



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Tese de Doutorado

*Desenvolvimento de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta
Eficiência em Fase Reversa a partir da Adsorção e Imobilização do
Poli(metiltetradecilsiloxano) sobre Sílica Metalizada.*

Anizio Marcio de Faria

Orientadora: **Prof^a. Dra. Carol Hollingworth Collins**

L_ABCROM Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida

CAMPINAS – SP

2006

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

F225d Faria, Anizio Marcio de.
Desenvolvimento de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa a partir da adsorção e imobilização do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre sílica metalizada / Anízio Marcio de Faria. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientadora: Carol Hollingworth Collins.

Tese - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Fases estacionárias reversas. 2. Cromatografia líquida de alta eficiência. 3. Poli(metiltetradecilsiloxano). 4. Suporte de sílica metalizada. I. Collins, Carol Hollingworth. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Development of stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography by adsorption and immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) onto metalized silica supports

Palavras-chaves em inglês: Reversed stationary phases, High-performance liquid chromatography, Poly(methyltetradecylsiloxane), Metalized silica support

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Carol Hollingworth Collins (orientadora), Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz (DEQ-UFV); Fernando Mauro Lanças (IQSC-USP); Fabio Augusto (IQ-UNICAMP); José Alberto Fracassi da Silva (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 01/12/2006

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

Aos meus pais, Rita e Vantuil (in memoriam), às minhas irmãs Aline e Adriana, às minhas sobrinhas Fabiana, Fabíola e Bruna e à minha sempre amada Leila, que foram lembrados com amor e carinho em cada letra aqui digitada,

dedico.

AGRADECIMENTOS

À prof. Dra. Carol, sinônimo de ciência e exemplo de dignidade, pela oportunidade, confiança e muitos, muitos indispensáveis ensinamentos que permitiram a minha evolução e deste trabalho ao longo dos 3 anos de doutorado. Pela amizade, pela cobrança e liberdade para conduzir o projeto.

À Prof. Dra. Isabel Jardim e ao prof. Dr. Kenneth Collins, pela disponibilidade e importantes sugestões para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos do LabCrom; em especial, aos amigos de todas as horas: Liane, Lais, Louise e Daniel, pelos muitos momentos de discussão, companheirismo, apoio e diversão, tornando a minha vida muito mais agradável, tanto pessoal como profissionalmente, em Campinas. Aos bons amigos e colegas de trabalho: César, Elias, Vanessa, Milva, Livia, Cristian, Priscila, Camila, Priscila Lalli, Marisa, Karen, Rose, Zahra, Edivan, Dânia, Wilker, Adriana, André, Rafaela, Alessandra, Dione, Fabiano, Fernanda, Mari, Josimara, Leonardo, Lika, Marcelo, Cintia, Roberta e Ricardo pelo convívio agradável e pelo companheirismo.

Ao pessoal do laboratório da frente, em especial à Ana Maria, Carlos e Alexandre pela amizade que fica.

Ao professores, técnicos e funcionários do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas que tiveram contribuições diretas para a conclusão deste projeto.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro para participação nas reuniões científicas.

Ao assessor da FAPESP, pela contribuição com olhar crítico sobre os relatórios.

Ao prof. Richard Landers do Instituto de Física da Unicamp, pelas medidas de EFX.

Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) pelas facilidades oferecidas nas análises de microscopia.

À Embrarad (Empresa Brasileira de Irradiação) e à CBE (Companhia Brasileira de Esterilização S.A.) pelas irradiações gama das fases estacionárias.

Às sempre amigos, que mesmo distantes, tem uma parcela de responsabilidade imensurável na minha formação, Maria Eliana e Antônio Augusto.

Ào Jony, professor do IMECC, pela amizade que ficará em forma de respeito e admiração, pelo suporte e pelas inúmeras caronas para a Unicamp.

Àos amigos de repúblicas: Aloísio, Alexandre, Renato, César, Altair, Eduardo, Kennedy e Rogério pelo convívio e pela amizade que fica.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, meu eterno agradecimento.

CURRICULUM VITAE

1. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Bacharelado e licenciatura plena em Química**, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG, Agosto de 2001.
- **Mestrado em Agroquímica**, Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG, Agosto de 2003. Título da dissertação: “**Dissulfoton: Avaliação da Mobilidade e Extração Ponto Nuvem**”, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Eliana L. R. de Queiroz.

2. INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- Bolsista do Programa PIBIC/CNPq-UFV de Agosto de 1998 a Julho de 1999. Orientadora: Profa. Dra. Maria Eliana L. R. de Queiroz.
- Bolsista do Programa PIBIC/CNPq-UFV de Agosto de 1999 a Julho de 2000. Orientadora: Profa. Dra. Maria Eliana L. R. de Queiroz.

3. EXPERIÊNCIA ACADÊMICA

- Monitor da Disciplina QUI-311 (Métodos de Separação), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 03/2002 a 07/2002.
- Monitor da Disciplina QA-316 (Química Analítica Instrumental I), Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 03/2006 a 07/2006.

4. PRÊMIOS E TÍTULOS

- Menção Honrosa - Melhor Trabalho do Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- Menção Honrosa - Melhor Trabalho do Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 2001.

5. INDICADORES DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- Trabalhos apresentados em eventos nacionais: **28**, sendo **6** na forma de comunicação oral.
- Trabalhos apresentados em eventos internacionais: **11**

6. ARTIGOS CIENTÍFICOS

- 1- **A.M. Faria**, C.B.G.Bottoli, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, Fases Estacionárias Monolíticas: Uma Nova Abordagem em Separações Cromatográficas. **Quim. Nova** 29 (2006) 300-309.

- 2- **A.M. Faria**, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, Immobilized Polymeric Stationary Phases Using Metalized Silica Supports. **J. Sep. Sci.** 29 (2006) 782-789.
- 3- **A.M. Faria**, K.E. Collins, C.H. Collins, New Stationary Phases for HPLC based on Poly(methyltetradecylsiloxane) Thermally Immobilized onto Zirconized Silica. **J. Chromatogr. A** 1122 (2006) 114-122.
- 4- **A.M. Faria**, L. Maldaner, C.C. Santana, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, Poly(methyltetradecylsiloxane) Immobilized onto Silica for Extraction of Multiclass Pesticides from Surface Waters. **Anal. Chim. Acta** (2006) *no prelo*.
- 5- **A.M. Faria**, R.P. Dardengo, C.F. Lima, A.A. Neves, M.E.L.R. Queiroz, Determination of Disulfoton in Surface Water Samples by Cloud Point Extraction and Gas Chromatography. **Int. J. Environ. Anal. Chem.** (2006) *no prelo*.
- 6- **A.M. Faria**, K.E. Collins, C.H. Collins, Preparation and Characterization of Poly(methyltetradecylsiloxane) Stationary Phases Immobilized by Gamma Radiation onto Zirconized Silica. **J. Chromatogr. A** (2006) *no prelo*.
- 7- **A.M. Faria**, E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins, Stability of Poly(methyltetradecylsiloxane) Sorbed and Immobilized onto Zirconized and Unmodified Silica as Stationary Phases for High-Performance Liquid Chromatography. **J. Chromatogr. A** (2006) *Submetido*.
- 8- **A.M. Faria**, D.R. Magalhães, K.E. Collins, C.H. Collins, Characterization of Zirconized Silica Supports for HPLC. **Anal. Chim. Acta** 550 (2005) 137-143.
- 9- **A.M. Faria**, M.E.L.R. Queiroz, A.A. Neves, Extração por Ponto Nuvem. Uma Técnica Alternativa para a Extração de Resíduos de Agrotóxicos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente** 15 (2005) 29-42.
- 10- **A.M. Faria**, D.R. Magalhães, C.H. Collins, Characterization of Titanized-Silica Chromatographic Supports for High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Revista Matéria** 9 (2004) 344-354.

RESUMO

Desenvolvimento de Fases Estacionárias para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa a partir da Adsorção e Imobilização do Poli(Metiltetradecilsiloxano) sobre Sílica Metalizada.

Autor: Anizio Marcio de Faria

Orientadora: Profa. Dra. Carol Hollingworth Collins

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de fases estacionárias para utilização em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE-FR) a partir da sorção e imobilização de poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS) sobre suportes de sílica metalizada (sílica zirconizada e sílica titanizada). O preparo dos suportes de sílica metalizada foi otimizado, aplicando-se planejamento de experimentos. Dois procedimentos de imobilização, tratamento térmico e radiação gama, e o fenômeno de auto-imobilização do PMTDS foram otimizados para o preparo das fases estacionárias. Os suportes, o PMTDS e as fases estacionárias foram caracterizados por testes físico-químicos e cromatográficos. As fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS), independente do procedimento de imobilização aplicado, resultaram em colunas com eficiências entre 58.000 e 84.000 pratos m^{-1} e boa separação, com picos simétricos para compostos apolares. A presença do óxido metálico no suporte resultou em fases estacionárias com caráter ácido acentuado, principalmente para fases à base de sílica zirconizada, apresentando baixo desempenho cromatográfico para compostos básicos. No entanto, a estabilidade das fases preparadas com sílica metalizada foi prolongada em condições drásticas de fase móvel, cerca de seis vezes, comparadas às fases similares baseadas em sílica nua. As fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) apresentam potencialidade na separação de diferentes classes de fármacos e agroquímicos.

ABSTRACT

Development of Stationary Phases for Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography by Adsorption and Immobilization of Poly(methyltetradecylsiloxane) onto Metalized Silica Supports.

Author: Anizio Marcio de Faria

Supervisor: Prof. Dr. Carol Hollingworth Collins

This work presents the development of stationary phases for used in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) by sorption and immobilization of poly(methyltetradecylsiloxane) (PMTDS) onto metalized (zirconized and titanized) silica supports. The preparation of metalized silica supports was optimized using experimental design. Two immobilization procedures, thermal treatment and gamma radiation, and the self-immobilization phenomenon were evaluated for preparation of the PMTDS stationary phases. The supports, PMTDS and the stationary phases were characterized by physiochemical and chromatographic tests. Si-Zr(PMTDS) and Si-Ti(PMTDS) stationary phases, independent of the immobilization procedure used, provide column efficiencies between 58,000 and 84,000 plates per meter and good separations with symmetrical peaks for apolar compounds. The presence of the metallic oxides on the chromatographic support resulted in stationary phases with accentuated acid character, principally for zirconized-silica-based stationary phases, providing poor chromatographic performance for basic compounds. However, the chemical stability of metalized silica-based stationary phases in alkaline mobile phases was prolonged about six times, compared with bare silica counterparts. Both Si-Zr(PMTDS) and Si-Ti(PMTDS) stationary phases present potential for separation of different pharmaceuticals and pesticides.

SUMÁRIO

RESUMO _____	IX
ABSTRACT _____	X
SUMÁRIO _____	XI
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS _____	XV
LISTA DE TABELAS _____	XVIII
LISTA DE FIGURAS _____	XXI
1. INTRODUÇÃO _____	1
1.1. SUPORTES CROMATOGRÁFICOS _____	1
1.2. SUPORTES CROMATOGRÁFICOS ALTERNATIVOS _____	5
1.2.1. MÉTODOS DE PREPARO DE ÓXIDOS MISTOS COMO SUPORTES PARA CLAE-FR _____	9
1.2.1.1. Reação com alcóxidos metálicos _____	10
1.2.1.2. Co-precipitação de silicato de sódio com cloretos metálicos _____	10
1.2.1.3. Emulsão em óleo _____	10
1.2.1.4. Reação com cloretos metálicos _____	11
1.2.1.5. Técnica da deposição auto-organizada de camadas de óxidos metálicos _____	11
1.3. FASES ESTACIONÁRIAS _____	12
1.3.1. FASES ESTACIONÁRIAS QUIMICAMENTE LIGADAS _____	12
1.3.2. FASES ESTACIONÁRIAS COM POLÍMEROS SORVIDOS OU IMOBILIZADOS EM SUPORTES DE SÍLICA _____	16
1.3.2.1. Radiação gama _____	19
1.3.2.2. Radiação microondas _____	20
1.3.2.3. Tratamento térmico _____	21
1.3.3. FASES ESTACIONÁRIAS BASEADAS EM SUPORTES ALTERNATIVOS RECOBERTOS COM POLÍMERO _____	22
1.3.4. HISTÓRICO E PERSPECTIVAS DAS FASES ESTACIONÁRIAS BASEADAS EM SUPORTES DE SÍLICA METALIZADA _____	23
1.4. SELETIVIDADE DA FASE ESTACIONÁRIA, POLI(METILTETRADECIL-SILOXANO) _____	26
1.5. TESTES CROMATOGRÁFICOS DE CARACTERIZAÇÃO _____	27
1.6. AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE FASES ESTACIONÁRIAS _____	28
1.7. PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS _____	33
2. OBJETIVOS _____	37

3. EXPERIMENTAL	39
3.1. REAGENTES	39
3.2. FASES ESTACIONÁRIAS COMERCIAIS	40
3.2.1. RECHEADAS NO LABORATÓRIO	40
3.2.2. COLUNAS COMERCIAIS PRONTAS	40
3.3. AGROQUÍMICOS E FÁRMACOS	41
3.3.1. AGROQUÍMICOS	41
3.3.2. FÁRMACOS	41
3.4. EQUIPAMENTOS	41
3.5. SÍNTESE DO SUPORTE DE SÍLICA METALIZADA	43
3.5.1. SÍLICA ZIRCONIZADA	43
3.5.2. SÍLICA TITANIZADA	44
3.5.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUPORTES DE SÍLICA METALIZADA	45
3.5.3.1. Espectroscopia de fluorescência de raios X	45
3.5.3.2. Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros	46
3.5.3.3. Microscopia eletrônica de varredura e de força atômica	46
3.5.3.4. Análise termogravimétrica	47
3.5.3.5. Espectroscopia de absorção no infravermelho	47
3.5.3.6. Espectroscopia de absorção no UV-vis com refletância difusa	47
3.5.3.7. Espectroscopia fotoeletrônica de raios X	47
3.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PMTDS	48
3.6.1. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO	48
3.7. PREPARO DA FASE ESTACIONÁRIA	49
3.7.1. SORÇÃO DA FASE LÍQUIDA AO SUPORTE	49
3.7.2. PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DO POLÍMERO AO SUPORTE CROMATOGRÁFICO	49
3.7.2.1. Tratamento térmico	50
3.7.2.2. Radiação gama - fonte de cobalto-60	51
3.7.2.3. Auto-imobilização das fases estacionárias	52
3.7.3. EXTRAÇÃO DO EXCESSO DO POLÍMERO	52
3.8. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FASES ESTACIONÁRIAS	52
3.8.1. ANÁLISE ELEMENTAR	52
3.8.2. ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA, VOLUME ESPECÍFICO E DIÂMETRO DE POROS	54
3.8.3. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA	54
3.8.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO	55

3.8.5. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ²⁹ Si _____	55
3.9. PREPARO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS _____	55
3.9.1. POLIMENTO DAS PAREDES INTERNAS DAS COLUNAS _____	55
3.9.2. SUSPENSÃO DA FASE ESTACIONÁRIA _____	56
3.9.3. RECHEIO DAS COLUNAS COM A FASE ESTACIONÁRIA _____	57
3.9.4. CONDICIONAMENTO DA FASE ESTACIONÁRIA _____	58
3.10. CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS FASES ESTACIONÁRIAS _____	59
3.10.1. PREPARO DAS FASES MÓVEIS _____	59
3.10.2. TESTES PRELIMINARES DE AVALIAÇÃO _____	59
3.10.3. MISTURA-TESTE DE ENGELHARDT _____	60
3.10.4. MISTURAS-TESTE DE TANAKA _____	60
3.11. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA DAS FASES ESTACIONÁRIAS _____	62
3.12. AVALIAÇÃO DA APLICABILIDADE DAS FASES ESTACIONÁRIAS _____	63
3.12.1. SEPARAÇÃO DE AGROQUÍMICOS _____	63
3.12.2. SEPARAÇÃO DE FÁRMACOS _____	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	67
4.1. SÍNTESE DO SUPORTE DE SÍLICA ZIRCONIZADA _____	67
4.1.1. PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 ⁵⁻² _____	67
4.1.2. PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL _____	70
4.2. SÍNTESE DO SUPORTE DE SÍLICA TITANIZADA _____	73
4.2.1. PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2 ⁴⁻¹ _____	74
4.2.2. PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL _____	76
4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUPORTES DE SÍLICAS METALIZADAS _____	79
4.3.1. ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA, VOLUME ESPECÍFICO E DIÂMETRO MÉDIO DE POROS _____	79
4.3.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E DE FORÇA ATÔMICA _____	80
4.3.3. ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS _____	83
4.3.4. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO _____	84
4.3.5. ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS COM REFLETÂNCIA DIFUSA _____	85
4.3.6. ESPECTROSCOPIA FOTOELETRÔNICA DE RAIOS X _____	87
4.4. SUMÁRIO DAS CARACTERIZAÇÕES DOS SUPORTES DE SÍLICA ZIRCONIZADA E TITANIZADA _____	89
4.5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PMTDS _____	90
4.5.1. ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA _____	90
4.5.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO _____	91
4.5.3. CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO _____	92

4.6. DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISES PARA AVALIAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIAS	93
4.7. EXTRAÇÃO DO PMTDS NÃO-SORVIDO OU NÃO-IMOBILIZADO DO SUPORTE	96
4.8. AVALIAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS PROCEDIMENTOS DE IMOBILIZAÇÃO DO PMTDS SOBRE SUPORTES DE SÍLICA METALIZADA	98
4.8.1. ESTUDO DA SORÇÃO DO PMTDS SOBRE SÍLICA ZIRCONIZADA	98
4.8.2. ESTUDO DA SORÇÃO DO PMTDS SOBRE SÍLICA TITANIZADA	103
4.8.3. AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DO PMTDS SOBRE SÍLICA ZIRCONIZADA	106
4.8.4. AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DO PMTDS SOBRE SÍLICA TITANIZADA	114
4.8.5. IMOBILIZAÇÃO DE PMTDS POR RAIOS GAMA SOBRE SÍLICA ZIRCONIZADA	121
4.8.6. IMOBILIZAÇÃO DE PMTDS POR RAIOS GAMA SOBRE SÍLICA TITANIZADA	125
4.8.7. SELETIVIDADE DAS FASES ESTACIONÁRIAS SI-ZR(PMTDS) E SI-TI(PMTDS)	129
4.9. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS FASES ESTACIONÁRIAS	130
4.9.1. ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA, VOLUME ESPECÍFICO E DIÂMETRO MÉDIO DE POROS	130
4.9.2. ANÁLISES TERMOGRAVIMÉTRICAS	132
4.9.3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO	133
4.9.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE ²⁹Si	134
4.10. CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS FASES ESTACIONÁRIAS	138
4.10.1. MISTURA-TESTE DE ENGELHARDT	138
4.10.2. MISTURAS-TESTE DE TANAKA	141
4.11. ESTABILIDADE QUÍMICA DAS FASES ESTACIONÁRIAS	149
4.12. ESTUDOS DE APLICAÇÃO DAS FASES ESTACIONÁRIAS	159
4.12.1. SEPARAÇÃO DE AGROQUÍMICOS	159
4.12.2. SEPARAÇÃO DE FÁRMACOS	161
5. CONCLUSÕES	165
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ρ – densidade do poli(metiltetradecilsiloxano).

τ – espessura de camada polimérica.

ν – graus de liberdade.

f - vazão de fase móvel.

μ - velocidade linear da fase móvel.

$\alpha_{B/P \text{ pH } 2,7}$ – capacidade de troca iônica em meio ácido.

$\alpha_{B/P \text{ pH } 7,6}$ – capacidade de troca iônica total.

$\alpha_{C/P}$ – capacidade de formação de ligação de hidrogênio.

α_{CH_2} – seletividade metilênica ou hidrofóbica.

$\alpha_{T/O}$ – seletividade estérica ou espacial.

Å – angstrom = 10^{-10} m.

AI – auto-imobilização.

ANOVA – análise da variância.

As – fator de assimetria a 10 % da altura do pico.

C12 – dodecil, $C_{12}H_{25}^-$.

C14 – tetradecil, $C_{14}H_{29}^-$.

C18 – octadecil, $C_{18}H_{37}^-$.

C8 – octil, $C_8H_{17}^-$.

CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência.

CP-MAS-NMR ^{29}Si - ressonância magnética nuclear de ^{29}Si com rotação em ângulo mágico e polarização cruzada.

d_p – diâmetro médio de poros.

DRIFT – infravermelho com refletância difusa.

Ef – efeito de uma variável.

EFX – espectroscopia fotoeletrônica de raios X.

ep – erro puro.

eV – elétrons volts.

F – fração de polímero immobilizada no suporte.

faj – falta de ajuste.

FE – fase(s) estacionária(s).

FEQL – fase(s) estacionária(s) quimicamente ligada(s).

FID – Free Induction Decay – decaimento livre induzido.
FM – fase(s) móvel(is).
FN – fase(s) estacionária(s) normal(is).
FR – fase(s) reversa(s).
FRX – espectroscopia de fluorescência de raios X.
FV – fonte de variação.
FWHM – “Full Width Half Maximum” – largura do pico à meia altura.
H – altura de um prato.
I – função geradora.
IP – índice de polidispersividade.
IUPAC – International Union Pure and Applied Chemistry – União Internacional de Química Pura e Aplicada.
IV – espectroscopia no infravermelho.
k – fator de retenção.
L – comprimento da coluna.
LabCrom – Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida do IQ-Unicamp.
MEV – microscopia eletrônica de varredura.
MFA – microscopia de força atômica.
 M_n – massa molar numérica média.
MQ – média quadrática.
 M_w – massa molar ponderal média.
 \bar{m}_{PMTDS} – massa de PMTDS por grama de suporte.
N – número de pratos ou eficiência da coluna.
N/L – eficiência de coluna por metro ou números de prato por metro.
ODS – octadecilsilano.
PBD – poli(butadieno).
PDMS – poli(dimetilsiloxano).
PMODS – poli(metiloctadecilsiloxano).
PMOS – poli(metiloctilsiloxano).
PMTDS – poli(metiltetradecilsiloxano).
PS-DVB – poliestireno-divinilbenzeno.
reg – regressão quadrática.
res – resíduos.
RG – radiação gama.

RP18 – octadecilsilano.

R_s – resolução entre dois picos adjacentes.

RSD - estimativa do desvio padrão relativo.

S – estimativa do erro dos efeitos.

S_{BET} – Área superficial específica determinada pelo método BET.

Si(PMTDS) - fase estacionária baseada na imobilização do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre partículas de sílica nua.

S_i^2 – variância individual.

Si-Ti(PMTDS) – fase estacionária baseada na imobilização do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre partículas de sílica titanizada.

Si-Zr(PMTDS) – fase estacionária baseada na imobilização do poli(metiltetradecilsiloxano) sobre partículas de sílica zirconizada.

SQ – soma quadrática.

t_i – parâmetro da distribuição de Student.

t_M – tempo de retenção de um composto não retido.

t_R – tempo de retenção.

TT – tratamento térmico.

UV-vis – região compreendida pela irradiação ultravioleta e luz visível.

V_{col} – volume de coluna cheia.

V_p – volume específico de poros.

w_b – largura de um pico na linha de base.

w_h – largura de um pico à meia altura.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA ZIRCONIZAÇÃO DA SÍLICA. ____ **44**
- TABELA 2.** VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS PARA A OTIMIZAÇÃO DA TITANIZAÇÃO DA SÍLICA. ____ **45**
- TABELA 3.** MATRIZ DO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA AS CONDIÇÕES DE TEMPO E TEMPERATURA DE IMOBILIZAÇÃO DAS FASES Si-Zr(PMTDS) E Si-Ti(PMTDS). PARA CONVERTER OS VALORES REAIS EM VALORES CODIFICADOS UTILIZAM-SE AS EQUAÇÕES: $x_1 = (T - 100)/20$ E $x_2 = (T - 12)/4$, NA QUAL T E T SÃO OS VALORES REAIS DE TEMPERATURA E TEMPO, RESPECTIVAMENTE. _____ **50**
- TABELA 4.** PERCENTAGENS DE ZIRCÔNIO INCORPORADAS NA SÍLICA DE ACORDO COM OS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{5-2} . _____ **68**
- TABELA 5.** EFEITOS DAS VARIÁVEIS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{5-2} E ESTIMATIVA DO ERRO DOS EFEITOS. _____ **69**
- TABELA 6.** PERCENTAGENS DE ZIRCÔNIO PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL. x_3 E x_5 REPRESENTAM OS VALORES DAS DUAS VARIÁVEIS CODIFICADOS PELAS EQUAÇÕES $x_3 = \frac{t-5}{1}$ E $x_5 = \frac{m-6,8}{0,8}$. _____ **70**
- TABELA 7.** ANÁLISE DA VARIÂNCIA DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO ÀS PERCENTAGENS DE ZIRCÔNIO. _____ **71**
- TABELA 8.** PERCENTAGEM DE TITÂNIO INCORPORADAS NA SÍLICA DE ACORDO COM OS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{4-1} . _____ **74**
- TABELA 9.** VALORES DOS EFEITOS PARA AS VARIÁVEIS ESTUDADAS NO PROCESSO DE TITANIZAÇÃO DA SÍLICA. _____ **75**
- TABELA 10.** PERCENTAGENS DE TITÂNIO PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL. x_2 E x_3 REPRESENTAM OS VALORES DOS DOIS FATORES, CODIFICADOS PELAS EQUAÇÕES $x_2 = \frac{t-4}{1}$ E $x_3 = \frac{T-40}{10}$. _____ **76**
- TABELA 11.** ANÁLISE DA VARIÂNCIA DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO ÀS PERCENTAGENS DE TITÂNIO. _____ **77**
- TABELA 12.** ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA, VOLUME E DIÂMETRO DE POROS DA SÍLICA PURA, ZIRCONIZADA E TITANIZADA. _____ **79**
- TABELA 13.** ENERGIAS DE LIGAÇÃO DOS ELEMENTOS NAS AMOSTRAS DE SÍLICAS METALIZADAS. ____ **87**

TABELA 14. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO PMTDS OBTIDAS POR CROMATOGRAFIA POR PERMEAÇÃO EM GEL. _____	93
TABELA 15. PERCENTAGENS DE PMTDS, ANTES E APÓS A EXTRAÇÃO DO POLÍMERO NÃO IMOBILIZADO NA SÍLICA ZIRCONIZADA, OBTIDAS PELOS DIFERENTES PROCEDIMENTOS EMPREGADOS. _____	97
TABELA 16. RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS DAS FASES Si-Zr(PMTDS) AUTO-IMOBILIZADAS. _	100
TABELA 17. RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS DAS FASES Si-Ti(PMTDS) AUTO-IMOBILIZADAS __	104
TABELA 18. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DAS FASES Si-Zr(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA DUAS VARIÁVEIS. _____	107
TABELA 19. ANÁLISE DA VARIÂNCIA DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO ÀS EFICIÊNCIAS DE COLUNA PARA O PICO DO NAFTALENO OBTIDAS PELAS FASES Si-Zr(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE. _____	111
TABELA 20. ANÁLISE DA VARIÂNCIA DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO AOS FATORES DE ASSIMETRIA PARA O PICO DO NAFTALENO OBTIDOS PELAS FASES Si-Zr(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE. _____	112
TABELA 21. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DAS FASES Si-Ti(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA DUAS VARIÁVEIS. _____	115
TABELA 22. ANÁLISE DA VARIÂNCIA DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO ÀS EFICIÊNCIAS DE COLUNA PARA O PICO DO NAFTALENO OBTIDAS PELAS FASES Si-Ti(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE. _____	118
TABELA 23. ANÁLISE DA VARIÂNCIA DO MODELO QUADRÁTICO AJUSTADO AOS FATORES DE ASSIMETRIA PARA O PICO DO NAFTALENO OBTIDOS PELAS FASES Si-Ti(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE. _____	119
TABELA 24. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DAS FASES Si-Zr(PMTDS) IMOBILIZADAS POR DIFERENTES DOSES DE RAIOS GAMA. _____	122
TABELA 25. PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS DAS FASES Si-Ti(PMTDS) IMOBILIZADAS POR DIFERENTES DOSES DE RAIOS GAMA. _____	126
TABELA 26. PROPRIEDADES FÍSICAS DAS FASES ESTACIONÁRIAS Si-Zr(PMTDS) E Si-Ti(PMTDS) E DOS SUPORTES DE SÍLICAS METALIZADAS. _____	131
TABELA 27. CARACTERIZAÇÃO CROMATOGRÁFICA DAS FASES Si-Zr(PMTDS) E Si-Ti(PMTDS) PELA MISTURA-TESTE DE ENGELHARDT. _____	140

TABELA 28. CARACTERÍSTICAS CROMATOGRÁFICAS DAS FASES SI-Zr(PMTDS) E SI-Ti(PMTDS) OBTIDAS PELAS MISTURAS-TESTE DE TANAKA.	143
TABELA 29. PERCENTAGEM DE MATERIAL LIGADO OU IMOBILIZADO AO SUPORTE CROMATOGRÁFICO, NAS FASES ESTACIONÁRIAS PREPARADAS NO LABORATÓRIO E COMERCIAIS, ANTES E APÓS O TESTE DE ESTABILIDADE.	158
TABELA 30. CARACTERÍSTICAS E APLICAÇÕES DAS FASES ESTACIONÁRIAS SI-Zr(PMTDS) E SI-Ti(PMTDS) PREPARADAS NESTE TRABALHO.	166

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** TIPOS DE GRUPOS SILANÓIS E LIGAÇÕES SILOXANO NA SUPERFÍCIE DA SÍLICA AMORFA. __ 3
- FIGURA 2.** REAÇÕES PARA O PREPARO DE FASES ESTACIONÁRIAS QUIMICAMENTE LIGADAS. _____ 13
- FIGURA 3.** AGENTES SILANOS EMPREGADOS NA ORGANOSSILANIZAÇÃO DE FASES ESTACIONÁRIAS, MONOFUNCIONAL (A), BIFUNCIONAL (B) E TRIFUNCIONAL (C). [R = CH₃; R' = NORMALMENTE, C₈H₁₇ OU C₁₈H₃₇; X = GRUPOS METÓXI OU ETÓXI OU CLORO]. _____ 14
- FIGURA 4.** TIPOS DE DEPOSIÇÃO POLIMÉRICA NOS POROS DO SUPORTE CROMATOGRÁFICO, RECOBRIMENTO DAS PAREDES DOS POROS (A) OU PREENCHIMENTO DO VOLUME DOS POROS (B)⁷. _____ 18
- FIGURA 5.** ESTRUTURA POLIMÉRICA DO PMTDS. _____ 27
- FIGURA 6.** O CROMATOGRAMA E SUAS INFORMAÇÕES CARACTERÍSTICAS. _____ 29
- FIGURA 7.** MEDIDA E CÁLCULO DO FATOR DE ASSIMETRIA DO PICO. _____ 31
- FIGURA 8.** CURVA DE VAN DEEMTER¹⁶². _____ 33
- FIGURA 9.** PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA DUAS VARIÁVEIS. (◆) PLANEJAMENTO FATORIAL 2², (+) PONTO CENTRAL E (●) PLANEJAMENTO AXIAL. _____ 35
- FIGURA 10.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM IRRADIADOR DE COBALTO-60¹⁶⁸. _____ 51
- FIGURA 11.** COLUNA CROMATOGRÁFICA E SUAS CONEXÕES. _____ 56
- FIGURA 12.** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE ENCHIMENTO DE COLUNAS. _____ 57
- FIGURA 13.** ESTRUTURA QUÍMICA DOS AGROQUÍMICOS ESTUDADOS. _____ 64
- FIGURA 14.** ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FÁRMACOS AVALIADOS NESTE ESTUDO. _____ 66
- FIGURA 15.** SUPERFÍCIE DE PERCENTAGENS DE ZIRCÔNIO INCORPORADAS À SUPERFÍCIE DA SÍLICA. 72
- FIGURA 16.** GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS. (●) VARIÁVEIS PRINCIPAIS OU INTERAÇÕES ENTRE DUAS OU MAIS VARIÁVEIS. _____ 75
- FIGURA 17.** SUPERFÍCIE DE PERCENTAGENS DE TITÂNIO INCORPORADAS À SÍLICA CROMATOGRÁFICA. _____ 78
- FIGURA 18.** FOTOMICROGRAFIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA COM AMPLIAÇÃO DE 2.000 VEZES DOS SUPORTES (A) DE SÍLICA NUA, (B) DE SÍLICA ZIRCONIZADA E (C) DE SÍLICA TITANIZADA. EM DETALHE NO CANTO SUPERIOR ESQUERDO DAS IMAGENS: AMPLIAÇÃO DAS PARTÍCULAS EM 7.000 VEZES. _____ 81
- FIGURA 19.** IMAGENS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA DA SUPERFÍCIE DE UMA PARTÍCULA DE SÍLICA ZIRCONIZADA (A) E DE UMA PARTÍCULA DE SÍLICA TITANIZADA (B). _____ 82
- FIGURA 20.** TERMOGRAMAS DOS SUPORTES DE SÍLICA ZIRCONIZADA (A) E TITANIZADA (B). _____ 83

FIGURA 21. ESPECTROS DA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA OS SUPORTES DE SÍLICA NUA, SÍLICA ZIRCONIZADA E SÍLICA TITANIZADA. _____	84
FIGURA 22. ESPECTROS DE ABSORÇÃO NO UV-VIS COM REFLETÂNCIA DIFUSA DE ZRO ₂ PURO, DA AMOSTRA DE SÍLICA ZIRCONIZADA E DE UMA MISTURA MECÂNICA DE SiO ₂ E ZRO ₂ . _____	86
FIGURA 23. ESPECTROS DE UV-VIS COM REFLETÂNCIA DIFUSA DE TiO ₂ PURO, DA AMOSTRA DE SÍLICA TITANIZADA E DE UMA MISTURA MECÂNICA DE SiO ₂ E TiO ₂ . _____	86
FIGURA 24. ESPECTROS DE EFX PARA O O 1s DAS AMOSTRAS DE (A) SÍLICA ZIRCONIZADA (21,6 % ZR) E (B) MISTURA FÍSICA SiO ₂ /ZRO ₂ (22 % ZR). _____	88
FIGURA 25. ESPECTROS DE EFX PARA O O 1s DAS AMOSTRAS DE (A) SÍLICA TITANIZADA (7,8 % Ti) E (B) MISTURA FÍSICA SiO ₂ /TiO ₂ (8 % Ti). _____	89
FIGURA 26. TERMOGRAMA DO POLI(METILTETRADECILSILOXANO). _____	90
FIGURA 27. ESPECTRO DA REGIÃO DO INFRAVERMELHO PARA O POLI(METILTETRADECILSILOXANO). _____	92
FIGURA 28. CROMATOGRAMA DE PERMEAÇÃO EM GEL DO POLI(METILTETRADECILSILOXANO). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: COLUNA ULTRASTYRAGEL 7,8 × 30 MM; FASE MÓVEL: TETRAIDROFURANO; VAZÃO: 1,0 ML MIN ⁻¹ ; VOLUME DE AMOSTRA: 200 µL; TEMPERATURA DE 40 °C E DETECÇÃO POR ÍNDICE DE REFRAÇÃO. _____	93
FIGURA 29. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE I POR UMA FASE Si-Zr(PMTDS) IMOBILIZADA TERMICAMENTE A 120 °C POR 12 H, EMPREGANDO DIFERENTES CONDIÇÕES DE FASE MÓVEL. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: VAZÃO DE FASE MÓVEL: 0,3 ML MIN ⁻¹ ; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS ANALISADOS: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO. _____	94
FIGURA 30. CURVA DE VAN DEEMTER PARA UMA FASE DE Si-Zr(PMTDS) IMOBILIZADA TERMICAMENTE. _____	95
FIGURA 31. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE I PELAS FASES Si-Zr(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE E SUBMETIDAS AOS DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA 70:30 (v/v), VAZÃO DE 0,3 ML MIN ⁻¹ ; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO. _____	97
FIGURA 32. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE I PELAS FASES Si-Zr(PMTDS) AUTO-IMOBILIZADAS. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,3 ML MIN ⁻¹ ; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO. _____	99

- FIGURA 33.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE II PELAS FASES SI-ZR(PMTDS) AUTO-IMOBILIZADAS. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) N,N-DIMETILANILINA, (4) NAFTALENO E (5) ACENAFTENO. _____ **102**
- FIGURA 34.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE I PELAS FASES SI-TI(PMTDS) AUTO-IMOBILIZADAS. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO. A DIFERENÇA NAS INTENSIDADES DOS PICOS DE UM MESMO COMPOSTO NOS CROMATOGRAMAS SE DEVE AO PREPARO DE DIFERENTES MISTURAS-TESTE AO LONGO DESTE ESTUDO. _____ **103**
- FIGURA 35.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE II PELAS FASES SI-TI(PMTDS) AUTO-IMOBILIZADAS. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) N,N-DIMETILANILINA, (4) NAFTALENO E (5) ACENAFTENO. A DIFERENÇA NAS INTENSIDADES DOS PICOS DE UM MESMO COMPOSTO NOS CROMATOGRAMAS SE DEVE AO PREPARO DE DIFERENTES MISTURAS-TESTE AO LONGO DESTE ESTUDO. _____ **105**
- FIGURA 36.** EFEITOS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS, E DA RESPECTIVA INTERAÇÃO, NA EFICIÊNCIA DE COLUNA DAS FASES ESTACIONÁRIAS SI-ZR(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE. _____ **107**
- FIGURA 37.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE I EMPREGANDO AS FASES SI-ZR(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO. _____ **108**
- FIGURA 38.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MISTURA-TESTE II PELAS FASES SI-ZR(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) N,N-DIMETILANILINA, (4) NAFTALENO E (5) ACENAFTENO. _____ **110**
- FIGURA 39.** SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS DA IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DE PMTDS SOBRE PARTÍCULAS DE SÍLICA ZIRCONIZADA. (A) EFICIÊNCIAS DE COLUNA E (B) FATORES DE ASSIMETRIA, MEDIDOS PARA O PICO DO NAFTALENO. _____ **113**

- FIGURA 40.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE I EMPREGANDO AS FASES SI-Ti(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,2 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO. _____ **116**
- FIGURA 41.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MISTURA-TESTE II PELAS FASES SI-Ti(PMTDS) IMOBILIZADAS TERMICAMENTE. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,2 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) N,N-DIMETILANILINA, (4) NAFTALENO E (5) ACENAFTENO. A DIFERENÇA NAS INTENSIDADES DOS PICOS DE UM MESMO COMPOSTO NOS CROMATOGRAMAS SE DEVE AO PREPARO DE DIFERENTES MISTURAS-TESTE AO LONGO DESTE ESTUDO. _____ **117**
- FIGURA 42.** SUPERFÍCIES DE RESPOSTAS DA IMOBILIZAÇÃO TÉRMICA DE PMTDS SOBRE PARTÍCULAS DE SÍLICA TITANIZADA. (A) EFICIÊNCIAS DE COLUNA E (B) FATORES DE ASSIMETRIA, MEDIDOS PARA O PICO DO NAFTALENO. _____ **120**
- FIGURA 43.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MISTURA-TESTE I PELAS FASES SI-Zr(PMTDS) IMOBILIZADAS POR RADIAÇÃO GAMA. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO. _____ **123**
- FIGURA 44.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MISTURA-TESTE II PELAS FASES SI-Zr(PMTDS) IMOBILIZADAS POR RADIAÇÃO GAMA. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) N,N-DIMETILANILINA, (4) NAFTALENO (5) ACENAFTENO. _____ **124**
- FIGURA 45.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MISTURA-TESTE I PELAS FASES SI-Ti(PMTDS) IMOBILIZADAS POR RADIAÇÃO GAMA. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,2 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) BENZONITRILA, (3) BENZENO, (4) TOLUENO E (5) NAFTALENO. _____ **127**
- FIGURA 46.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MISTURA-TESTE II PELAS FASES SI-Ti(PMTDS) IMOBILIZADAS POR RADIAÇÃO GAMA. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (70:30, v/v); 0,2 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA INJETADA: 5 µL;

- DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 25 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) N,N-DIMETILANILINA, (4) NAFTALENO (5) ACENAFTENO. _____ **128**
- FIGURA 47.** TERMOGRAMAS TÍPICOS DAS FASES (A) SI-ZR(PMTDS) E (B) SI-TI(PMTDS). _____ **132**
- FIGURA 48.** ESPECTROS DA REGIÃO DO INFRAVERMELHO DO SUPORTE DE SÍLICA ZIRCONIZADA E DAS FASES SI-ZR(PMTDS) (A) E DO SUPORTE DE SÍLICA TITANIZADA E DAS FASES SI-TI(PMTDS) (B). _____ **134**
- FIGURA 49.** ESPECTROS DE RMN DE ²⁹SI DAS FASES SI-ZR(PMTDS) E DE UMA FASE SI(PMTDS) IMOBILIZADA TERMICAMENTE. _____ **135**
- FIGURA 50.** ESPÉCIES DE SILÍCIO PRESENTES NAS FASES ESTACIONÁRIAS. _____ **136**
- FIGURA 51.** ESPECTROS DE RMN DE ²⁹SI DAS FASES SI-TI(PMTDS). _____ **137**
- FIGURA 52.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE DE ENGELHARDT E JUNGHEIM PELAS FASES SI-ZR(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (55:45, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) ANILINA, (3) FENOL, (4) N,N-DIMETILANILINA, (5) TOLUENO, (6) ETILBENZENO E (*) IMPUREZAS. _____ **139**
- FIGURA 53.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE DE ENGELHARDT E JUNGHEIM PELAS FASES SI-TI(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (55:45, v/v); 0,2 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) ANILINA, (3) FENOL, (4) N,N-DIMETILANILINA, (5) TOLUENO, (6) ETILBENZENO E (*) IMPUREZAS. _____ **141**
- FIGURA 54.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE A DO PROTOCOLO DE TANAKA PELAS FASES SI-ZR(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (80:20, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) BUTILBENZENO, (3) PENTILBENZENO, (4) O-TERFENIL E (5) TRIFENILENO. _____ **142**
- FIGURA 55.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE A DO PROTOCOLO DE TANAKA PELAS FASES SI-TI(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (80:20, v/v); 0,2 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) BUTILBENZENO, (3) PENTILBENZENO, (4) O-TERFENIL E (5) TRIFENILENO. _____ **144**
- FIGURA 56.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE B DO PROTOCOLO DE TANAKA PELAS FASES SI-ZR(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (30:70, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) CAFEÍNA E (3) FENOL. _____ **145**

