a média entre todas as colunas foi: 1,7 μm para os esqueletos de sílica, 7,2 μm para os macroporos, e a soma dos dois valores foi 8,9 μm , que é o tamanho médio dos domínios. Com isso, concluiu-se que diferentes processos de imobilização térmica não afetam o tamanho da estrutura do monolito.

5.2.2.2. Avaliação Cromatográfica

Com relação à temperatura empregada, observou-se na tabela 12 que o aumento de 120 para 150 $^{\circ}\text{C}$ na segunda etapa do tratamento térmico causou um

aumento na eficiência, porém não afetou o fator de retenção das colunas preparadas. Isso indica que o aumento de temperatura provoca um rearranjo do PDMS sobre o suporte.

Comparando as colunas que empregaram as mesmas condições, com exceção do tempo empregado a 120 ou 150 °C, verificou-se que um aumento de 4 para 16 horas causou um aumento no fator de retenção, mas não afetou consideravelmente a eficiência. Isso indica que um maior tempo provoca um aumento da espessura da camada polimérica formada sobre o monólito.

Comparando as colunas que empregaram uma primeira etapa de aquecimento a 100 °C por 24 horas, com as que não empregaram essa etapa, observou-se que a 120 °C a ausência da primeira etapa causou queda de eficiência (coluna 1-T120/t16); por outro lado, a 150 °C a ausência dessa primeira etapa causou aumento da eficiência.

Tabela 13 – Parâmetros cromatográficos – Resolução (Rs), assimetria (As), fator de retenção (k) e eficiência (pratos/m) – das colunas preparadas na parte final do trabalho: Variando tempo e temperatura de imobilização térmica. Os valores foram calculados para o composto mais retido (pentilbenzeno)

Coluna	Tratamento térmico				Parâmetros cromatográficos			
	1ª etapa		2ª etapa		Rs	As	k	Pratos/m
	T (°C)	t (h)	T (°C)	t (h)				
2-T120/t04	100	24	120	04	4,4	1,2	2,3	43900
2-T120/t16	100	24	120	16	4,6	1,4	2,5	49000
1-T120/t16	-	-	120	16	3,8	1,4	2,6	39100
2-T150/t04	100	24	150	04	3,7	1,6	2,4	35100
2-T150/t04 B	100	24	150	04	4,6	1,5	2,1	69200
2-T150/t16	100	24	150	16	5,1	1,5	2,6	68400
1-T150/t16	-	-	150	16	4,9	1,6	2,3	79500

A coluna 2-T150/t04 apresentou uma eficiência que foi quase metade das outras duas. Para verificar sua baixa eficiência, preparou-se a coluna 2-T150/t04 B (com exatamente as mesmas condições da 2-T150/t04). Essa nova coluna apresentou uma eficiência de 69200 pratos/m – diferente do valor encontrado anteriormente, de

35100 pratos/m, e mais coerente com os resultados das demais colunas. Isso é um indicativo de que a coluna 2-T150/t04 possuía alguma heterogeneidade estrutural no monolito que causou queda drástica de sua eficiência.

Observando a figura 47 e os valores de Rs e As da tabela 12, verifica-se que todas as colunas preparadas nessa etapa tiveram valores altos de resolução, com separação completa entre os picos, e fatores de assimetria maiores ou iguais a 1,2, que indicam presença de cauda e leve alargamento de banda próximo à linha de base.