- FIGURA 57.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE B DO PROTOCOLO DE TANAKA PELAS FASES SI-Ti(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (30:70, v/v); 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) CAFEÍNA E (3) FENOL. _____ **145**
- FIGURA 58.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE C DO PROTOCOLO DE TANAKA PELAS FASES SI-Zr(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 MOL L⁻¹ (30:70, v/v) PH 7,6; 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) BENZILAMINA E (*) IMPUREZAS. _____ **147**
- FIGURA 59.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE C DO PROTOCOLO DE TANAKA PELAS FASES SI-Ti(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 MOL L⁻¹ (30:70, v/v) PH 7,6; 0,2 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) BENZILAMINA E (*) IMPUREZAS. _____ **147**
- FIGURA 60.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE D DO PROTOCOLO DE TANAKA PELAS FASES SI-Zr(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:KH₂PO₄/H₃PO₄ 0,02 MOL L⁻¹ (30:70, v/v) PH 2,7; 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) BENZILAMINA E (*) IMPUREZAS. _____ **148**
- FIGURA 61.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DA MISTURA-TESTE D DO PROTOCOLO DE TANAKA PELAS FASES SI-Ti(PMTDS). CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:KH₂PO₄/H₃PO₄ 0,02 MOL L⁻¹ (30:70, v/v) PH 2,7; 0,2 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; DETECÇÃO A 254 NM E TEMPERATURA DE 40 °C. COMPOSTOS TESTES: (1) URACILA, (2) FENOL, (3) BENZILAMINA E (*) IMPUREZAS. _____ **149**
- FIGURA 62.** VARIAÇÃO DO FATOR DE RETENÇÃO DAS FASES (A) SI-Zr(PMTDS), (B) SI-Ti(PMTDS), (C) SI(PMTDS) E (D) COMERCIAIS QUIMICAMENTE LIGADAS À BASE DE C18 COM A PASSAGEM DE FASE MÓVEL METANOL:0,050 MOL L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ A PH 10 (70:30, v/v); VAZÃO DE 1,0 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 1 µL; TEMPERATURA DO FORNO DA COLUNA DE 50 °C; DETECÇÃO UV-VIS A 254 NM. ANALITO-TESTE: ACENAFTENO. _____ **151**
- FIGURA 63.** CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DA MISTURA-TESTE II, ANTES (A) E APÓS (B) O TESTE DE ESTABILIDADE, PELA FASE SI-Zr(PMTDS) IMOBILIZADA POR RAIOS GAMA. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:0,050 MOL L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ A PH 10 (70:30, v/v); VAZÃO DE 0,3 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA 1 µL; TEMPERATURA DE 50 °C; DETECÇÃO UV-VIS A 254 NM. _____ **152**

FIGURA 64. VARIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE COLUNA DAS FASES (A) SI-ZR(PMTDS), (B) SI-TI(PMTDS), (C) SI(PMTDS) E (D) COMERCIAIS QUIMICAMENTE LIGADAS À BASE DE C18 COM A PASSAGEM DE FASE MÓVEL METANOL:0,050 MOL L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ A PH 10 (70:30, V/V); VAZÃO DE 1,0 ML MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 1 µL; TEMPERATURA DO FORNO DA COLUNA DE 50 °C; DETECÇÃO UV-VIS A 254 NM. ANALITO-TESTE: ACENAFTENO. _____ **153**

FIGURA 65. VARIAÇÃO DO FATOR DE ASSIMETRIA PARA O PICO DO ACENAFTENO OBTIDO PELAS FASES (A) SI-ZR(PMTDS), (B) SI-TI(PMTDS), (C) SI(PMTDS) E (D) COMERCIAIS QUIMICAMENTE LIGADAS À BASE DE C18 COM A PASSAGEM DE FASE MÓVEL METANOL:0,050 MOL L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ A PH 10 (70:30, V/V); VAZÃO DE 1,0 ML MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 1 µL; TEMPERATURA DO FORNO DA COLUNA DE 50 °C; DETECÇÃO UV A 254 NM. _____ **155**

FIGURA 66. VARIAÇÃO DO FATOR DE ASSIMETRIA PARA O PICO DA N,N-DIMETILANILINA OBTIDO PELAS FASES (A) SI-ZR(PMTDS), (B) SI-TI(PMTDS), (C) SI(PMTDS) E (D) COMERCIAIS QUIMICAMENTE LIGADAS À BASE DE C18 COM A PASSAGEM DE FASE MÓVEL METANOL:0,050 MOL L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ A PH 10 (70:30, V/V); VAZÃO DE 1,0 ML MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 1 µL; TEMPERATURA DO FORNO DA COLUNA DE 50 °C; DETECÇÃO UV A 254 NM. _____ **156**

FIGURA 67. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DE UMA MISTURA DE AGROQUÍMICOS PELAS FASES (A) SI-ZR(PMTDS) IMOBILIZADA TERMICAMENTE A 100 °C POR 12 H E (B) KROMASIL C18. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:ÁGUA (50:50, V/V); VAZÃO DE (A) 0,3 ML MIN⁻¹ E (B) 0,8 ML MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; TEMPERATURA DE 25 °C; DETECÇÃO UV A 254 NM. COMPOSTOS: (1) IMAZETAPIR, (2) CIANAZINA, (3) CARBOXIM, (4) ATRAZINA, (5) DIUROM, (6) LINUROM E (*) PRODUTO DE DEGRADAÇÃO DO IMAZETAPIR. A DIFERENÇA NAS INTENSIDADES DOS PICOS DE UM MESMO COMPOSTO NOS CROMATOGRAMAS SE DEVE AO PREPARO DE DIFERENTES MISTURAS-TESTE AO LONGO DESTE ESTUDO. _____ **160**

FIGURA 68. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DE UMA MISTURA DE FÁRMACOS PELA FASE SI-ZR(PMTDS) IMOBILIZADA POR RAIOS GAMA A 120 KGY. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL METANOL:0,020 MMOL L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄ A PH 11 (50:50, V/V); VAZÃO DE 0,3 ML MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; TEMPERATURA DE 25 °C; DETECÇÃO UV A 254 NM. COMPOSTOS: (1) PARACETAMOL, (2) IBUPROFENO, (3) LORAZEPAM E (4) ALPRAZOLAM. _____ **161**

FIGURA 69. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DE UMA MISTURA DE FÁRMACOS BÁSICOS PELAS FASES (A) SI-TI(PMTDS) IMOBILIZADA TERMICAMENTE A 120 °C POR 12 H E (B) LUNA C8. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL (A) METANOL:0,020 MOL L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄ A PH 12 (80:20, V/V) E (B) METANOL:ÁGUA A PH 7 (65,35, V/V); VAZÃO DE (A) 0,3 ML MIN⁻¹ E (B) _____

1,0 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; TEMPERATURA DE 25 °C; DETECÇÃO UV A 254 NM. COMPOSTOS: (1) CEFALEXINA, (2) PRILOCAÍNA E (3) AMITRIPTILINA. _____ **162**

FIGURA 70. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DE UMA MISTURA DE FÁRMACOS ÁCIDOS PELAS FASES (A) SI-TI(PMTDS) IMOBILIZADA TERMICAMENTE A 120 °C POR 12 H E (B) CHROMOLITH RP18. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL (A) METANOL:ÁGUA (40:60, v/v) E (B) ACETONITRILA:ÁGUA (50:50, v/v); VAZÃO DE (A) 0,3 mL MIN⁻¹ E (B) 0,6 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; TEMPERATURA DE 25 °C; DETECÇÃO UV A 254 NM. COMPOSTOS: (1) METIL-, (2) PROPIL-, (3) BUTIL-PARABENO. A DIFERENÇA NAS INTENSIDADES DOS PICOS DE UM MESMO COMPOSTO NOS CROMATOGRAMAS SE DEVE AO PREPARO DE DIFERENTES MISTURAS-TESTE AO LONGO DESTE ESTUDO. _____ **163**

FIGURA 71. CROMATOGRAMAS DA SEPARAÇÃO DE UMA MISTURA DE FÁRMACOS PELAS FASES (A) SI-TI(PMTDS) IMOBILIZADA TERMICAMENTE A 120 °C POR 12 H E (B) LUNA C8. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: FASE MÓVEL (A) METANOL:ÁGUA (50:50, v/v) E (B) METANOL:ÁGUA PH 2,5 (30:70, v/v); VAZÃO DE (A) 0,3 mL MIN⁻¹ E (B) 1,0 mL MIN⁻¹; VOLUME DE AMOSTRA: 5 µL; TEMPERATURA DE 25 °C; DETECÇÃO UV A 254 NM. COMPOSTOS: (1) ÁCIDO ACETILSALISÍLICO, (2) PARACETAMOL E (3) CAFEÍNA. _____ **164**

1. INTRODUÇÃO

Em muitos laboratórios, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) se tornou uma técnica indispensável para a análise de amostras, determinação de constantes físicas e isolamento de componentes de misturas complexas. Atualmente, a CLAE encontrou uma ampla aceitação como técnica analítica de escolha em muitas áreas científicas e de aplicação, tais como: ciências da vida, alimentos, polímeros sintéticos e química ambiental. O desenvolvimento ainda contínuo e a disponibilidade de fases estacionárias (FE) de alta qualidade e equipamentos de alto desempenho se apresentam como fatores primordiais para o crescente interesse de pesquisas e aplicações em CLAE.

Embora o desenvolvimento da modalidade de fase reversa (FR) da CLAE tenha iniciado há quase quatro décadas atrás, pesquisas e aplicações envolvendo tal modalidade ainda ocupam um lugar proeminente na literatura. A grande popularidade da CLAE-FR se deve principalmente às suas inúmeras vantagens, tais como: uso de fases móveis de menor custo, devido à presença de água em sua composição; rápido equilíbrio da coluna após a mudança de fase móvel (FM); possibilidade da condução de separações no modo de eluição por gradiente, resultando em maior rapidez e melhor separação nas análises; boa repetibilidade dos tempos de retenção; amplo campo de atuação, devido à possibilidade de separação de compostos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades; dentre outras^{1,2}.

Sistemas de CLAE-FR consistem de FE de caráter menos polar que a FM. Normalmente, as fases estacionárias são constituídas de espécies orgânicas ligadas quimicamente³⁻⁵ ou imobilizadas⁶⁻⁸ ou apenas sorvidas^{9,10} em um suporte cromatográfico, convencionalmente um óxido inorgânico, tal como a sílica.

1.1. Suportes cromatográficos

As fases estacionárias reversas normalmente são compostas de um líquido estacionário sorvido, ligado ou imobilizado a um suporte cromatográfico. O material a ser utilizado como suporte, no entanto, necessita de alguns requisitos para que a FE apresente desempenho satisfatório nas separações cromatográficas. Um material ideal, para ser utilizado como suporte, deve apresentar as seguintes características^{11,12}:

- Ser suficientemente poroso, a fim de permitir que o líquido seja absorvido pelos seus poros;
- Possuir diâmetro de poro entre 5 e 100 nm. Poros muito estreitos tornam difícil a transferência de massa, podendo ocorrer efeitos de exclusão por tamanho. Poros muito largos impedem a fixação do líquido estacionário por forças capilares, e, desta forma, o líquido pode ser removido com a passagem da FM;
- Possuir uma alta concentração de grupos ativos em sua superfície para facilitar a adsorção do líquido estacionário ou a reação de fixação do mesmo;
- Possuir área superficial suficientemente grande para aumentar a capacidade de aceitação da amostra;
- Inércia química, para não reagir com os componentes da amostra;
- Resistência mecânica alta, a qual seja capaz de resistir às altas pressões necessárias em CLAE;

Após quase 40 anos de aplicações da CLAE-FR com diferentes materiais, orgânicos e inorgânicos, utilizados como suporte, ainda não foi encontrado aquele que preenchesse todos estes requisitos e, portanto, não existe um suporte cromatográfico ideal.

Os primeiros materiais empregados como suporte cromatográfico foram os óxidos inorgânicos de silício (SiO_2 – sílica) e de alumínio (Al_2O_3 – alumina). A sílica, na sua forma amorfa tem sido, desde então, o material mais empregado como suporte, quase a totalidade das aplicações da CLAE-FR fundamentam-se em suportes à base de sílica¹³. Esta ampla utilização está relacionada às suas propriedades altamente favoráveis para aplicações cromatográficas, em especial de CLAE-FR. Dentre as principais características da sílica, podem ser destacadas: partículas pequenas e esféricas disponíveis em uma ampla variedade de diâmetro (1 a 20 μm , a maioria com distribuição de tamanho reduzida) e tamanhos de poros (6 a 400 nm); partículas altamente porosas com grande área superficial (100 a 500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$); força mecânica (elevada rigidez) adequada para resistir às altas pressões necessárias em CLAE; e facilidade de modificação de sua superfície, devido à presença de grupos hidroxilas (silanóis) bastante reativos¹³⁻¹⁶, principalmente por reações dos grupos silanóis com reagentes, tais como triclorooctadecilsilano ou clorodimetiloctadecilsilano que produzem ligações do tipo $\equiv\text{Si-O-Si-C}\equiv$.

A sílica amorfa, com estrutura porosa, possui pelo menos três tipos de grupos silanóis em sua superfície (Figura 1). É possível, por técnicas espectroscópicas, determinar estes diferentes tipos de silanóis. Por exemplo, o infravermelho com refletância difusa (DRIFT) possibilita a distinção entre silanóis isolados e vicinais, enquanto que a ressonância magnética nuclear de ^{29}Si com rotação em ângulo mágico e polarização cruzada (CP-MAS-NMR ^{29}Si)

distingue entre os silanóis isolados e os geminais. A superfície da sílica também contém ligações siloxano (Si-O-Si) expostas, estas ligações são altamente estáveis e são a base da estrutura rígida do óxido¹³⁻¹⁶.

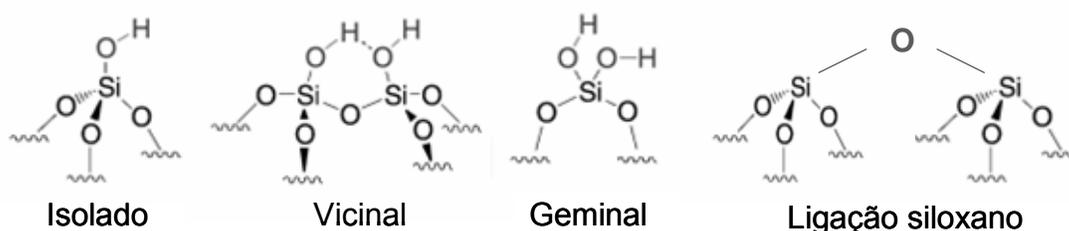


Figura 1. Tipos de grupos silanóis e ligações siloxano na superfície da sílica amorfa.

As propriedades que fazem da sílica um óxido altamente interessante, capaz de interagir com as mais diversas espécies orgânicas, fornecendo FE de diferentes seletividades, são determinadas (i) pela alta atividade química da superfície – esta atividade depende da concentração e distribuição dos diferentes grupos silanóis, e não das ligações siloxano^{14,16}; e (ii) pela estrutura porosa da sílica¹⁴.

A concentração superficial de grupos silanóis na sílica pode ser determinada por métodos químicos como (a) troca isotrópica por deutério¹⁷ ou trítio¹⁸; (b) titulação com NaOH¹⁹ na presença de sal; (c) reação com alquillítio¹⁹, entre outros. Os métodos mais confiáveis de determinação da concentração dos grupos silanóis totais, principalmente a troca isotrópica por D₂O, fornecem resultados de $8,0 \pm 1,0 \mu\text{mol m}^{-2}$, sendo este, o valor mais aceito para concentração de OH na superfície da sílica^{14,16}. A concentração e distribuição dos diferentes grupos silanóis é altamente dependente do tipo de pré-tratamento (ácido,²⁰ básico²¹ ou térmico¹⁴) pelo qual a sílica foi submetida. Em especial, tratamentos térmicos foram amplamente discutidos por Zhuravlev¹⁴, que sugeriu um modelo físico-químico para a concentração de grupos silanóis da superfície da sílica. Em linhas gerais o modelo descreve as etapas ocorridas a partir da desidratação até uma completa desidroxilação da sílica, indicando os principais tipos de silanóis presentes em cada estágio do modelo. Uma informação importante abstraída do modelo de Zhuravlev é a faixa de temperatura em que a superfície apresenta um grau máximo de hidroxilação, 25 – 190 °C, sob vácuo.

Se por um lado a elevada atividade química da superfície da sílica é desejável para a interação com diversas moléculas apolares, proporcionando FE de diferentes seletividades, por outro, é estimado que, por problemas de impedimento estérico, apenas 50 % dos grupos silanóis são capazes de se ligar quimicamente aos modificadores orgânicos²², restando um

grande número de silanóis residuais. A presença destes grupos residuais nas fases estacionárias afeta o mecanismo cromatográfico de retenção²³. Devido à acidez elevada dos grupos silanóis é possível que eles interajam fortemente com compostos básicos (grande maioria dos fármacos, compostos bio-orgânicos, etc.) de forma reversível ou irreversível. Quando ocorre o fenômeno de adsorção reversível tem-se como resultado picos cromatográficos assimétricos, dificultando a quantificação dos compostos. Quando irreversível ocorre restrição à transferência de massa, devido ao bloqueio de alguns sítios de interação hidrofóbica e esta forte interação entre soluto e suporte pode levar à deterioração da coluna². Este problema está associado principalmente às fases quimicamente ligadas e uma das formas de minimizar a presença de sítios residuais têm sido o preparo de FE obtidas pela deposição ou imobilização de um polímero pré-sintetizado sobre o suporte cromatográfico^{6,7}.

Porém, além de silanóis residuais, a sílica e as fases estacionárias baseadas em sílica apresentam estabilidade química limitada a uma faixa relativamente estreita de pH, entre 2 e 8. Desta forma, o emprego de FM mais ácidas ou básicas torna-se mais complicado, limitando o campo de aplicação da CLAE-FR, uma vez que FM com valores fora desta faixa são amplamente recomendadas para análises de diversos compostos, contendo em suas estruturas grupos ácidos ou básicos, tais como os encontrados em muitas classes de agroquímicos e de fármacos^{2,24}.

Quando o pH da fase móvel é menor que 2, a hidrólise, catalisada por ácido, das ligações Si-C entre a superfície da sílica e o material ligado quimicamente torna-se significativa. Isto resulta em contínua perda da fase ligada, concomitante, com a perda de retenção cromatográfica. Em fases móveis básicas, com valores de pH acima de 8, ocorre rápida dissolução da sílica devido à exposição de parte do suporte que não reagiu com o modificador orgânico (silanóis residuais) e, conseqüentemente, a fase ligada é clivada do suporte. A dissolução da sílica leva a uma progressiva e rápida perda de desempenho cromatográfico, produzindo um vão no topo da coluna e uma acentuada queda de pressão²⁵.

Estas duas limitações de materiais à base de sílica, juntamente com a necessidade de suportes para CLAE-FR de maior estabilidade, seletividade e eficiência levou a utilização de materiais alternativos, inorgânicos ou orgânicos, como suportes cromatográficos²⁶. Dentre os materiais inorgânicos; alumina, titânia e zircônia foram os mais utilizados devido à maior estabilidade hidrolítica destes óxidos em uma faixa de pH mais ampla. Além disso, as superfícies destes óxidos (principalmente os grupos OH) possuem menor capacidade adsorviva comparadas à superfície da sílica após as respectivas modificações químicas²⁷.

1.2. Suportes cromatográficos alternativos

Dentre os primeiros materiais empregados como suportes alternativos à sílica, que foram sintetizados e comercializados se destaca a alumina. Este óxido é amplamente empregado como fase estacionária normal (FN) em cromatografia de coluna e tem como vantagem principal a boa estabilidade em uma faixa ampla de pH, nominalmente de 1 a 13, fato este que o tornou altamente atrativo como substituto à sílica²⁸.

Esta elevada estabilidade da alumina permite separações cromatográficas em valores de pH nos quais compostos básicos não se encontram na forma ionizada, assim a separação é baseada somente no mecanismo de interação hidrofóbica, sem interferência do mecanismo de interação iônica. Várias FE baseadas em alumina foram preparadas e comercializadas, seja pela modificação química do suporte²⁹ ou por recobrimento das partículas com polímeros orgânicos²⁷. Apesar das FE à base de alumina terem apresentado estabilidade numa faixa de pH mais ampla, em muitos casos as propriedades de retenção não foram significativamente diferentes quando comparadas a materiais similares de sílica. Além disso, o baixo desempenho cromatográfico nas separações obtido com este material aliado a disponibilidade comercial limitada de formas, tamanhos e grau de porosidades das partículas contribuíram para a modesta difusão da alumina como suporte cromatográfico^{25,26,29,30}.

Outros materiais que vêm sendo amplamente empregados como suportes alternativos à sílica são os óxidos de zircônio e titânio. A elevada estabilidade destes óxidos metálicos em quase toda a faixa de pH e em temperaturas mais extremas ($> 150\text{ }^{\circ}\text{C}$, no caso da zircônia) tem sido um dos focos de interesse de importantes cromatografistas^{25,29-33}.

A zircônia (ZrO_2) é utilizada como suporte na sua forma monoclinica, a qual o átomo de zircônio está coordenadamente ligado a sete átomos de oxigênio vizinhos. Trata-se um óxido anfótero, com propriedades de trocador de ânions e cátions, quando em soluções neutras e ácidas ou alcalinas, respectivamente^{25,32}. A estabilidade intrínseca do suporte de zircônia faz dele a melhor escolha para separações da CLAE-FR em condições extremas de pH (> 11) ou de temperatura ($> 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)^{25,29,32}. Dentre as principais fases reversas empregando a zircônia como suporte, destacam-se as fases de zircônia-poli(butadieno) (zircônia-PBD)³⁴⁻³⁶ e zircônia-octadecilsilano (zircônia-ODS)^{37,38}. As fases estacionárias de zircônia-PBD foram extensivamente estudadas e aplicadas a diferentes compostos, tais como substâncias polares e apolares, proteínas e peptídeos, permitindo rápidas separações e estabilidade acima de cinco mil volumes de coluna com a passagem de fase móvel metanol:NaOH a $1,0\text{ mol L}^{-1}$ ³². A zircônia-PBD também exibiu retenção, seletividade e eficiência muito similares a fases

comerciais ODS (sílica-octadecilsilano) para analitos não-eletrólitos³⁴. Partículas de zircônia ligada a grupos octadecil (C18), assim como a zircônia-PBD, também apresentaram mecanismos de retenção similares àqueles observados em fases quimicamente ligadas baseadas em sílica¹⁵. Outras aplicações empregando a zircônia como suporte cromatográfico também foram descritas, como o recobrimento com fina camada de carbono que resultou em fases reversas igualmente estáveis à zircônia-PBD, porém de baixa eficiência para solutos como alquil-fenonas e nitroaromáticos³⁹. Materiais de zircônia-poliestireno também foram investigados, em detalhes, quanto à seletividade cromatográfica de uma série homóloga de aromáticos apolares de isomeria posicional. O material exibiu diferenças substanciais na seletividade de analitos polares e apolares quando comparado à zircônia-PBD e, também, estabilidade térmica em temperaturas elevadas, tal como 160 °C⁴⁰.

Apesar da obtenção de FE altamente estáveis com suportes de zircônia, este material apresenta uma importante desvantagem. A sua superfície apresenta, sob determinadas condições, sítios ativos (átomos de Zr (IV) que se encontram coordenadamente insaturados) que se comportam como ácidos fortes de Lewis. Desta forma, analitos contendo em sua estrutura bases fortes de Lewis; como fosfatos, hidróxidos, fluoretos, etc., podem interagir fortemente com estes sítios produzindo picos cromatográficos com caudas acentuadas. Estas interações indesejáveis podem ser controladas pela adição de fluoretos ou fosfatos na FM, os quais irão competir com os grupos básicos dos analitos pelos sítios ácidos, da mesma forma que ocorre para fases estacionárias baseadas em suportes de sílica²⁵.

Um outro aspecto desfavorável ao uso deste material como suporte é a necessidade de se evitar a presença de dióxido de carbono, tanto na fase móvel quanto na amostra, pois sua ligação com o dióxido de zircônio pode alterar as propriedades do suporte durante as análises, afetando os parâmetros de retenção⁴¹.

A titânia (TiO₂) tem atraído diversos interesses para utilização como material de suporte cromatográfico. O óxido de titânio possui propriedades físicas e mecânicas similares à sílica, porém apresenta estabilidade química e hidrolítica superior. A titânia é um óxido metálico anfótero e possui propriedades de troca de ânions em baixos valores de pH e propriedades de troca de cátions em valores elevados de pH⁴². Assim como a sílica, a titânia possui em sua superfície diferentes grupos OH (titanóis), sendo que, após a ligação de espécies químicas, os sítios residuais podem interferir nos mecanismos de retenção de analitos básicos^{2,25}.

Estudos sobre o comportamento cromatográfico da titânia em fase normal^{42,43} e reversa⁴⁴⁻⁴⁶ comprovam a potencialidade deste óxido como suporte cromatográfico para CLAE-FR.

Tani e Suzuki⁴² investigaram o comportamento da retenção cromatográfica de titânia pura e modificada com octadeciltrietóxissilano sob condições de fase normal e reversa, respectivamente. Estes autores observaram que, em cromatografia de fase normal (FN), a titânia apresentou propriedades básicas, retendo fortemente o fenol (composto ácido) e eluindo o pico da piridina (composto básico) sem caudas. Entretanto, em cromatografia de fase reversa (FR), com o uso de uma solução tampão de ácido acético/acetato de sódio na FM, a titânia se comportou como um trocador de ânions e a influência do suporte na retenção só foi reduzida com o aumento do grau de modificação de sua superfície com grupos octadecil.

Winkler e Marmé⁴³ compararam as propriedades físico-químicas da titânia com sílica, alumina e zircônia utilizados como adsorventes em FN, fornecendo exemplos de separações cromatográficas. Eles observaram que a presença de grupos titanóis levemente ácidos na superfície da titânia possibilitava uma boa separação de moléculas básicas (cloroanilinas, flumetrinas, α - e β -endossulfan, etc.) por cromatografia em fase normal, apresentando picos bastante simétricos para os compostos. Em um outro trabalho empregando fases de titânia ligadas com octadecil⁴⁴ foram também obtidos picos simétricos para três diferentes misturas-teste, contendo hidrocarbonetos aromáticos, anilinas e fenilalquilaminas. Os resultados para as duas últimas misturas indicaram a presença de poucos grupos titanóis residuais nas fases estacionárias. Pursch et al.⁴⁵ avaliaram fases estacionárias C30 utilizando diferentes materiais inorgânicos como suportes. Eles observaram que, apesar destas fases apresentarem menor eficiência e maior fator de assimetria de picos, quando comparadas a fases monoméricas de C18, as fases de C30 foram superiores na separação de isômeros de carotenóides (β -caroteno e zeaxantina). As fases de titânia e zircônia ligadas ao grupo C30 apresentaram boa seletividade na separação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, carotenóides e tocoferóis. Segundo os autores, isto se deveu ao maior comprimento da cadeia alquila e ao caráter cristalino destes óxidos, fornecendo uma alternativa ao uso de sílica para esta aplicação em específico.

Apesar de resultados promissores nas aplicações da titânia como suporte, assim como os demais óxidos ela também apresenta algumas limitações. Sua superfície apresenta grupos titanóis ácidos que se assemelham aos silanóis, podendo também adsorver fortemente compostos básicos^{10,29}. O desempenho cromatográfico das fases à base de titânia são inferiores aos obtidos por fases baseadas em sílica. Além disso apresenta disponibilidade comercial limitada de formas, tamanhos e porosidades de partículas.

Outros óxidos inorgânicos também foram avaliados como materiais alternativos ao uso de sílica como suporte cromatográfico, tais como: Florisil⁴⁷, céria⁴⁸, etc. Porém, algumas

propriedades inadequadas para uso em CLAE e o baixo desempenho cromatográfico das fases baseadas nestes óxidos impossibilitaram maiores desenvolvimentos.

Materiais orgânicos poliméricos também foram estudados extensivamente como suportes alternativos à sílica. Estes materiais apresentam estabilidade química em uma faixa de pH de 1 – 13 e picos simétricos para compostos básicos devido à ausência de grupos reativos em sua superfície. Dentre os polímeros usados como suporte cromatográfico, destaca-se o poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB) que apresentou parâmetros de retenção similares aos obtidos por fases estacionárias comerciais de sílica-C18⁴⁹. O grande inconveniente apresentado pelos polímeros orgânicos quando empregados como suportes cromatográficos é a baixa resistência mecânica das partículas poliméricas, restringindo a sua utilização a pressões elevadas. Outro inconveniente, não menos importante, é o alargamento de pico que ocorre devido a não homogeneidade do fluxo da fase móvel nestes materiais, podendo ocorrer dilatação e compressão quando da mudança do modificador orgânico da fase móvel^{15,50,51}.

Um outro material orgânico empregado como suporte cromatográfico foi o carbono grafitizado poroso, que apresenta elevada resistência aos solventes orgânicos. Ele foi usado principalmente na separação de compostos de estruturas similares, incluindo estereoisômeros⁵², derivados da anilina⁵³ e diversas drogas⁵⁴. Quando comparados com fases comerciais de sílica-C18, os suportes de carbono grafitizado apresentaram boa estabilidade até pH 12 e em temperaturas mais elevadas^{55,56}. Porém, as fases baseadas em carbono apresentam baixa capacidade de aceitação de amostras e desempenho cromatográfico bastante limitado⁵⁷.

De acordo com as publicações encontradas na literatura, observa-se que as características dos suportes cromatográficos permanecem um tanto quanto distantes do ideal e, por isso, este tópico da CLAE-FR tem sido explorado com afinco pelos principais cromatografistas. Mais recentemente, uma alternativa bastante promissora que vem sendo investigada é a utilização de óxidos mistos como suportes cromatográficos. Apesar de amplamente difundidos em outras aplicações, tais como a catálise, estes materiais receberam pouca atenção para aplicação em fases estacionárias para CLAE.

O Laboratório de Pesquisas em Cromatografia Líquida do Instituto de Química da Unicamp (LabCrom), no intuito de unir as propriedades da sílica, apropriadas para finalidades cromatográficas, com a maior estabilidade química dos óxidos metálicos, tais como a zircônia e a titânia, vem propondo a utilização de um suporte contendo uma mistura destes óxidos – suporte de sílica metalizada. O objetivo principal é incorporar à estrutura porosa e rígida da sílica a elevada estabilidade da zircônia ou da titânia, possibilitando a separação de solutos

básicos em condições de FM com altos valores de pH. Alguns trabalhos realizados no LabCrom, empregando suportes de sílica titanizada⁵⁸⁻⁶⁰ e sílica zirconizada^{61,62} recobertas com poli(metilotilsiloxano) (PMOS), já foram relatados, apresentando boa simetria e eficiência para solutos básicos em FM com pH 10.

Outros grupos de pesquisadores também vêm aplicando suportes de óxidos metálicos mistos para as mesmas finalidades. Os primeiros a sugerirem a utilização de óxidos mistos como fases estacionárias na modalidade de fase normal da CLAE foram Aue e Wickramanyake⁶³. Estes autores produziram partículas de sílica de 10 µm com camadas de crômia ligadas à sua superfície. O desempenho cromatográfico das fases baseadas neste material foi satisfatório, porém as separações indicaram que a seletividade foi completamente diferente das FE baseadas em suporte de sílica nua.

Feng e colaboradores⁶⁴⁻⁶⁸ estudaram o comportamento cromatográfico de partículas de sílica-zircônia em cromatografia líquida de fase normal. Eles separaram uma mistura-teste com diferentes FM e obtiveram bom desempenho cromatográfico para solutos básicos e ácidos com estes óxidos mistos. A FE exibiu melhor desempenho cromatográfico para solutos ácidos que as fases de zircônia pura⁶⁴. Estes autores vêm produzindo também suportes de óxidos mistos, como magnésia-zircônia^{65,66}, zircônia-alumina⁶⁷, céria-zircônia⁶⁸, com aplicações bem sucedidas na análise de solutos básicos, tanto no modo de fase reversa quanto de fase normal. Kaneko e colaboradores⁶⁹ também empregaram diferentes óxidos mistos, por exemplo sílica-zircônia, sílica-titânia, etc., como suportes cromatográficos com desempenho bastante promissor. Ohta^{70,71} estudou o comportamento de partículas de sílica-zircônia como fases estacionárias para cromatografia de exclusão de íons, obtendo separações com alta detectabilidade para compostos ácidos, como fenol e ácidos carboxílicos.

1.2.1. Métodos de preparo de óxidos mistos como suportes para CLAE-FR

O método de preparo dos óxidos mistos é um fator de interesse relevante para finalidades cromatográficas. O resultado cromatográfico final pode ser altamente dependente das condições iniciais que estes materiais foram submetidos, e, portanto, merecem maiores considerações. Existem vários métodos utilizados para síntese de óxidos mistos, principalmente para finalidades catalíticas. Porém, para finalidades cromatográficas este número ainda é limitado.

De uma forma geral, os principais métodos de preparo de óxidos mistos que foram descritos na literatura para estas finalidades são:

1.2.1.1. Reação com alcóxidos metálicos

Trata-se da reação de um óxido (matriz desejada, normalmente a sílica) com um alcóxido do metal que se deseja incorporar a superfície da matriz. A reação pode ser realizada sob refluxo ou em banho termostático, com tempo e temperatura controlados. Esta reação é freqüentemente realizada na ausência de ar/O₂. Normalmente, o material é submetido a lavagens sucessivas para a remoção de resíduos do alcóxido e de outras substâncias não incorporadas à matriz. O sólido resultante pode ser submetido a uma etapa de secagem ou calcinação (dependendo do tipo de aplicação) para a obtenção do óxido misto na forma de um pó^{58,61,62,69}.

1.2.1.2. Co-precipitação de silicato de sódio com cloretos metálicos

Este método foi desenvolvido por Kaneko e colaboradores^{69,72-74} que relataram a obtenção de óxidos mistos para uso como suportes cromatográficos (FR) ou fases estacionárias (FN) para CLAE. Estes materiais são obtidos pela precipitação de uma mistura de metassilicatos de sódio acidificados e cloretos metálicos, pelo ajuste de pH da solução para um valor apropriado, com adição de hidróxido de sódio. A mistura é deixada sob agitação e o precipitado obtido é, posteriormente, separado da solução por filtração. O material sólido é submetido a etapas sucessivas de lavagem com água destilada, e em seguida, seco a uma temperatura apropriada. O material cristalizado é triturado e peneirado para obtenção de partículas com estreita distribuição de tamanho.

1.2.1.3. Emulsão em óleo

Neste método, os óxidos mistos que se deseja preparar são obtidos pela dissolução de cloretos, nitratos, etc. dos dois elementos em água destilada. Em seguida, a mistura é adicionada a uma emulsão de éter de petróleo e surfactantes, sob agitação, com controle de temperatura. Aditivos também são adicionados à emulsão para iniciar a reação de gelificação.

O hidrogel obtido é submetido a estágios múltiplos de lavagem com solventes de diferentes polaridades para a remoção de substâncias residuais. Pode-se selecionar uma estreita distribuição do tamanho de partículas através de etapas seqüenciais de sedimentação/identificação/re-suspensão. As partículas de óxidos mistos obtidas são filtradas e aquecidas para converter o hidrogel em xerogel. O xerogel pode ser submetido a altas temperaturas, por exemplo 600 °C, para a remoção de resíduos orgânicos^{65,75,76}.

1.2.1.4. Reação com cloretos metálicos

Basicamente, o procedimento é o mesmo realizado para o preparo de óxidos mistos com alcóxidos metálicos, porém, substituindo o grupo alcóxido por cloretos^{59,60}. A reação pode também acontecer em temperaturas elevadas, superiores a 500 °C, para depositar cloretos de óxidos metálicos na sílica, obtendo materiais praticamente puros e sem necessidade de estágios de lavagem com solventes orgânicos para remoção de resíduos⁶³.

1.2.1.5. Técnica da deposição auto-organizada de camadas de óxidos metálicos

Recentemente, Dun et al.⁷⁷ desenvolveram um método para o preparo de partículas de sílica-zircônia a partir da imobilização de um agente surfactante (Triton X-114) na superfície da sílica e subsequente incorporação de nanopartículas de zircônia. O material foi submetido a uma etapa posterior de sinterização, a temperaturas superiores a 500 °C, para a combustão dos componentes orgânicos, fornecendo um material de sílica com uma camada de nanopartículas de zircônia. Este método permitiu a incorporação de várias camadas de zircônia na superfície da sílica pela simples repetição do procedimento experimental, tantas vezes se façam necessárias. Os autores obtiveram oito camadas de nanopartículas de zircônia sobre a sílica. De maneira similar, Ge et al.⁷⁸ prepararam um suporte de sílica-titânia com várias camadas de titânia sobre a sílica, empregando dodecilsulfato de sódio como agente surfactante e temperaturas de 525 °C para a combustão dos componentes orgânicos do material.

1.3. Fases estacionárias

1.3.1. Fases estacionárias quimicamente ligadas

O desenvolvimento da cromatografia líquida de alta eficiência está diretamente associado ao desenvolvimento da tecnologia de preparo das fases estacionárias. Em especial na CLAE-FR, este desenvolvimento foi impulsionado pela introdução das fases estacionárias quimicamente ligadas (FEQL). Anteriormente, o recheio da fase estacionária era constituído de um líquido estacionário de baixa massa molar apenas sorvido ao suporte cromatográfico. A manutenção da concentração constante do líquido estacionário no suporte se mostrava difícil e ineficiente com o emprego de vazões mais altas da fase móvel. Para a condução das separações cromatográficas fazia-se necessário a pré-saturação da FM com a FE e o controle rígido da temperatura da coluna cromatográfica¹². Tais necessidades impossibilitavam separações no modo de eluição por gradiente, as quais eram freqüentemente desejadas para separação de misturas complexas. A eliminação de muitos destes problemas tornou-se possível com o advento das FEQL para CLAE-FR, na qual cadeias orgânicas foram ligadas covalentemente à superfície do suporte, fornecendo alta estabilidade hidrolítica ao líquido estacionário⁷⁹.

Diversos métodos foram sugeridos para modificar covalentemente a superfície do suporte de sílica. A esterificação⁸⁰ foi o primeiro passo para obtenção das FEQL. Neste método, as fases foram preparadas pela esterificação direta de grupos silanóis (Si-OH) da sílica com uma camada orgânica monomolecular de um álcool (R-OH), como ilustrado na Figura 2a.

No entanto, os ésteres de silicato apresentaram baixa estabilidade hidrolítica e com a popularização das fases móveis aquosas o uso da sílica esterificada tornou-se rapidamente obsoleto para separações em CLAE-FR⁷⁹.

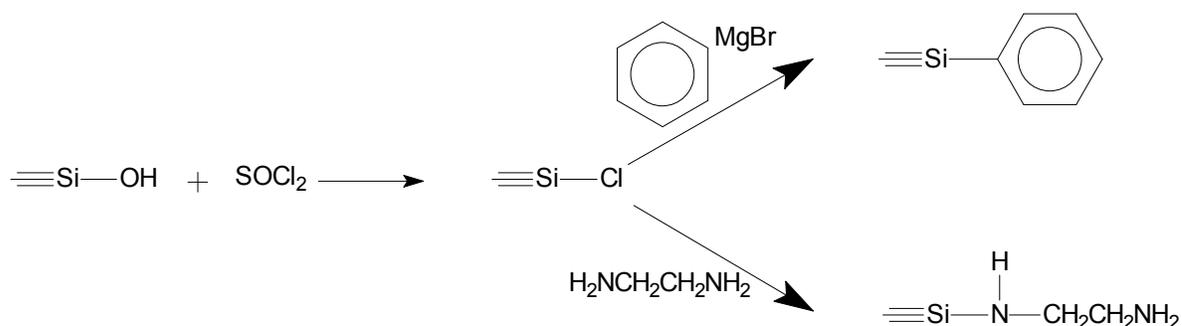
Em um outro método, as FEQL foram preparadas pela reação dos grupos Si-OH da sílica com cloreto de tionila seguida pela reação com um reagente de Grignard apropriado, para produzir ligações do tipo Si-C ou pela reação com aminas para fornecer estruturas com ligações do tipo Si-N (Figura 2b). Estes materiais apresentaram estabilidade hidrolítica superior às fases estacionárias esterificadas. Entretanto, reações de Grignard freqüentemente resultam em baixas concentrações do ligante na superfície do suporte e presença de resíduos indesejáveis no recheio após a reação. As fases do tipo Si-N são restritas a uma faixa muito limitada de pH

(4 a 8) quando fases móveis aquosas são empregadas. Estas diferentes limitações restringiram o uso das fases estacionárias Si-Ph ou Si-N para CLAE-FR^{11,12,79}.

a) Ésteres de silicato



b) Ligações de sílica-carbono e sílica-nitrogênio



c) Ligações siloxano

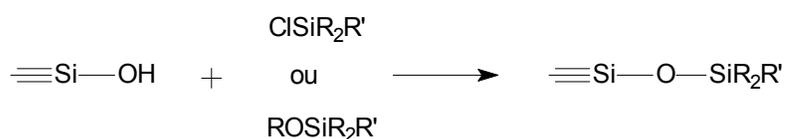


Figura 2. Reações para o preparo de fases estacionárias quimicamente ligadas.

Atualmente, o método mais utilizado para o preparo das FEQL é a organossilanização⁸¹ (Figura 2c). Neste método, as fases ligadas são preparadas pela reação dos grupos silanóis da sílica com reagentes organossilanos, resultando em fases estacionárias com ligações do tipo siloxano (Si-O-Si-C). As FE deste tipo são as mais estáveis hidroliticamente e as colunas recheadas com este material exibem eficiências mais altas devido ao rápido processo de transferência de massas¹². O agente silano pode ser monofuncional, bifuncional ou trifuncional (Figura 3). Dependendo destas funções as fases apresentam características físicas e cromatográficas bastante distintas. Outro fator importante é a ausência ou presença de água

durante a síntese que podem resultar em fases com ligantes monoméricos ou poliméricos, respectivamente.

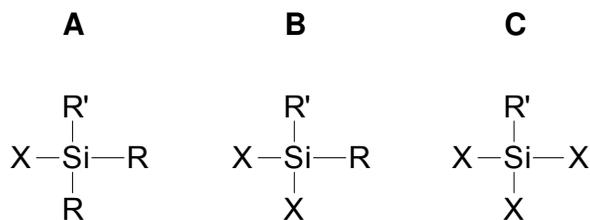


Figura 3. Agentes silanos empregados na organossilanização de fases estacionárias, monofuncional (A), bifuncional (B) e trifuncional (C). [R = CH₃; R' = normalmente, C₈H₁₇ ou C₁₈H₃₇; X = grupos metóxi ou etóxi ou cloro].

Os ligantes monoméricos são obtidos com organossilanos mono, bi ou tri funcionais na ausência absoluta de moléculas de água. O método mais comum de preparo das fases ligadas monoméricas envolve a reação de clorodimetilalquilsilanos (normalmente, alquil = C₈H₁₇ ou C₁₈H₃₇) com os grupos silanóis da sílica. A grande vantagem deste método é a alta repetibilidade do preparo das fases, uma vez que cada grupo silanol reage com uma molécula do silano. Estas fases são também conhecidas como fases do *tipo escova* devido à estrutura orientada obtida pelo ligante¹⁵. As colunas cromatográficas recheadas com a fase monomérica apresentam as mais altas eficiências devido à cinética favorável envolvendo a rápida difusão dentro e fora da camada orgânica fina da FE. No entanto, o principal inconveniente do preparo deste tipo de fase é que mais de 50 % dos grupos silanóis da sílica permanecem sem reagir (silanóis residuais), após o processo de síntese. Esta baixa concentração do ligante na superfície está associada ao impedimento estérico ocasionado pelos volumosos agentes silanos empregados na reação. Embora os silanóis residuais não estejam disponíveis para a reação com os agentes silanos, alguns são suficientemente acessíveis para interagir com componentes da amostra durante a separação cromatográfica. Os silanóis residuais são os principais responsáveis pelo aumento da retenção e alargamento de pico de compostos básicos⁸².

Diversos procedimentos são relatados na literatura para a obtenção de fases estacionárias reversas de maior estabilidade, minimizando as interações indesejáveis dos silanóis, tais como:

- *Fases poliméricas quimicamente ligadas*⁸³⁻⁸⁵. As FE são obtidas pela reação de agente silano bi ou trifuncional na presença de traços de água. Apesar da maior estabilidade hidrolítica desta fase, a dificuldade de controlar a reação de entrecruzamento e a

espessura da camada resultante torna o processo pouco reproduzível, sendo raramente formada uma camada uniforme;

- *Capreamento*^{11,86} – Após a ligação das espécies químicas (C_8H_{17} ou $C_{18}H_{37}$) na superfície da sílica, a FE é submetida a uma segunda reação com um agente sililante apropriado, normalmente trimetilclorossilano e/ou hexametildissilazano, proporcionando melhor proteção do suporte cromatográfico e maior estabilidade à FE;
- *Fases com polimerização horizontal*⁸⁷⁻⁹⁰ – Neste método, monocamadas auto-organizadas de silanos trifuncionais de cadeias longas (C_8H_{17} , $C_{18}H_{37}$) e curtas (CH_3) são obtidas sobre as partículas de sílica, melhorando a estabilidade hidrolítica das fases com substancial redução do acesso aos silanóis residuais. Além disso, o processo de obtenção destas fases é altamente reproduzível, principalmente se comparado a fases poliméricas convencionais.
- *Fases estericamente protegidas*^{5,91,92} – São obtidas pela reação de um reagente organossilano contendo a espécie química (C_8H_{17} ou $C_{18}H_{37}$) na cadeia lateral e dois grupos alquilas volumosos (isopropil ou isobutil) que restringem o acesso de solutos básicos aos grupos silanóis residuais. Desta forma, há um aumento da estabilidade química das fases. Comparativamente às fases de mesma cadeia alquila lateral, as estericamente protegidas apresentam menor densidade de ligação, devido a limitação estérica durante o processo de silanização⁹³.
- *Fases estacionárias com grupos polares embutidos*⁹⁴⁻⁹⁷ – Trata-se de um método alternativo para a redução da atividade silanofílica das FE, pois a inserção de grupos polares (como amida, amina, uréia, carbamato) promovem uma competição destes com solutos básicos pelos silanóis residuais.
- *Fases estacionárias bidentadas*^{5,98,99} – Preparadas a partir de silanos bifuncionais, proporcionam maior restrição do acesso de componentes da amostra aos silanóis residuais e maior estabilidade química quando empregadas fases móveis ácidas ou básicas.
- *Suportes híbridos*^{100,101} – Apresentam em sua estrutura um correto balanço orgânico/inorgânico, com propriedades intermediárias a grupos orgânicos e inorgânicos na forma pura. Estes suportes são comercializados com o nome de X-Terra. O suporte mais comum contém unidades de metilsiloxano, tanto na estrutura interna quanto na superfície das partículas de sílica. Este material apresenta uma boa estabilidade entre pH 1 e 12, com aumento do recobrimento superficial nas fases quimicamente ligadas e redução da atividade silanofílica.

- *Uso de sílicas mais puras*^{12,102} – Conhecidas como sílicas do tipo B, que apresentam apenas traços de impurezas metálicas, tornando os silanóis residuais menos ácidos¹⁰³. Em aplicações cromatográficas, estas sílicas promovem separações de melhor desempenho, principalmente para compostos básicos. Atualmente, quase todas as fases estacionárias disponíveis comercialmente são preparadas a partir da sílica tipo B, exceto os que partiram dos suportes híbridos.

Embora alguns destes procedimentos tenham oferecido melhor proteção do suporte cromatográfico, resultando em maior estabilidade química em fases móveis alcalinas, as fases estacionárias preparadas, aplicando estas estratégias não resolveram completamente o problema dos grupos silanóis residuais.

1.3.2. Fases estacionárias com polímeros sorvidos ou imobilizados em suportes de sílica

Uma outra estratégia desenvolvida para evitar as interações indesejáveis de componentes da amostra com os grupos silanóis residuais, oriundos das FEQL com baixa concentração de ligantes, foram as FE recobertas com polímeros. Idealmente, as fases estacionárias quimicamente ligadas não protegem suficientemente os analitos de interação com os silanóis residuais, assim, uma proteção mais eficiente pode ser alcançada com a imobilização de macromoléculas na superfície e nos poros da sílica^{2,7,10}.

Em princípio, as fases estacionárias recobertas com polímeros combinam as propriedades mecânicas de óxidos inorgânicos (tais como: sílica, zircônia, titânia, etc.) com a inércia química e a seletividade de polímeros orgânicos^{7,29}. Estas fases apresentam uma série de vantagens que as tornam extremamente atrativas para uso em CLAE-FR, tais como: melhor proteção dos silanóis residuais (sílica) ou de sítios ácidos de Lewis (zircônia, titânia, alumina) comparado às FEQL, evitando interações indesejáveis com componentes da amostra; proteção mais eficaz da matriz do suporte inorgânico contra o ataque químico de fases móveis agressivas; maior facilidade de preparo; etc.^{7,29}. Além disso, a seletividade destas fases depende essencialmente dos grupos funcionais do polímero imobilizado. Devido à disponibilidade de uma vasta gama de polímeros com diferentes funcionalidades, as fases recobertas com polímeros permitem o ajuste flexível da seletividade cromatográfica dentro de uma ampla faixa, dependendo apenas da escolha do polímero apropriado para a separação.

Uma grande variedade de polímeros foi empregada no preparo de fases estacionárias recobertas para CLAE-FR, dentre estes se destacam: o poli(etileno)¹⁰⁴; o poli(butadieno)^{32,105-109}; o poli(estireno)^{40,110} e, principalmente, os polissiloxanos – poli(dimetilsiloxano) (PDMS)^{111,112}, poli(metiloctilsiloxano) (PMOS)^{9,58,60,61,111,113-119} e poli(metiloctadecilsiloxano) (PMODS)^{8,120,121}.

A forma mais simples de preparo das fases recobertas com polímeros é realizada pelo método de evaporação estática do solvente sem etapas posteriores de imobilização da camada polimérica no suporte cromatográfico^{115,116}. Para isto, o polímero é apropriadamente dissolvido em um solvente, no qual ele seja completamente solúvel (solvente “bom”) e a esta solução com polímero é adicionada a matriz do óxido inorgânico. Em seguida, evapora-se o solvente obtendo a fase estacionária sorvida. A sorção do polímero no suporte cromatográfico é um processo complexo governado por um balanço muito sutil entre fatores energéticos e entrópicos e deve ser controlado cuidadosamente para a obtenção de fases estacionárias confiáveis e reprodutíveis¹²². A química da superfície do suporte também tem uma influência significativa na sorção dos polímeros. Os grupos reativos superficiais agem como pontos de ancoragem, nos quais os polímeros podem se ligar covalentemente^{27,123,124} ou apenas interagir fracamente^{8,58,60,61,115-117,121}.

Outro ponto a ser destacado na preparação destas fases é a quantidade de polímero depositado na superfície do suporte. Se por um lado, uma quantidade maior de polímero fornecerá um material com maior proteção dos silanóis ou sítios ácidos de Lewis, contra interações indesejáveis com a amostra, por outro, resultará em uma camada mais espessa e bloqueio dos poros do suporte. Desta forma, resultará em um processo de transferência de massa mais lento e, portanto, fases estacionárias com baixo desempenho cromatográfico. Portanto, a preparação das fases recobertas com polímeros é uma etapa crítica que tem por finalidade a obtenção de duas propriedades idealizadas:

- *Um filme fino que não bloqueie ou restrinja a entrada dos poros*, para manter a estrutura geral e a conectividade, resultando em rápida transferência de massa nos poros e no filme polimérico;
- *Uma camada polimérica uniforme*, para recobrir completamente os sítios não específicos de interações indesejáveis e, se possível, impermeável aos analitos a serem separados.

Existem várias formas de se fazer o recobrimento. Os mais comumente empregados consistem na adsorção física de um polímero pré-sintetizado, com composição química bem definida sobre o suporte cromatográfico^{6,7,10}. Alternativamente, o polímero pode ser depositado pela polimerização *in situ* de uma solução de monômeros ou oligômeros, iniciada ou propagada

na superfície do suporte¹²⁵⁻¹²⁷. A primeira forma é preferida por fornecer maior reprodutibilidade no preparo das fases estacionárias¹⁰.

Basicamente, o polímero sorvido pode formar um filme fino na superfície da sílica (Figura 4A) ou preencher todo volume do poro (Figura 4B), é possível também haver uma combinação destas duas formas. Em ambos os casos, as cadeias poliméricas podem apenas recobrir (por mecanismo de adsorção) as paredes dos poros sem entrecruzamento e sem ligação à superfície (parte esquerda da Figura 4A e 4B), podem formar uma camada densamente entrecruzada sem ligação química com a superfície dos poros (parte central) ou então podem se ligar quimicamente às paredes dos poros (lado direito da Figura)⁷. Porém se a sorção do polímero ao suporte for governada por interação fraca, ele poderá ser facilmente removido durante a passagem da fase móvel. Faz-se necessário, portanto, uma etapa de imobilização posterior à sorção para melhor “ancoragem” do polímero no suporte, fornecendo uma maior estabilidade à FE.

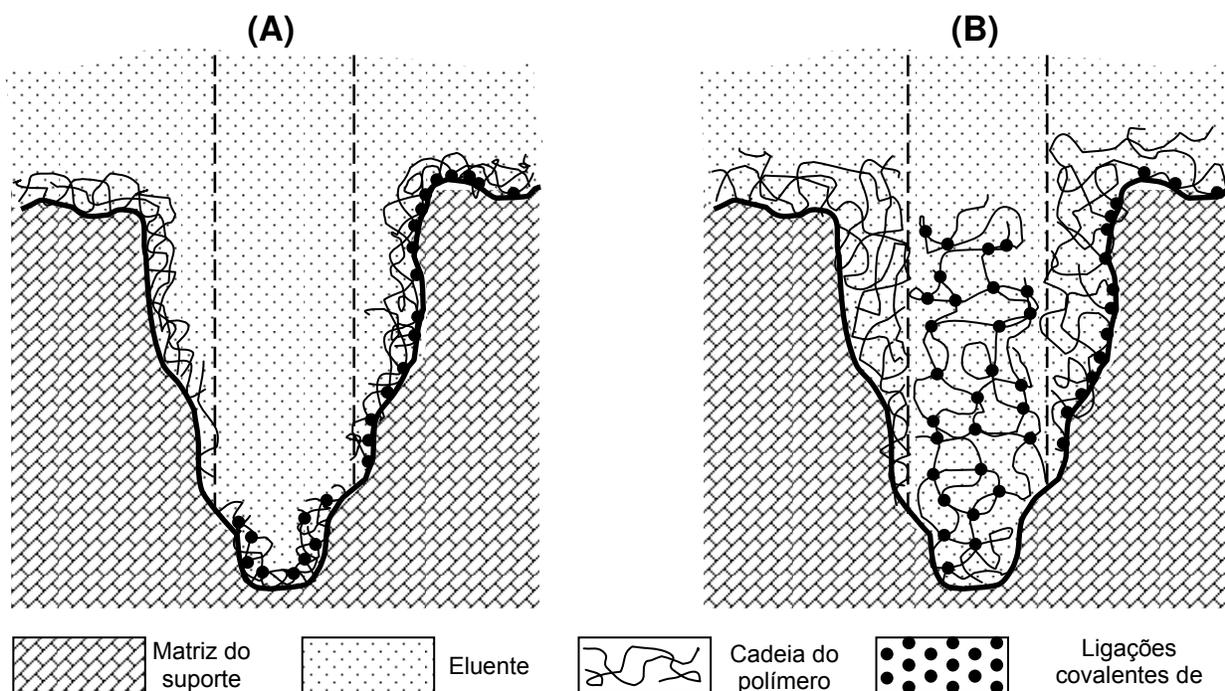


Figura 4. Tipos de deposição polimérica nos poros do suporte cromatográfico, recobrimento das paredes dos poros (A) ou preenchimento do volume dos poros (B)⁷.

Os métodos atuais de imobilização de polímeros são originários de várias técnicas para a criação de camadas poliméricas em materiais de vidro, da experiência em deposição de fases estacionárias poliméricas em suportes para cromatografia gasosa e das várias técnicas para modificação de suportes para cromatografia líquida clássica, antes do desenvolvimento da

CLAE. Porém, o grande avanço conquistado nos procedimentos de imobilização de polímeros aconteceu com o advento da introdução de micropartículas de sílica macroporosas, pois minimizou o risco de entupimento dos poros e possibilitou eficiências altas nas separações, comparadas às sílicas modificadas com ligantes de massa molar baixa⁷.

Atualmente, as FE imobilizadas são obtidas por reações entre as moléculas individuais da fase líquida sorvida, catalisadas, ou não, por processos de entrecruzamento. Estas reações de entrecruzamento resultam em camadas estáveis, quando comparadas com as FE apenas sorvidas¹¹⁹ e são insolúveis nas fases móveis comumente empregadas em CLAE-FR. Vários métodos, químicos ou físicos, são empregados para que estas reações ocorram, tais como: reticulação induzida por agentes químicos como peróxidos e azocompostos^{9,113,120}; tratamento térmico^{8,9,119,128,129,131}; radiação ionizante (radiação gama)^{61,62,113,130,131} e radiação microondas^{58,109,129,131}.

Ao longo dos últimos 15 anos, o LabCrom tem direcionado esforços para o preparo de fases estacionárias com polímeros, principalmente o poli(butadieno)¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ e diversos polissiloxanos^{8,112,129} sorvidos e imobilizados por diferentes tratamentos sobre suportes de sílica^{108,111,112,118} e sílica metalizada^{58,60-62,109}, sem a utilização de agentes químicos para indução do entrecruzamento das cadeias poliméricas. O principal foco destes estudos tem sido a obtenção de fases estacionárias com maior estabilidade química em condições drásticas de fase móvel.

A seguir é descrito o princípio dos procedimentos físicos mais comumente empregados para a imobilização dos polímeros sobre os suportes cromatográficos:

1.3.2.1. Radiação gama

A radiação gama é uma radiação eletromagnética de origem nuclear, altamente energética, que lhe confere um grande poder de penetração e uma alta capacidade de interação com espécies atômicas ou moleculares¹³². Os radionuclídeos cobalto-60 e césio-137 são as principais fontes emissoras de radiação gama disponíveis comercialmente, sendo o cobalto-60 o mais empregado por liberar raios gamas mais energéticos¹³³.

Quando a radiação gama incide na matéria, ocorrem processos tais como excitação eletrônica e ionização. As moléculas excitadas ou ionizadas podem sofrer cisões ou reagirem com outras espécies, através de radicais livres ou íons, produzindo novas substâncias químicas. Assim, o efeito mais marcante da radiação gama em polímeros pode ser resumido na

formação de produtos menores (degradação) ou maiores (entrecruzamento)¹³⁴. A degradação de um polímero resulta em mudanças em suas propriedades físicas causadas por reações químicas que envolvem cisões na cadeia polimérica. Estas reações químicas levam à diminuição do comprimento da cadeia. No entrecruzamento, as cadeias poliméricas são ligadas umas as outras, resultando em estruturas ramificadas tridimensionais de massa molar mais alta, com propriedades físicas características¹³⁴.

No LabCrom, uma série de fases estacionárias foi preparada pela imobilização via radiação gama sem o emprego de agentes químicos para indução do entrecruzamento polimérico. O poli(metiloctilsiloxano) (PMOS) foi imobilizado em suportes de sílica¹³⁰, sílica titanizada^{59,60} e sílica zirconizada^{61,62}, empregando radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto-60. Os resultados cromatográficos foram bastante satisfatórios e, em especial, as fases baseadas em suportes de sílica metalizada recobertas com PMOS apresentaram excelente estabilidade química mesmo após a passagem de 10.000 volumes de coluna empregando fase móvel em pH 12⁵⁹.

Outra possibilidade é o emprego da radiação gama juntamente com um iniciador radical para induzir o entrecruzamento das cadeias poliméricas na superfície do suporte. Schomburg et al.¹¹³ empregaram a radiação gama na presença de metacrilato de alila para a imobilização e entrecruzamento das cadeias de polibutadieno (PBD), PMOS e PMODS em sílica nua e sílica pré-silanizada (pré-capeada). Os autores obtiveram fases com bom desempenho cromatográfico e recobrimentos poliméricos de acordo com a quantidade de metacrilato de alila adicionado.

1.3.2.2. Radiação microondas

A radiação microondas é um tipo de energia não ionizante e, portanto, insuficiente para romper ligações químicas. Porém o aquecimento rápido induzido por ela pode ser utilizado eficientemente na imobilização de polímeros sobre suportes cromatográficos. O mecanismo de ação da radiação microondas baseia-se na transformação da energia eletromagnética em calor. Basicamente, esta transformação ocorre por duas formas diferentes: condução iônica e rotação dipolar. A condução iônica é uma forma de migração condutiva (eletroforética) de íons dissolvidos em um campo elétrico aplicado. A rotação dipolar é originada quando se aplica um campo elétrico alto, ocorrendo o alinhamento de moléculas com dipolos permanentes ou induzidos, presentes no meio. Quando o campo elétrico decresce devido à sua própria

oscilação, as moléculas alinhadas retornam ao estado inicial de desordem, produzindo uma energia associada. Na frequência de um forno de microondas comercial (2,45 GHz), o alinhamento e a desordem ocorrem cerca de 5×10^9 vezes por segundo, proporcionando um aquecimento muito rápido¹³³.

Alguns trabalhos desenvolvidos no LabCrom empregando a radiação microondas como forma de imobilização de PMOS sobre suporte de sílica¹³⁵ e sílica-titanizada⁵⁸ e de poli(butadieno) sobre partículas de sílica titanizada^{109,136} resultaram em fases estacionárias com bom desempenho cromatográfico e boa estabilidade em condições alcalinas de fase móvel.

1.3.2.3. Tratamento térmico

O tratamento térmico é uma fonte de energia empregada para as mais diversas finalidades. Este vem sendo o principal procedimento para a obtenção de fases reversas imobilizadas com⁹ ou sem^{8,118,119,131,137} o uso de agentes químicos de entrecruzamento. O princípio da imobilização térmica baseia-se no aquecimento da amostra por condução de calor, no qual o recipiente contendo a amostra é aquecido e ocorre a transferência de calor para a amostra. O tratamento térmico é empregado para acelerar a imobilização do polímero nos suportes cromatográficos, auxiliando no processo de auto-imobilização¹¹⁹. A auto-imobilização é um processo lento de imobilização à temperatura ambiente, sendo necessário um longo período de tempo, dependendo do tipo de fase e de suporte, para que ocorra o rearranjo das moléculas do polímero na forma de uma camada estável sobre a superfície dos poros do suporte¹³⁷.

Bottoli et al.⁸ prepararam fases de PMOS e de PMODS termicamente imobilizadas em partículas de sílica, empregando temperaturas na faixa de 80 a 220 °C. Os autores observaram que, em temperaturas mais baixas, 120 °C para o PMOS e na faixa de 80 a 100 °C para o PMODS, as fases apresentam melhores desempenhos cromatográficos devido à formação de uma monocamada polimérica. Em temperaturas mais elevadas, o desempenho cromatográfico é inferior, devido à formação de uma camada polimérica mais espessa, resultando em um processo mais lento de transferência de massa. A imobilização térmica foi empregada também para o preparo de fases estacionárias baseadas em suportes de sílica metalizada, apresentando comportamento cromatográfico semelhante às fases baseadas em sílica nua⁵⁸.

Fases estacionárias imobilizadas termicamente a temperaturas mais elevadas também já foram descritas na literatura. Ohmacht et al.⁹ imobilizaram PMOS em partículas de sílica empregando temperaturas superiores a 300 °C na presença de peróxido de benzoila para

promover a reticulação do polímero sobre o suporte. As fases preparadas a 400 °C apresentaram o melhor desempenho cromatográfico e boa estabilidade química em fase móvel a pH 9,0.

Porém, ainda não existe uma fase estacionária ideal, e cada tipo de fase tem seus prós e contras. A principal desvantagem das fases recobertas (sorvidas ou imobilizadas) com polímeros é a dificuldade de se obter uma camada polimérica uniforme ou bem definida na superfície dos poros do suporte cromatográfico. Nawrocki et al.²⁹ sugeriram que o recobrimento polimérico resultante, de uma forma geral, é invariavelmente retalhado e desigual (não homogêneo). Collins et al.¹¹⁷ mostraram que a deposição na forma de um filme polimérico fino e uniforme ao longo de uma área superficial muito grande é energeticamente desfavorável e que, preferencialmente, ocorrerá a formação de “plugs” dispersos ao longo de toda extensão da superfície da sílica. Desta forma, a não homogeneidade do recobrimento resultará em exposição dos grupos silanóis residuais e, conseqüentemente, haverá interação indesejável do suporte com solutos da amostra e locais suscetíveis ao ataque químico de fases móveis alcalinas, acelerando a dissolução da sílica. O grande desafio do preparo de fases recobertas com polímeros hoje é a obtenção de fases estacionárias com número reduzido de sítios de interações residuais, e o desenvolvimento de suporte estável em uma faixa de pH ampla. O LabCrom vem explorando estas duas linhas através do estudo da imobilização de diferentes polímeros sobre suportes de sílica metalizada com camadas de óxidos de titânio ou zircônio.

1.3.3. Fases estacionárias baseadas em suportes alternativos recobertos com polímero

Como discutido anteriormente, óxidos inorgânicos como alumina, zircônia e titânia apresentam estabilidade hidrolítica numa faixa de pH bem mais ampla que a sílica e, por este motivo, a utilização destes como suportes cromatográficos se tornou o foco de vários estudos para a obtenção de FE mais estáveis. Várias tentativas foram realizadas para modificar covalentemente os suportes de titânia, alumina e zircônia com ligantes orgânicos comumente empregados para o preparo de fases quimicamente ligadas baseadas em sílica. No entanto, as fases quimicamente ligadas baseadas nestes suportes alternativos, além de fornecerem densidade de ligação inferior, também não asseguraram estabilidades químicas comparáveis à sílica^{32,41,138}. No intuito de contornar estes inconvenientes e empregar os suportes de maior

estabilidade hidrolítica, um quantitativo número de estudos foi realizado para o recobrimento polimérico destes materiais.

Carr e colaboradores têm empregado suportes de zircônia recoberta com diversos polímeros, tais como: o poli(butadieno)^{32,106,139,140} e polímeros aromáticos¹⁴¹, incluindo o poli(estireno) (PS)⁴⁰, como fases estacionárias reversas. A preparação, as propriedades e a avaliação cromatográfica das fases de zircônia recoberta com PBD foram extensivamente descritas por Carr e colaboradores^{32,106,139,140}. Estas fases apresentam comportamento cromatográfico, principalmente com relação à retenção e à separação de compostos neutros, muito similares às fases reversas baseadas em sílica. Porém, foram observadas diferenças substanciais para compostos polares ou iônicos. As principais vantagens das fases de zircônia recobertas com polímeros são as estabilidades térmica e química elevadas. Por exemplo, as fases de zircônia recobertas com um polímero aromático¹⁴¹ foram estáveis em condições ácidas e alcalinas de fase móvel a 160 °C. Fases de zircônia recobertas com PBD podem ser utilizadas para análises por pelo menos 5.000 volumes de coluna em fase móvel a pH 14 e também a 195 °C sem que ocorra a deterioração do leito cromatográfico¹⁰⁶.

Jiang et al.¹⁰⁵ estudaram o comportamento de retenção de fases estacionárias de titânia recobertas com PBD e compararam os resultados com fases ligadas de sílica-C18. Os autores observaram que as fases de PBD baseadas em titânia têm comportamento de retenção muito similar às baseadas em sílica-C18, ou seja, a separação de compostos nas fases titânia-PBD é governada por mecanismos de partição. De uma forma geral, nas fases de titânia-PBD a retenção dos compostos é um pouco maior que na sílica-C18. Outros pesquisadores¹¹⁴ estudaram a viabilidade e a estabilidade de fases de alumina recobertas com polímeros, e obtiveram resultados similares aos descritos para fases à base de titânia e zircônia, com desempenho cromatográfico satisfatório para compostos apolares, porém com baixo desempenho para compostos polares, ácidos e básicos.

1.3.4. Histórico e perspectivas das fases estacionárias baseadas em suportes de sílica metalizada

Desde os primeiros estudos realizados com as fases estacionárias baseadas nos suportes de sílica metalizada foram obtidos resultados muito promissores para solucionar um histórico problema da cromatografia líquida de alta eficiência: a estabilidade química limitada de suas fases estacionárias, convencionalmente baseadas em sílica, a uma faixa estreita de pH, 2

a 8. A tentativa de substituição do suporte de sílica por um outro material mais estável, orgânico ou inorgânico, se esbarra no baixo desempenho cromatográfico das fases baseadas nestes suportes alternativos, apesar da obtenção de fases estacionárias estáveis em faixas mais amplas de pH. A alternativa encontrada pelos pesquisadores do LabCrom foi a união, em um único material de suporte, das propriedades da sílica, apropriadas para finalidades cromatográficas, à estabilidade química maior de óxidos metálicos.

As primeiras fases estacionárias baseadas em suportes de sílica metalizada foram preparadas no LabCrom pela sorção de PMODS¹⁴² e PMOS¹⁴³ sobre sílica zirconizada. O suporte de sílica zirconizada foi preparado pela reação sob refluxo de tetracloreto de zircônio (IV) com sílica cromatográfica em temperaturas brandas. No entanto, a quantidade de zircônio incorporada à sílica foi extremamente baixa, apenas 1,5 %. A este suporte de sílica zirconizada foi sorvida uma camada de PMODS¹⁴² ou de PMOS¹⁴³ e as fases estacionárias resultantes apresentaram desempenhos cromatográficos similares aos obtidos por fases baseadas em suportes de sílica nua. Este fato por si só trouxe grande perspectiva para o uso deste material como suporte cromatográfico. Porém, os parâmetros de retenção dos compostos nestas fases apresentaram baixa estabilidade com a passagem contínua de fase móvel. Para o aumento da quantidade de zircônio incorporada à sílica, Melo et al.^{61,62} empregaram temperaturas mais elevadas (150 °C) e substituíram o tetracloreto por tetrabutóxido de zircônio no processo de síntese, resultando em aproximadamente 15 % de zircônio na sílica. Além disso, os autores imobilizaram o PMOS na sílica zirconizada através da radiação gama para aumentar a estabilidade dos parâmetros de retenção dos compostos durante as análises cromatográficas. Os primeiros testes de estabilidade química das fases baseadas em sílica zirconizada também foram realizados por estes autores, mostrando boa estabilidade dos parâmetros cromatográficos destas fases em condições alcalinas.

Simultaneamente ao desenvolvimento das fases com PMOS sorvido e imobilizado por raios gama sobre a sílica zirconizada, Silva et al.^{59,60} prepararam um novo tipo de fase estacionária baseada na imobilização do PMOS sobre sílica titanizada. O procedimento de obtenção do suporte de sílica titanizada foi similar ao obtido para a sílica zirconizada, contudo, a quantidade de titânio incorporada à sílica foi muito inferior, apenas 5 %. Os autores também imobilizaram, por radiação gama, uma camada de PMOS sobre este suporte, a fase estacionária resultante apresentou desempenho cromatográfico similar às fases baseadas em suportes de sílica nua com boa estabilidade dos parâmetros cromatográficos em condições alcalinas drásticas, tal como em pH 12 (0,01 mol L⁻¹ NaOH).

Após os bons resultados obtidos com as fases de PMOS baseadas na imobilização sobre partículas de sílicas metalizadas (zirconizada e titanizada) esforços foram direcionados para o estudo de outros polímeros e novos procedimentos de imobilização, como por exemplo: Morais^{109,136} estudou o comportamento de fases estacionárias obtidas pela sorção e imobilização por radiação microondas de PBD sobre partículas de sílica titanizada, a qual foi sintetizada a partir de alcóxidos metálicos, obtendo cerca de 9 % de titânio incorporado à sílica; e Fonseca et al.^{58,144} empregaram o tratamento térmico e a radiação microondas como procedimentos de imobilização do PMOS sobre partículas de sílica contendo cerca 9 % de titânio. Em todos os casos, foram obtidas fases estacionárias de bom desempenho cromatográfico e estabilidade química, em condições alcalinas de fase móvel, superior à obtida por fases similares baseadas em suportes de sílica nua.

Mais recentemente, os estudos do grupo têm se voltado para o desenvolvimento de fases estacionárias baseadas em suportes de sílica metalizada de seletividades variadas, tal como a imobilização de misturas de polímeros de polaridades distintas e de polímeros com características mais polares¹⁴⁵. As fases estacionárias reversas resultantes têm apresentado um compromisso interessante, em termos de seletividade, entre as fases reversas convencionais e as fases estacionárias normais¹⁴⁵. Outro foco de pesquisas tem sido o desenvolvimento de fases estacionárias quimicamente ligadas baseadas nos suportes de sílica metalizada¹⁴⁶⁻¹⁴⁹. O processo de síntese baseado na reação sob refluxo de alcóxidos de titânio para o preparo do suporte de sílica titanizada vêm resultando em quantidades altas de titânio sobre a sílica, aproximadamente 15 %. Além disso, as fases estacionárias quimicamente ligadas com estes suportes têm apresentado estabilidade química, em condições alcalinas, superiores a uma vasta gama de fases estacionárias disponíveis comercialmente. Ambos os estudos têm empregado um número maior de camadas de óxidos metálicos sobre o suporte de sílica cromatográfica, o qual tem mostrado um aumento significativo na estabilidade química das fases se comparada à estabilidade de fases baseadas em suporte com apenas uma camada de óxido metálico incorporada à sílica¹⁴⁵.

Cada um destes trabalhos contribuiu significativamente para que as fases estacionárias preparadas no LabCrom alcançassem, atualmente, um nível adequado de qualidade. No entanto, muitos estudos ainda se fazem necessários, como por exemplo: o desenvolvimento de um método que possibilite o recobrimento mais uniforme das partículas do suporte para eliminar as interações indesejáveis de grupos residuais altamente ácidos com componentes polares da amostra; bem como a avaliação de novos óxidos metálicos que possam ser incorporados à superfície da sílica (tais como: crômia, céria, alumina, etc.) e de novos polímeros, os quais

possibilitem ajustar a fase estacionária a um determinado problema analítico e não o contrário, como comumente é realizado; o preparo de suportes com mais camadas de óxidos metálicos; etc.

1.4. Seletividade da fase estacionária, poli(metiltetradecil-siloxano)

Uma questão freqüentemente é levantada, “*Por que as fases estacionárias baseadas em grupos octadecil são as mais empregadas?*”. Segundo Kirkland⁷⁹ existem várias razões para isto, mas a principal é a tradição. As fases estacionárias baseadas em C18 foram as primeiras a serem preparadas devido à disponibilidade e baixo custo do reagente silano de C18. Os reagentes silanos baseados em grupos C18 foram usados para outras finalidades e foram fornecidos, naquela época, por diversas fontes. Portanto, era natural que os pesquisadores empregassem este reagente em seus experimentos. Desta experiência surgiram as primeiras colunas comercialmente disponíveis para CLAE-FR. Uma outra razão para a popularidade do C18 é a quantidade orgânica relativamente alta que se reagia com os suportes de sílica (fases densamente ligadas). Este fato foi muito importante no início do desenvolvimento da CLAE, pois se utilizavam suportes de sílica superficialmente porosa ou suportes peliculares, que apresentavam pequena área superficial, a qual limitava a retenção do componente da amostra. Portanto, uma alta porcentagem orgânica no suporte era necessária para uma retenção mais forte dos analitos a serem separados. Uma outra vantagem potencial era o comprimento da cadeia orgânica do C18 que protegia mais eficientemente o suporte do ataque de fases móveis mais ácidas e também mais básicas, comparado aos ligantes de cadeias mais curtas. Esta estabilidade das colunas C18 foi de extrema importância naquela época, pois desta forma, os cromatografistas poderiam focar a atenção na reprodutibilidade da separação⁷⁹.

Entretanto, existem algumas desvantagens relacionadas às fases baseadas em C18. Recheios cromatográficos densamente ligados, como descritos acima, podem exibir o colapso da fase quando se empregam fases móveis contendo percentagem aquosa alta. Além disso, fases estacionárias com ligantes de cadeias mais curtas podem apresentar eficiência de coluna ligeiramente maior para alguns compostos. Recheios cromatográficos com grupos funcionais mais curtos podem re-equilibrar mais rapidamente após as separações empregando eluições por gradiente.

Portanto, uma outra questão pode ser aqui colocada. *Existe alguma fase estacionária alquila ideal, em geral, com as melhores características para separações no modo de fase reversa?* Segundo Kováts e colaboradores¹⁵⁰ a resposta é sim. Estes autores determinaram em seus estudos que o grupo C14 proporciona, de uma forma geral, as propriedades ótimas para uma fase estacionária, pois, fases estacionárias com o grupo C14 resultarão em separações no modo de fase reversa com boa eficiência, estabilidade, picos simétricos e características apropriadas de retenção. Embora este e outros estudos sugiram que grupos C14 (ou C12) apresentem características cromatográficas mais apropriadas que o C18, este último juntamente com o grupo C8 ainda são os mais populares. Curiosamente, não se encontram relatos do uso das “fases ótimas” baseadas em C12 e C14 nos dias de hoje.

Um dos objetivos deste trabalho foi verificar as características cromatográficas do poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS). O PMTDS é um polissiloxano com cadeias poliméricas contendo 14 átomos de carbono em média (Figura 5) e possui um alto grau de compatibilidade de hidrocarboneto. Assim, como qualquer outro polissiloxano, apresenta boa estabilidade térmica e termo-oxidativa, elasticidade a baixas temperaturas, temperatura de transição vítrea baixa e resistência química e mecânica, enquanto a seletividade é dependente do grupo tetradecil presente na estrutura polimérica¹⁵¹.

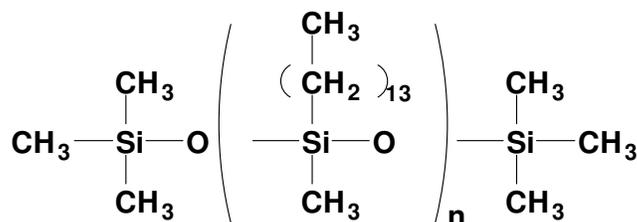


Figura 5. Estrutura polimérica do PMTDS.

1.5. Testes cromatográficos de caracterização

A grande utilização de fases reversas levou a introdução de uma ampla faixa de diferentes fases estacionárias, como visto, de alta qualidade que, juntamente com um grande número de ferramentas para controle e otimização das separações, contribuíram para a sólida popularização da CLAE-FR. Entretanto, as várias centenas de fases reversas, em muitos casos nominalmente idênticas, disponíveis atualmente dificultam a seleção de uma melhor coluna para um problema específico de separação. Este problema se estende tanto às fases quimicamente ligadas quanto às fases recobertas por polímeros. Desta forma, para que a

seleção da coluna contendo a fase estacionária apropriada, para a separação em questão, não se torne um problema, uma completa caracterização da fase estacionária é extremamente desejável para diferenciar características aparentemente similares¹. Métodos espectroscópicos¹⁵², termogravimétricos¹⁵³ e físico-químicos para a caracterização são freqüentemente empregados. Porém, estes métodos destroem a fase estacionária durante a análise. Uma alternativa mais apropriada é o uso de testes cromatográficos que avaliam a qualidade, as características e a viabilidade analítica das fases com base em interações intermoleculares entre o analito, a fase estacionária e a fase móvel, sem a destruição da coluna¹⁵⁴.

Um grande número de testes cromatográficos tem sido discutido na literatura. Apesar da maioria dos protocolos testes sugeridos fornecer apenas um sistema de qualificação interna das próprias fases, que em nada contribuem para um sistema objetivo de caracterização geral, alguns protocolos testes simples para avaliação de fases estacionárias reversas foram sugeridos para tal propósito. Estes testes permitem a comparação das propriedades (tais como: retenção, hidrofobicidade, seletividade estérica, atividade silanofílica, capacidade de troca iônica e habilidade de formar ligações de hidrogênio, além da eficiência da coluna) de uma determinada fase em relação a uma outra em específico, ou, em relação a valores encontrados na literatura^{155,156}. Os mais conhecidos e freqüentemente empregados foram sugeridos por Tanaka e colaboradores¹⁵⁷, Engelhardt e Jungheim¹⁵⁸ e Neue et al.^{159,160}. Além da simplicidade e da possibilidade de uma comparação geral entre fases aparentemente idênticas, também contribuem para um entendimento mais detalhado da retenção e seletividade em CLAE-FR.