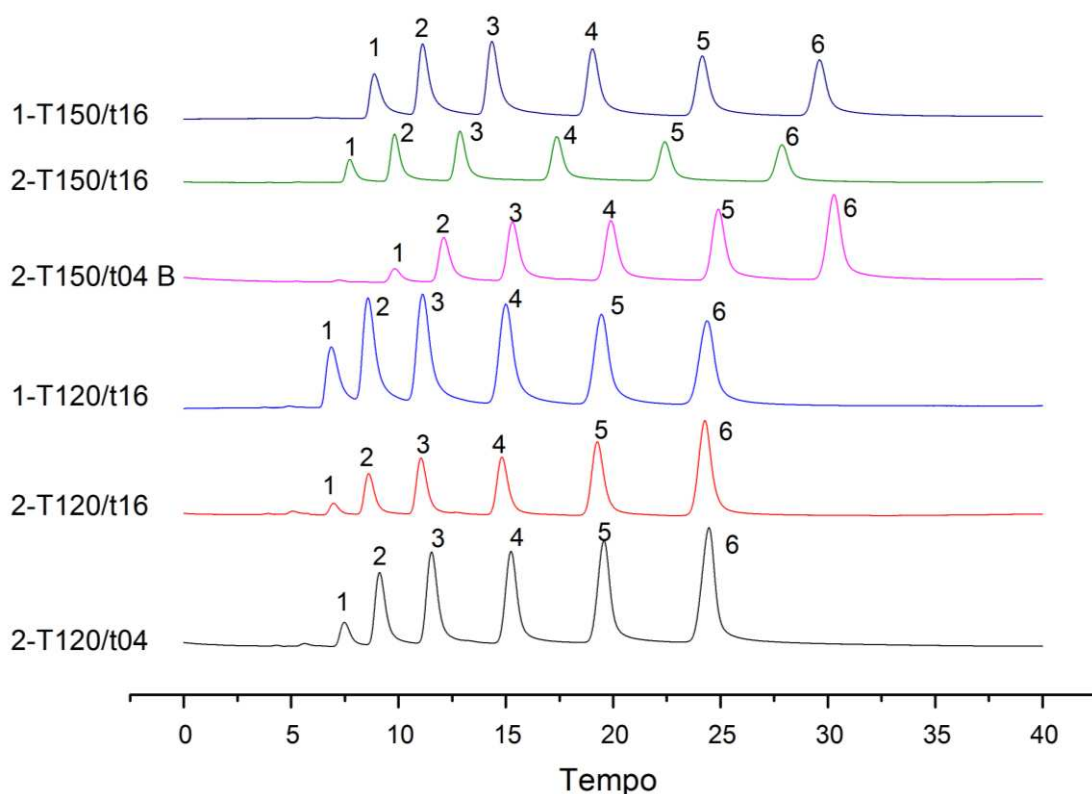


Figura 47 – Cromatogramas das colunas preparadas na última etapa do trabalho, de estudo das condições de imobilização térmica. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. Gradiente de FM 40-65% (v/v) ACN em meio aquoso com 40 minutos de corrida, vazão de 1,2 $\mu\text{L}/\text{min}$, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 μL .

Dentre as seis colunas preparadas nesta etapa, e entre todas as preparadas nesse trabalho, a que apresentou maior eficiência foi a 1-T150/t16, com 79500 pratos/m, mostrando que a condição que promoveu uma melhor imobilização térmica do PDMS sobre o M1 foi uma única etapa de aquecimento a 150°C por 16 horas.

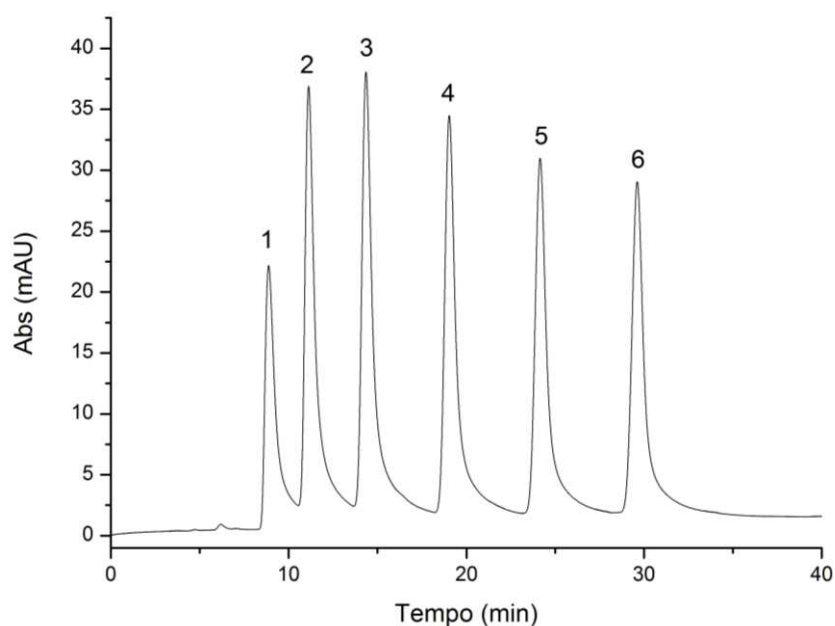


Figura 48 - Cromatograma da coluna 1-T150/t16, que apresentou a maior eficiência entre todas as preparadas nesse trabalho. Analitos: 1. Benzeno, 2. Tolueno, 3. Etilbenzeno, 4. Propilbenzeno, 5. Pentilbenzeno. Gradiente de FM 40-65% (v/v) ACN em meio aquoso com 40 minutos de corrida, vazão de 1,2 $\mu\text{L}/\text{min}$, detecção em 215 nm e volume de injeção de 0,05 μL .