1.6. Avaliação cromatográfica de fases estacionárias

O cromatograma da separação de uma determinada mistura-teste, contendo compostos previamente selecionados, pode ser utilizado para fornecer informações a respeito do desempenho de uma coluna cromatográfica. Para isto, alguns parâmetros cromatográficos são calculados a partir de dados característicos dos compostos obtidos no cromatograma, como mostrado na Figura 6:

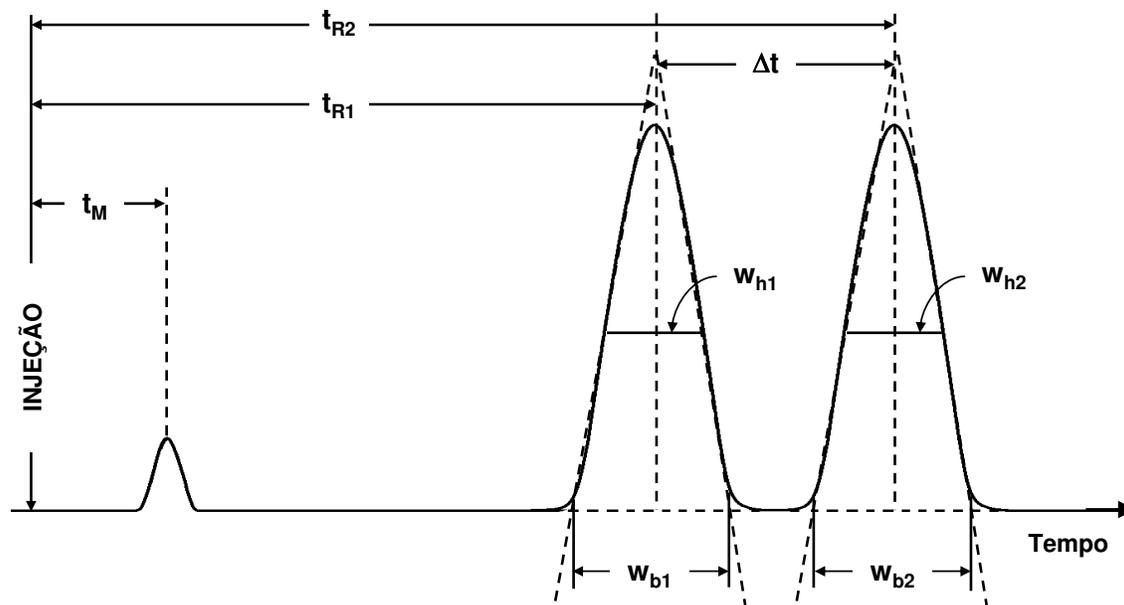


Figura 6. O cromatograma e suas informações características.

no qual:

w_b é a largura do pico na linha de base;

w_h é a largura do pico à meia altura;

t_M é o tempo de retenção de um composto não retido pela fase estacionária, isto é, o tempo gasto pela fase móvel, na qual a amostra injetada se encontra diluída, para percorrer a coluna cromatográfica e conexões até a cela do detector.

t_R é o tempo de retenção do composto, isto é, o tempo que o composto leva para percorrer o sistema cromatográfico desde o momento de sua injeção até o registro do máximo de seu pico.

Dois componentes só poderão ser separados se tiverem tempos de retenção diferentes na fase estacionária. O tempo que um composto fica retido na fase estacionária, tempo de retenção ajustado (t'_R), é obtido pela diferença entre o tempo total gasto pelo composto no sistema cromatográfico (t_R) e o tempo em que ele se encontra na fase móvel (t_M), $t'_R = t_R - t_M$.

O tempo de retenção é uma função de algumas variáveis, dentre as quais se destacam: a vazão da fase móvel e do comprimento da coluna. Se a fase móvel tiver uma vazão muito baixa ou se a coluna for muito longa, tanto o t_M quanto o t_R serão muito altos. Portanto, o t_R não é apropriado para caracterizar um determinado composto. Neste caso, é preferível utilizar o fator de retenção (k), pois este parâmetro é independente do comprimento da coluna e da vazão da fase móvel e representa a razão molecular do composto nas fases estacionária e móvel, como sugerido pela Equação 1, onde n_s e n_m são os números de moléculas retidas na FE ou percorrendo a coluna na FM, respectivamente.

$$k = \frac{n_s}{n_M} = \left(\frac{t_R}{t_M} \right) = \frac{t'_R}{t_M} \quad \text{Equação 1}$$

O fator de retenção deve compreender valores de 2 a 10, preferivelmente. Se os valores de k são muito baixos, o grau de separação pode ser inadequado, valores de k muito altos resultam em tempos de análises muito longos^{12,161}.

Dois componentes em uma mistura não podem ser separados se apresentarem o mesmo valor de k . O grau de separação entre dois compostos adjacentes em um cromatograma normalmente é verificado pelo fator de separação (α)¹¹, conforme mostrado na Equação 2:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_{R2}} \quad \text{Equação 2}$$

com $k_2 > k_1$. Se $\alpha = 1$, nenhuma separação ocorre porque os tempos de retenção dos compostos são idênticos. O fator de separação é uma medida do potencial do sistema cromatográfico para a separação de dois compostos, ou seja, sua seletividade, que é totalmente dependente das fases estacionária e móvel empregadas¹¹.

A resolução (R_s) de dois compostos adjacentes é definida pela razão da distância entre os máximos dos dois picos correspondentes (ou seja, a distância entre os dois tempos de retenção, t_R) e a média aritmética das larguras à linha de base dos dois picos:

$$R_s = 2 \left[\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{b1} + w_{b2}} \right] = 1,177 \left[\frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{h1} + w_{h2}} \right] \quad \text{Equação 3}$$

Quando $R_s = 1$, os picos não estão completamente separados, mas é possível observar a presença de dois componentes. Resolução de 1,25 representa uma separação ideal de dois compostos adjacentes, sem nenhuma superposição dos picos se estes são perfeitamente simétricos¹¹.

A simetria de um pico no cromatograma é determinada pelo fator de assimetria (A_s). O fator de assimetria é calculado a partir da razão da distância horizontal do ponto central até o fim do pico (CB) pela distância horizontal do início até o ponto central do pico (AC), conforme

mostrado na Figura 7. Por razões práticas, como problemas de estabilidade da linha de base, esta medida é realizada a 10 % da altura do pico.

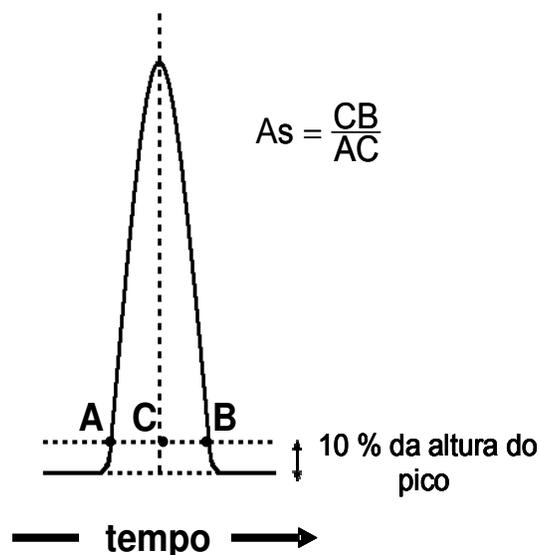


Figura 7. Medida e cálculo do fator de assimetria do pico.

Segundo a literatura, os valores de A_s devem estar entre 0,9 e 1,2, sendo admitido valores de até 1,6^{11,12}.

Finalmente, o cromatograma pode ser utilizado para calcular o número de pratos, N , em uma coluna, conforme sugere a Equação 4:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w_b} \right)^2 = 5,54 \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2 \quad \text{Equação 4}$$

A partir da Equação 4, nota-se que a eficiência de uma coluna será maior quanto mais estreito for o pico cromatográfico. Além disso, outros fatores podem alterar o número de pratos de uma coluna como, por exemplo: tamanho das partículas do recheio estacionário, condições de enchimento da coluna, tipo de soluto, comprimento da coluna, etc. Normalmente, a eficiência de uma coluna usada em CLAE é expressa em número de pratos por metro (N/m), pois, desta forma, é possível comparar a eficiência cromatográfica de colunas de diferentes comprimentos.

A medida da altura de um prato (H) é uma outra forma de se comparar o desempenho de colunas cromatográficas diferentes. H pode ser obtida de acordo com a Equação 5:

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Equação 5}$$

onde: L é o comprimento e N o número de pratos da coluna.

Outra forma de expressar a eficiência de uma coluna cromatográfica é através da equação de van Deemter, Equação 6:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu \quad \text{Equação 6}$$

onde: μ é a velocidade linear da fase móvel ($\mu = L / t_M$). O *termo A* da equação está relacionado à difusão turbilhonar, que resulta em alargamento dos picos devido aos diferentes caminhos percorridos pelas moléculas do analito. Uma das formas de minimizar o efeito do termo A na equação de van Deemter é a utilização de colunas com diâmetros internos reduzidos, com boa compactação do recheio cromatográfico constituído de partículas uniformes e de tamanho reduzido. O *termo B* está relacionado à difusão longitudinal, na qual as moléculas do analito são espalhadas na fase móvel. A forma mais simples de minimizar este efeito é a utilização de velocidades lineares altas de fase móvel. Este termo tem contribuição de pouca relevância em CLAE, pois o coeficiente de difusão de um dado composto no líquido é muito baixo. O *termo C* está relacionado ao efeito de transferência de massa, o qual quantifica a dificuldade de transferência das moléculas do analito entre a fase móvel e a fase estacionária. Para minimizar a contribuição deste efeito na equação de van Deemter pode-se reduzir a espessura do filme polimérico ligado/imobilizado/adsorvido à superfície das partículas do suporte. Quanto maior a espessura deste filme, maior será a contribuição do termo C para a equação e, conseqüentemente, menor será a eficiência da coluna.

A equação de van Deemter, contendo a contribuição dos termos A, B e C, pode ser representada graficamente, conforme ilustrado na Figura 8.

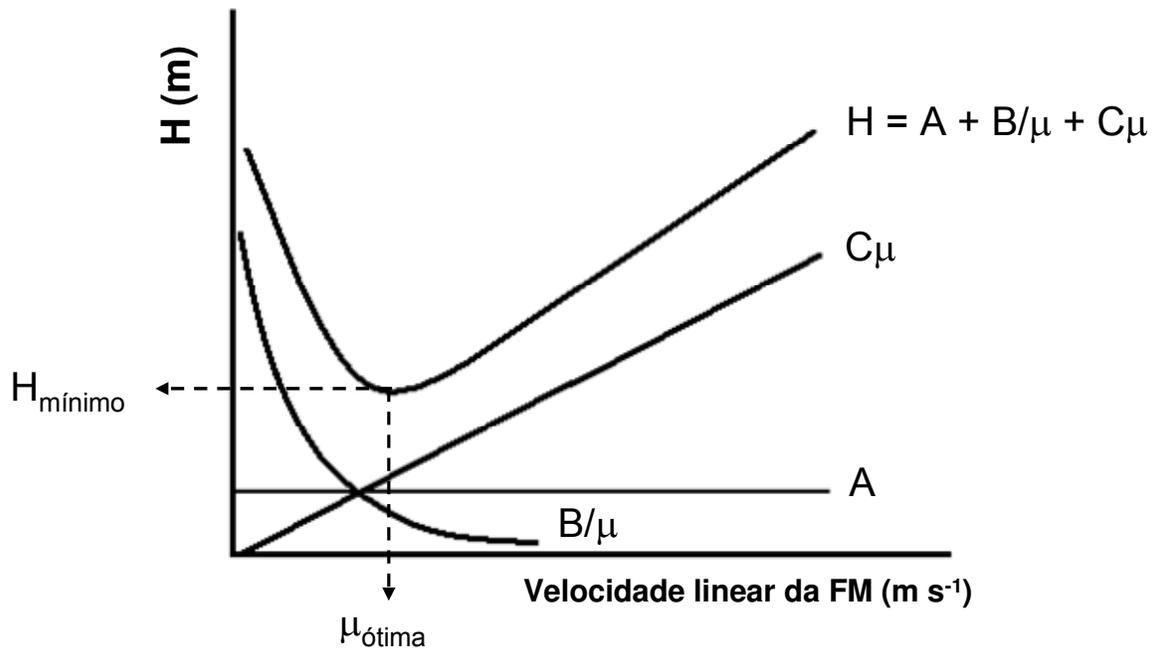


Figura 8. Curva de van Deemter¹⁶².

A curva de van Deemter mostra que existe uma vazão ótima (f) de fase móvel, relacionada à velocidade linear (μ), que resulta em um valor máximo de eficiência de coluna ou em um valor mínimo de H .

1.7. Planejamento e Otimização de Experimentos

O planejamento e a otimização de experimentos são ferramentas usadas para examinar sistematicamente diferentes tipos de problemas nos mais diversos setores de pesquisa, desenvolvimento e produção. Quando os experimentos são realizados de forma aleatória é de se esperar que os resultados também sejam obtidos de forma aleatória. Por isso, faz-se necessário o planejamento de experimentos para que a informação de interesse possa ser obtida.

Em qualquer procedimento experimental, algumas variáveis podem influenciar o resultado de forma positiva ou negativa. Quando a lista de variáveis a serem investigadas está completa, um planejamento experimental é escolhido para estimar a influência das diferentes variáveis nos resultados. O planejamento fatorial permite determinar a influência de todas as variáveis experimentais, bem como os seus efeitos de interação na resposta investigada. Para se fazer um planejamento fatorial completo, os experimentos devem ser realizados em todas as

possíveis combinações dos níveis dos fatores. Desta forma, para k variáveis investigadas em dois níveis cada, serão necessários, pelo menos, 2^k experimentos. Ou seja, para duas variáveis investigadas são necessários, no mínimo, 4 experimentos. Porém, quando se conhece pouco sobre o procedimento experimental faz-se necessária uma triagem das variáveis que realmente influenciam os resultados, de forma significativa. Neste caso, se a quantidade de variáveis a serem investigadas é muito grande, torna-se inviável o uso de um planejamento fatorial completo. Por exemplo, se tiverem 7 (sete) variáveis a serem estudadas, serão necessários $2^7 = 128$ experimentos. No entanto, planejamentos fatoriais fracionários permitem o estudo de um grande número de variáveis realizando apenas um número limitado de experimentos sem perder as informações de interesse^{163,164}. Este tipo de planejamento é aplicável, principalmente, em triagens de variáveis.

Muitas vezes a determinação das variáveis que influenciam nos resultados e a intensidade desta influência são apenas uma das etapas do processo. Principalmente em química analítica, a otimização de um procedimento experimental é uma necessidade, seja para a redução de gastos ou de tempo, entre outros. Uma excelente ferramenta para otimização de um procedimento analítico é a utilização de metodologia de superfície de resposta. A metodologia de superfícies de respostas é uma boa forma de ilustrar graficamente a relação entre diferentes variáveis experimentais e as respostas. A única exigência que se faz para a determinação do ponto de ótimo (melhor resultado) é que a função polinomial que explica os resultados contenha termos quadráticos. Para ajustar os dados experimentais a um modelo quadrático, normalmente aplica-se o planejamento composto central^{163,164}. Este planejamento é dividido, basicamente, em três partes:

- Planejamento fatorial completo ou fracionário, para determinação das variáveis que influenciam significativamente os resultados;
- Experimentos no ponto central. O ponto central é a condição intermediária aos níveis de todas as variáveis estudadas;
- Planejamento axial (ou estrela), que são experimentos realizados em pontos axiais, com distância $\pm \alpha$ da origem. Este tipo de planejamento pode ser melhor entendido quando ilustrado graficamente. A Figura 9 apresenta um sistema de coordenadas situando cada etapa do planejamento composto central.

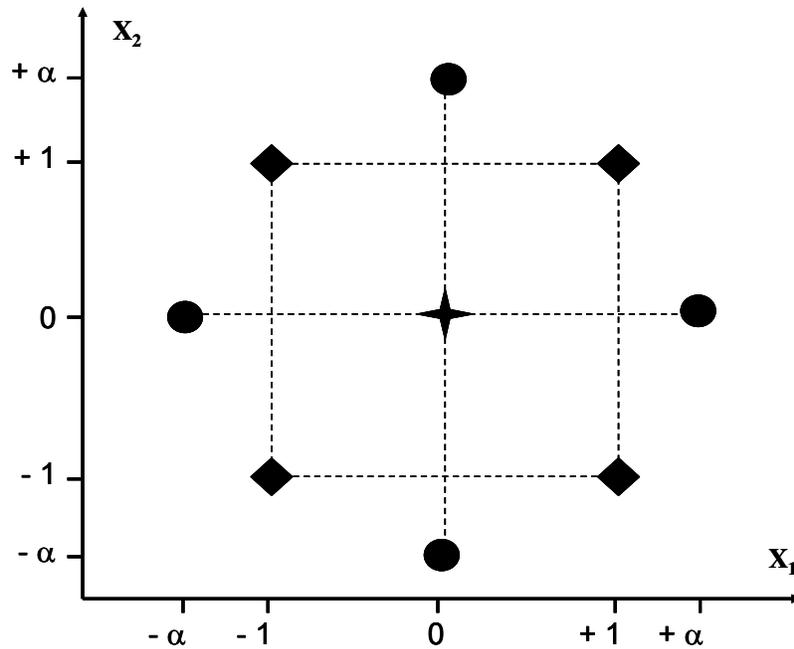


Figura 9. Planejamento composto central para duas variáveis. (◆) planejamento fatorial 2^2 , (+) ponto central e (●) planejamento axial.

O planejamento experimental permite conclusões apenas dentro da região investigada (superfície de resposta), porém, é uma ferramenta bastante útil e confiável para otimização de processos em química analítica.

2. OBJETIVOS

Esta pesquisa teve por objetivo principal o desenvolvimento de FE para serem empregadas em CLAE-FR, baseadas na imobilização do polímero PMTDS na superfície e poros de partículas de sílicas metalizadas (sílica zirconizada e sílica titanizada) de 5 μm . Para justificar as suas competitividades, as FE desenvolvidas deverão apresentar desempenho cromatográfico similar e estabilidade maior quando comparadas às fases disponíveis comercialmente.

Para alcançar os objetivos delineados, foram realizadas as seguintes etapas:

- Síntese dos suportes de sílica metalizada, através da modificação da superfície da sílica com tetrabutóxido de zircônio ou titânio, otimizando a percentagem do metal incorporado à sílica.
- Caracterização textural e estrutural das partículas de sílica metalizada, empregando métodos físicos e químicos.
- Preparação das fases estacionárias, empregando o método de evaporação estática do solvente e, aplicando, para a imobilização do PMTDS sobre as partículas de sílica metalizada, a radiação gama e o tratamento térmico.
- Avaliação da adsorção do PMTDS sobre os suportes de sílica metalizada, fenômeno da auto-imobilização¹¹⁹.
- Otimização das condições de imobilização das fases estacionárias para a obtenção de colunas cromatográficas com bom desempenho cromatográfico.
- Caracterização das fases estacionárias sorvidas e imobilizadas, empregando testes químicos, físicos e cromatográficos.
- Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias otimizadas em condições alcalinas de fase móvel e comparação com a estabilidade de fases estacionárias similares baseadas em suportes de sílica nua, nas mesmas condições.
- Avaliação da aplicabilidade das fases estacionárias na separação de diferentes classes de compostos.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes

- Acenafteno, 99 %, Aldrich.
- Ácido Nítrico, p.a., Synth.
- Água Deionizada Milli Q Plus, Millipore.
- Anilina, 99,5 %, Fluka.
- Benzeno p.a., Synth.
- Benzilamina, 99 %, Merck.
- Benzonitrila, Riedel – de Häen.
- Butilbenzeno, 98 %, Merck.
- Butanol, grau cromatográfico, Tedia.
- Cafeína, 100 % USP, Aldrich.
- Clorofórmio p.a., Tedia.
- Diclorometano, grau cromatógrafo, Tedia.
- Diclorometano, p.a., Merck.
- Etilbenzeno, Merck.
- Fenol, 99 %, Aldrich.
- Hexano, grau cromatográfico, Tedia.
- Isopropanol p.a., Tedia.
- Metanol grau cromatográfico, Tedia.
- Naftaleno, Carlo Erba.
- N,N-Dimetilanilina, 98 %, Fluka.
- *o*-Terfenila, 99 %, Merck.
- Óxido de titânio, 99,7% de pureza, Alfa Aesar.
- Óxido de zircônio, 99,7% de pureza, Alfa Aesar.
- Peneira molecular de 30 nm, Alfa Inorganics Ventron.
- Pentilbenzeno, 98 %, Merck.
- Poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS), United Technologies.
- Sílica Kromasil, partículas de 5 µm, Akzo Nobel.
- Tetrabutóxido de titânio, 97 %, Sigma Aldrich.

- Tetrabutóxido de zircônio, 99 %, Aldrich.
- Tolueno p.a., Merck.
- Trifenileno, 98 %, Fluka.
- Uracil, 98 %, Aldrich.

3.2. Fases estacionárias comerciais

3.2.1. Recheadas no laboratório

- Kromasil-C18, com partículas esféricas, diâmetro médio de 5 μm , de sílica-C18, Eka Chemicals. Coluna de 60 \times 3,9 mm de d.i.
- Lichrosorb-RP18, fase estacionária constituída por partículas irregulares de sílica-C18, diâmetro médio de 10 μm , Agilent Technologies. Coluna de 60 \times 3,9 mm de d.i.
- Rainin-ODS, fase estacionária constituída por partículas irregulares de sílica-C18, diâmetro médio de 5 μm , Varian. Coluna de 60 \times 3,9 mm de d.i.
- Spherisorb ODS, fase estacionária constituída de partículas esféricas de sílica-C18, diâmetro médio de 10 μm , Waters. Coluna de 60 \times 3,9 mm de d.i.

3.2.2. Colunas comerciais prontas

- Kromasil-C18, com partículas esféricas, diâmetro médio de 5 μm , de sílica-C18, recheando uma coluna de 125 \times 4,6 mm de d.i., Eka Chemicals.
- Chromolith-C18, coluna monolítica de sílica-C18 com dimensões de 100 \times 4,6 mm de d.i., Merck.
- Luna-C8, coluna com dimensões de 125 \times 4,6 mm de d.i. recheada com partículas esféricas de sílica-C8, Phenomenex.

3.3. Agroquímicos e fármacos

3.3.1. Agroquímicos

- Atrazina, 97,7 %, adquirido na Novartis.
- Carboxim, 99,0 %, adquirido na BASF.
- Cianazina, 98,0 %, adquirido na Cyanamid.
- Diurom, 99,3 %, adquirido na Du Pont.
- Imazetapir, 99,0 %, adquirido na ChemService.
- Linurom, 99,5 %, adquirido na Hoescht.

3.3.2. Fármacos

- Ácido acetilsalisílico, doado pela Medley.
- Alprazolam, doado pela Medley.
- Amitriptilina, doado pela Medley.
- Cafeína, doado pela Medley.
- Cefalexima, doado pela Medley.
- Ibuprofeno, doado pela Medley.
- Lorazepam, doado pela Medley.
- Paracetamol, doado pela Medley.
- Prilocaina, doado pela Medley.
- Metilparabeno, doado pela Medley.
- Propilparabeno, doado pela Medley.
- Butilparabeno, doado pela Medley.

3.4. Equipamentos

- Agitador magnético, Corning modelo PC351.
- Agitador roto-torque, Cole-Parmer modelo 7637-01.
- Agitador Vórtex, Phoenix modelo AP56.

- Analisador elementar, Perkin-Elmer modelo 2400.
- Analisador termogravimétrico, TA Instruments modelo TGA-2050.
- Balança analítica, Fischer Scientific modelo A-250, precisão de 0,0001 g.
- Banho termostatizado, Marconi modelo MA120.
- Banho ultra-som, Thornton modelo T14.
- Bomba para enchimento de colunas, Haskel modelo 51769.
- Centrífuga, Fischer Scientific modelo 225.
- Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, composto de uma bomba de alta pressão, Shimadzu modelo LC-10 AD; detector UV-Vis, Shimadzu modelo SPD-10 AV utilizado em $\lambda = 254$ nm; válvula de injeção (alça de amostragem de 5 μ L), Rheodyne modelo 8125; Softwares usados para aquisição de dados - ChromPerfect for Windows 3.52 e Report Write Plus (Justice Innovations).
- Cromatógrafo a líquido, Shimadzu, equipado com uma bomba de alta pressão, Shimadzu modelo LC-10AD; detector UV-vis, Shimadzu modelo SPD-10A utilizado em 254 nm; forno de coluna CTO-10AS; injetor automático SIL-10AD e um sistema controlador SCL-10A. Os dados foram adquiridos e processados empregando o software CLASS-VP da Shimadzu.
- Cromatógrafo a líquido para permeação em gel, Waters, equipado com uma bomba de alta pressão modelo 510; sistema de detecção por índice de refração modelo 410; sistema de injeção U6K; forno para coluna e sistema de aquisição de dados Millennium.
- Espectrômetro de fluorescência raios X, Shimadzu, modelo EDX-700, energia 4,5 eV, fonte de rádio.
- Espectrômetro fotoeletrônico de raios X, McPherson-30, com ânodo de alumínio ($Al_{K\alpha} = 1486,6$ eV).
- Espectrômetro de absorção no infravermelho, Perkin-Elmer modelo FTIR 1600.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian, modelo INOVA 500.
- Espectrofotômetro de absorção no UV-vis, Varian modelo CARY 5G, com acessórios de refletância difusa.
- Estufa a vácuo, Yamato modelo ADP21.
- Forno tubular, EDG modelo 10P-S.
- Microscópio eletrônico de varredura Jeol modelo JSM-6360LV.
- Microscópio de força atômica, DInanoscope modelo IIIa.
- pHmetro, Digimed modelo DM 21.
- Porosímetro, Micromeritics ASAP 2010.
- Sistema de deionização de água, Milli-Q plus, Millipore.

- Sistema para extração do excesso de polímero, composto por uma bomba cromatográfica Waters modelo 510 e um forno com controle de temperatura, Eldex Laboratories modelo CH-150.

3.5. Síntese do suporte de sílica metalizada

As sínteses dos suportes cromatográficos, de sílica zirconizada e de sílica titanizada, foram realizadas segundo uma adaptação do método de Gushikem e colaboradores^{165,166} que sintetizaram óxidos mistos com finalidades catalíticas. Os procedimentos são baseados na reação de partículas de sílicas com alcóxidos metálicos.

3.5.1. Sílica zirconizada

Frascos contendo sílica Kromasil foram colocados em estufa a 150 °C por 12 horas para ativação antes do uso. Outras porções não sofreram ativação. Em tubos de reação foram pesados 2,5 g de sílica e adicionados 20 mL de solução de tetrabutóxido de zircônio em solvente anidro (butanol ou tolueno) (adicionando peneiras moleculares dentro dos frascos do solvente). A mistura foi deixada por tempos e temperaturas pré-estabelecidos em banho termostático. A cada 30 minutos a mistura era retirada do banho e agitada em agitador vórtex por um minuto. Após o período da reação, a mistura foi centrifugada por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sólido resultante submetido a cinco etapas sucessivas de lavagem com o solvente anidro, para a remoção de resíduos orgânicos. Cada etapa de lavagem consistiu da adição de 15 mL de solvente anidro, agitação em vórtex, centrifugação por 15 minutos e descarte do sobrenadante. Após esta etapa, o material foi seco com gás nitrogênio (N₂). Ao sólido seco, dentro do tubo de reação, foram adicionados 15 mL de solução aquosa de HNO₃ 10⁻³ mol L⁻¹, para hidrólise dos grupos alcóxidos residuais do sólido. A mistura foi agitada em vórtex e centrifugada por 15 min. Novamente a parte sólida foi lavada, desta vez com água deionizada, por quatro vezes. Após o descarte do sobrenadante no último estágio da lavagem com água, o material sólido foi colocado em estufa a 120 °C por 12 horas. Para a incorporação de uma dupla camada de óxido de zircônio à superfície da sílica, no dia seguinte o procedimento foi novamente repetido.

Para otimizar o processo de “zirconização” da sílica foi utilizado o planejamento composto central. As etapas envolvidas foram:

- Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} , para seleção das variáveis (fatores) que afetam significativamente a incorporação de zircônio à superfície da sílica;
- Planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central;
- Planejamento estrela.

As variáveis e os níveis estudados pelo planejamento (Tabela 1) foram selecionados segundo trabalhos anteriores desenvolvidos no LabCrom^{61,62,142}, empregando método univariado.

Tabela 1. Variáveis e níveis estudados para a otimização da zirconização da sílica.

	Variáveis	Nível baixo (-)	Nível alto (+)
1	Sílica	não ativada	ativada
2	Solvente anidro	butanol	tolueno
3	Tempo de reação (h)	4	6
4	Temperatura (°C)	30	50
5	Quantidade de reagente (g)	6,0	7,6

As quantidades de tetrabutóxido de zircônio avaliadas neste estudo, 6,0 e 7,6 g, equivalem a 25 e 35 mmol de Zr para cada grama de sílica, respectivamente.

3.5.2. Sílica titanizada

O procedimento para a síntese da sílica titanizada foi similar ao da sílica zirconizada, diferindo apenas nas condições avaliadas para a otimização do processo de “titanização”. Todo o processo também foi repetido, no dia seguinte, para obtenção de quantidades maiores de titânio na sílica. O planejamento composto central foi utilizado para otimizar o procedimento, as etapas envolvidas foram:

- Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , para seleção dos fatores mais importantes na incorporação de titânio à sílica;
- Planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central;
- Planejamento estrela.

As variáveis e seus respectivos níveis foram determinados de acordo com trabalhos anteriores do LabCrom^{58,59,60,109}, que empregaram método univariado para a síntese deste

suporte. A sílica empregada neste estudo não foi ativada, pois, de acordo com o procedimento de zirconização, a presença de traços de água adsorvidos na sílica favorece a incorporação (por hidrólise) do óxido metálico. A Tabela 2 apresenta as condições analisadas para a otimização da síntese do suporte de sílica titanizada.

Tabela 2. Variáveis e níveis estudados para a otimização da titanização da sílica.

	Variáveis	Nível baixo (-)	Nível alto (+)
1	Solvente	butanol	tolueno
2	Tempo de reação (h)	3	5
3	Temperatura (°C)	30	50
4	Quantidade de reagente (g)	5,0	6,4

As quantidades de tetrabutóxido de titânio avaliadas neste estudo, 5,0 e 6,4 g, equivalem a aproximadamente 25 e 35 mmol de Ti para cada grama de sílica, respectivamente.

3.5.3. Caracterização físico-química dos suportes de sílica metalizada

Apesar de alguns trabalhos já terem sido desenvolvidos no LabCrom empregando os suportes de sílica zirconizada e titanizada, as propriedades texturais e estruturais destes materiais ainda não foram bem definidas. Neste trabalho foi desenvolvido um estudo detalhado sobre estas propriedades. Diversas técnicas foram utilizadas para a obtenção de um máximo de informação possível sobre os novos suportes cromatográficos. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas.

3.5.3.1. Espectroscopia de fluorescência de raios X

A espectroscopia de fluorescência de raios (FRX) permite avaliar quantitativamente a extensão da incorporação de zircônio e titânio na superfície da sílica. Para tal, foram preparadas duas curvas analíticas, uma para a análise das amostras de sílica zirconizada e outra para a sílica titanizada. Cada ponto da curva analítica foi obtido pela análise de 100 mg de padrão contendo uma mistura mecânica de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ ou $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$, na faixa de concentração

de 0 a 21 % em massa. As concentrações de zircônio e titânio foram determinadas pela análise de 100 mg das amostras, contidas em microcelas específicas, em um espectrofotômetro de fluorescência de raios X.

3.5.3.2. Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros

As amostras de sílica zirconizada e titanizada foram submetidas à determinação da área superficial específica, volume e diâmetro de poros. Estas medidas foram obtidas pela adsorção e dessorção de nitrogênio a $-195,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Porém, antes das medidas, as amostras foram desgaseificadas a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h sob vácuo. A área superficial específica foi calculada de acordo com o método BET¹⁶⁷ a pressões relativas (p/p_0) entre 0,06 e 0,25, na qual p e p_0 são, respectivamente, pressão de equilíbrio e pressão de saturação do nitrogênio a $-195,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. O volume total de poro foi determinado empregando o método do ponto único, pela conversão do volume de nitrogênio adsorvido na p/p_0 de 0,995 para o volume do adsorbato líquido. O diâmetro médio dos poros foi calculado a partir dos valores de volume total de poro e da área superficial BET ($4 V_p/S_{\text{BET}}$).

3.5.3.3. Microscopia eletrônica de varredura e de força atômica

A morfologia das partículas de sílica zirconizada e titanizada foi avaliada por duas técnicas microscópicas, eletrônica de varredura (MEV) e força atômica (MFA).

Na MEV, as partículas foram fixadas em porta-amostras por uma fita dupla face de carbono. Em seguida, foram recobertas com uma fina camada de ouro, na qual o metal foi bombardeado com átomos de argônio sob alto vácuo por 120 s, para a formação de uma camada de aproximadamente 10 nm de espessura. As fotomicrografias das partículas foram obtidas com resoluções de até 7.000 vezes.

Na MFA, as partículas foram colocadas sob discos metálicos (~25 mm de diâmetro) e fixadas com esmalte, para evitar desprendimento de partículas durante as medidas. As amostras foram analisadas em um microscópio de força atômica nas instalações do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), empregando o método do contato.

3.5.3.4. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das sílicas metalizadas foi avaliada por análise termogravimétrica, na qual 10 mg de amostra foram submetidas a um aquecimento na faixa de temperatura de 25 °C até 1.000 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹. As medidas foram realizadas sob ar atmosférico em um analisador termogravimétrico, no qual foi medida a percentagem de perda de massa da amostra, empregando uma microbalança, com o aumento da temperatura.

3.5.3.5. Espectroscopia de absorção no infravermelho

As amostras foram prensadas com brometo de potássio sob vácuo, na proporção de 10:1, formando pastilhas adequadas para análises na região do infravermelho (IV). Os espectros de IV foram obtidos no intervalo espectral de 4.000 a 400 cm⁻¹, empregando uma resolução de 4 cm⁻¹ e uma taxa de 20 varreduras por minuto.

3.5.3.6. Espectroscopia de absorção no UV-vis com refletância difusa

Os suportes de sílica metalizada foram analisados na região do ultravioleta, na faixa de 190-400 nm de comprimento de onda. A utilização de acessório de refletância difusa se justifica devido a grande área superficial das partículas de sílica modificada que gera grandes perturbações nos espectros de absorção, advindas do espalhamento de luz. Sulfato de bário (BaSO₄) foi utilizado como refletância padrão para as medidas, pois apresenta baixo nível de ruído. Os espectros de cada amostra foram corrigidos pelo branco. Foram analisadas misturas mecânicas de SiO₂/ZrO₂ e SiO₂/TiO₂, preparadas pela simples mistura dos óxidos em agitador vórtex sem qualquer tratamento posterior, para comparação de seus espectros com os espectros das amostras.

3.5.3.7. Espectroscopia fotoeletrônica de raios X

As medidas de espectroscopia fotoeletrônica de raios X (EFX) foram realizadas usando radiação K característica do anodo de Al, para excitar as amostras. Um analisador hemisférico, de raio médio de 100 mm, operou com uma passagem de energia constante de 44 eV, o qual

resulta em um pico com largura à meia altura (FWHM) de 1,6 eV para a linha 4f do Au. Uma determinada quantidade de cada amostra foi pressionada entre dois pratos de aço inox para formar uma pastilha fina, que foi fixada ao porta-amostra com fita condutora dupla face. As análises foram realizadas a uma pressão de 5×10^{-4} mPa e efeitos de carregamento foram corrigidos pela mudança dos espectros para que a linha C 1s estivesse a 284,6 eV. Antes do ajuste dos dados, usando Gaussiana, foi subtraída uma linha de base Shirley. Para efeitos de comparação, foram realizadas medidas por EFX de misturas mecânicas de $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ e $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$.

3.6. Caracterização físico-química do PMTDS

O PMTDS foi caracterizado físico-quimicamente por análise termogravimétrica e espectroscopia no infravermelho, conforme descrito nos itens 3.5.3.4 e 3.5.3.5, respectivamente, e também por cromatografia por permeação em gel.

3.6.1. Cromatografia por exclusão

A cromatografia por exclusão, na modalidade de permeação em gel, avalia as características do polímero, fornecendo informações sobre a distribuição da massa molar e o índice de polidispersividade. Para as medidas foi empregada uma coluna American Polymer Standard Corporation 1.000 – 20.000, com dimensões de 300 mm de comprimento por 7,8 mm de diâmetro interno. Para construção da curva analítica foram empregados padrões de poliestireno de massas moleculares $5,0 \times 10^2$; $2,6 \times 10^3$; $6,4 \times 10^3$; $1,8 \times 10^4$ e $4,3 \times 10^4$ dissolvidos em tetraidrofurano. Foram injetados 250 μL de cada padrão, empregando como fase móvel tetraidrofurano a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e uma temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ para a coluna e para o detector por índice de refração. Para a avaliação do PMTDS, as amostras foram preparadas a partir da dissolução do polímero em tetraidrofurano, 0,5 % (v/v).

3.7. Preparo da fase estacionária

3.7.1. Sorção da fase líquida ao suporte

O poli(metiltetradecilsiloxano) (PMTDS) foi sorvido à superfície e poros dos suportes de sílica zirconizada e sílica titanizada, empregando o método de evaporação estática do solvente^{115,116}. Quantidades apropriadas de PMTDS foram dissolvidas em hexano, de maneira a obter uma solução 10 % (m/v) do polímero. A esta solução, foram adicionadas quantidades apropriadas da sílica metalizada, previamente ativada a 140 °C por 12 h, obtendo uma carga de polímero (massa de polímero em relação à massa do suporte) de 45 % (m/m). Esta carga foi calculada a partir do produto da densidade do PMTDS ($d_{\text{PMTDS}} = 0,89 \text{ g cm}^{-3}$) e do volume total de poros da sílica metalizada (V_p), $X = d_{\text{PMTDS}} \times V_p$, em que X representa a quantidade mínima de PMTDS necessária para preencher todos os poros da sílica metalizada. Fazendo-se os cálculos, foram obtidos valores inferiores a 35 % (m/m) para os suportes de sílica zirconizada e de sílica titanizada. Sendo assim, todas as fases estacionárias foram preparadas com excesso de carga, 45 % (m/m), evitando, desta forma, problemas devido a perdas do polímero durante o preparo.

O béquer com a mistura foi fechado com papel alumínio contendo pequenos furos para facilitar a evaporação do solvente e impedir a contaminação de pequenas partículas. Em seguida, a mistura foi agitada brandamente por 3 h à temperatura ambiente e deixada em repouso, na capela, para evaporação do solvente, resultando em uma fase (*fase sorvida*), na qual o PMTDS se encontra adsorvido à superfície e poros do suporte cromatográfico.

3.7.2. Processo de imobilização do polímero ao suporte cromatográfico

Após a sorção do PMTDS ao suporte de sílica metalizada, o material foi submetido aos procedimentos de imobilização. Esta etapa se faz necessária, pois aumenta a intensidade da interação do polímero com o suporte, evitando a sua lixiviação com a passagem contínua de fase móvel. Dois diferentes tratamentos foram avaliados, imobilização térmica e irradiação com raios gama provenientes de uma fonte de cobalto-60 e, também, o fenômeno de auto-imobilização do PMTDS nas partículas dos suportes de sílica metalizada.

3.7.2.1. Tratamento térmico

Porções de 1,2 g da fase sorvida foram colocadas em um tubo de aço inoxidável (150 × 10 mm) e este conectado a um forno tubular, de maneira a obter um fluxo de nitrogênio através do tubo. O tempo e a temperatura de imobilização, apropriados para obtenção de fases estacionárias de bom desempenho cromatográfico, foram determinados de acordo com um planejamento composto central para duas variáveis. As diferentes condições de imobilização para a fase estacionária baseadas nos suportes de sílica metalizada recoberta com PMTDS, Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS), foram avaliadas de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Matriz do planejamento composto central para as condições de tempo e temperatura de imobilização das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS). Para converter os valores reais em valores codificados utilizam-se as equações: $x_1 = (T - 100)/20$ e $x_2 = (t - 12)/4$, na qual T e t são os valores reais de temperatura e tempo, respectivamente.

Experimentos	Valores reais		Valores codificados	
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	x_1	x_2
1	80	8	- 1	-1
2	120	8	+ 1	-1
3	80	16	-1	+1
4	120	16	+1	+1
5	100	12	0	0
6	100	12	0	0
7	100	12	0	0
8	72	12	-1,4	0
9	128	12	+1,4	0
10	100	6,4	0	-1,4
11	100	7,6	0	+1,4

3.7.2.2. Radiação gama - fonte de cobalto-60

Porções de 2,0 g da fase sorvida foram colocadas em ampolas de vidro pirex e subsequentemente seladas. As ampolas foram enviadas à Empresa Brasileira de Radiação (EMBRARAD), na cidade de Cotia-SP, e à Companhia Brasileira de Esterilização (CBE), na cidade de Jarinu-SP, para a aplicação das doses de radiação γ provenientes de uma fonte de cobalto-60 para as fases com suporte de sílica zirconizada e sílica titanizada, respectivamente. O material foi irradiado em doses de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 e 120 kGy para as fases com suporte de sílica zirconizada e de 60, 80, 100, 120 e 140 kGy para às fases com suporte de sílica titanizada.

A Figura 10 mostra uma representação esquemática de um irradiador comercial de cobalto-60 ¹⁶⁸.

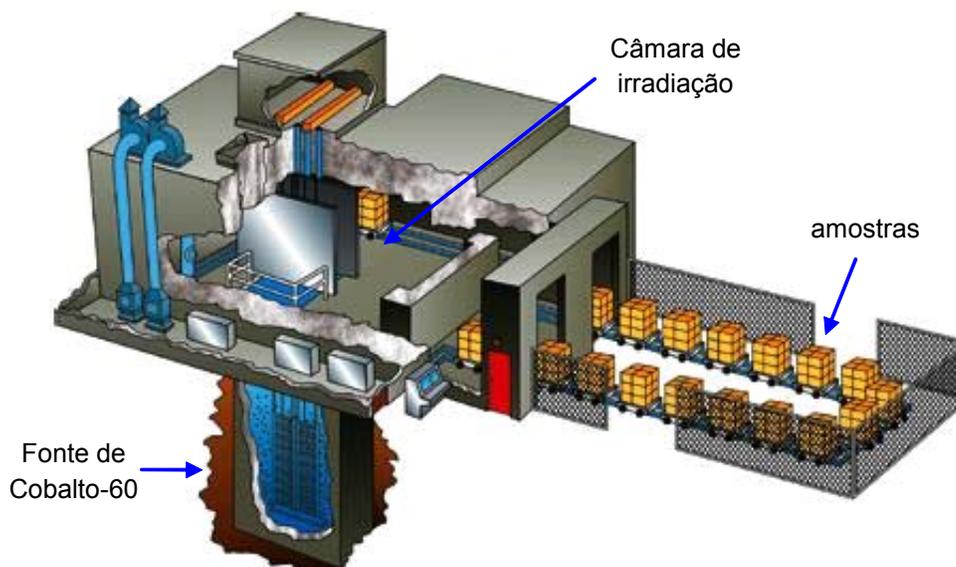


Figura 10. Representação esquemática de um irradiador de cobalto-60 ¹⁶⁸.

No processo de imobilização das sílicas metalizadas por raios gama, os materiais, devidamente embalados nas ampolas de vidro, foram colocados dentro da câmara de irradiação, por meio de um sistema de transporte (Figura 10), e foram expostos à energia ionizante, que agiu diretamente na cadeia polimérica do PMTDS, provocando a quebra de suas moléculas e/ou promovendo o entrecruzamento das mesmas.

3.7.2.3. Auto-imobilização das fases estacionárias

Além do tratamento térmico e da radiação γ , foram preparadas fases estacionárias sem qualquer etapa de imobilização após a sorção do polímero ao suporte. Para tal, um lote maior do material foi preparado e deixado por até 100 dias na capela sendo avaliado periodicamente quanto ao desempenho cromatográfico das fases estacionárias. Aproximadamente 1,0 g do material sorvido de Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS), quantidade necessária para o enchimento de uma coluna cromatográfica, foi retirado em períodos de 15 em 15 dias para esta avaliação.

3.7.3. Extração do excesso do polímero

Após a etapa de imobilização, nem todo o PMTDS adicionado inicialmente foi imobilizado na superfície dos poros da sílica metalizada. A quantidade não imobilizada (excesso) deve ser removida antes do enchimento da coluna cromatográfica. Uma considerável melhora nos parâmetros cromatográficos da fase é alcançada quando da realização desta etapa, devido à obtenção de uma camada polimérica mais fina, permitindo maior rapidez na velocidade de transferência de massa do soluto entre a FE e a FM. Para isto, o tubo de aço inox (150 × 10 mm) contendo o material imobilizado ou auto-imobilizado foi colocado dentro de um forno e conectado a uma bomba recíproca de alta pressão de pistão duplo. O hexano foi escolhido como solvente de extração por solubilizar completamente o PMTDS (“*solvente bom*”), permitindo assim uma completa remoção do PMTDS não imobilizado no suporte. Para tal, o hexano foi bombeado para dentro do tubo a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹ por 4 h, mantendo a temperatura do tubo a 50 °C. Após a extração a fase foi transferida do tubo para um béquer e deixada sob um fluxo brando de N₂ até a completa secura.

3.8. Caracterização físico-química das fases estacionárias

3.8.1. Análise elementar

Todas as fases estacionárias preparadas neste trabalho foram submetidas à análise elementar para a determinação da percentagem de carbono após a etapa de imobilização,

avaliando-se, desta forma, o grau de recobrimento efetivo do suporte cromatográfico com o PMTDS. O método empregado utiliza a combustão do material devidamente seco para converter os elementos da amostra em gases simples, como CO₂, H₂O e N₂. Estes gases são homogeneizados e controlados em condições exatas de pressão, temperatura e volume. Em seguida, os gases são despressurizados através de uma coluna, separados e detectados em função das respectivas condutividades térmicas, sendo convertidos em percentagem de carbono, hidrogênio e nitrogênio¹⁶⁹.

Sabendo-se que o PMTDS contém 70 % (m/m) de carbono, as percentagens de carbono obtidas pela análise elementar foram convertidas em percentagens de PMTDS pela Equação 7:

$$\% \text{ PMTDS} = \frac{\%C \times 100}{70} \quad \text{Equação 7}$$

Além disso, as percentagens de carbono também foram convertidas em massa de polímero (m_{PMTDS}) por grama do suporte (m_{suporte}), denominada de massa específica (\bar{m}_{PMTDS}), de acordo com a Equação 8:

$$\bar{m}_{\text{PMTDS}} = \frac{m_{\text{PMTDS}}}{m_{\text{suporte}}} = \frac{\%C}{70 - \%C} \quad \text{Equação 8}$$

Através dos resultados obtidos com a massa específica, pode-se estimar o grau do recobrimento de PMTDS no suporte de sílica metalizada. Para tal, determinou-se a espessura da camada polimérica (τ) depositada na superfície e paredes dos poros do suporte cromatográfico, empregando a Equação 9:

$$\tau = - \left(\frac{\sqrt{d^2 - Fd^2} - d}{2} \right) \quad \text{Equação 9}$$

onde F é a fração de polímero imobilizado e d é o diâmetro médio do poro da sílica. Para tal, assume-se que os poros do suporte possuem diâmetros uniformes e que o polímero imobilizado é caracterizado por uma camada de espessura constante nas paredes dos poros do suporte.

O valor de F foi determinado a partir da Equação 10.

$$F = \frac{\bar{m}_{\text{PMTDS immobilizado}}}{\bar{m}_{\text{PMTDS poros cheios}}} \quad \text{Equação 10}$$

A massa de PMTDS necessária para encher os poros do suporte, $\bar{m}_{\text{PMTDS poros cheios}}$, foi determinada a partir do volume específico de poro da sílica metalizada (sílica zirconizada = 0,68 mL g⁻¹ e sílica titanizada = 0,73 mL g⁻¹) e da densidade do PMTDS, $\rho = 0,89 \text{ g mL}^{-1}$, conforme apresentado na Equação 11:

$$\bar{m}_{\text{PMTDS poros cheios}} = V_{\text{p suporte}} (\text{mL g}^{-1}) \times \rho_{\text{PMTDS}} (\text{g mL}^{-1}) \quad \text{Equação 11}$$

Logo, para a sílica zirconizada, a $\bar{m}_{\text{PMTDS poros cheios}} = 0,60 \text{ g}$ de PMTDS e, para a sílica titanizada, a $\bar{m}_{\text{PMTDS poros cheios}} = 0,65 \text{ g}$ de PMTDS por g do suporte.

3.8.2. Área superficial específica, volume específico e diâmetro de poros

Estas medidas baseiam-se na adsorção/dessorção de nitrogênio nos poros e superfície das amostras e os resultados são obtidos pela análise das isotermas de adsorção e dessorção na temperatura do nitrogênio líquido. O procedimento empregado foi similar ao descrito no item 3.5.3.2.

3.8.3. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica das fases estacionárias imobilizadas pelos diferentes tratamentos sobre as partículas de sílica metalizada foi avaliada empregando análises termogravimétricas de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.3.4.

3.8.4. Espectroscopia de absorção no infravermelho

A avaliação qualitativa da presença de grupos funcionais característicos nas fases estacionárias foi realizada por espectroscopia de absorção no infravermelho. Os espectros de transmissão foram obtidos de acordo com o procedimento descrito no item 3.5.3.5.

3.8.5. Ressonância magnética nuclear de ^{29}Si

As fases estacionárias foram analisadas por ressonância magnética nuclear com polarização cruzada com rotação em um ângulo mágico (CP-MAS) no núcleo de ^{29}Si . Estas análises foram realizadas com o intuito de avaliar possíveis alterações químicas causadas na superfície do suporte de sílica metalizada após a aplicação dos diferentes procedimentos de imobilização do PMTDS.

Para a obtenção dos espectros de ^{29}Si RMN-CP-MAS foi utilizado um rotor de ZrO_2 com 7 μm de diâmetro interno e uma frequência de rotação de 3500 Hz, na qual foram colocadas aproximadamente 300 mg das fases estacionárias. O tempo de contato de polarização cruzada foi de 5 ms e o tempo de intervalo de pulso de 1 s. Foram acumulados 1,5 decaimentos livres induzidos (FID – *Free Induction Decay*) com tempo de aquisição de 30 ms em número de pontos de 1 kb, que foram preenchidos até 8 kb, antes da transformada de Fourier. O alargamento da banda utilizado foi de 30 Hz e a largura espectral de aproximadamente 20 kHz.

3.9. Preparo das colunas cromatográficas

3.9.1. Polimento das paredes internas das colunas

Para a avaliação das FE preparadas neste trabalho foram empregados tubos de aço inoxidável 316 de formato cilíndrico com 60 mm de comprimento e 3,9 mm de diâmetro interno, sem costura. A coluna e suas conexões terminais, apresentadas na Figura 11, foram construídas na oficina de mecânica fina do Instituto de Química da Unicamp. Como os tubos apresentavam inicialmente uma superfície interna altamente rugosa e repleta de estruturas microporosas, fez-se necessário o polimento desta, uma vez que os tubos com superfícies

rugosas podem levar a uma redução do número de pratos da ordem de dez vezes, especialmente quando são empregadas partículas inferiores a $20\ \mu\text{m}$ ^{11,170}. Portanto, realizou-se o polimento da superfície interna dos tubos empregando um procedimento desenvolvido no LabCrom¹⁷⁰. Brevemente, conectou-se verticalmente uma haste de metal envolvida por uma palha de aço e pasta de polimento (carborundum 360F) ao suporte de uma furadeira elétrica, passando a haste inúmeras vezes, em alta rotação, por dentro do tubo até a obtenção de uma superfície interna espelhada. Tomou-se o devido cuidado para manter o diâmetro uniforme, pois o diâmetro interno de uma coluna cromatográfica é um dos fatores que afetam o seu desempenho. Quanto maior o diâmetro interno da coluna menor será a eficiência do sistema.

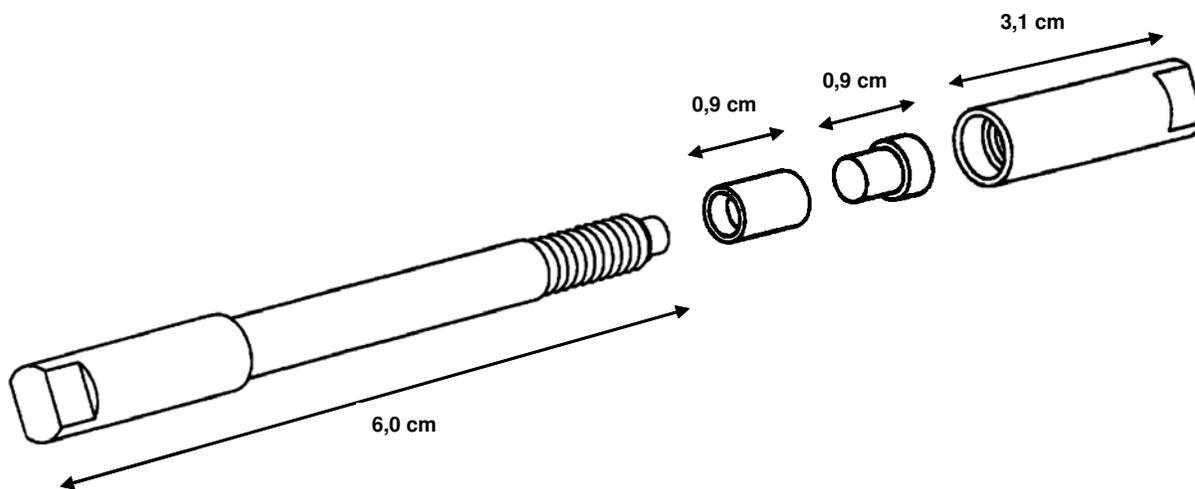


Figura 11. Coluna cromatográfica e suas conexões.

Após o polimento, os tubos foram colocados em solução de HNO_3 a 50 % (v/v), por 30 min. Em seguida foram submetidos a etapas sucessivas de lavagem com água, etanol, hexano e tetraidrofurano para a remoção completa de resíduos provenientes da construção e do polimento.

3.9.2. Suspensão da fase estacionária

Após a extração e com o material devidamente seco, preparou-se uma suspensão da fase estacionária em um solvente de densidade e viscosidade apropriadas (clorofórmio) para o subsequente recheio da coluna cromatográfica. A função principal do clorofórmio (solvente de suspensão) é evitar uma sedimentação rápida e/ou aglomeração das partículas, pois, nestas condições, a FE tem o desempenho cromatográfico afetado negativamente.

Para o preparo da suspensão, pesaram-se 0,70 g das fases Si-Ti(PMTDS) e Si-Zr(PMTDS) em um tubo de ensaio com tampa e adicionaram-se 14 mL de clorofórmio previamente filtrado, obtendo uma concentração da fase na suspensão de 5,0 % (m/v). Outras concentrações de suspensão foram avaliadas, tais como 10 e 15 % (m/v), porém com estas fases estacionárias obtiveram-se picos apresentando caudas frontais acentuadas, que somente foram reduzidas ou eliminadas com o preparo de suspensão a 5 % (m/v). A massa de fase estacionária utilizada para o preparo da suspensão foi a quantidade necessária para o enchimento de uma coluna cromatográfica (60 mm × 3,9 mm de d.i.). Em seguida, o tubo de ensaio contendo a suspensão foi colocado em um agitador roto-torque e agitado mecanicamente por um período mínimo de 12 h antes do enchimento da coluna cromatográfica, para evitar a sedimentação das partículas.

3.9.3. Recheio das colunas com a fase estacionária

As colunas cromatográficas foram recheadas utilizando o método de suspensão à alta pressão, como ilustrado na Figura 12.

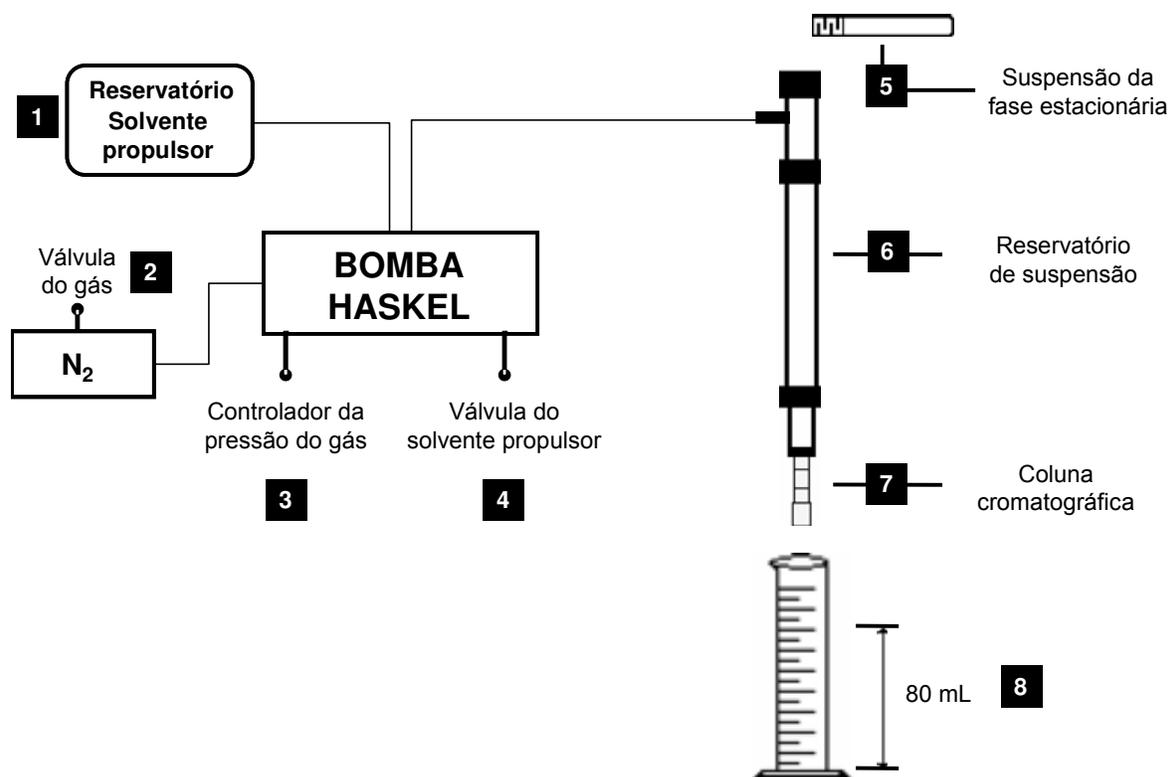


Figura 12. Representação esquemática do sistema de enchimento de colunas.

De acordo com a Figura 12, para o enchimento das colunas cromatográficas, o reservatório do solvente (1) foi preenchido com metanol previamente filtrado (solvente propulsor). Em seguida, ajustou-se a pressão da bomba (2 e 3) para um valor fixo de 5.500 psi (38 MPa) para as fases estacionárias baseadas no suporte de sílica zirconizada e de 7.000 psi (52 MPa) para as fases estacionárias baseadas no suporte de sílica titanizada. Esta maior pressão, empregada para as fases baseadas na imobilização do PMTDS sobre a sílica titanizada, foi necessária devido a problemas de compactação do recheio cromatográfico utilizando pressões mais baixas. Ao reservatório de suspensão (6) foi conectada a coluna cromatográfica (7) e adicionada a suspensão da FE (5), completando o volume do reservatório com clorofórmio filtrado. Na etapa seguinte, a válvula do solvente propulsor (4) foi aberta e a pressão exercida pelo gás N₂ empurra a suspensão para o interior da coluna ficando retido apenas as partículas devido à presença de um filtro (diâmetro de poro de 2 µm) na extremidade inferior da coluna. O sistema é mantido sob pressão até a passagem de 80 mL de solvente (8). A manutenção de uma pressão constante durante todo o procedimento de recheio da coluna resultará em um leito homogêneo e com boa compactação. Depois de terminado o enchimento, o sistema foi despressurizado e a coluna desconectada do reservatório, fechando apropriadamente sua extremidade superior com um filtro terminal, reservando o excesso da FE, encontrado nas conexões do reservatório, para testes subseqüentes.

3.9.4. Condicionamento da fase estacionária

Após o enchimento, a coluna deve ser condicionada para que seja atingido o equilíbrio entre a FE e a FM na composição a ser empregada nas análises e para eliminar os resíduos do solvente de propulsão. Para o condicionamento, a coluna foi acoplada apenas ao sistema de injeção, evitando, desta forma, a obstrução de tubulações e da cela de detecção, uma vez que impurezas podem ser removidas de dentro do leito cromatográfico nesta etapa. Todas as colunas preparadas neste trabalho foram submetidas à pelo menos uma hora de condicionamento com vazão de FM de 0,3 mL min⁻¹ e a etapa foi repetida, se a linha de base no cromatograma não se apresentasse estável.

3.10. Caracterização cromatográfica das fases estacionárias

3.10.1. Preparo das fases móveis

Para a avaliação das fases estacionárias foram utilizadas diversas fases móveis, de acordo com a mistura a ser analisada. Os solventes das fases móveis foram volumetricamente medidos e filtrados, de forma individual, em membrana hidrofílica de 0,45 μm de tamanho de poros. Em seguida, os solventes da fase móvel filtrados foram misturados, sempre adicionando o componente aquoso (água ou solução tampão) ao orgânico (metanol). Após a mistura dos componentes e rotineiramente antes da sua utilização, as fases móveis foram desgaseificadas em ultra-som por 20 minutos. Para fases móveis tamponadas procedeu-se a filtração antes e após a mistura dos componentes.

3.10.2. Testes preliminares de avaliação

Todas as colunas foram avaliadas cromatograficamente com base na separação dos compostos de duas misturas-teste comumente empregadas no LabCrom. A primeira mistura, mistura-teste I, constituída de compostos neutros de polaridades variadas: uracila (1 mg L^{-1}), benzonitrila (30 mg L^{-1}), benzeno (30 mg L^{-1}), tolueno (30 mg L^{-1}) e naftaleno (30 mg L^{-1}); foi empregada para avaliação da seletividade e hidrofobicidade das fases estacionárias. A segunda mistura, mistura-teste II, constituída por compostos ácidos, básicos e neutros: uracila (1 mg L^{-1}), fenol (20 mg L^{-1}), N,N-dimetilanilina (20 mg L^{-1}), naftaleno (30 mg L^{-1}) e acenafteno (50 mg L^{-1}) foi empregada para avaliação da interação dos analitos, principalmente o de caráter básico, com o suporte cromatográfico. Estas informações são obtidas pelo tempo de retenção e pela simetria de pico destes compostos. As duas misturas foram preparadas qualitativamente em fase móvel metanol:água (60:40, v/v) e armazenadas em geladeira. A uracila foi adicionada às misturas para a obtenção do t_M essencial para o cálculo dos parâmetros cromatográficos. O t_M é o tempo necessário para que a fase móvel passe através de toda a extensão do sistema cromatográfico, desde o momento da injeção até o registro do máximo do pico da uracila pelo sistema de detecção.

3.10.3. Mistura-teste de Engelhardt

Um conjunto dos compostos da mistura-teste de Engelhardt e Jungheim¹⁵⁸ foi utilizada para a caracterização de algumas das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) preparadas sob diferentes procedimentos de imobilização. A mistura foi composta por uracila (1 mg L⁻¹), anilina (15 mg L⁻¹), fenol (20 mg L⁻¹), N,N-dimetilanilina(20 mg L⁻¹), tolueno (30 mg L⁻¹) e etilbenzeno (30 mg L⁻¹). Para a avaliação da mistura foi empregada fase móvel metanol:água (55:45, v/v), a uma vazão ótima de 0,3 mL min⁻¹, temperatura de análise de 40 °C e detecção a 254 nm. As principais informações fornecidas por este teste são:

- - *Seletividade hidrofóbica*. Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção do etilbenzeno e do tolueno ($\alpha_{CH_2} = k_{\text{etilbenzeno}} / k_{\text{Tolueno}}$), que diferem entre si por um grupo CH₂, também denominada de seletividade metilênica. O valor de α_{CH_2} fornece informações a respeito da hidrofobicidade das fases estacionárias.
- - *Atividade silanofílica*. Medida pelo fator de assimetria do pico da N,N-dimetilanilina a 10 % de sua altura e também pela ordem de eluição dos compostos básicos (anilina e N,N-dimetilanilina). Para uma coluna com baixa atividade silanofílica, a anilina deve eluir antes do fenol. Em alguns casos pode haver a co-eluição destes dois compostos: A N,N-dimetilanilina deve ser eluída antes do tolueno. Além disso, a razão entre os fatores de assimetria para o pico da anilina e do fenol deve ser inferior a 1,3¹⁵⁸.

3.10.4. Misturas-teste de Tanaka

No teste de Tanaka e colaboradores¹⁵⁷, quatro misturas-teste foram avaliadas empregando uma determinada composição de fase móvel para cada uma destas misturas. Todas as misturas foram analisadas a 40 °C, empregando uma vazão de fase móvel ótima de 0,3 mL min⁻¹ e detecção a 254 nm. As misturas e suas respectivas fases móveis utilizadas foram:

Mistura A: uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, *o*-terfenila e trifenileno. Fase móvel: metanol:água (80:20, v/v).

Mistura B: uracila, cafeína e fenol. Fase móvel: metanol:água (30:70, v/v).

Mistura C: uracila, benzilamina e fenol. Fase móvel: metanol:0,020 mol L⁻¹ de KH₂PO₄/K₂HPO₄ pH 7,6 (30:70, v/v).

Mistura D: uracila, benzilamina e fenol. Fase móvel: metanol:0,020 mol L⁻¹ de KH₂PO₄/H₃PO₄ pH 2,7 (30:70, v/v).

Com a realização deste teste foi possível avaliar cinco diferentes propriedades cromatográficas das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS):

- *Hidrofobicidade ou seletividade hidrofóbica (α_{CH_2})*. Medida pela razão dos fatores de retenção do pentilbenzeno e do butilbenzeno, $\alpha_{CH_2} = k_{PB} / k_{BB}$. Esta é uma medida do recobrimento superficial da fase, pois a seletividade entre alquilbenzenos, diferenciados por um grupo CH₂, é dependente da quantidade de polímero imobilizado.
- *Seletividade estérica ($\alpha_{T/O}$)*. Medida pela razão entre os fatores de retenção do trifenileno e da *o*-terfenila, $\alpha_{T/O} = k_T / k_O$. O $\alpha_{T/O}$ é uma medida da seletividade estérica, a qual é influenciada pelo espaçamento dos ligantes e também pela funcionalidade do polímero.
- *Capacidade de ligação de hidrogênio ($\alpha_{C/P}$)*. Esta propriedade é obtida pela razão entre os fatores de retenção da cafeína e do fenol, $\alpha_{C/P} = k_C / k_P$. O $\alpha_{C/P}$ é uma medida do número de grupos silanóis disponíveis para formarem ligações de hidrogênio com os constituintes da amostra.
- *Capacidade de troca iônica total ($\alpha_{B/P \text{ pH } 7,6}$)*. Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/P \text{ pH } 7,6} = k_B / k_P$. O valor obtido é uma estimativa da atividade silanofílica total da fase estacionária.
- *Capacidade de troca iônica em meio ácido ($\alpha_{B/P \text{ pH } 2,7}$)*. Propriedade medida pela razão entre os fatores de retenção da benzilamina e do fenol, $\alpha_{B/P \text{ pH } 2,7} = k_B / k_P$. O valor obtido é uma estimativa da acidez dos grupos silanóis residuais.

3.11. Avaliação da estabilidade química das fases estacionárias

A estabilidade química das fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS), preparadas nas condições ótimas dos diferentes procedimentos de imobilização, foi avaliada em condição alcalina de fase móvel, metanol:0,050 mol L⁻¹ Na₂CO₃/NaHCO₃ a pH 10 (70:30, v/v). Os resultados foram comparados com a estabilidade de fases estacionárias de PMTDS imobilizadas sobre suportes de sílica nua, Si(PMTDS), empregando os mesmos procedimentos de imobilização aplicados nas fases baseadas em sílica metalizada, e, também, de fases estacionárias quimicamente ligadas disponíveis comercialmente.

A estabilidade química em condições alcalinas foi avaliada pelo monitoramento de parâmetros cromatográficos, como eficiência, fator de assimetria calculado a 10 % da altura do pico e fator de retenção para o composto mais retido (acenafteno) da mistura-teste II, utilizada para este estudo. Para tal, a fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ Na₂CO₃/NaHCO₃ a pH 10 (70:30, v/v) foi eluída através das colunas cromatográficas contendo as fases estacionárias a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹, empregando uma temperatura de 50 °C. O pH do componente aquoso da fase móvel foi ajustado com uma solução de NaOH diluída antes de ser adicionado ao componente orgânico. As colunas foram periodicamente avaliadas quanto ao comportamento cromatográfico pela mistura-teste II do laboratório (uracila, fenol, N,N-dimetilanilina, naftaleno e acenafteno), empregando a mesma fase móvel na vazão ótima de trabalho, 0,3 mL min⁻¹. A estabilidade de cada fase estacionária foi determinada em função do número de volume de colunas eluído através de cada coluna cromatográfica. O volume de coluna corresponde ao volume de fase móvel que ocupa os espaços dentro da coluna, os quais não são ocupados pelo recheio cromatográfico – volume de coluna cheia (V_{col}). O volume de coluna foi calculado a partir do t_M (t_R da uracila) e da vazão da fase móvel, conforme a Equação 12:

$$V_{col} = f \times t_M \quad \text{Equação 12}$$

na qual f é a vazão da fase móvel e t_M é o tempo de retenção do composto não retido (uracila). O valor de V_{col} calculado foi igual a 0,40 mL de fase móvel.

Foram avaliadas as estabilidades das fases de Si-Zr(PMTDS), Si-Ti(PMTDS) e Si(PMTDS) imobilizadas, sob condições ótimas, pelos diferentes procedimentos e de quatro fases estacionárias quimicamente ligadas: Kromasil-C18, Lichrosorb-RP18, Rainin-ODS e

Spherisorb ODS. As condições empregadas neste teste aceleram a deterioração da coluna, possibilitando avaliações mais rápidas com a utilização de uma quantidade menor de fase móvel em tempo reduzido de funcionamento do cromatógrafo¹⁷¹.

3.12. Avaliação da aplicabilidade das fases estacionárias

A aplicabilidade das fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foi avaliada na separação de compostos com características ácidas e básicas, tais como agroquímicos e fármacos. Para estes estudos foram empregadas colunas cromatográficas de 60 mm de comprimento contendo as fases estacionárias preparadas nas condições otimizadas de imobilização.

3.12.1. Separação de agroquímicos

Uma fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente a 100 °C por 12 h foi utilizada para a separação de seis agroquímicos, imazetapir (2,0 mg L⁻¹), cianazina (2,0 mg L⁻¹), atrazina (2,0 mg L⁻¹), carboxim (2,0 mg L⁻¹), diurom (2,0 mg L⁻¹) e linurom(2,0 mg L⁻¹); cujas estruturas químicas estão ilustradas na Figura 13. Para a obtenção de uma separação satisfatória e rápida destes agroquímicos, foi empregada uma fase móvel metanol:água (50:50, v/v) com vazão de 0,3 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C e detecção UV a 254 nm. Inicialmente, os agroquímicos foram analisados individualmente para a determinação do tempo de retenção e, em seguida, foi preparada uma mistura contendo todos os agroquímicos em fase móvel metanol:água (40:60, v/v). Esta mistura de agroquímicos foi separada também por uma coluna de 60 × 3,9 mm de d.i. recheada com uma fase comercial, Kromasil-C18, com partículas de 5 µm, empregando as mesmas condições de análises utilizadas para a separação na coluna de Si-Zr(PMTDS).

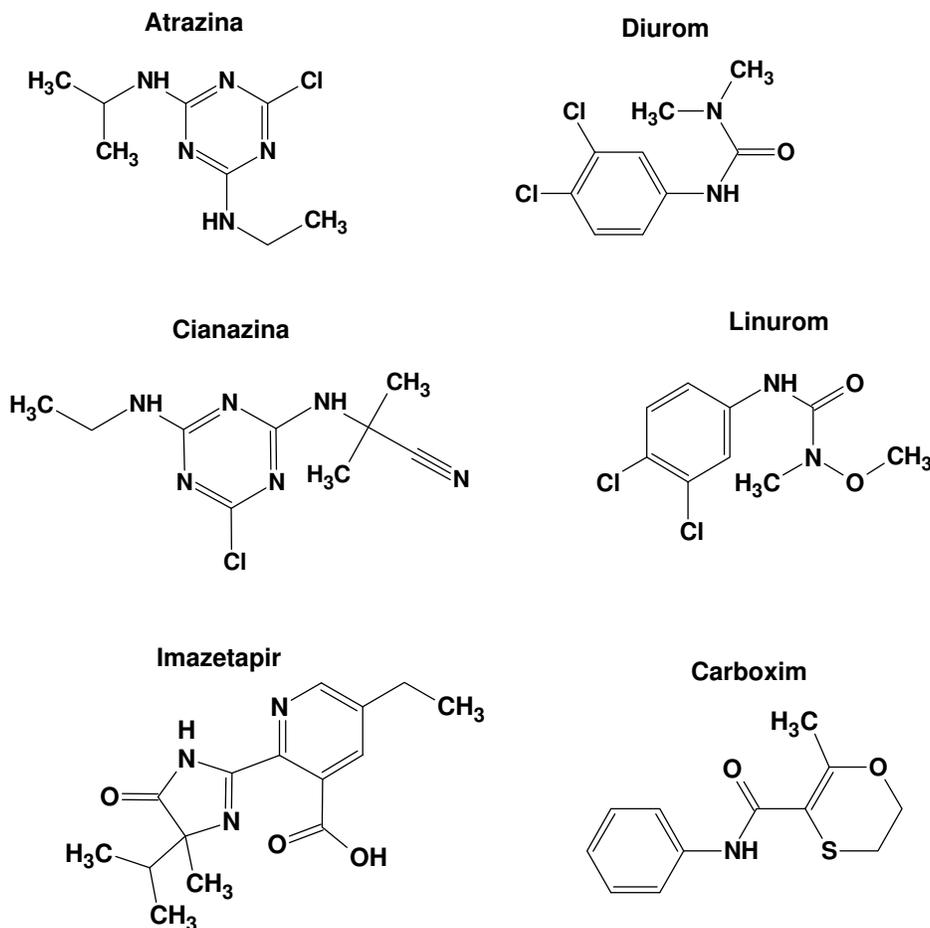


Figura 13. Estrutura química dos agroquímicos estudados.

3.12.2. Separação de fármacos

As fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) imobilizada por raios gama a 120 kGy e Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente a 110 °C por 12 h foram empregadas na separação de algumas misturas de fármacos com características ácidas e/ou básicas.

A fase de Si-Zr(PMTDS) foi utilizada para a separação de quatro fármacos; paracetamol (14 mg L⁻¹), ibuprofeno (18 mg L⁻¹), lorazepam (15 mg L⁻¹) e alprazolam (15 mg L⁻¹), empregando fase móvel metanol:0,020 mol L⁻¹ K₂HPO₄/K₃PO₄ a pH 11 (50:50, v/v), com uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, temperatura de 25 °C e detecção UV a 254 nm. O pH do componente aquoso da fase móvel foi ajustado com uma solução diluída de KOH.

A fase de Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente foi aplicada na separação de três misturas de fármacos, empregando três diferentes condições de análises. A primeira mistura, contendo um composto ácido, ácido acetilsalisílico (4,0 mg L⁻¹), e dois compostos ligeiramente

básicos, paracetamol ($14,0 \text{ mg L}^{-1}$) e cafeína ($17,0 \text{ mg L}^{-1}$) foi separada empregando fase móvel metanol:água (50:50, v/v) a uma vazão $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. A segunda mistura contendo três conservantes da classe dos benzodiazepínicos que apresentam características ácidas; metil- ($23,0 \text{ mg L}^{-1}$), propil- ($35,0 \text{ mg L}^{-1}$) e butil-parabeno ($17,0 \text{ mg L}^{-1}$) foram separadas empregando fase móvel metanol:água (40:60, v/v) a uma vazão de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. A terceira mistura contendo três fármacos com caráter básico bastante acentuado; cefalexina ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), prilocaína ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$) e amitriptilina ($0,3 \text{ mg L}^{-1}$), foi separada empregando fase móvel metanol: $0,020 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4/\text{K}_3\text{PO}_4$ a pH 12 (80:20, v/v) a uma vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$. O pH da fase móvel foi ajustado com KOH. Em todas as análises foram empregadas temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e detecção UV a 254 nm . Estas três misturas foram separadas também por uma coluna ($125 \times 4,6 \text{ mm de d.i.}$) recheada com uma fase comercial quimicamente ligada, Luna C8, com partículas de $5 \text{ }\mu\text{m}$. As condições de análises empregadas para a separação das diferentes misturas pela fase comercial foram: para a primeira mistura, fase móvel metanol:água pH 2,5 (30:70, v/v) a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; para a segunda mistura, fase móvel acetonitrila:água (50:50, v/v) a uma vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$, e, para a terceira mistura, fase móvel metanol:água pH 7,0 (65:35, v/v) a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os valores de pH foram ajustados com soluções diluídas de H_3PO_4 ou KOH.

As estruturas químicas de cada um dos fármacos avaliados neste estudo estão apresentadas na Figura 14.

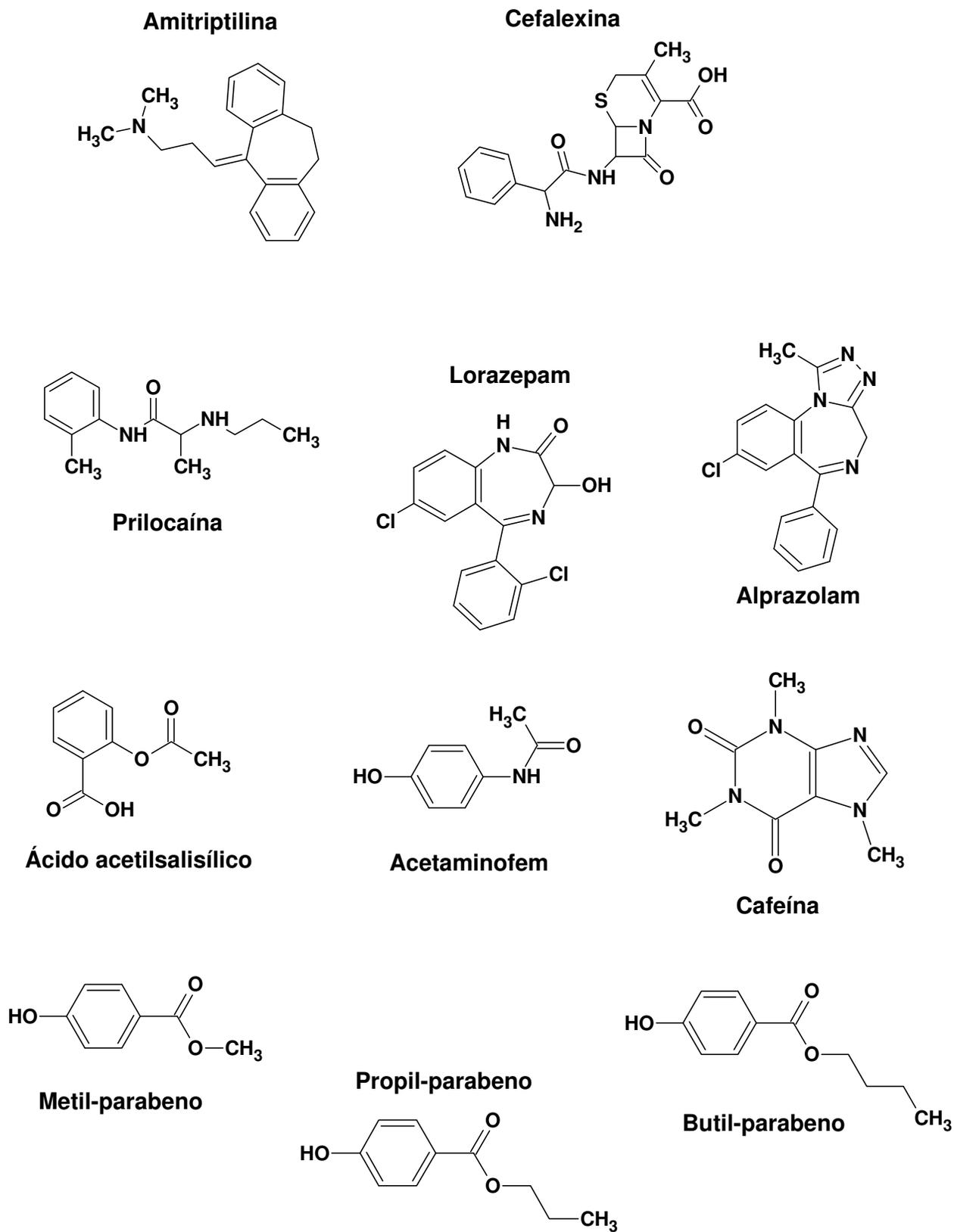


Figura 14. Estruturas químicas dos fármacos avaliados neste estudo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese do suporte de sílica zirconizada

4.1.1. Planejamento fatorial fracionário 2^{5-2}

Apesar de alguns trabalhos já realizados no LabCrom, empregando métodos univariados, para a obtenção do suporte de sílica zirconizada, pouco se sabe sobre as variáveis que afetam de forma significativa o processo de incorporação de zircônio na sílica cromatográfica. Neste estudo, uma etapa de triagem das variáveis mais importantes (Tabela 1) foi realizada para determinar quais destas afetam a zirconização da sílica. Para tal, um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} foi empregado para determinar o grau de influência destes fatores, dentro dos níveis investigados, sobre o processo de zirconização da sílica. Neste tipo de planejamento a realização de apenas um quarto dos experimentos do planejamento fatorial 2^5 completo, oito experimentos, é necessária para avaliação dos fatores sem que ocorram perdas de informações importantes^{163,164}. A função objetivo (resposta) avaliada foi a percentagem de zircônio na sílica obtida por FRX.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e de forma aleatória (para evitar que desvios atípicos sejam associados a determinadas combinações de níveis). A aleatoriedade da realização dos experimentos foi determinada através de sorteio, conforme sugerido pelos protocolos estatísticos¹⁶⁴. A Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} e a percentagem de zircônio obtida para cada um dos oito experimentos realizados. A matriz de planejamento foi construída segundo as funções geradoras^{163,164} $I = 1234$ e $I = 125$, isto é, as colunas dos fatores 1, 2 e 3 foram preenchidas normalmente com os sinais indicativos dos níveis destes fatores, enquanto que as colunas dos fatores 4 e 5 foram preenchidas segundo o produto dos sinais dos fatores $1 \times 2 \times 3$ e 1×2 , respectivamente.

Tabela 4. Percentagens de zircônio incorporadas na sílica de acordo com os experimentos do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} .

Exp.	Fatores					% Zr	S_i^2
	1	2	3	4	5		
1 (6 e 14)	-	-	-	-	+	11,1	2,4
2 (3 e 11)	-	+	-	+	-	11,1	2,0
3 (2 e 16)	-	+	-	+	-	14,6	2,6
4 (8 e 9)	+	+	-	-	+	13,4	2,3
5 (7 e 15)	-	-	+	+	+	10,5	1,9
6 (4 e 10)	+	-	+	-	-	8,0	1,4
7 (1 e 13)	-	+	+	-	-	17,1	3,2
8 (5 e 12)	+	+	+	+	+	7,4	1,3

% Zr: percentagem média de zircônio ($n = 2$). S_i^2 : variância individual dos experimentos. Valores entre parênteses: ordem de realização dos experimentos.

Os efeitos (contrastes) principais foram determinados para as cinco variáveis segundo a Equação 13. Somente o efeito principal foi considerado como relevante, rejeitando os valores de interações entre as variáveis, pois, o objetivo foi determinar apenas aquelas que afetam a resposta de forma significativa.

$$Ef = \% Zr_{(+)} - \% Zr_{(-)} \quad \text{Equação 13}$$

onde Ef é o efeito (contraste) principal para cada variável; $\% Zr_{(+)}$ é a média das respostas no nível alto e $\% Zr_{(-)}$ é a média das respostas no nível baixo.