6 CONCLUSÕES

Na fase inicial do trabalho, primeiramente tentou-se reproduzir as condições de preparo de monolitos capilares de sílica encontradas na literatura, o que não foi possível sem a realização de otimizações do processo.

Foi necessária a implementação de uma rampa gradual de temperatura entre a etapa de formação dos macroporos e gelificação (43 °C por 20 horas) e a etapa de secagem e formação dos mesoporos (120 °C por 4 horas), para que não ocorresse separação macroscópica de fases e a não formação da estrutura monolítica dentro do capilar. Esta etapa é crítica no processo de formação do monolito.

Observou-se que ocorrem dois tipos de encolhimentos nos monolitos: o radial e o por ação da gravidade. Para evitar que ocorresse encolhimento por gravidade em toda a extensão da coluna, elas começaram a ser colocadas na posição vertical dentro da estufa durante a etapa de gelificação e secagem. Isso permitiu que o espaço vazio formado pelo encolhimento, se concentrasse na parte superior da coluna, podendo ser cortado posteriormente e permitindo um preenchimento mais uniforme do capilar.

Implementou-se um sistema com pressurização por N₂ construído pelo grupo para o enchimento das colunas capilares no lugar do enchimento por bomba-seringa. Essa medida proporcionou um preenchimento muito mais rápido e uniforme do capilar.

Na vedação das extremidades das colunas foram empregadas borrachas escolares ao invés de conectores de vidro durante o processo de gelificação e secagem em estufa, evitando qualquer tipo de vazamento do líquido ou do gel de dentro do capilar. Com isso, foi possível obter colunas bem preenchidas.

Aplicou-se a mistura MTMS+TMOS como opção de precursores no processo sol-gel com o objetivo de evitar encolhimentos, pois a incorporação de grupos metila do MTMS na estrutura de sílica provoca um impedimento estérico e dificulta a condensação de grupos hidroxila. Observou-se experimentalmente que 64% das colunas preparadas com o M1 tiveram encolhimento radial, enquanto apenas 22% das colunas preparadas com o M2 tiveram esse tipo de encolhimento.

Foram estudados diversos parâmetros no processo sol-gel. Verificou-se que as quantidades de cada componente são variáveis interdependentes e que uma variação em apenas uma delas pode acarretar em mudanças consideráveis na estrutura monolítica, ou até mesmo a não formação de monolitos.

A quantidade de solvente controla o *volume* dos macroporos e foi verificado experimentalmente que sua diminuição pode ocasionar a formação de uma estrutura transparente, encolhida e maciça dentro do capilar. Já a quantidade de PEG (que é um indutor de separação de fases) controla o *tamanho* dos macroporos. Foi verificado que a partir de uma certa quantidade, não se forma estrutura monolítica devido a separação de fases macroscópica onde, nessas condições, foram observadas estruturas bem parecidas com a obtida quando se emprega menor quantidade de solvente.

Em relação à quantidade de precursor, observou-se que ela está relacionada a formação dos esqueletos de sílica e que uma quantidade mínima é necessária para formar uma rede tridimensional dentro do capilar. A força mecânica do monolito aumenta com o aumento da concentração de precursor.

Por último, em relação à composição da mistura inicial, foi observado que a proporção de MTMS empregada afeta totalmente a morfologia do esqueleto de sílica, sendo que, com maior porcentagem de MTMS, a estrutura é mais irregular.

Após a etapa de otimização no preparo de monolitos, foram escolhidas duas condições onde foram observadas a formação do esqueleto de sílica e macroporos característicos, com bom preenchimento do capilar. Essas colunas foram empregadas para os posteriores testes de imobilização do polímero.