A estimativa do erro para o efeito de cada variável foi calculada a partir das variâncias individuais obtidas em cada experimento, seguindo os protocolos estatísticos¹⁶⁴. Os valores e a estimativa do erro dos efeitos para cada variável estudada são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Efeitos das variáveis do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} e estimativa do erro dos efeitos.

Fatores	Efeitos	S
1	- 3,32	$\pm 0,73$
2	+ 2,94	$\pm 0,73$
3	- 1,77	$\pm 0,73$
4	- 1,50	$\pm 0,73$
5	- 2,12	$\pm 0,73$

S: estimativa do erro dos efeitos.

A partir dos valores dos efeitos, são consideradas estatisticamente significativas apenas aquelas variáveis cujos efeitos não estejam dentro de um intervalo de confiança, o qual é determinado pelo produto do erro padrão (em valor absoluto) pelo ponto da distribuição de Student (t_8) a 95 % de confiança (valor tabelado)¹⁶⁴. O intervalo de confiança = $t_{8,95\%} \times S_{(\text{efeito})} = 2,306 \times 0,73 = 1,68$. Portanto, de acordo com a Tabela 5, apenas a variável 4 (temperatura da reação) não é relevante na incorporação do zircônio na sílica, pois o valor de seu efeito encontra-se dentro do intervalo de confiança, $\pm 1,68$. Em outras palavras, pode-se usar qualquer temperatura dentro da faixa de 30 a 50 °C para a reação, que nenhuma mudança significativa ocorrerá na percentagem de zircônio.

O sinal positivo do efeito da variável 2 (tipo de solvente) indica sinergismo, aumento da quantidade de zircônio no nível alto desta variável. Os sinais negativos para os fatores 1 (ativação da sílica), 3 (tempo de reação) e 5 (quantidade de reagente) indicam efeito antagônico na resposta, aumento da quantidade de zircônio no nível baixo das respectivas variáveis.

A partir da Tabela 5 observa-se que quatro variáveis afetam de forma significativa o processo de zirconização da sílica cromatográfica e, portanto, devem ser otimizadas. Duas destas, a ativação da sílica e o tipo de solvente, são variáveis discretas (ou pertencem a uma categoria ou à outra) e, para a próxima etapa da otimização, devem-se fixar o nível que proporcionou a maior percentagem de zircônio. Portanto, foram fixados o nível baixo (sílica não ativada) da variável 1 e o nível alto (tolueno) da variável 2, restando apenas duas variáveis contínuas (podem assumir qualquer valor dentro de uma determinada faixa), tempo de reação e quantidade de reagente, para serem otimizadas. Para tal, aplicou-se um planejamento composto central para duas variáveis e a metodologia de superfície de respostas.

4.1.2. Planejamento composto central

Nesta etapa da otimização da incorporação do zircônio na sílica, foram realizados onze experimentos, quatro referentes ao planejamento fatorial 2^2 completo, três experimentos no ponto central e quatro experimentos referentes ao planejamento axial. As percentagens de zircônio obtidas para cada um dos experimentos estão apresentadas na Tabela 6. A temperatura nesta série de experimentos foi fixada em 40 °C.

Tabela 6. Percentagens de zircônio para o planejamento composto central. x_3 e x_5 representam os valores das duas variáveis codificados pelas equações $X_3 = \frac{t-5}{1}$ e $X_5 = \frac{m-6,8}{0,8}$.

Experimentos	t (h)	m (g)	x_3	x_5	% Zr
1 (5)	4	6,0	-1	-1	13,4
2 (1)	6	6,0	+1	-1	16,3
3 (4)	4	7,6	-1	+1	17,4
4 (7)	6	7,6	+1	+1	19,5
5 (3)	5	6,8	0	0	20,5
6 (6)	5	6,8	0	0	19,4
7 (2)	5	6,8	0	0	21,7
8 (11)	3,6	6,8	- 1,4	0	12,8
9 (9)	6,4	6,8	+ 1,4	0	15,7
10 (8)	5	5,7	0	- 1,4	13,8
11 (10)	5	7,9	0	+ 1,4	16,8

Valores entre parênteses: ordem de realização dos experimentos.

Admitindo que a superfície de resposta na região investigada seja uma função polinomial das variáveis, as respostas poderão ser estimadas por uma equação quadrática do tipo $y = b_0 + b_1x_3 + b_2x_5 + b_3x_3^2 + b_4x_5^2 + b_5x_3x_5$, em que x_3 e x_5 representam as variáveis codificadas para o tempo de reação e a quantidade de tetrabutóxido de zircônio (IV), respectivamente, e b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_4 e b_5 são os estimadores dos parâmetros do modelo. A partir dos resultados de percentagem de zircônio na Tabela 6 foi ajustado um modelo quadrático,

determinando os valores dos estimadores dos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados¹⁶⁴ e as respectivas estimativas de erro, para explicar as variações das respostas durante o processo de incorporação de zircônio nas partículas de sílica. Empregando um programa estatístico, tal como o STATISTICA®, obtém-se o modelo da Equação 14 que melhor se ajusta às respostas obtidas.

$$\% \text{ Zr} = 20,5 + 1,1x_3 + 1,4x_5 - 2,7x_3^2 - 2,2x_5^2 - 0,2x_3x_5 \quad \text{Equação 14}$$

$\pm 0,9 \quad \pm 0,6 \quad \pm 0,6 \quad \pm 1,0 \quad \pm 1,0 \quad \pm 0,8$

Pela análise da equação quadrática ajustada para a percentagem de zircônio incorporada à sílica, Equação 14, pode-se observar que o parâmetro de interação das variáveis, x_3x_5 , não foi estatisticamente significativo no nível de 95 % de confiança, e, portanto, pode ser removido da equação. O modelo quadrático então se resume a:

$$\% \text{ Zr} = 20,5 + 1,1x_3 + 1,4x_5 - 2,7x_3^2 - 2,2x_5^2 \quad \text{Equação 15}$$

$\pm 0,9 \quad \pm 0,6 \quad \pm 0,6 \quad \pm 1,0 \quad \pm 1,0$

Para verificar a validade do ajuste deste modelo (Equação 15) às percentagens de zircônio obtidas, foi realizada a análise da variância (ANOVA) que, por sua vez, foi obtida através de um programa estatístico. Os resultados da ANOVA estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Análise da variância do modelo quadrático ajustado às percentagens de zircônio.

Fonte de Variação (FV)	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (v)	Média quadrática (MQ)
Regressão	78,00	5	15,60
Resíduos	11,57	5	2,31
Falta de ajuste	8,92	3	2,97
Erro puro	2,65	2	1,32
Total	89,57	10	

% de variação explicada: 87,1
% de variação explicável: 97,0

O modelo quadrático não apresenta falta de ajuste pela ANOVA, pois a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e o erro puro experimental ($MQ_{faj}/MQ_{ep} = 2,25$) foi menor que o $F_{3,2,95\%}$ tabelado = 19,16, conforme sugerido pelos protocolos estatísticos para se confirmar a validade de um determinado modelo polinomial¹⁶⁴. Além disso, a regressão é estatisticamente significativa, pois a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos ($MQ_{reg}/MQ_{res} = 6,75$) é maior que o valor do teste F tabelado ($F_{5,5,95\%} = 5,05$). Isto implica que o modelo quadrático, ajustado aos dados de percentagem de zircônio obtidos para os experimentos, explica bem as variações ocorridas nos resultados. Conforme a Tabela 7, aproximadamente 87 % das variações ocorridas nas respostas é explicada pelo modelo da Equação 15.

O modelo quadrático ajustado pode ser representado graficamente através de uma superfície de resposta para as percentagens de zircônio obtidas pelos experimentos do planejamento composto central. A Figura 15 apresenta a superfície de percentagem de zircônio para as variáveis estudadas, tempo de reação (x_3) e quantidade de tetrabutóxido de zircônio (IV) (x_5).

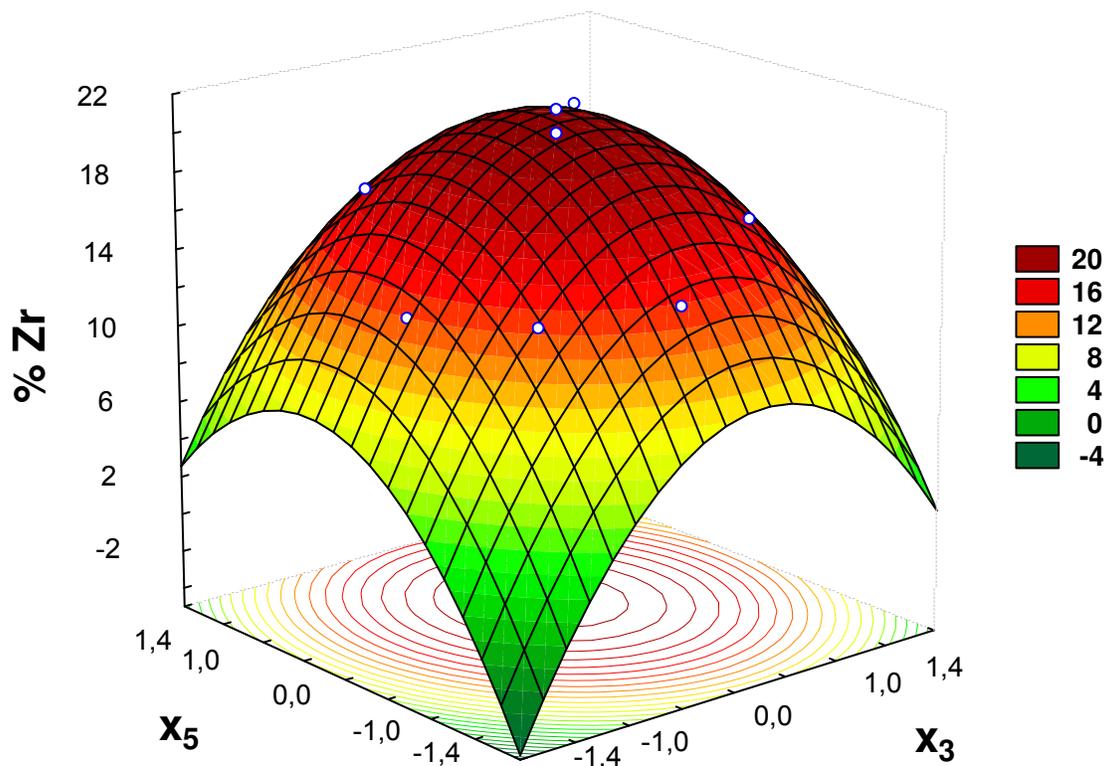


Figura 15. Superfície de percentagens de zircônio incorporadas à superfície da sílica.

Numa simples análise da superfície de respostas apresentada na Figura 15, pode-se observar que o ápice, correspondente ao ponto de ótimo, está dentro da região investigada. O ponto de ótimo trata-se das condições de tempo de reação (x_3) e quantidade de tetrabutóxido de zircônio (x_5) que resultarão na maior incorporação de zircônio à superfície da sílica. Os valores nestas condições de reação podem ser determinados pela derivada da equação quadrática, ($\partial y/\partial x_3$ e $\partial y/\partial x_5$). Efetuando a derivada encontram-se as condições ótimas, em valores codificados, para o tempo de reação e a quantidade de reagente, $x_3 = 0,21$ e $x_5 = 0,33$. Substituindo os valores de x_3 e x_5 na equação 14, obtém-se 20,9 % de zircônio na matriz de sílica, valor máximo previsto pelo modelo. Estes valores codificados correspondem, respectivamente, a 5 h 10 min de tempo de reação e 7,1 g de tetrabutóxido de zircônio para reagir com 2,5 g de sílica (ou 30 mmol de Zr por g de sílica). Portanto, com a otimização destas duas variáveis contínuas, todas as variáveis inicialmente estudadas para otimização do processo de zirconização da sílica foram otimizadas.

Em síntese, as condições ótimas obtidas para a síntese do suporte de sílica zirconizada foram: sílica não-ativada, solvente tolueno, 5 h 10 min de reação a uma temperatura de 40 °C e 7,1 g de reagente (tetrabutóxido de zircônio). Nestas condições, a percentagem de zircônio prevista é de 20,9 % bem maior que a determinada em trabalhos anteriores do LabCrom^{61,62}, aproximadamente 15 %, empregando uma otimização pelo método univariado.

Depois de otimizado o processo de zirconização da sílica cromatográfica, foi realizada a síntese de uma amostra de sílica zirconizada, em triplicata. A percentagem média de zircônio destas amostras foi de $20,6 \pm 1,3$ %, medida por fluorescência de raios X. Este valor é muito similar ao teórico previsto pelo modelo, de 20,9 %, indicando a eficiência do processo de zirconização da sílica.

4.2. Síntese do suporte de sílica titanizada

A otimização das condições de síntese do suporte de sílica titanizada foi realizada de forma similar à obtida para o processo de zirconização da sílica. Inicialmente foi realizada uma triagem das variáveis que afetam, de forma significativa, o processo de titanização através de um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , no qual foram avaliadas quatro variáveis em dois níveis cada (Tabela 2). Os níveis estudados foram selecionados de acordo com as condições empregadas em trabalhos anteriores utilizando-se de métodos univariados^{59,60,109}.

4.2.1. Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Para a otimização do processo de titanização da sílica deve-se, primeiramente, determinar as variáveis que afetam significativamente a incorporação de titânio na sílica. Para tal, foi empregado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} , que requer apenas metade dos dezesseis experimentos de um planejamento fatorial 2^4 completo. Os experimentos foram realizados de forma aleatória e sem replicatas. A matriz de planejamento foi construída segundo a relação geradora $I = 1234$, isto é, os sinais da variável 4, dispostos na Tabela 8, foram obtidos pelo produto dos sinais das variáveis $1 \times 2 \times 3$ para cada experimento. A percentagem de titânio foi determinada por espectroscopia de fluorescência de raios X. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Percentagem de titânio incorporadas na sílica de acordo com os experimentos do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Exp.	Fatores				% Ti
	1	2	3	4	
1 (7)	-	-	-	-	4,7
2 (1)	+	-	-	+	7,3
3 (2)	-	+	-	+	5,0
4 (4)	+	+	-	-	6,8
5 (3)	-	-	+	+	4,7
6 (6)	+	-	+	-	7,1
7 (5)	-	+	+	-	2,8
8 (8)	+	+	+	+	4,2

Valores entre parênteses: ordem de execução dos experimentos.

A partir dos resultados de percentagem de titânio foram calculados os efeitos das variáveis na incorporação do titânio à sílica. O cálculo foi realizado segundo a Equação 13. Os resultados dos efeitos para cada variável estudada estão apresentados na Tabela 9. Os efeitos das interações entre as variáveis foram desconsiderados uma vez que o objetivo deste estudo

foi apenas selecionar as variáveis que atuam significativamente na incorporação de titânio na sílica cromatográfica.

Tabela 9. Valores dos efeitos para as variáveis estudadas no processo de titanização da sílica.

Variáveis	Efeitos
1	2,05
2	- 1,25
3	- 1,25
4	- 0,05

Como os experimentos não foram realizados em replicatas, o erro dos efeitos não pôde ser estimado a partir de variâncias individuais dos experimentos. Porém, uma outra forma de estimar o erro dos efeitos é realizada pela análise do gráfico normal dos efeitos¹⁶⁴, no qual os efeitos mais dispersos de um valor padronizado (Z) igual a zero são estatisticamente significativos. Por outro lado, aqueles que se aproximam deste valor não possuem influência significativa na resposta. O gráfico normal dos resíduos para os experimentos do processo de titanização da sílica está ilustrado na Figura 16.

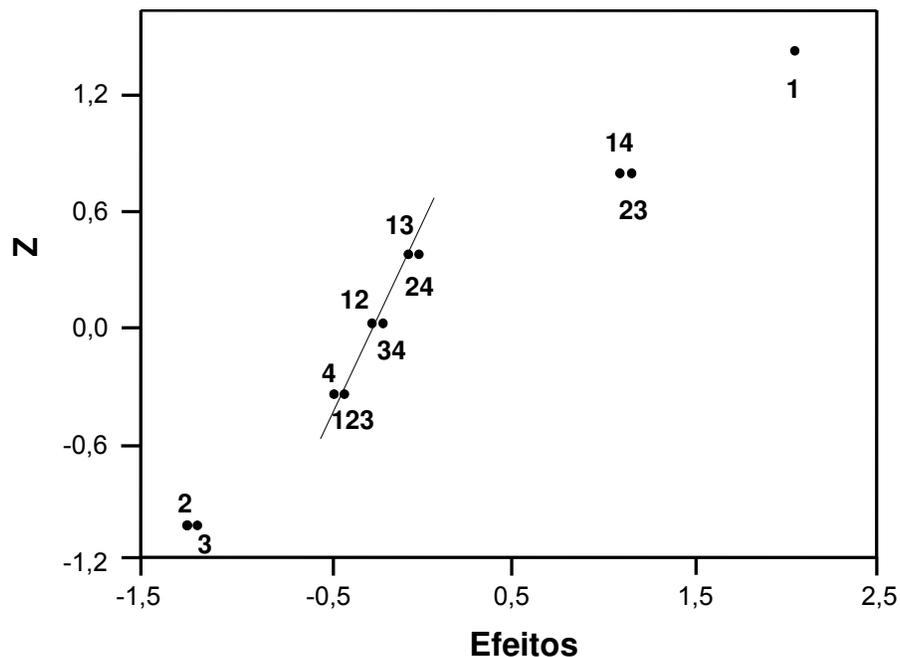


Figura 16. Gráfico normal dos efeitos. (•) variáveis principais ou interações entre duas ou mais variáveis.

Pelo gráfico dos resíduos, apenas a variável 4 (quantidade de tetrabutóxido de titânio) não foi estatisticamente significativa, no nível de 95 % de confiança e, portanto, não afeta a incorporação de titânio na sílica cromatográfica, dentro dos níveis estudados. As demais variáveis estudadas possuem influência na resposta e necessitam de otimização. Como o tipo de solvente (variável 1) é uma variável discreta, sua otimização foi realizada pela fixação do nível que proporcionou a maior percentagem de titânio na sílica. Neste caso, como o seu efeito é precedido pelo sinal positivo, o nível alto (tolueno) foi o que proporcionou melhores resultados para titanização. Para a otimização das duas variáveis contínuas restantes, 2 (tempo de reação) e 3 (temperatura de reação) foi realizado um planejamento composto central.

4.2.2. Planejamento composto central

Para a otimização da quantidade de titânio incorporado à superfície da sílica foram realizados onze experimentos de acordo com o planejamento composto central. Nestes experimentos a quantidade de tetrabutóxido de titânio (IV) foi fixada em 5,0 g. As percentagens de titânio medidas para cada experimento e a matriz do planejamento estão dispostas na Tabela 10.

Tabela 10. Percentagens de titânio para o planejamento composto central. x_2 e x_3 representam os valores dos dois fatores, codificados pelas equações $X_2 = \frac{t-4}{1}$ e $X_3 = \frac{T-40}{10}$.

Experimentos	t (h)	T (°C)	x_2	x_3	% Ti
1 (3)	3	30	-1	-1	7,3
2 (7)	5	30	1	-1	6,8
3 (6)	3	50	-1	1	7,1
4 (1)	5	50	1	1	4,2
5 (2)	4	40	0	0	7,8
6 (4)	4	40	0	0	7,8
7 (5)	4	40	0	0	7,5
8 (11)	2,6	40	-1,4	0	7,5
9 (8)	5,4	40	1,4	0	7,2
10 (10)	4	25	0	-1,4	7,1
11 (9)	4	55	0	1,4	7,0

A partir dos resultados de percentagens de titânio para os experimentos do planejamento composto central foi ajustado um modelo quadrático (Equação 16), para determinar as condições ótimas de tempo e temperatura de reação que resultem em uma percentagem máxima de titânio na sílica cromatográfica.

$$\% \text{Ti} = 7,71 - 0,48x_2 - 0,37x_3 - 0,40x_2^2 - 0,55x_3^2 - 0,60x_2x_3 \quad \text{Equação 16}$$

$$\pm 0,03 \quad \pm 0,04 \quad \pm 0,04 \quad \pm 0,07 \quad \pm 0,07 \quad \pm 0,08$$

Todos os parâmetros do modelo são estatisticamente significativos, uma vez que as respectivas estimativas de erro não incluem nenhum dos coeficientes dos parâmetros. A validade deste modelo no ajuste das percentagens de titânio incorporadas na sílica foi determinada pela ANOVA. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Análise da variância do modelo quadrático ajustado às percentagens de titânio.

Fonte de Variação (FV)	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade (v)	Média Quadrática (MQ)
Regressão	6,39	5	1,28
Resíduos	3,41	5	0,68
Falta de ajuste	3,35	3	1,12
Erro puro	0,06	2	0,03
Total	9,08	10	

% de variação explicada: 65,2

% de variação explicável: 99,4

Apesar de a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} (37,33) ser maior que o $F_{3,2,95\%}$ (19,16) tabelado, e portanto, o modelo apresentar falta de ajuste, esta equação foi considerada adequada para o ajuste dos nossos resultados de incorporação de titânio à sílica, pois, aproximadamente 65 % das variações ocorridas durante a execução dos experimentos puderam ser explicadas pelo modelo da Equação 16.

O modelo ajustado para os resultados de titanização da sílica pode ser representado graficamente por uma superfície de resposta. A Figura 17 apresenta a superfície de percentagens de titânio para as duas variáveis estudadas, tempo e temperatura de reação.

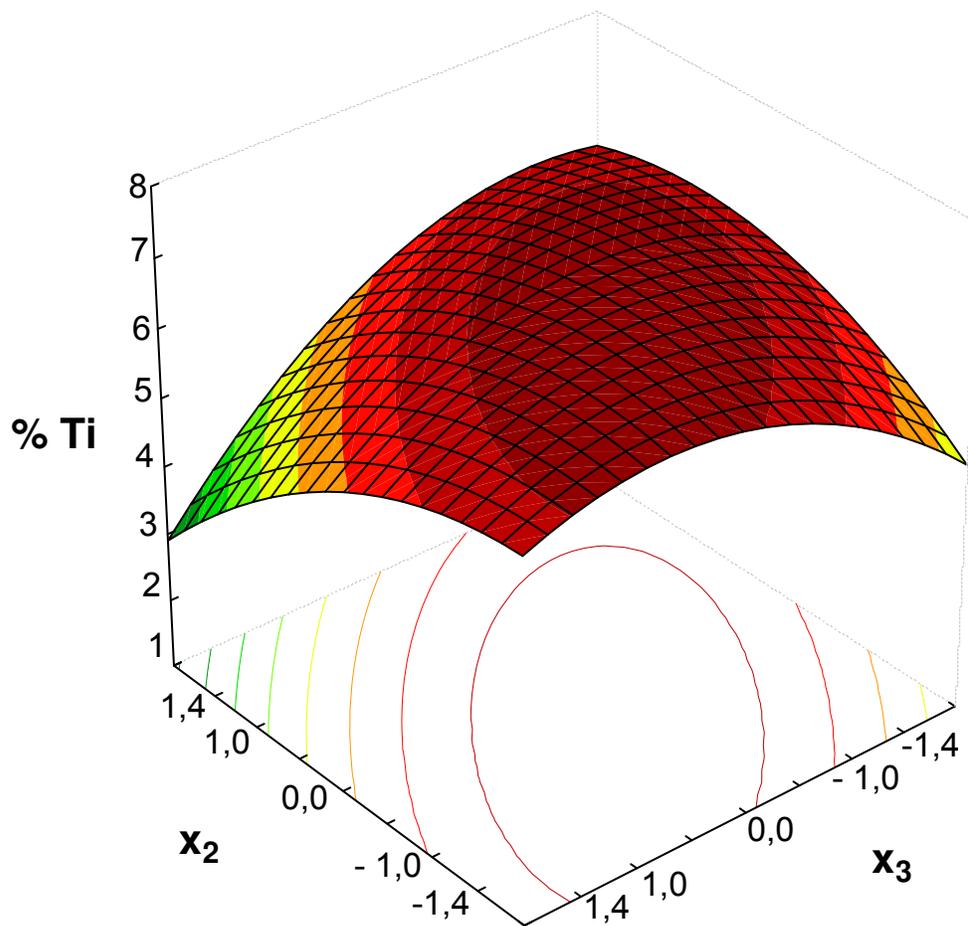


Figura 17. Superfície de percentagens de titânio incorporadas à sílica cromatográfica.

Pela superfície de resposta, observa-se que a região de máximo está dentro dos níveis investigados. Este valor pôde ser determinado pela derivada da equação quadrática ajustada às percentagens de titânio. As condições ótimas, de tempo e temperatura de reação, obtidas foram em valores codificados, $x_2 = 0,59$ e $x_3 = -0,02$, respectivamente. Em valores reais estas condições correspondem a um tempo de reação de 4 h 40 min e temperatura de, aproximadamente, 40 °C. Nestas condições, a percentagem máxima de titânio incorporada à superfície da sílica, prevista pelo modelo, foi de 7,8 %.

As condições otimizadas para a titanização da sílica foram: solvente tolueno, 5,0 g de tetrabutóxido de titânio para 2,5 g de sílica não ativada (ou 25 mmol de Ti por g de sílica), tempo de reação de 4 h 40 min e temperatura de reação de 40 °C. Empregando estas

condições no processo de titanização da sílica foi realizada a síntese de uma amostra em triplicata. A percentagem média de titânio destas amostras foi de $7,6 \pm 0,2$ %. Este valor é similar ao teórico previsto pelo modelo, de 7,8 %, indicando a eficiência do processo de titanização otimizado pela metodologia de superfície de resposta e pelo planejamento de experimentos.

4.3. Caracterização físico-química dos suportes de sílicas metalizadas

4.3.1. Área superficial específica, volume específico e diâmetro médio de poros

Os valores de área superficial específica (S_{BET}), volume específico de poros (v_p) e diâmetro médio de poros (d_p) foram realizadas pelas medidas de adsorção e dessorção de N_2 a $-195,5$ °C. As medidas das amostras de sílica zirconizada e de sílica titanizada foram realizadas em triplicatas de acordo com os respectivos processos de metalização otimizados. Os resultados obtidos para as amostras de sílica zirconizada e sílica titanizada (média das três amostras) e sílica nua estão dispostos na Tabela 12.

Tabela 12. Área superficial específica, volume e diâmetro de poros da sílica pura, zirconizada e titanizada.

Amostras	Área superficial ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volume de poros ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Diâmetro de poros (nm)
Sílica Kromasil	309	0,89	11,70
Sílica zirconizada	336 ± 7	$0,68 \pm 0,01$	$8,0 \pm 0,5$
Sílica titanizada	292 ± 3	$0,73 \pm 0,05$	$9,5 \pm 0,7$

As amostras de sílica zirconizada e sílica titanizada apresentaram redução do volume e diâmetro de poros das partículas, sugerindo que a deposição dos óxidos metálicos ocorreu dentro dos poros das partículas de sílica, porém sem obstruí-los. Esta redução não compromete as características do material, uma vez que os valores resultantes correspondem a mais de

70 % do valor inicial dos parâmetros de poros da sílica cromatográfica nua. A redução do volume e diâmetro de poros foi menor nas partículas de sílica titanizada que nas partículas de sílica zirconizada, provavelmente devido à menor quantidade de titânio depositado nos poros da sílica, 7,8 %, contra 20,6 % de zircônio.

Outra característica importante das partículas dos suportes de sílica metalizada é a área superficial específica. As amostras de sílica zirconizada tiveram sua área superficial aumentada, em comparação à da sílica nua, após a deposição do zircônio, enquanto que a área superficial específica das partículas de sílica titanizada apresentou uma redução, inferior a 5 %, da área inicial das partículas de sílica nua. Provavelmente, a maior área superficial específica da sílica zirconizada ocorreu devido a deposição do óxido de zircônio dentro dos poros da sílica formando pequenas rugosidades nas paredes internas sem bloqueá-los. Estes valores de área superficial específica para os suportes de sílica zirconizada e titanizada são bastante apropriados para as finalidades cromatográficas¹¹, mostrando que a síntese da sílica metalizada não altera, de forma significativa, as propriedades apropriadas da sílica. Propriedades estas que o torna um material de suporte quase ideal.

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura e de força atômica

A morfologia das partículas do suporte de sílica metalizada foi avaliada, após o processo de síntese, por técnicas microscópicas: microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA). A Figura 18 apresenta as fotomicrografias eletrônicas de partículas de sílica nua, sílica zirconizada e sílica titanizada.

As fotomicrografias mostram claramente que não houveram quaisquer alterações quanto à forma esférica, o tamanho e a distribuição de tamanho das partículas de sílica zirconizada e sílica titanizada em relação à sílica nua. É possível notar também que as etapas de lavagens sucessivas com tolueno e água, no processo de síntese dos suportes, foram eficientes para remoção do material orgânico residual, pois não há presença de resíduos de reagentes ou de aglomerados das partículas das sílicas metalizadas.

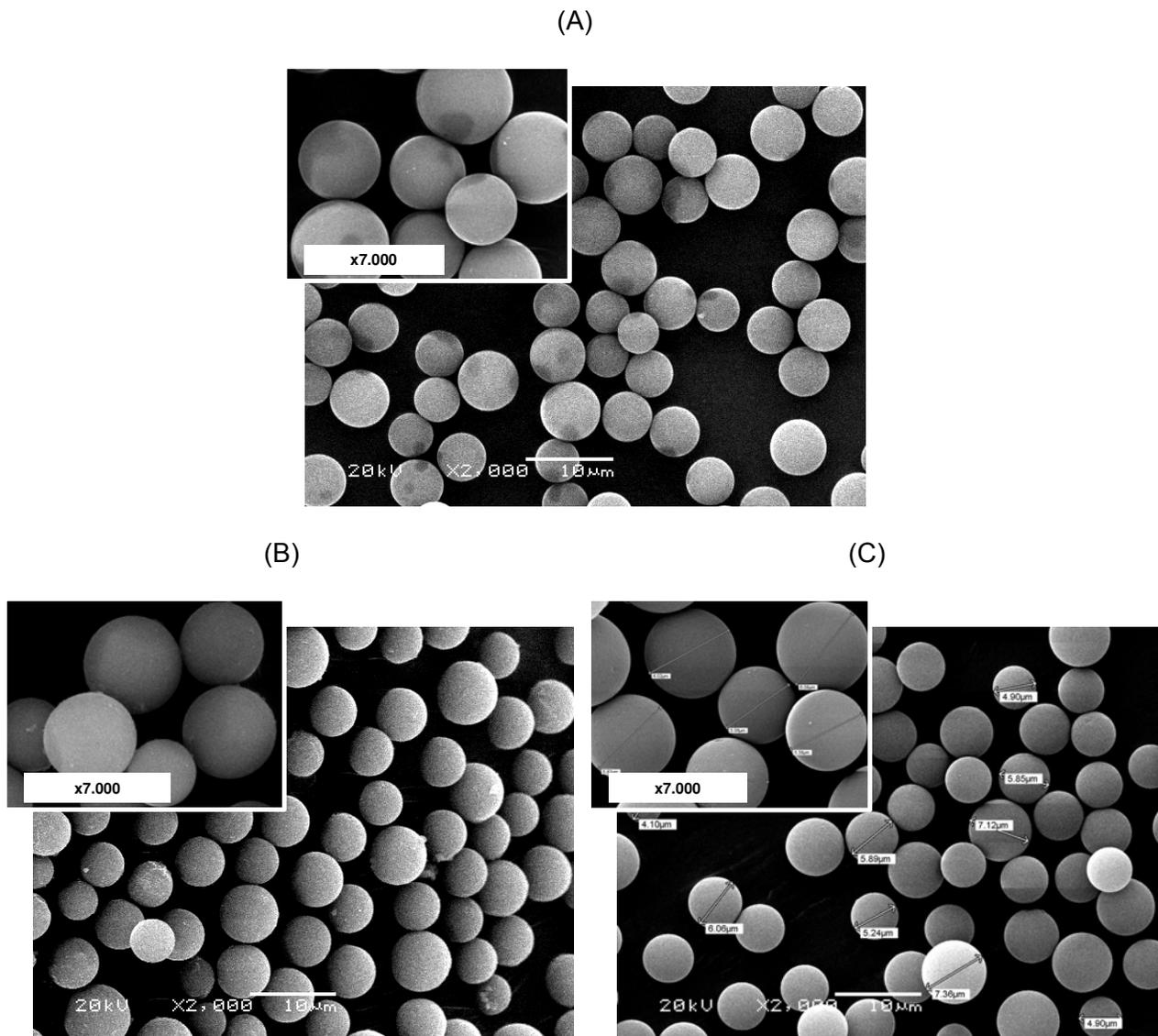


Figura 18. Fotomicrografias eletrônicas de varredura com ampliação de 2.000 vezes dos suportes (A) de sílica nua, (B) de sílica zirconizada e (C) de sílica titanizada. Em detalhe no canto superior esquerdo das imagens: ampliação das partículas em 7.000 vezes.

As características morfológicas das superfícies das amostras de sílica zirconizada e sílica titanizada foram avaliadas por fotomicrografias de MFA, empregando o modo “tapping mode” de obtenção das imagens. Imagens típicas das superfícies das partículas de sílica zirconizada e titanizada estão ilustradas na Figura 19.

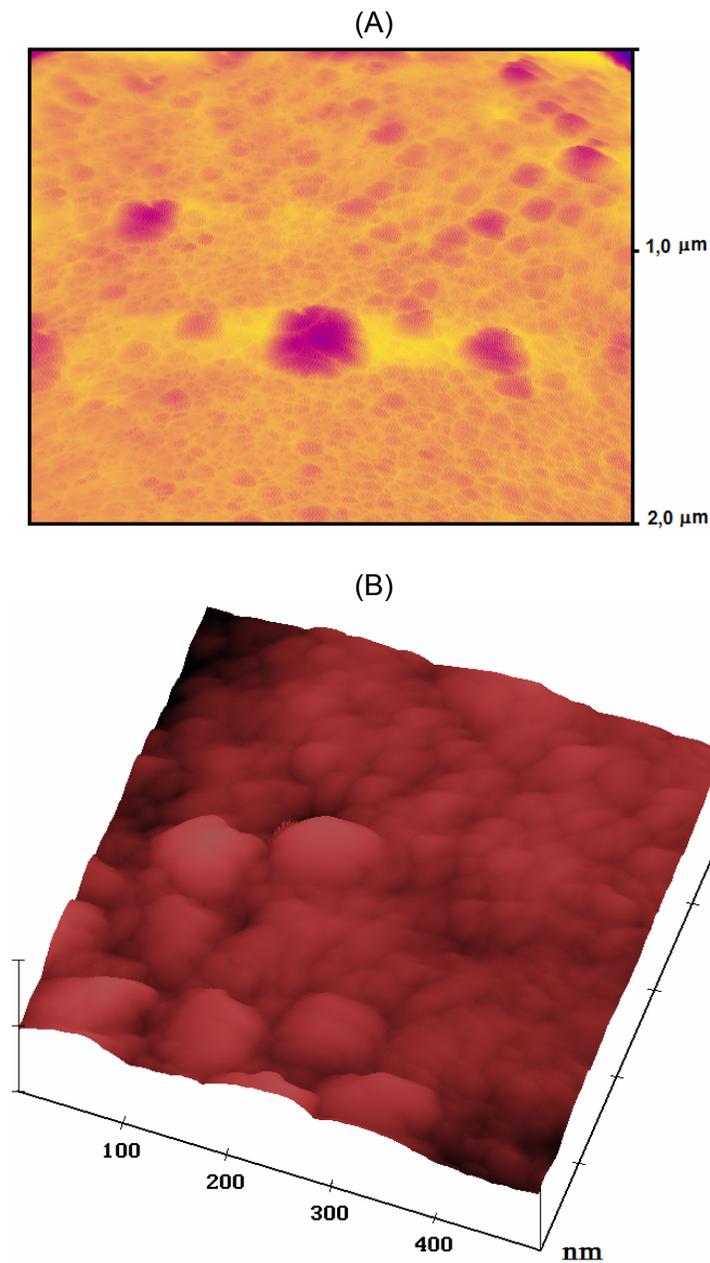


Figura 19. Imagens de microscopia de força atômica da superfície de uma partícula de sílica zirconizada (A) e de uma partícula de sílica titanizada (B).

Pelas imagens das superfícies das sílicas metalizadas obtidas por MFA, observam-se que as partículas apresentam um alto grau de porosidade, pontos mais escurecidos da Figura 19A, com alguns poucos macroporos e mesoporos e, predominantemente, um grande número de microporos, de acordo com as definições da International Union Pure and Applied Chemistry (IUPAC)¹⁷². Segundo a IUPAC, os microporos são poros com diâmetros que não excedem a

2 nm (20 Å), os macroporos são definidos como poros com diâmetros superiores a 50 nm (500 Å), e os mesoporos são poros de tamanhos intermediários a estes, 2 a 50 nm. Além disso, as superfícies das partículas das sílicas metalizadas apresentam um alto nível de rugosidade, conforme pode ser conferido pela imagem ilustrada na Figura 19B.

4.3.3. Análises termogravimétricas

As estabilidades térmicas dos suportes de sílica metalizada foram avaliadas por medidas termogravimétricas. A Figura 20 apresenta termogramas típicos obtidos para as partículas de sílica zirconizada e titanizada.

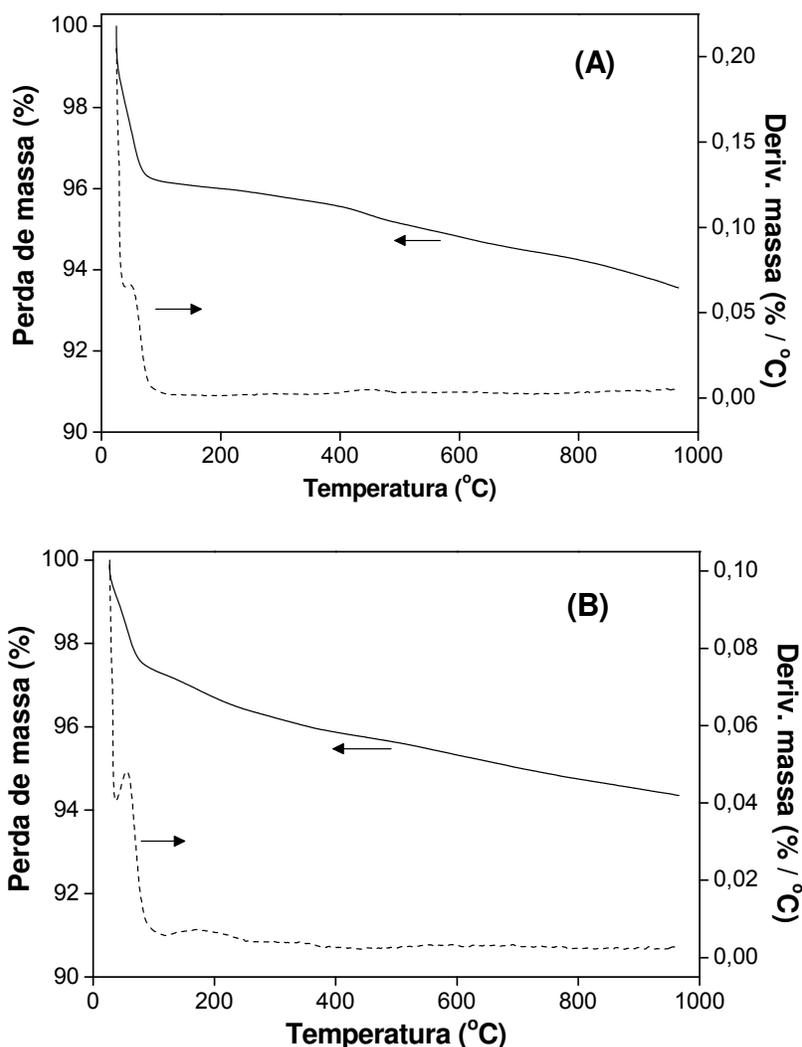


Figura 20. Termogramas dos suportes de sílica zirconizada (A) e titanizada (B).

As perdas de massas estão relacionadas principalmente aos processos de desidratação e desidroxilação das partículas de sílicas zirconizada e titanizada. Nos quais, moléculas de água fracamente adsorvidas são evaporadas e, portanto, desprendidas da superfície dos suportes, até aproximadamente 150 °C. Entre 150 e 600 °C as perdas de massas são referentes à evaporação de moléculas de água fisicamente adsorvidas nos suportes. A partir de 600 °C ocorre o processo de desidroxilação nos materiais devido à remoção de grupos hidroxilas da sílica, da zircônia e da titânia. A perda de massa total foi inferior a 7 % da massa inicial das sílicas metalizadas, indicando uma boa resistência térmica destes suportes cromatográficos.

4.3.4. Espectroscopia de absorção no Infravermelho

A caracterização estrutural dos suportes cromatográficos antes e após a incorporação dos óxidos metálicos foi realizada por técnicas espectroscópicas de análises. Medidas na região do infravermelho foram realizadas para as amostras de sílicas nua, zirconizada e titanizada. Os espectros obtidos para as amostras são apresentados na Figura 21.

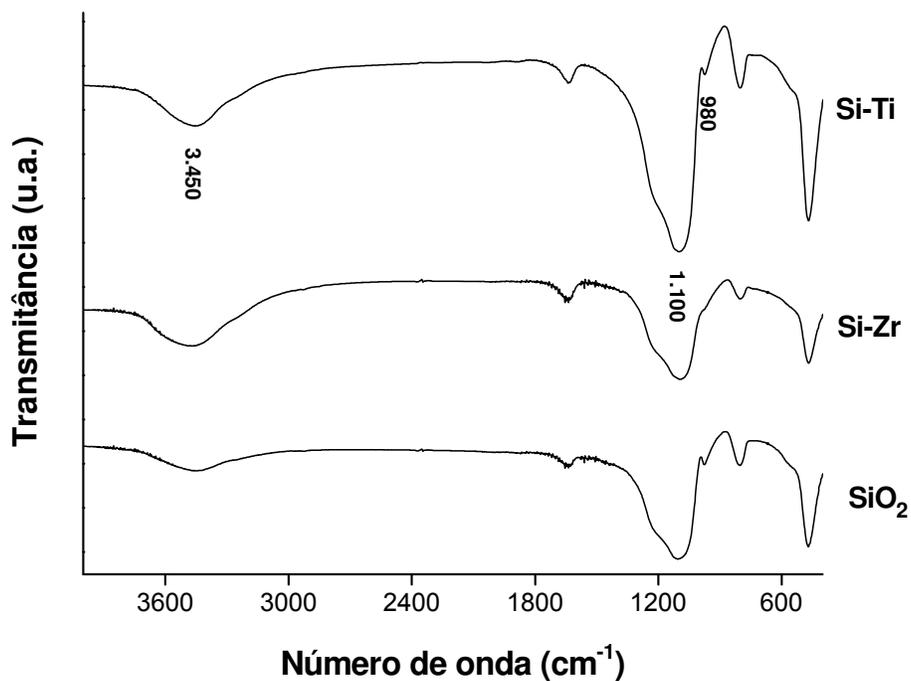


Figura 21. Espectros da região do infravermelho para os suportes de sílica nua, sílica zirconizada e sílica titanizada.

De acordo com os espectros dos suportes cromatográficos, as principais bandas ocorrem em 3.450, 1.100 e 980 cm^{-1} . A banda larga em 3.450 cm^{-1} é atribuída à presença de grupos silanóis, grupos hidroxilas da zircônia (zirconóis) e da titânia (titanóis) e água adsorvida ao material. A banda acentuada em 1100 cm^{-1} é atribuída ao estiramento das ligações siloxano, Si-O-Si. Os espectros de sílica zirconizada e titanizada são bastante similares ao da sílica nua com exceção do pequeno ombro referente a vibrações dos grupos silanóis livres em 980 cm^{-1} . Este sinal desaparece nos espectros de sílica zirconizada, indicando que a incorporação do zircônio na sílica ocorreu, principalmente, nestes grupos silanóis. Diferentemente da sílica zirconizada, o sinal em 980 cm^{-1} permaneceu inalterado após o processo de titanização, provavelmente, devido à quantidade relativamente baixa de titânio incorporado à sílica (~8 %), comparada à maior percentagem de zircônio presente na sílica.

4.3.5. Espectroscopia de UV-vis com refletância difusa

A espectroscopia de absorção no UV-vis é freqüentemente usada para caracterização superficial de óxidos em catálise¹⁷³⁻¹⁷⁷. Os espectros de UV-vis fornecem informações a respeito do estado de oxidação de íons dos metais de transição, podendo, desta forma, inferir no tipo de ligação que estes óxidos formam com a matriz de sílica nos suportes de sílicas zirconizada e titanizada.

As amostras de sílicas zirconizada e titanizada foram submetidas às análises por espectroscopia no UV-vis com refletância difusa, juntamente com misturas mecânicas dos óxidos, sem qualquer etapa posterior de tratamento, e de óxidos de zircônio e de titânio puros. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas. Espectros típicos das amostras à base de zircônio estão apresentados na Figura 22.

Os espectros da mistura física ($\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$) e do óxido de zircônio puro apresentaram comportamento semelhante. Ambos apresentam uma banda intensa próxima a 230 nm que é atribuída a ligações Zr-O-Zr^{173,174}, na qual o zircônio encontra-se em sua forma monoclinica, apresentando uma configuração octaédrica¹⁷⁵. As amostras de sílica zirconizada apresentaram um deslocamento desta banda para a região de 204 nm, o qual é atribuído à transferência de carga do ligante (O^{2-}) para o orbital do metal (Zr^{4+})¹⁷³⁻¹⁷⁶. O zircônio, nesta região, se encontra em geometria tetraédrica¹⁷⁷, evidenciando a formação de ligações Si-O-Zr nas amostras de sílica zirconizada.

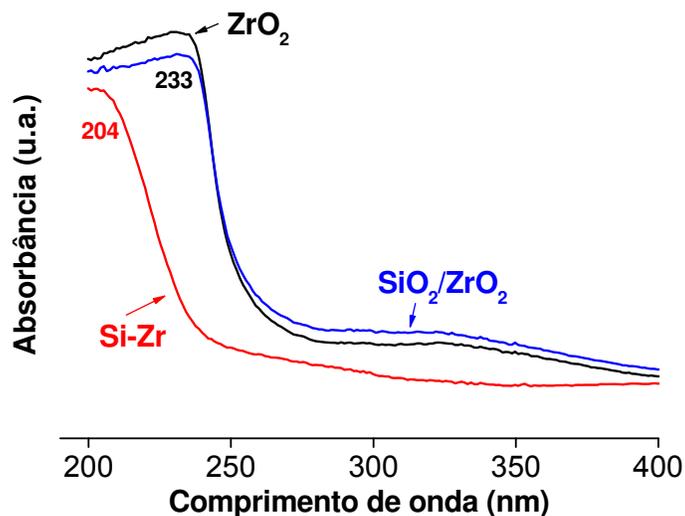


Figura 22. Espectros de absorção no UV-vis com refletância difusa de ZrO₂ puro, da amostra de sílica zirconizada e de uma mistura mecânica de SiO₂ e ZrO₂.

Os espectros das amostras de sílica titanizada (Figura 23) apresentam uma banda intensa em 365 nm que, de acordo com a literatura¹⁷⁸⁻¹⁸⁰, indica a presença de fases separadas de titânia na sua forma cristalina anatase. Bandas na região de 220 nm^{179,180}, as quais são atribuídas à ligações químicas entre os óxidos (Si-O-Ti) devido a transferência de carga do ligante (O²⁻) para o orbital vazio *d* do Ti⁴⁺, não foram detectadas nos espectros de sílica titanizada. Estes resultados indicam que a titânia foi depositada, na sua forma cristalina anatase, na superfície da sílica sem interação química entre os dois óxidos.

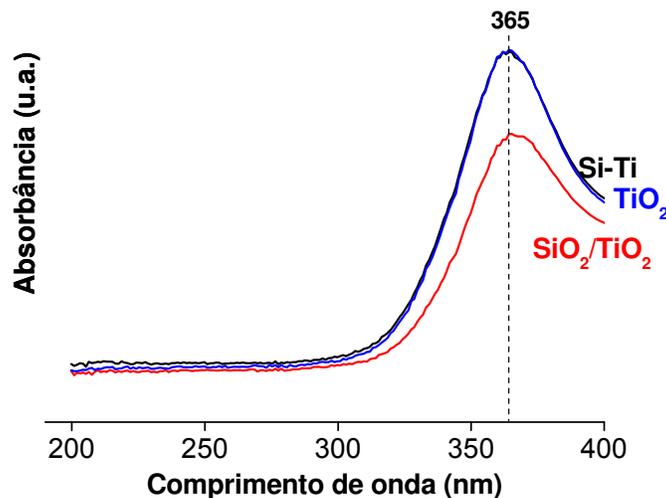


Figura 23. Espectros de UV-vis com refletância difusa de TiO₂ puro, da amostra de sílica titanizada e de uma mistura mecânica de SiO₂ e TiO₂.

4.3.6. Espectroscopia fotoeletrônica de raios X

As formas de ligação do zircônio e do titânio na superfície da sílica foram obtidas por espectroscopia fotoeletrônica de raios X. Amostras de sílica zirconizada e sílica titanizada foram medidas em triplicata. Misturas mecânicas dos óxidos e amostras dos óxidos de zircônio e titânio também foram analisadas. As energias de ligação dos picos de fotoemissão estão apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Energias de ligação dos elementos nas amostras de sílicas metalizadas.

Amostras	Energias de Ligação (eV)			
	Zr 3d ^{5/2} / Ti 2d	Si 2p	O 1s	
			O-Zr ou O-Ti	O-Si
Sílica zirconizada	182,7	102,4	530,7	532,7
Mistura mecânica (SiO ₂ -ZrO ₂)	182,5	104,4	530,3	533,0
*SiO ₂ -ZrO ₂ (Si-O-Zr)	182,8	102,9	531,0	532,7
*ZrO ₂ (Zr-O-Zr)	182,4	-	530,2	-
*SiO ₂ (Si-O-Si)	-	103,4	-	532,7
Sílica titanizada	459,1	103,6	530,3	532,3
Mistura mecânica (SiO ₂ -TiO ₂)	459,3	103,6	530,3	532,3
*SiO ₂ -TiO ₂ (Si-O-Ti)	459,3	103,4	531,5	532,3
*TiO ₂ (Ti-O-Ti)	459,3	-	530,3	-

*valores de referência na literatura.

As informações mais relevantes a respeito da ligação entre os óxidos nas amostras são obtidas dos resultados da energia de ligação do orbital 1s do oxigênio (O 1s). De acordo com a literatura, em uma ligação química do tipo Si-O-Zr ou Si-O-Ti, as energias de ligação do O 1s no Zr-O/Ti-O sofrem deslocamentos químicos convergindo para um valor intermediário de energia de ligação aos dois extremos dos óxidos puros¹⁷⁸. O valor da energia de ligação do O 1s mais

descrito como representativo das ligações Si-O-Zr é de 531,0 eV¹⁷⁷ e das ligações Si-O-Ti é de 531,5 eV¹⁸¹.

Pode ser observado na Tabela 13 que a amostra de sílica zirconizada apresentou deslocamento químico da energia de ligação do O 1s para um valor de 530,7 eV, mostrando evidências da formação de ligações químicas entre a sílica e a zircônia. A Figura 24 apresenta os espectros de EFX do O 1s da amostra de sílica zirconizada e também da mistura física entre a sílica e a zircônia, na qual podem ser observados os picos referentes às ligações Si-O e Zr-O.

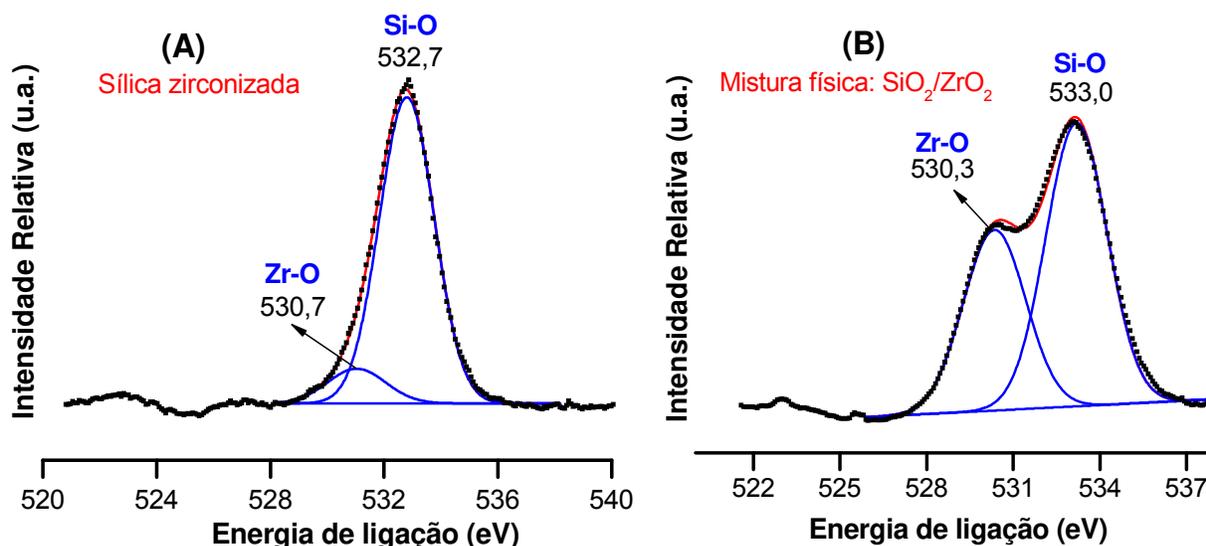


Figura 24. Espectros de EFX para o O 1s das amostras de (A) sílica zirconizada (21,6 % Zr) e (B) mistura física SiO₂/ZrO₂ (22 % Zr).

A maior intensidade do pico do orbital 1s do oxigênio na ligação Zr-O da mistura física SiO₂/ZrO₂, a qual contém praticamente a mesma percentagem de Zr da amostra de sílica zirconizada, está relacionado, possivelmente, à presença de maior quantidade de átomos de Zr na superfície deste material. Nas amostras de sílica zirconizada, os átomos de Zr depositados dentro dos poros da sílica não são detectados pelas medidas de EFX, fazendo com que a intensidade deste sinal seja menor. No entanto, na Figura 24 pode ser observado o deslocamento da energia de ligação na amostra de sílica zirconizada comparada à energia de ligação da mistura física SiO₂/ZrO₂, a qual é idêntica à da zircônia pura (ZrO₂), Tabela 13.

Por sua vez, este deslocamento químico da energia de ligação do O 1s não foi observado nas amostras de sílica titanizada. Conforme os resultados apresentados na Tabela 13 e ilustrados na Figura 25, as energias de ligação do O 1s das amostras de sílica titanizada e da mistura física SiO₂/TiO₂ são idênticas à energia de ligação do óxido de titânio puro. O valor

de energia de ligação do orbital 1s do oxigênio da ligação O-Ti obtidas para estas amostras foi igual ao valor de referência para a titânia na sua forma cristalina anatase, 530,3 eV^{177,182}. Estes resultados de EFX corroboram os obtidos por UV-vis, indicando que houve apenas a deposição de óxido de titânio na superfície e poros da sílica cromatográfica. É importante ressaltar que todas as amostras foram realizadas em triplicatas e, em nenhuma delas houve deslocamento químico do O 1s da ligação Ti-O.

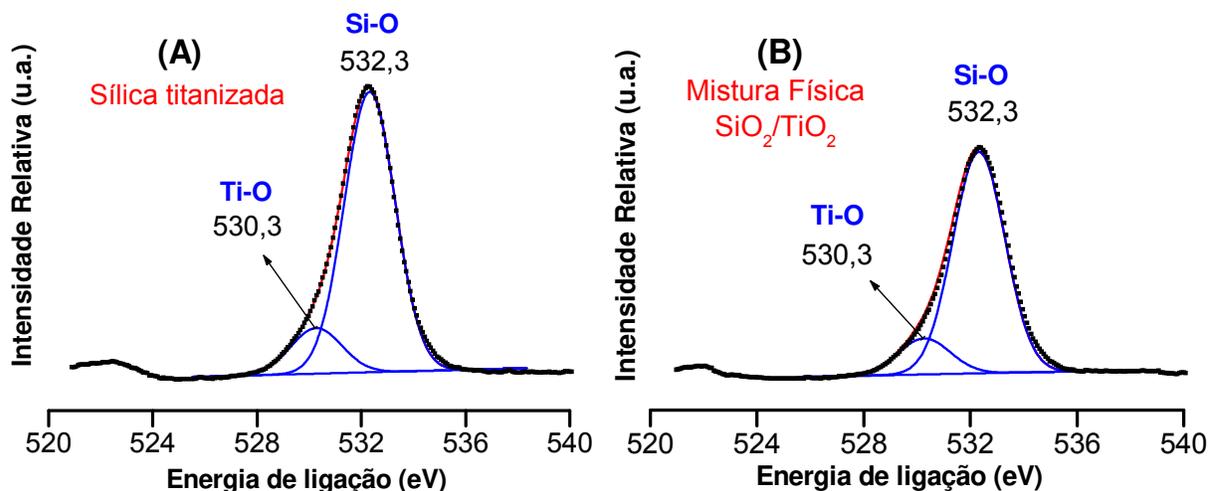


Figura 25. Espectros de EFX para o O 1s das amostras de (A) sílica titanizada (7,8 % Ti) e (B) mistura física $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ (8 % Ti).

4.4. Sumário das caracterizações dos suportes de sílica zirconizada e titanizada

O suporte de sílica zirconizada apresenta-se como um sólido na forma de partículas esféricas contendo aproximadamente 21 % de zircônio na superfície e poros da sílica cromatográfica. A sílica zirconizada possui uma grande área superficial específica e propriedades de poros (volume específico e diâmetro médio) adequadas para as finalidades cromatográficas. O zircônio está ligado à sílica, principalmente, pelos grupos silanóis isolados, sendo esta uma ligação química do tipo Si-O-Zr, à qual se credita uma maior estabilidade química frente a condições mais drásticas de fase móvel.

O suporte de sílica titanizada apresenta-se na forma de partículas esféricas com propriedades texturais, tais como área superficial específica, volume e diâmetro médio de poros bastante similares à sílica Kromasil. Aproximadamente 8 % de titânio estão depositados na

forma de um óxido cristalino (anatase) na superfície e poros da sílica cromatográfica por interações fracas governadas pelas forças de van der Waals.

Os dois materiais apresentaram diferenças quanto ao tipo de ligação com a sílica, provavelmente, devido a maior quantidade de zircônio incorporado, favorecendo a formação de ligação química de maior estabilidade do tipo Si-O-Zr. Por outro lado, apesar dos óxidos estarem ligados fracamente por forças de van der Waals no material de sílica titanizada, este também se apresenta promissor como uma alternativa aos suportes cromatográficos à base de sílica nua.

4.5. Caracterização físico-química do PMTDS

4.5.1. Análise termogravimétrica

A estabilidade térmica do PMTDS foi avaliada por análise termogravimétrica. As perdas de massas do PMTDS ocorreram principalmente a partir de 130 °C, início da degradação do polímero, como pode ser visto na Figura 26.

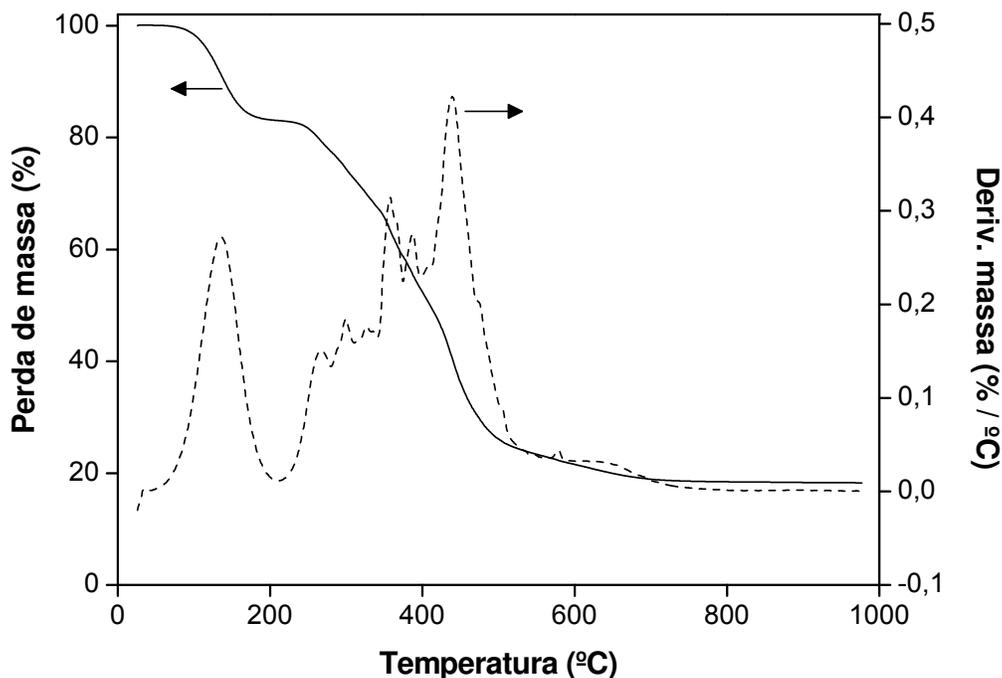


Figura 26. Termograma do poli(metiltetradecilsiloxano).

Como o PMTDS é constituído também por monômeros e oligômeros de comprimentos de cadeias carbônicas variadas (desde as mais curtas como CH_3 às mais longas como $\text{C}_{30}\text{H}_{61}$), podem ser observados vários picos de degradação (curva pontilhada) dentro da faixa de 130 a 600 °C. A 600 °C todo o polímero é degradado, deixando um depósito de sílica. Diante destes resultados, a faixa de aplicação do PMTDS para a utilização como fase estacionária fica limitada a uma temperatura máxima de 120 °C, para garantir que a sua estrutura inicial não seja afetada pela alteração da temperatura durante o preparo da fase estacionária.

4.5.2. Espectroscopia de absorção no infravermelho

A presença de bandas características dos grupos funcionais da estrutura do PMTDS foi avaliada qualitativamente por análises na região do infravermelho. Um espectro típico de transmissão do PMTDS na região do infravermelho está ilustrado na Figura 27. As principais bandas do espectro estão indicadas na Figura. A pequena banda em 3.420 cm^{-1} refere-se ao estiramento (ν) de grupos hidroxilas (Si-OH) do polímero, indicando que, mesmo após a imobilização do PMTDS sobre o suporte cromatográfico, estes grupos podem atuar no processo de retenção das fases estacionárias ou podem se envolver no processo de imobilização do polímero sobre o suporte. O tripleto na região de 2.900 cm^{-1} está relacionado à vibração C-H de grupos CH_2 e CH_3 do PMTDS, e as bandas em 1.460 e 1.260 cm^{-1} são atribuídas às deformações C-C e C-H de grupos alquilas, respectivamente. O duplete na região espectral de 1.010 e 1.100 cm^{-1} é atribuído a ligações siloxanos (Si-O-Si).

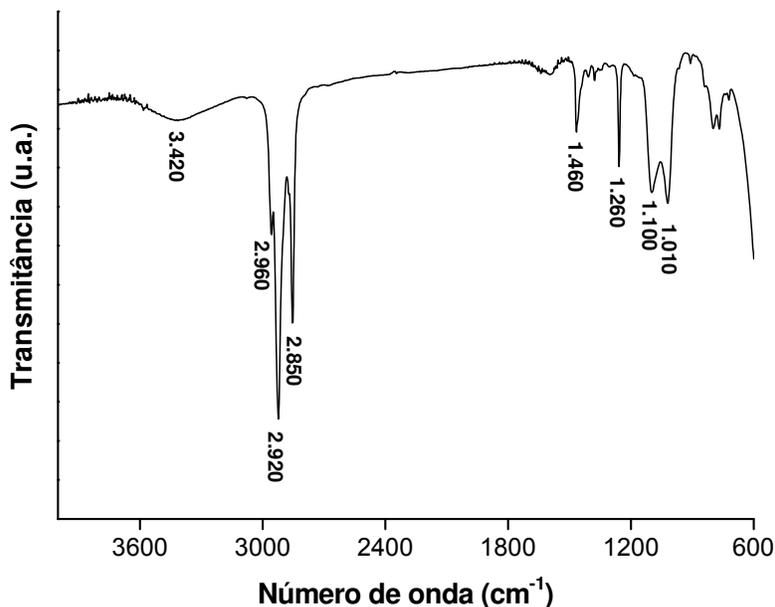


Figura 27. Espectro da região do infravermelho para o poli(metiltetradecilsiloxano).

4.5.3. Cromatografia por exclusão

Através da cromatografia por exclusão, na modalidade de permeação em gel, foi possível determinar os valores de massa molar numérica média (M_n) e massa molar ponderal média (M_w) do PMTDS. Estes dados foram obtidos a partir do cromatograma de PMTDS, o qual está ilustrado na Figura 28. O índice de polidispersividade (IP) do PMTDS foi obtido pela razão dos valores de M_n e M_w , $IP = M_w/M_n$.

Conforme pode ser observado na Tabela 14, a massa molar numérica média do PMTDS foi de 7.957 daltons e o seu índice de polidispersividade de 3,47. Estes valores são muito similares aos determinados para outros polissiloxanos, tais como: PMOS e PMODS, em trabalhos anteriores do LabCrom^{135,183}. Desta forma, espera-se que o desempenho cromatográfico das fases estacionárias com PMTDS também seja similar aos obtidos pelas fases baseadas em PMOS e PMODS.

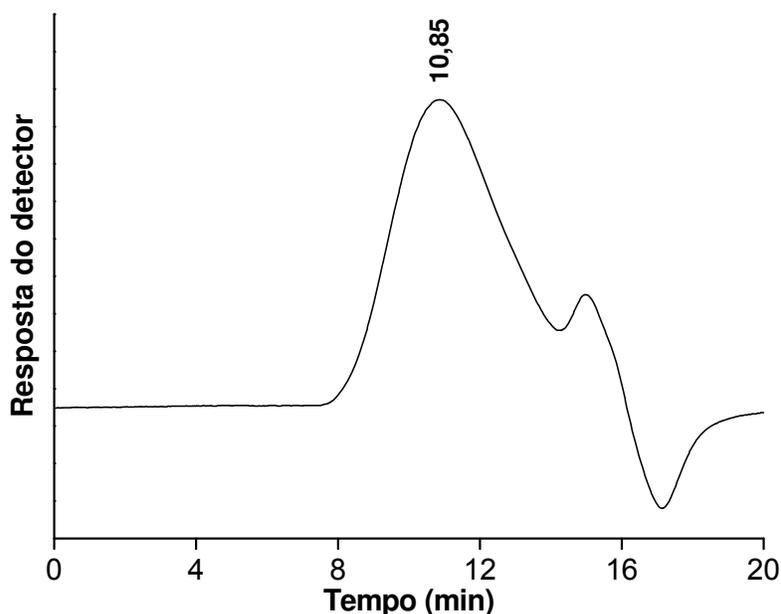


Figura 28. Cromatograma de permeação em gel do poli(metiltetradecilsiloxano). Condições cromatográficas: coluna Ultrastyrigel 7,8 × 30 mm; fase móvel: tetraidrofurano; vazão: 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 200 µL; temperatura de 40 °C e detecção por índice de refração.

Tabela 14. Características físicas do PMTDS obtidas por cromatografia por permeação em gel.

Polímero	M _n (Daltons)	M _w (Daltons)	IP
PMTDS	7.957	27.633	3,47
PMOS ¹³⁵	6.168	15.543	2,52

M_n: massa molar numérica média. M_w: massa molar ponderal média. IP: índice de polidispersividade.

4.6. Determinação das condições cromatográficas de análises para avaliação das fases estacionárias

A vazão ótima de fase móvel e a sua composição ideal para análise das fases de Si-Zr(PMTDS) e de Si-Ti(PMTDS) foram determinadas como etapas iniciais dos estudos do desempenho cromatográfico das fases estacionárias. A percentagem do componente orgânico na fase móvel ideal para a avaliação das fases estacionárias foi determinada pela avaliação da mistura-teste I (uracila, benzonitrila, benzeno, tolueno e naftaleno). Fases móveis de metanol:água em composições de 60:40; 70:30 e 80:20 (v/v) foram empregadas com uma fase

estacionária de Si-Zr(PMTDS) termicamente imobilizada a 120 °C por 8 h (condições ótimas de trabalhos anteriores com PMOS⁵⁸). Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 29.

A fase móvel considerada como ideal para a avaliação das fases estacionárias foi a de composição metanol:água (70:30, v/v), pois nesta composição tem-se um tempo adequado de análise, de aproximadamente 10 minutos para a fase estacionária em questão, com boa separação de todos os compostos da mistura, obtendo um fator de retenção de 3,0 para o composto mais retido, o naftaleno. O mesmo não ocorreu para as fases móveis com composição de 60:40 e 80:20 (v/v) que apresentaram fatores de retenção superiores a 16 e inferiores a 1,5 para o naftaleno, respectivamente, ficando fora da faixa considerada como adequada, entre 2 e 10^{11,12}. Esta composição de fase móvel foi adotada também para as fases estacionárias de PMTDS imobilizadas sobre partículas de sílica titanizada, pois fases estacionárias com o mesmo polímero imobilizado sobre suportes de sílicas titanizada ou zirconizada apresentam características de retenção similares, principalmente, para compostos apolares^{58,62}.

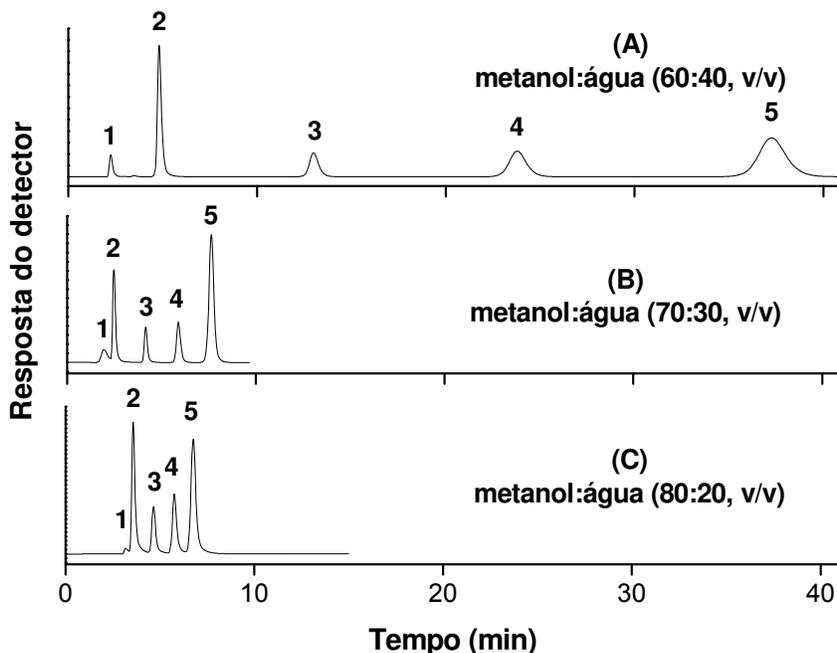


Figura 29. Cromatogramas da separação da mistura-teste I por uma fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente a 120 °C por 12 h, empregando diferentes condições de fase móvel. Condições cromatográficas: vazão de fase móvel: 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos analisados: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

A vazão ótima da fase móvel metanol:água 70:30 (v/v) foi definida com base na curva de van Deemter, que relaciona a altura de um prato (H) à velocidade linear da fase móvel (μ). A vazão ótima determina a velocidade linear da fase móvel que proporciona a máxima eficiência de coluna (menor valor da altura de um prato, H), localizada no ponto mínimo da curva. Os termos H e μ foram obtidos a partir do valor de eficiência para o pico do naftaleno, do comprimento da coluna (L) e do tempo de retenção da uracila, Equações 4, 5 e 6. A Figura 30 mostra a curva de van Deemter para a fase de sílica zirconizada com PMTDS imobilizado termicamente a 120 °C por 8 h.

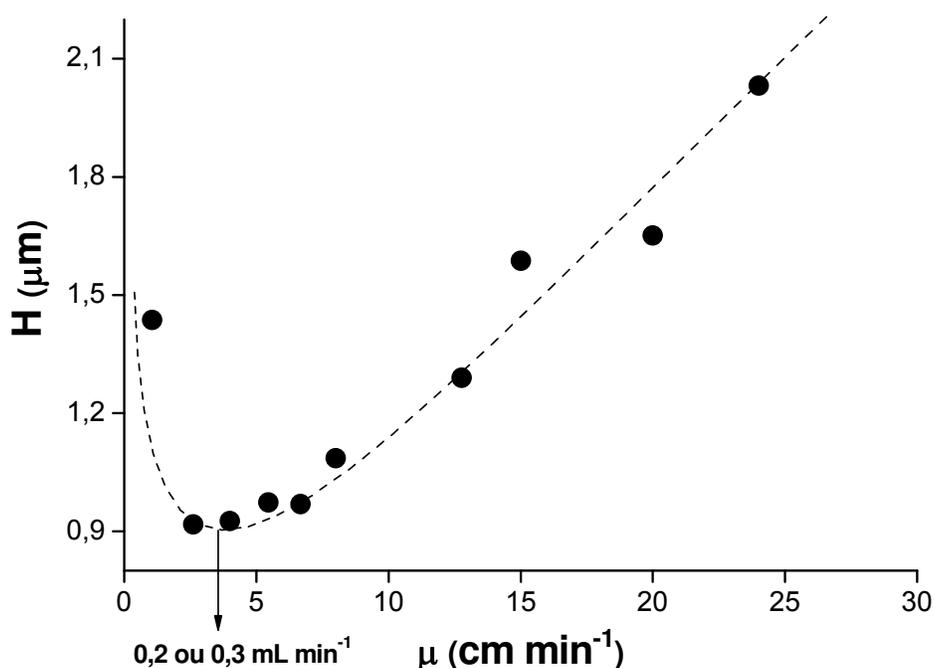


Figura 30. Curva de van Deemter para uma fase de Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente.

O ponto mínimo da curva, correspondente à máxima eficiência de coluna, apresenta altura de um prato (H) equivalente a 0,9 μm (ou eficiência de coluna de 67.000 pratos m^{-1}) para o composto mais retido pela fase estacionária Si-Zr(PMTDS) avaliada. Esta máxima eficiência da fase estacionária foi obtida em vazão de fase móvel na faixa de 0,2 a 0,3 mL min^{-1} (velocidade linear de aproximadamente 3 cm min^{-1}). A vazão de 0,3 mL min^{-1} foi escolhida para o desenvolvimento do trabalho por resultar em um tempo de análise menor para a avaliação das fases estacionárias com PMTDS imobilizada sobre os suportes de sílicas zirconizada e titanizada.

4.7. Extração do PMTDS não-sorvido ou não-imobilizado do suporte

As fases estacionárias foram preparadas a partir de uma carga de polímero de 45 % (m/m). Esta carga é necessária para que o PMTDS possa recobrir toda a superfície e preencher completamente todos os poros dos suportes de sílica zirconizada e de sílica titanizada, restando um excesso de polímero para que perdas durante o processo de preparo das fases estacionárias não possam impedir o recobrimento polimérico completo do suporte. Porém, após a sorção e/ou imobilização do polímero apenas uma determinada quantidade ficará realmente sorvida ou imobilizada no suporte. Faz-se necessária uma etapa para extração do polímero não-sorvido ou não-imobilizado no suporte, pois este poderá ser lixiviado para o sistema cromatográfico com a passagem contínua de fase móvel. Esta perda de polímero com a passagem da fase móvel resultará em alteração contínua dos parâmetros de retenção. Três processos de extração previamente otimizados no laboratório foram avaliadas para a extração do PMTDS não-sorvido ou não-imobilizado nos suportes cromatográficos. Para tal, diferentes porções das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente a 120 °C por 8 h foram submetidas aos seguintes procedimentos de extração:

- Extração por 2 h com metanol a 1,0 mL min⁻¹, seguido de extração por 2 h com clorofórmio a 1,0 mL min⁻¹, empregando temperatura de 25 °C.
- Extração por 4 h com hexano a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹ e temperatura de 50 °C.
- Extração com 120 mL de hexano empregando a bomba de enchimento a uma pressão de 34,5 MPa.

As fases foram avaliadas quanto ao desempenho cromatográfico e a percentagem de PMTDS antes e após as respectivas etapas de extração. Os resultados de percentagem de PMTDS, calculados pela Equação 7, estão apresentados na Tabela 15. Os cromatogramas das fases Si-Zr(PMTDS) obtidos após as etapas de extração estão ilustrados na Figura 31.

Tabela 15. Percentagens de PMTDS, antes e após a extração do polímero não imobilizado na sílica zirconizada, obtidas pelos diferentes procedimentos empregados.

Procedimentos de Extração	% PMTDS antes	% PMTDS depois
Clorofórmio/metanol	38,1 ± 1,2	20,3 ± 0,6
Hexano a 50 °C	40,4 ± 1,7	19,1 ± 1,1
Hexano a alta pressão	40,6 ± 1,6	20,6 ± 0,3

Todos os três procedimentos de extração se mostraram satisfatórios na remoção do PMTDS não imobilizado do suporte de sílica zirconizada, uma vez que houve boa repetibilidade do comportamento cromatográfico entre as injeções e alta estabilidade dos tempos de retenção dos compostos da mistura-teste avaliada nas fases estacionárias após as etapas de extração.

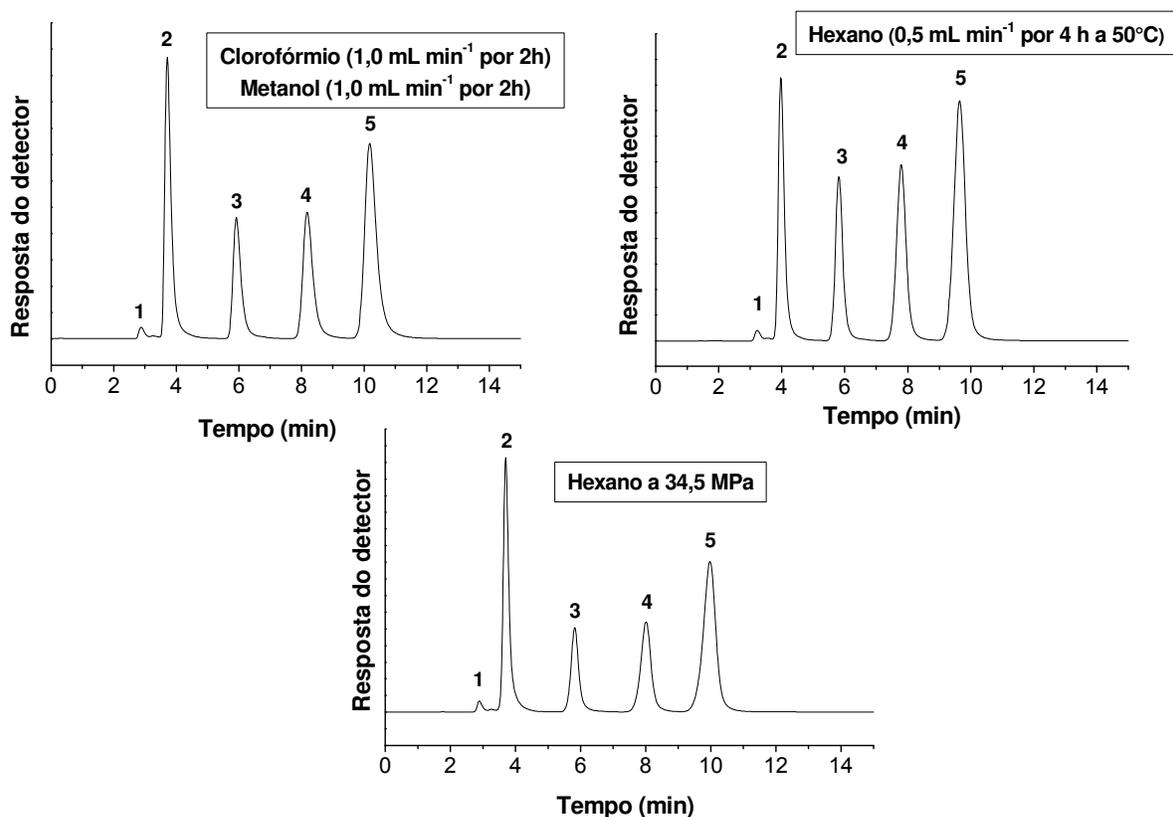


Figura 31. Cromatogramas da separação da mistura-teste I pelas fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente e submetidas aos diferentes procedimentos de extração. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água 70:30 (v/v), vazão de 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

Os resultados da Figura 31 e da Tabela 15 mostram que os três procedimentos apresentaram resultados cromatográficos e percentagens de PMTDS extraídas bastante similares para as fases. Como os volumes de solventes extratores empregados nos três procedimentos também foram idênticos, o critério de escolha para a determinação das condições ótimas de extração do PMTDS não-sorvido ou não-imobilizado no suporte de sílica zirconizada foi a simplicidade de execução do procedimento. Desta forma, a extração com hexano a $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ empregando temperatura de $50 \text{ }^\circ\text{C}$ foi o procedimento selecionado.

4.8. Avaliação cromatográfica dos procedimentos de imobilização do PMTDS sobre suportes de sílica metalizada

4.8.1. Estudo da sorção do PMTDS sobre sílica zirconizada

Trabalhos anteriores^{116,128,137,184} desenvolvidos no LabCrom mostraram que a sorção de PMOS sobre suportes de sílica nua, sem qualquer etapa posterior de imobilização, pode resultar em fases estacionárias com propriedades cromatográficas bastante similares àquelas obtidas por polímeros fisicamente imobilizados sobre o suporte. Porém, faz-se necessário um determinado período de tempo para que uma quantidade mínima do polímero, uma monocamada, fique sorvida mais fortemente ao suporte cromatográfico. Este processo foi denominado de auto-imobilização^{118,137}.

Nesta etapa do trabalho, foi avaliado o fenômeno da auto-imobilização do PMTDS sobre a superfície e nos poros de partículas de sílica zirconizada e de sílica titanizada. Para tal, um lote maior de PMTDS sorvido em partículas de sílica Kromasil metalizada ($5 \mu\text{m}$) com carga de polímero de 45 % (m/m) foi preparado e periodicamente avaliado, de 15 em 15 dias, quanto ao desempenho cromatográfico por um período de 100 dias. Todas as fases foram submetidas à etapa de extração com hexano a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ após os períodos previamente determinados de sorção, para avaliar a quantidade efetiva de PMTDS que ficou sorvida (ou auto-imobilizada) aos suportes de sílicas metalizadas. As fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foram avaliadas a partir do sexto dia do início do experimento, pois este foi o tempo necessário para que o hexano, solvente empregado no preparo das fases estacionárias, fosse completamente evaporado à temperatura ambiente.