Através do estudo dos parâmetros como tipo de suporte monolítico, proporção e massa molar de PDMS, avaliou-se as colunas preparadas no modo isocrático e foi possível observar que as melhores condições que proporcionaram maior eficiência, foram o M1 como suporte, 50% (v/v) de PDMS (6000 g/mol) em hexano. Esses resultados com monolitos capilares baseados em sílica, são coerentes com estudos encontrados na literatura obtidos para colunas convencionais recheadas com partículas de sílica. Apesar de os monolitos com MTMS (M2) terem apresentado menos encolhimento radial que os de sílica pura (M1), as eficiências obtidas para as colunas preparadas com o M2 foram menores que para as com o M1.

Um comportamento inesperado observado foi que as colunas com 30% de PDMS apresentaram os maiores fatores de retenção. Nessa etapa, constatou-se que a camada de polímero formada ainda não interagiu fortemente com os analitos, pois a força cromatográfica utilizada foi baixa, com FM ACN:H₂O 40:60.

Com as condições previamente otimizadas, realizou-se o estudo dos parâmetros tempo e temperatura utilizados na imobilização térmica do PDMS. Verificou-se que o aumento de temperatura (de 120 para 150 °C) provoca um rearranjo do PDMS sobre o suporte - verificado pelo aumento da eficiência - e um maior tempo (de 4 para 16 horas) provoca um aumento da espessura da camada polimérica formada sobre o monolito - verificado pelo aumento no fator de retenção.

A aplicação de monolitos de sílica em capilares como suporte cromatográfico tem sido objeto de estudos recentes e tem-se reportado a dificuldade na obtenção de capilares com preenchimento completo e homogêneo. Nesse estudo, verificou-se em algumas colunas eficiências muito abaixo do esperado e acredita-se que isso ocorre devido a heterogeneidade presente em alguma porção do suporte monolítico. Este é um aspecto que afeta drasticamente as eficiências deste tipo de FE.

Ao final do trabalho, a coluna que apresentou a maior eficiência foi a 1-T150/t16, com 79500 pratos/m, para a separação de seis alquilbenzenos através do uso de um gradiente de FM em CLC no modo fase reversa. Devido à alta eficiência

obtida (para este tipo de coluna), ela pode ser considerada promissora para uso em CLC.

“As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

REFERÊNCIAS

- [1] Núñez, O., Nakanishi, K. & Tanaka, N. Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1191**, 231–252 (2008).
- [2] Collins, C. H., Braga, G. L. & BONATO, P. S. *Fundamentos de Cromatografia*. (Unicamp, 2006).
- [3] Degani, A. L. G., Cass, Q. Q. & Vieira, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química Nov. na Esc.* **7**, 21–25 (1998).
- [4] Jandera, P. Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography : a review. *Anal. Chim. Acta* **692**, 1–25 (2011).
- [5] Silva, R. G. da C., Collins, C. H. & Bottoli, C. B. G. Cromatografia líquida capilar: Estado da arte e aplicações. *Quim. Nova* **34**, 841–849 (2011).
- [6] Maldaner, L. & Jardim, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Sci. Chromatogr.* **4**, 197–207 (2012).
- [7] Chervet, J. P., Ursem, M. & Salzmänn, J. P. Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography. *Anal. Chem.* **68**, 1507–1512 (1996).
- [8] Coutinho, L. F. M. & Lanças, F. M. Cromatografia líquida capilar: 1. Principais características da técnica. *Sci. Chromatogr.* **3**, 115–130 (2011).
- [9] Lanças, F. M. Vantagens e limitações da miniaturização em cromatografia líquida. *Sci. Chromatogr.* **1**, 51–60 (2009).
- [10] Takeuchi, T. Capillary columns in liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **375**, 26–27 (2003).
- [11] Coutinho, L. & Lanc'as, F. M. Cromatografia líquida capilar: 2. Alargamento das bandas por efeitos extracoluna. *Sci. Chromatogr.* **3**, 185–197 (2011).
- [12] Monteiro, A. M. Cromatografia líquida capilar: desenvolvimento de colunas empacotadas e monolíticas, celas de detecção UV, e aplicação da programação de temperatura. (Tese - USP, São Carlos, 2010).
- [13] Nazario, C. E. D. & Lanças, F. M. Suportes cromatográficos e fases estacionárias para cromatografia líquida: preparo, evolução e tendências. *Sci. Chromatogr.* **5**, 111–135 (2013).

- [14] Tanaka, N. & Unger, K. K. in *Monolithic silicas in separation science - Concepts, syntheses, characterization, modeling and applications* (eds. Unger, K. K., Tanaka, N. & Machtejevas, E.) 2–4 (Wiley-VCH: Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011).
- [15] Unger, K. K., Skudas, R. & Schulte, M. M. Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. *J. Chromatogr. A* **1184**, 393–415 (2008).
- [16] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N. & Tanaka, N. Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* **68**, 3498–3501 (1996).
- [17] Nakanishi, K. & Soga, N. Phase Separation in Gelling Silica–Organic Polymer Solution: Systems Containing Poly(sodium styrenesulfonate). *J. Am. Ceram. Soc.* **74**, 2518–2530 (1991).
- [18] Nakanishi, K. & Soga, N. Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid I. Gel formaation behavior and effect of solvent composition. *J. Non. Cryst. Solids* **139**, 1–13 (1992).
- [19] Nakanishi, K. & Soga, N. Phase separation in silica sol-gel system containing polyacrylic acid II. Effects of molecular weight and temperature. *J. Non. Cryst. Solids* **139**, 14–24 (1992).
- [20] Ishizuka, N. *et al.* Chromatographic Properties of Miniaturized Silica Rod Columns. *J. High Resolut. Chromatogr.* **21**, 477–479 (1998).
- [21] Svec, F. Porous monoliths: the newest generation of stationary phases for HPLC and related methods. *LC GC Eur.* **16**, 24–28 (2003).
- [22] Cabrera, K. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *J. Sep. Sci.* **27**, 843–852 (2004).
- [23] Wu, M. *et al.* ‘ One-Pot ’ Process for Fabrication of Organic-Silica Hybrid Monolithic Capillary Columns Using Organic Monomer and Alkoxysilane. *Anal. Chem.* **81**, 3529–3536 (2009).
- [24] Aguiar, V. S. Desenvolvimento e caracterização de fases estacionárias monolíticas à base de octadecilmetacrilato para uso em eletrocromatografia capilar. (Dissertação - Unicamp, 2011).
- [25] Ou, J. *et al.* Recent advances in preparation and application of hybrid organic-silica monolithic capillary columns. *Electrophoresis* **34**, 126–140 (2013).
- [26] Benvenuto, E. V., Moro, C. C., Costa, T. M. H. & Gallas, M. R. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. *Quim. Nova* **32**, 1926–1933 (2009).
- [27] Yuan-Chao, W., Qiong, W., Ying-Zhi, J. & Jin-Hua, L. Preparation and characterization of inorganic silica-organic polymer mixture based C16 capillary monolithic column. *Fenxi Huaxue/ Chinese J. Anal. Chem.* **38**, 828–832 (2010).
- [28] McNaught, A. D. & Wilkinson, A. IUPAC - Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the ‘Gold Book’): mesopore. (2014). doi:10.1351/goldbook.M03853
- [29] Faria, A. M., Bottoli, C. B. G., Jardim, I. C. S. F. & Collins, C. H. Fases

- estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. *Quim. Nova* **29**, 300–309 (2006).
- [30] Trojer, L. *et al.* in *Handbook of HPLC - Chromatographic Science Series, Volume 101* (ed. Corradini, D.) 14 (CRC Press, 2011).
doi:10.1201/EBK1574445541
- [31] Aggarwal, P., Tolley, H. D. & Lee, M. L. Monolithic bed structure for capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1219**, 1–14 (2012).
- [32] Tanaka, N., Motokawa, M., Kobayashi, H., Hosoya, K. & Ikegami, T. in *Journal of Chromatography Library* (eds. Svec, F., Tennikova, T. B. & Deyl, Z.) **67**, 173–195 (Elsevier Science B.V., 2003).
- [33] Hara, T., Mascotto, S., Weidmann, C. & Smarsly, B. M. The effect of hydrothermal treatment on column performance for monolithic silica capillary columns. *J. Chromatogr. A* **1218**, 3624–3635 (2011).
- [34] Fardad, M. a., Yeatman, E. M., Dawnay, E. J. C., Green, M. & Horowitz, F. Effects of H₂O on structure of acid-catalysed SiO₂ sol-gel films. *J. Non. Cryst. Solids* **183**, 260–267 (1995).
- [35] Hara, T., Kobayashi, H., Ikegami, T., Nakanishi, K. & Tanaka, N. Performance of monolithic silica capillary columns with increased phase ratios and small-sized domains. *Anal. Chem.* **78**, 7632–7642 (2006).
- [36] Siouffi, a. M. Silica gel-based monoliths prepared by the sol-gel method: Facts and figures. *J. Chromatogr. A* **1000**, 801–818 (2003).
- [37] Ponce, M. de J. S. G. Síntese e caracterização de nova fase monolítica para eletrocromatografia capilar usando método sol-gel. (Tese - Unicamp, 2011).
- [38] Morisato, K. *et al.* Semi-micro-monolithic columns using macroporous silica rods with improved performance. *J. Chromatogr. A* **1216**, 7384–7387 (2009).
- [39] Tanaka, N. *et al.* Monolithic silica columns for high-efficiency chromatographic separations. *J. Chromatogr. A* **965**, 35–49 (2002).
- [40] Puy, G. *et al.* Electrochromatographic behavior of silica monolithic capillaries of different skeleton sizes synthesized with a simplified and shortened sol-gel procedure. *Electrophoresis* **27**, 3971–3980 (2006).
- [41] Kanamori, K., Yonezawa, H., Nakanishi, K., Hirao, K. & Jinnai, H. Structural formation of hybrid siloxane-based polymer monolith in confined spaces. *J. Sep. Sci.* **27**, 874–886 (2004).
- [42] Gao, W., Yang, G., Yang, J. & Liu, H. Formation of the monolithic silica gel column with bimodal pore structure. *Turkish J. Chem.* **28**, 379–385 (2004).
- [43] Júnior, E. S. da S. Preparação de fases estacionárias para CLAE com uma mistura de poli(dimetilsiloxano) e poli(metiloctadecilsiloxano) sorvidos e imobilizados por tratamento térmico sobre sílica. (Dissertação - Unicamp, 2007).
- [44] Seethapathy, S. & Górecki, T. Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta* **750**, 48–62 (2012).
- [45] Melo, L. F. C., Collins, C. H., Collins, K. E. & Jardim, I. C. S. F. Stability of high-

- performance liquid chromatography columns packed with poly(methyloctylsiloxane) sorbed and radiation-immobilized onto porous silica and zirconized silica. *J. Chromatogr. A* **869**, 129–135 (2000).
- [46] Faria, A. M., Collins, K. E. & Collins, C. H. New stationary phases for high-performance liquid chromatography based on poly(methyltetradecylsiloxane) thermally immobilized onto zirconized silica. *J. Chromatogr. A* **1122**, 114–122 (2006).
 - [47] Faria, A. M., Collins, K. E. & Collins, C. H. Preparation and characterization of poly(methyltetradecylsiloxane) stationary phases immobilized by gamma radiation onto zirconized silica. *J. Chromatogr. A* **1156**, 51–59 (2007).
 - [48] da Silva, C. G. a & Collins, C. H. Preparation and characterization of a poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto zirconized silica stationary phase for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1232**, 248–256 (2012).
 - [49] Silva, C. G. A. da & Collins, C. H. Improved chemical stabilities for end-capped high performance liquid chromatography stationary phases based on poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto metalized silicas. *J. Chromatogr. A* **1260**, 81–87 (2012).
 - [50] Barbosa Silva, R., Collins, K. E. & Collins, C. H. Effects in high-performance liquid chromatography of a high pH in the mobile phase on poly(methyloctylsiloxane) immobilized by γ -radiation on titanium-grafted silica. *J. Chromatogr. A* **869**, 137–141 (2000).
 - [51] Silva, R. B. & Collins, C. H. Chromatographic evaluation of radiation-immobilized poly (methyloctylsiloxane) on titanium-grafted silica. *J. Chromatogr. A* **845**, 417–422 (1999).
 - [52] Silva, R. B., Gushikem, Y. & Collins, C. H. Synthesis, characterization, and chromatographic evaluation of titanium tetrabutoxide-modified silica as a support for HPLC-RP separations in alkaline mobile phases. *J. Sep. Sci.* **24**, 49–54 (2001).
 - [53] Fonseca, D. a., Collins, K. E. & Collins, C. H. Titanized silica-based stationary phases prepared with thermally and microwave-immobilized poly(methyloctylsiloxane). *J. Chromatogr. A* **1030**, 209–215 (2004).
 - [54] Morais, L. S. R. & Jardim, I. C. S. F. Characterization of a new stationary phase based on microwave immobilized polybutadiene on titanium oxide-modified silica. *J. Chromatogr. A* **1073**, 127–135 (2005).
 - [55] Silva, C. G. A. da & Collins, C. H. Stationary phases based on poly(methyloctadecylsiloxane) thermally immobilized onto titanized silica for high-performance liquid chromatography. *Microchem. J.* **109**, 150–157 (2013).
 - [56] Tonhi, E., Collins, K. E. & Collins, C. H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on polysiloxanes with different chain lengths thermally immobilized on silica supports. *J. Chromatogr. A* **1119**, 135–139 (2006).
 - [57] Vigna, C. R. M., Bottoli, C. B. G., Collins, K. E. & Collins, C. H. Preparation of stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography

- using thermal treatments at high temperature. *J. Chromatogr. A* **1156**, 60–67 (2007).
- [58] Tonhi, E., Collins, K. E. & Collins, C. H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica I. Physical and chemical characterizations. *J. Chromatogr. A* **948**, 97–107 (2002).
- [59] Collins, K. E., Granja, M. L. M. M., Pereira Filho, R. G., Anazawa, T. A. & Jardim, I. C. S. F. The spatial distribution of poly (methyloctylsiloxane) deposited by solvent evaporation in the pores of HPLC silica particles. *Chromatographia* **45**, 99–103 (1997).
- [60] Bottoli, C. B. G., Chaudhry, Z. F., Fonseca, D. A., Collins, K. E. & Collins, C. H. Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **948**, 121–128 (2002).
- [61] Tonhi, E., Collins, K. E. & Collins, C. H. High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(dimethylsiloxane) immobilized on silica. *J. Chromatogr. A* **1075**, 87–94 (2005).
- [62] Anazawa, T. A., Carraro, F., Collins, K. E. & Jardim, I. C. S. F. Stability of high-performance liquid chromatography columns packed with C1 and C8 polysiloxanes sorbed into porous silica particles. *J. Chromatogr. A* **697**, 159–164 (1995).
- [63] Jardim, I. C. S. F., Maldaner, L., Lourenco, J., Fioravanti, L. M. A. & Collins, C. H. Some new selective stationary phases for RP-HPLC. *J. Sep. Sci.* **33**, 2917–2929 (2010).
- [64] Lopes, N. P., Collins, K. E. & Jardim, I. C. S. F. Influence of air on polybutadiene used in the preparation of stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1030**, 231–236 (2004).
- [65] Faria, A. M., Collins, C. H. & Jardim, I. C. S. F. State-of-the-art in immobilized polymer stationary phases for high-performance liquid chromatography. *J. Braz. Chem. Soc.* **20**, 1385–1398 (2009).
- [66] Addad, J.-P. C. in *Adsorption on silica surfaces - Surfactant Science Series vol.90* (ed. Papirer, E.) 621–624 (2000).
- [67] Weston, A. & Brown, P. R. *HPLC and CE Principles and Practice*. (Academic Press, 1997).
- [68] Dolan, J. W. Peak Tailing and Resolution. *LC GC Eur. - LC Troubl.* 6–9 (2002).
- [69] Neue, U. D. *HPLC Columns - Theory, Technology, and Practice*. (Wiley-VCH: Verlag GmbH & Co. KGaA, 1997).
- [70] Augusto, J., Paschoal, R., Pereira, F. & Reyes, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Quim. Nova* **31**, 1190–1198 (2008).
- [71] Nic, M., Jirat, J. & Kosata, B. IUPAC - Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the 'Gold Book'): retention factor, k. (2014). Available at: <https://goldbook.iupac.org/R05359.html>. (Accessed: 2nd January 2017)

- [72] da Silva, C. G. A., Collins, C. H. & Bottoli, C. B. G. Monolithic capillary columns based on silica and zirconium oxides for use in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Microchem. J.* **116**, 249–254 (2014).
- [73] Ishizuka, N. *et al.* Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **960**, 85–96 (2002).
- [74] Bottoli, C. B. G. Sorção, imobilização e extração de polissiloxanos em sílicas porosas para uso em cromatografia líquida de alta eficiência. (Tese - Unicamp, 2002).
- [75] Vigna, C. R. M. Tratamento térmico na imobilização de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência. (Dissertação - Unicamp, 2004).
- [76] Motokawa, M. *et al.* Monolithic silica columns with various skeleton sizes and through-pore sizes for capillary liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **961**, 53–63 (2002).