O desempenho cromatográfico das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizadas e o grau de recobrimento foram avaliados pelas mistura-testes I e II e por análise elemental, respectivamente. Os cromatogramas da separação da mistura-teste I pelas fases Si-Zr(PMTDS) estão apresentados na Figura 32.

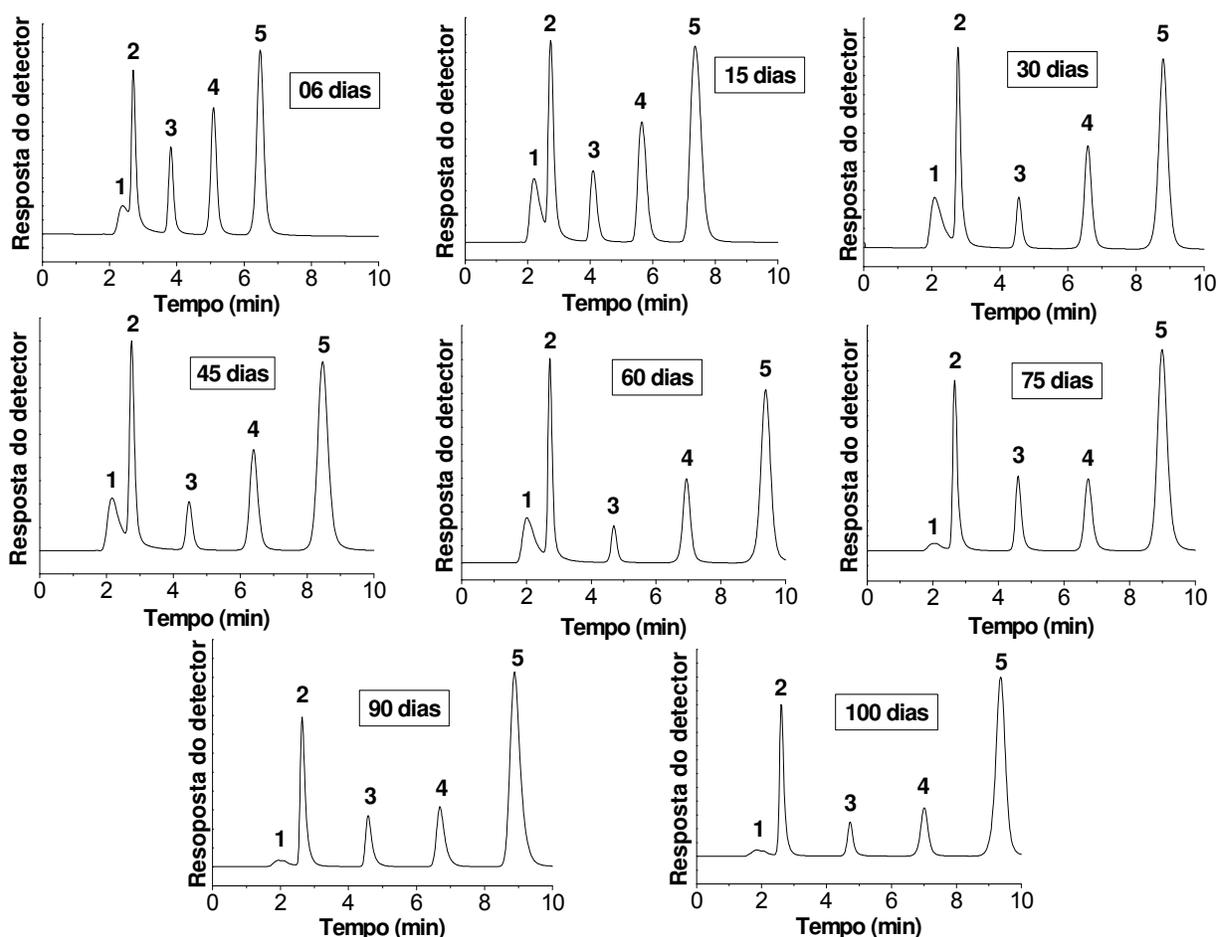


Figura 32. Cromatogramas da separação da mistura-teste I pelas fases Si-Zr(PMTDS) auto-imobilizadas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra injetada: $5 \mu\text{L}$; detecção a 254 nm e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

De acordo com os cromatogramas da Figura 32, já a partir da primeira avaliação, sexto dia de estudo, a fase estacionária Si-Zr(PMTDS) resultou em uma boa separação, apresentando boa eficiência para o naftaleno, composto mais retido da mistura, como mostrado na Tabela 16. A quantidade de PMTDS sorvida no suporte de sílica zirconizada nos primeiros seis dias de experimento foi exatamente a mesma da quantidade de PMOS, em termos de percentagem de carbono, sorvida no suporte de sílica Kromasil pura (sílica de alto grau de

pureza) nos experimentos de Bottoli et al.¹¹⁸ após 51 dias do seu preparo. Com base em seus estudos¹³⁷, os autores propuseram que a presença de traços de impurezas metálicas no suporte de sílica aumenta indiretamente a atividade dos sítios ativos (grupos silanóis) da sílica, acelerando o rearranjo e, por conseguinte, a imobilização do PMOS na sua superfície e poros. Esta conclusão foi baseada em estudos no quais os autores mostraram que sílicas Rainin e Davisil, com maior teor de impurezas metálicas que a Kromasil, promovem a formação mais rápida de uma monocamada polimérica. A camada de PMOS de aproximadamente 1 nm de espessura foi obtida após 5 e 40 dias de auto-imobilização sobre as sílicas Rainin e Davisil, respectivamente, comparadas à obtida na sílica Kromasil, que necessitou de 100 dias para que houvesse a formação da camada polimérica de mesma espessura. Portanto, a presença de zircônio, aproximadamente 21 % (m/m), na superfície da sílica Kromasil, neste estudo, pode ter sido o fator primordial para a rápida auto-imobilização do PMTDS no suporte cromatográfico, resultando no bom desempenho da fase logo no início do experimento. Porém, este não deve ser considerado o único fator para a imobilização mais rápida do PMTDS na sílica zirconizada, uma vez que a imobilização de polímeros em sólidos é um processo complexo influenciado por contribuições dos mais diversos tipos¹⁸⁵.

Tabela 16. Resultados cromatográficos das fases Si-Zr(PMTDS) auto-imobilizadas.

Experimentos (dias)	Parâmetros Cromatográficos					% PMTDS	τ (nm)
	N/L ^a	As ^a	As ^b	k ^{a,c}	Rs ^d		
6	74.100	1,1	2,2	1,7	3,9	12,7	0,51
15	82.100	1,1	1,9	2,3	4,2	14,4	0,60
30	81.500	1,0	2,9	3,2	5,0	15,7	0,67
45	54.400	1,2	2,7	2,9	3,9	15,9	0,68
60	73.900	1,1	3,4	3,7	4,9	17,6	0,78
75	66.400	1,2	3,8	3,3	4,5	19,7	0,93
90	67.700	1,6	4,1	3,6	4,4	20,3	0,96
100	77.400	1,0	4,7	3,9	4,8	20,6	0,98

^a Calculado para o pico do naftaleno; ^b Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^c t_M medido a partir do tempo de retenção da uracila; ^d Calculado para o par tolueno-naftaleno.

A quantidade de polímero sorvida no suporte aumenta com o aumento do tempo de repouso e, provavelmente, a auto-imobilização se dará por completa quando todo o polímero adicionado inicialmente for fortemente sorvido ao suporte, conforme pode ser observado na Tabela 16. Porém, é importante que o processo de auto-imobilização do PMTDS seja interrompido, pois, a partir de um determinado momento, a quantidade de polímero auto-imobilizada no suporte pode resultar em uma fase estacionária de camada polimérica muito espessa que, por sua vez, tornará lento o processo de transferência de massas do soluto entre as fases estacionárias e móvel¹¹⁸.

As fases Si-Zr(PMTDS) apresentam um máximo de eficiência de coluna no início do estudo (entre 15 e 30 dias), devido a formação de uma camada mais fina de PMTDS na superfície da sílica zirconizada. Com este período de imobilização, as fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) auto-imobilizadas resultaram em eficiências de colunas superiores a 80.000 pratos m^{-1} . O desempenho cromatográfico das fases não apresentou comportamento uniforme ao longo do estudo, a eficiência de coluna alterna entre valores mais altos e mais baixos neste período. Provavelmente, ocorre a formação de pontos (ou “plugs”) mais espessos no filme polimérico auto-imobilizado, seguido da redistribuição e reorganização destes pontos, retomando uma configuração de filme com espessura uniforme ao longo da superfície e nos poros da sílica zirconizada²⁹.

A metodologia para o cálculo da espessura de camada de PMTDS é um procedimento empírico, pois dificilmente ocorre uma distribuição homogênea do polímero na superfície e nos poros do suporte. Desta forma, alguns grupos silanóis ficarão expostos e a interação destes com solutos polares, principalmente básicos, será até mais intensa que os silanóis residuais de suportes de sílica nua devido à presença de um átomo de metal adjacente a um grupo silanol residual, não recoberto com o polímero, aumentando a atividade (acidez) deste silanol livre¹⁰³. Além disso, os grupos zirconóis (Zr-OH) residuais apresentam características de ácidos de Lewis e também reterão fortemente compostos básicos. Esta interação mais forte com compostos polares, principalmente com aqueles de caráter básico, foi observada pela avaliação da separação da mistura-teste II, que contém um composto ácido (fenol) e um composto básico (N,N-dimetilanilina) e compostos neutros (naftaleno e acenafteno). Os cromatogramas da separação desta mistura-teste obtidas pelas fases Si-Zr(PMTDS) auto-imobilizadas estão ilustrados na Figura 33.

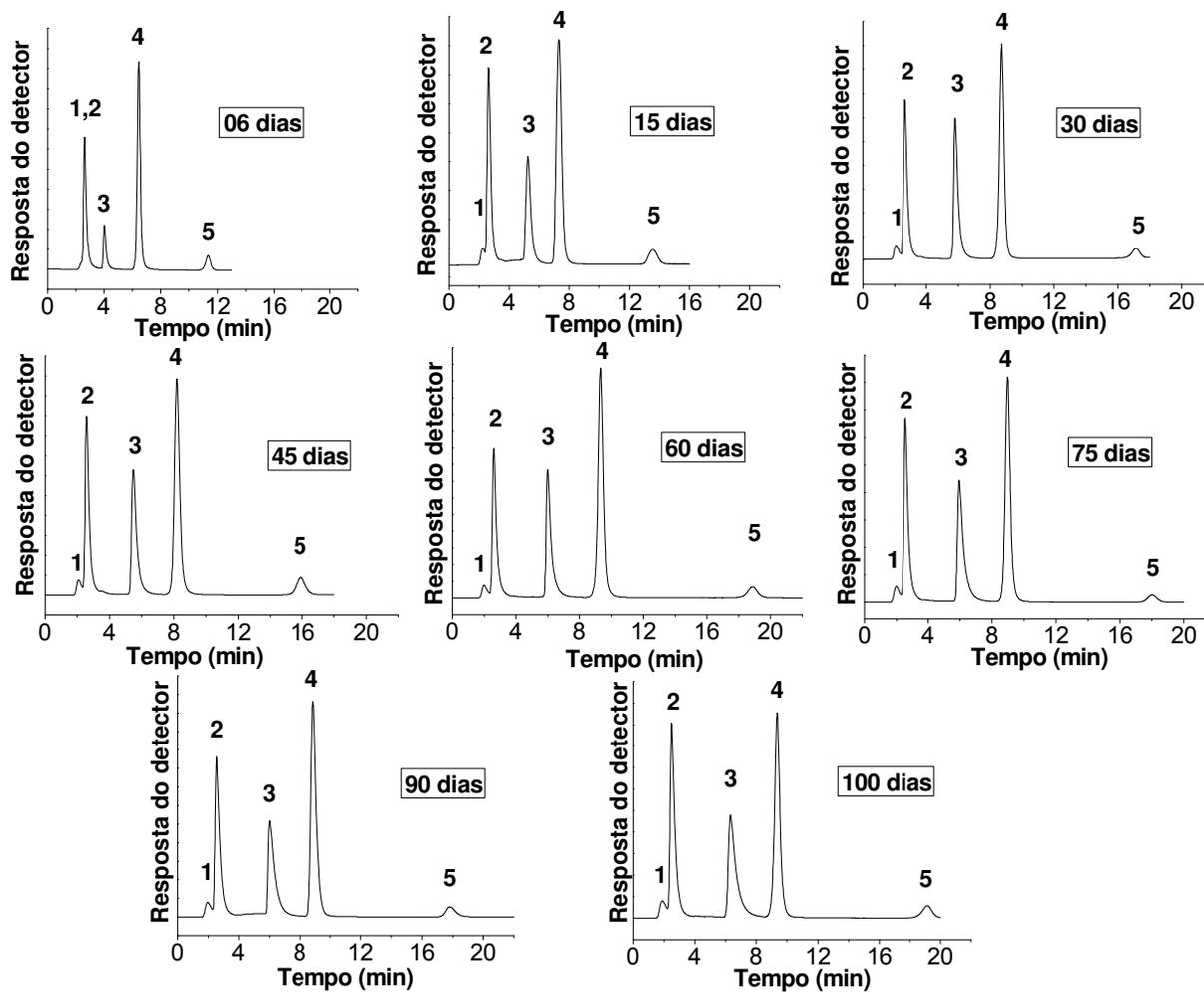


Figura 33. Cromatogramas da separação da mistura-teste II pelas fases Si-Zr(PMTDS) auto-imobilizadas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

Observa-se pela Figura 33 e pela Tabela 16 que o pico da N,N-dimetilanilina foi eluído com um fator de assimetria bastante elevado nas fases auto-imobilizadas, independente do tempo de sorção, devido à interação mais forte de substâncias básicas com o suporte de sílica zirconizada. Este comportamento também foi observado em outros trabalhos do grupo empregando PMOS imobilizado em suportes de sílica metalizada com óxido de zircônio^{61,62}. Interessantemente, o fator de assimetria para o pico da N,N-dimetilanilina aumenta com o aumento da percentagem de polímero sorvida no suporte.

4.8.2. Estudo da sorção do PMTDS sobre sílica titanizada

Para as fases estacionárias com PMTDS auto-imobilizado sobre partículas de sílica titanizada, o processo de sorção do polímero foi muito mais lento se comparado ao obtido sobre sílica zirconizada. Somente após o 75º dia de experimento foi possível obter uma perfeita separação dos componentes da mistura-teste I, conforme pode ser observado na Figura 34. Este fato pode estar relacionado à maior reatividade do zircônio se comparada à do titânio, de acordo com a escala de reatividade da tabela periódica, tornando a superfície o suporte cromatográfico mais susceptível (mais reativa) à adsorção do PMTDS.

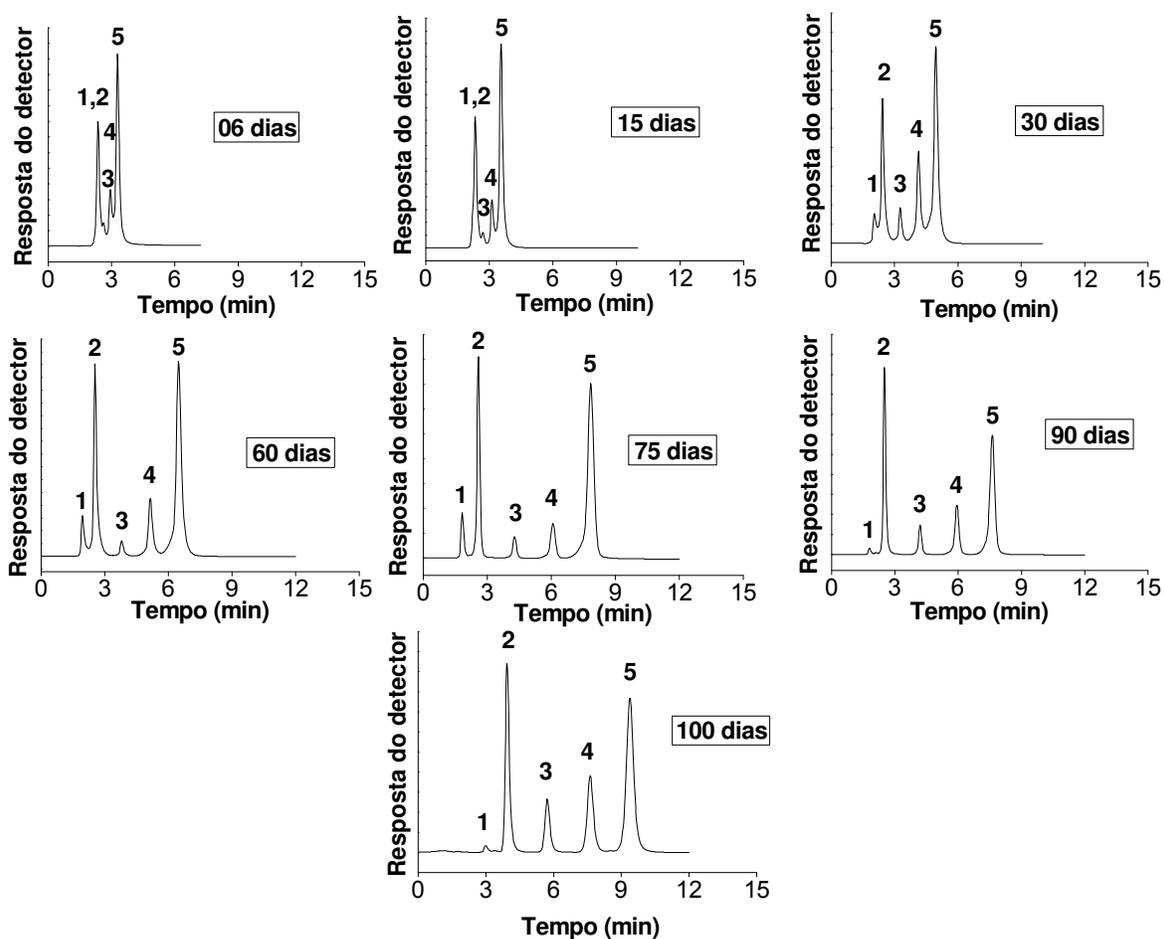


Figura 34. Cromatogramas da separação da mistura-teste I pelas fases Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizadas. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra injetada: $5 \mu\text{L}$; detecção a 254 nm e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno. A diferença nas intensidades dos picos de um mesmo composto nos cromatogramas se deve ao preparo de diferentes misturas-teste ao longo deste estudo.

A separação ineficiente dos compostos da mistura-teste I é devido à quantidade reduzida de polímero sorvida na sílica titanizada no início do estudo (Tabela 17). À medida que maiores quantidades de PMTDS são fixadas (ou auto-imobilizadas) nas partículas de sílica titanizada melhores resolução e separação dos picos são obtidas. Após 75 dias de estudo, o grau de separação cromatográfica das fases Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizadas se assemelharam ao obtido pelas contrapartes baseadas em suportes de sílica zirconizada.

O desempenho cromatográfico das fases Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizadas aumentaram proporcionalmente ao aumento da quantidade de polímero auto-imobilizada no suporte cromatográfico, conforme pode ser observado na Tabela 17. O desempenho máximo, em termos de eficiência de coluna, ocorreu nas fases Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizadas por um período de 90 e 100 dias, nas quais eficiências de colunas acima de 80.000 pratos m^{-1} para o naftaleno foram obtidas com parâmetros de retenção adequados para compostos apolares. A quantidade de PMTDS auto-imobilizada aumentou com o aumento do tempo de sorção da fase estacionária, resultando em espessuras de camadas poliméricas sobre a sílica titanizada de aproximadamente 1 nm ao final do experimento.

Tabela 17. Resultados cromatográficos das fases Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizadas

Experimentos (dias)	Parâmetros Cromatográficos					% PMTDS	τ (nm)
	N/L ^a	As ^a	As ^b	k ^{a,c}	Rs ^d		
6	41.200	-	-	1,3	0,1	4,9	0,19
15	42.900	-	-	1,6	0,3	6,2	0,25
30	55.300	0,8	-	2,6	1,0	12,4	0,56
60	58.300	1,1	1,8	3,4	1,6	13,7	0,62
75	56.400	0,8	1,7	3,7	2,0	15,6	0,73
90	81.500	0,9	1,7	4,3	2,0	17,2	0,83
100	84.400	0,9	1,2	4,6	2,2	18,3	0,90

^a Calculado para o pico do naftaleno; ^b Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^c t_M medido a partir do tempo de retenção da uracila; ^d Calculado para o par tolueno-naftaleno.

Diferentemente das fases Si-Zr(PMTDS), as fases Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizadas apresentaram fator de assimetria para compostos básicos, representado pela N,N-dimetilanilina na mistura-teste II, similares aos obtidos por fases estacionárias com polissiloxanos

imobilizados sobre suportes de sílica nua^{133,137,183,184} (Tabela 17). Este fato pode estar associado à menor reatividade da superfície do suporte de sílica titanizada e também a presença de uma quantidade menor do titânio no suporte, < 8 %, comparado aos quase 21 % de zircônio incorporado na sílica. Além disso, a quantidade de PMTDS auto-imobilizada também é um fator que contribuiu significativamente para a redução do fator de assimetria para a N,N-dimetilanilina. No início do estudo, com a menor quantidade de PMTDS, o pico da N,N-dimetilanilina foi eluído posteriormente ao do naftaleno (06 dias de auto-imobilização), e em outras situações os dois componentes co-eluíram (15 e 30 dias de auto-imobilização), como mostrado na Figura 35. Com o aumento contínuo da quantidade de PMTDS auto-imobilizado na sílica titanizada, o composto básico retomou a sua ordem de eluição, apresentando caudas cromatográficas cada vez menores, como pode ser observado na Tabela 17 e Figura 35.

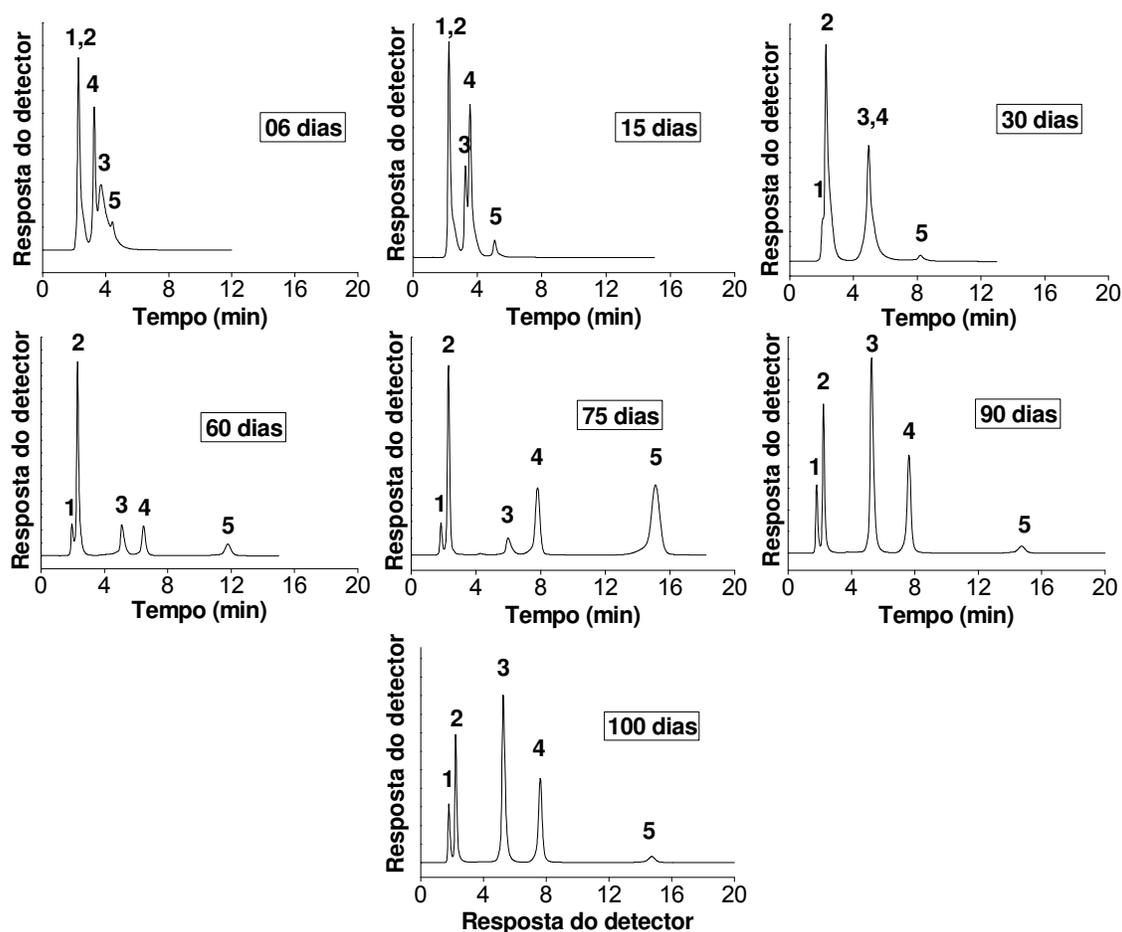


Figura 35. Cromatogramas da separação da mistura-teste II pelas fases Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizadas.

Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteño. A diferença nas intensidades dos picos de um mesmo composto nos cromatogramas se deve ao preparo de diferentes misturas-teste ao longo deste estudo.

A mudança da ordem de eluição entre a N,N-dimetilanilina e o naftaleno já havia sido relatada em outro trabalho desenvolvido por Fonseca¹⁴⁴, empregando fases estacionárias com PMOS imobilizado termicamente sobre partículas de sílica titanizada.

4.8.3. Avaliação da imobilização térmica do PMTDS sobre sílica zirconizada

Todas as fases estacionárias foram preparadas a partir de uma carga de PMTDS de 45 % (m/m). O material, após seis dias de sorção à temperatura ambiente, foi submetido a uma etapa de imobilização via tratamento térmico, empregando um planejamento composto central (planejamento fatorial 2^2 + triplicata no ponto central + planejamento estrela). O tempo e a temperatura de imobilização foram as variáveis estudadas neste trabalho. O domínio experimental (intervalos de tempo e de temperatura estudados) foi definido de acordo com trabalhos anteriores do grupo, empregando o método univariado para a imobilização térmica de outros polissiloxanos na superfície da sílica^{133,137,183,184}. As fases Si-Zr(PMTDS) foram submetidas à etapa de imobilização térmica de acordo com a matriz de planejamento apresentada na Tabela 3. Após a etapa de imobilização, todas as fases foram submetidas ao procedimento de extração para a remoção do PMTDS não imobilizado sobre as sílicas metalizadas. As espessuras das camadas (τ) de PMTDS imobilizada termicamente, sob diferentes condições, nas partículas de sílicas metalizadas e os resultados cromatográficos das fases de Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente estão apresentadas na Tabela 18.

O desempenho cromatográfico das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente foi muito bom, com uma variação de eficiências de colunas de 74.000 a 84.000 pratos m^{-1} , e ótimo fator de assimetria para compostos apolares (Tabela 18), medido para o naftaleno, dentro dos limites aceitáveis, entre 0,8 e 2,0¹⁸⁶. A única exceção foi observada no experimento 9, no qual o fator de assimetria para o naftaleno foi de 2,7. Este maior fator de assimetria provavelmente está relacionado ao início da degradação de alguns oligômeros presentes no PMTDS, uma vez que a temperatura de imobilização empregada (128 °C) foi próxima deste acontecimento, conforme indicado por análises termogravimétricas. Apesar do início da degradação do polímero, nesta condição obteve-se a maior quantidade de PMTDS imobilizada sobre o suporte, apresentando uma camada polimérica de 1 nm de espessura.

Tabela 18. Parâmetros cromatográficos das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente de acordo com o planejamento composto central para duas variáveis.

Experimentos	Parâmetros cromatográficos					% PMTDS	τ (nm)
	N/L ^a	As ^a	As ^b	k ^{a,c}	Rs ^d		
1 - 80 °C / 8 h	83.800	0,9	2,5	3,0	4,8	13,3	0,54
2 - 120 °C / 8 h	79.900	1,9	3,1	4,4	5,1	19,7	0,93
3 - 80 °C / 16 h	74.400	0,9	2,6	2,5	4,2	15,1	0,64
4 - 120 °C / 16 h	76.800	1,2	5,1	4,3	5,1	19,7	0,93
5 - 100 °C / 12 h	78.800	1,1	3,3	3,3	4,9	17,9	0,80
6 - 100 °C / 12 h	82.100	1,1	4,1	3,5	4,9	15,4	0,66
7 - 100 °C / 12 h	81.000	1,0	4,5	3,0	4,8	17,1	0,75
8 - 72 °C / 12 h	83.100	1,2	4,5	3,1	4,7	16,0	0,69
9 - 128 °C / 12 h	75.800	2,7	5,4	4,3	4,8	21,0	1,00
10 - 100 °C / 6,4 h	82.800	1,2	4,1	3,0	4,7	17,6	0,78
11 - 100 °C / 17,6 h	79.700	1,3	4,4	3,6	4,7	19,3	0,90

^a Calculado para o pico do naftaleno; ^b Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^c t_M medido a partir do tempo de retenção da uracila; ^d Calculado para o par tolueno-naftaleno.

Estatisticamente, a quantidade de PMTDS imobilizada no suporte de sílica zirconizada aumenta mais acentuadamente com o aumento da temperatura do que com o aumento do tempo de imobilização dentro do período avaliado, de acordo com o gráfico de Pareto (Figura 36).

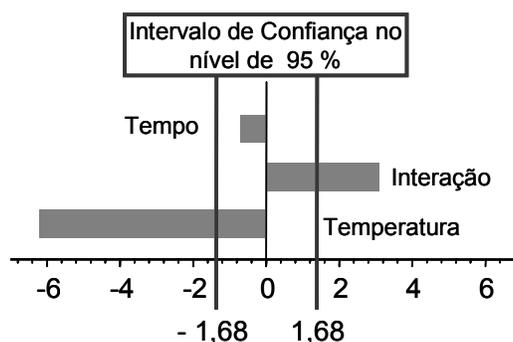


Figura 36. Efeitos das variáveis estudadas, e da respectiva interação, na eficiência de coluna das fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente.

Os parâmetros cromatográficos da Tabela 18 foram medidos a partir dos cromatogramas, referente aos experimentos do planejamento composto central, das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente, os quais estão dispostos na Figura 37. Nestes cromatogramas pode ser observado que a fase estacionária obtida pelo experimento 9 (128 °C / 12 h) apresentou caudas para os picos de todos os compostos. As demais fases estacionárias apresentaram excelente desempenho cromatográfico, com eluições relativamente rápidas para os compostos, inferior a 12 minutos.

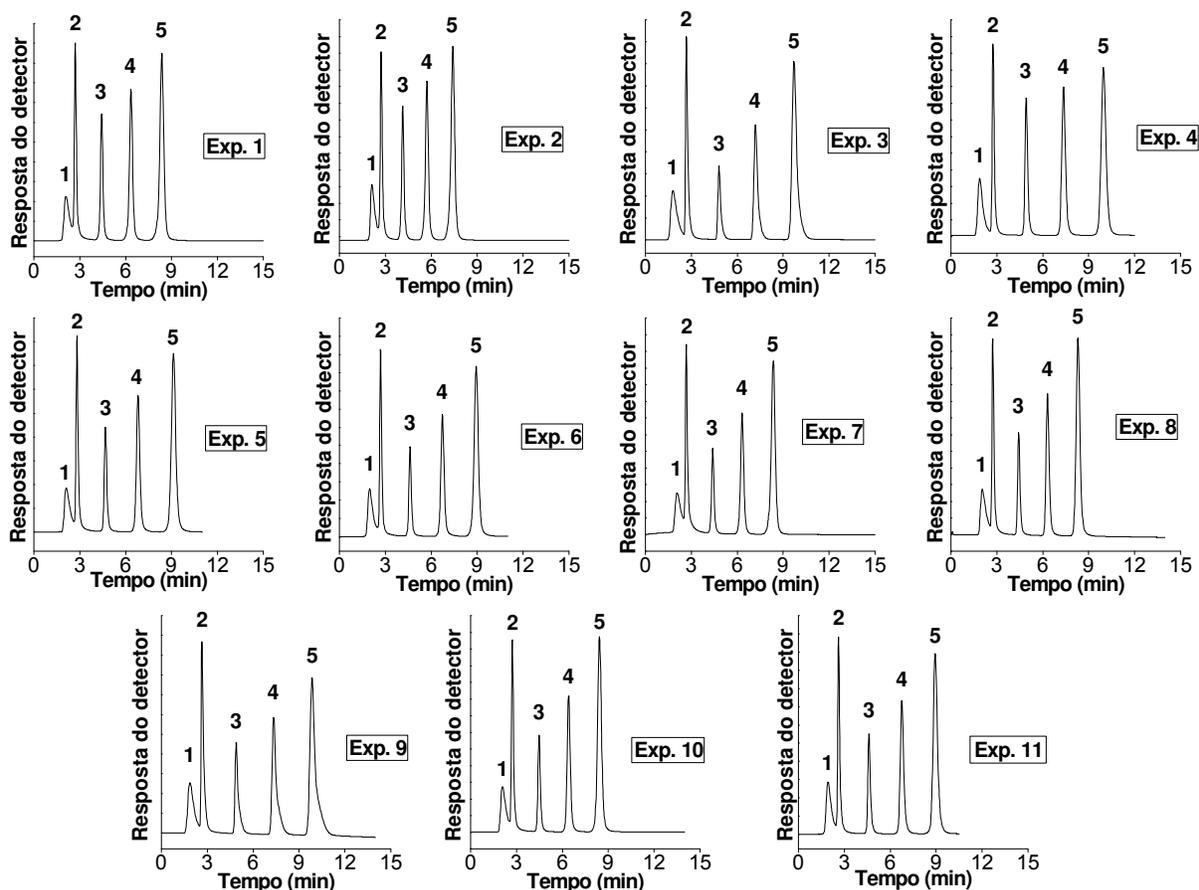


Figura 37. Cromatogramas da separação da mistura-teste I empregando as fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

A repetibilidade do preparo das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente foi verificada pela realização de três experimentos no ponto central do planejamento delineado, empregando as mesmas condições (exp. 5, 6 e 7). A estimativa do desvio padrão relativo (RSD)

medida para estes experimentos foi inferior a 2 %, em termos de eficiência de coluna para o pico do naftaleno, e de aproximadamente 6 %, em termos de percentagem de PMTDS sobre a sílica zirconizada (grau de recobrimento polimérico). Este resultado é bastante satisfatório levando-se em consideração que este grau de repetibilidade é, pelo menos, similar aos obtidos para as fases estacionárias disponíveis comercialmente. Por outro lado, uma característica peculiar das fases estacionárias baseadas no suporte de sílica zirconizada é o alto fator de assimetria para compostos polares, principalmente, básicos. A separação da mistura-teste II empregando as fases imobilizadas termicamente está apresentada na Figura 38. A presença do óxido de zircônio na superfície da sílica acentua a acidez dos grupos silanóis residuais (não recobertos pelo PMTDS), além de atuar como ácido de Lewis²⁹. Desta forma, estas duas formas indesejáveis de interação atuam simultaneamente retendo fortemente compostos básicos, como pode ser comprovado pelo alto fator de assimetria obtido para o pico da N,N-dimetilanilina na Tabela 18 e, também, visualmente pelos cromatogramas da Figura 38. Estas caudas acentuadas para a N,N-dimetilanilina são indícios de que o recobrimento polimérico não é uniformemente homogêneo em nenhuma das fases imobilizadas termicamente. Este fato reforça a idéia da formação de uma camada polimérica retalhada na superfície e nos poros do suporte cromatográfico, na forma de “plugs” (ou gotas)¹¹⁷, deixando partes da superfície do suporte de sílica zirconizada expostas às interações indesejáveis com componentes da amostra. Além disso, compostos ácidos eluem mais rapidamente devido à maior acidez da fase estacionária, quase simultaneamente ao composto não retido (uracila), como pode ser observado em todos os cromatogramas da separação da mistura-teste II. De acordo com a Figura 38, para temperaturas de imobilização mais elevadas (exp. 2, 4 e 9), maiores que 100 °C, a cauda do pico da N,N-dimetilanilina aumenta consideravelmente se comparada às fases imobilizadas a temperaturas inferiores a 100 °C (exp. 1, 3 e 8). Possivelmente, grupos silanóis residuais provenientes do próprio PMTDS foram gerados com o aquecimento do material, uma vez que o PMTDS apresenta várias ligações Si-O-Si-C em sua estrutura, das quais algumas podem ter sido quebradas durante a imobilização térmica⁹.

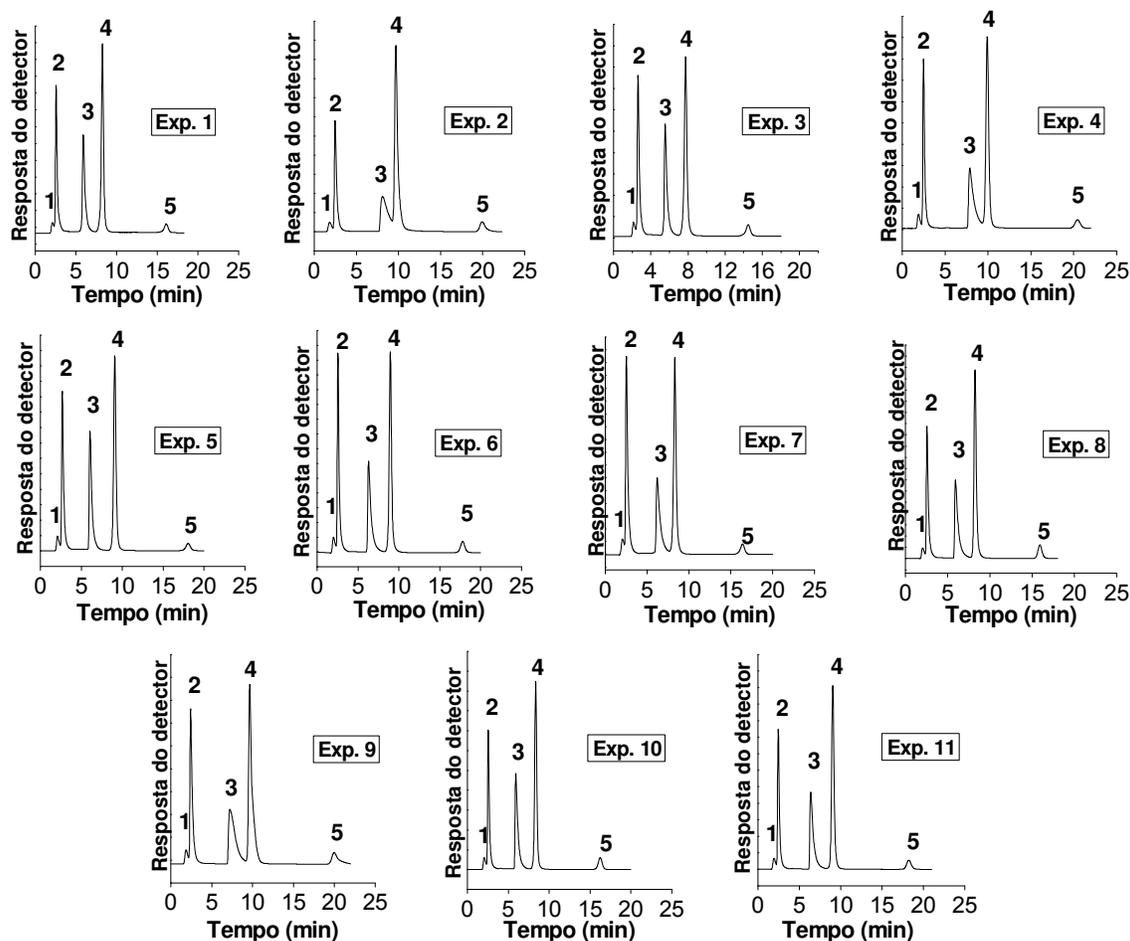


Figura 38. Cromatogramas da separação dos compostos da mistura-teste II pelas fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra injetada: $5 \mu\text{L}$; detecção a 254 nm e temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno.

A partir dos resultados de eficiência de coluna e fator de assimetria para o pico do naftaleno obtidos para as fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente, foram ajustados os respectivos modelos quadráticos para determinar uma condição ou uma região ótima de imobilização. Estes modelos foram ajustados às respectivas respostas, empregando um software de tratamento estatístico de dados, tal como o STATISTICA[®]. As equações que explicam as variações ocorridas na execução dos experimentos, no nível de 95 % de confiança, estão apresentadas abaixo:

$$N/m = 80,6 - 1,5x_1 - 2,1x_2 - 1,0x_1^2 - 0,1x_2^2 + 1,6x_1x_2 \quad \text{Equação 17}$$

$$As = 1,1 + 0,4x_1 - 0,1x_2 + 0,3x_1^2 - 0,2x_1x_2 \quad \text{Equação 18}$$

A validade das equações ajustadas para as eficiências de coluna e fatores de assimetria obtidas pelas fases Si-Zr(PMTDS) foram avaliadas pela análise da variância (ANOVA). Os dados da ANOVA para as eficiências de coluna estão dispostos na Tabela 19.

Tabela 19. Análise da variância do modelo quadrático ajustado às eficiências de coluna para o pico do naftaleno obtidas pelas fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente.

Fonte de Variação (FV)	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (v)	Média quadrática (MQ)
Regressão	69,09	5	13,82
Resíduos	28,69	5	5,74
Falta de ajuste	23,04	3	7,68
Erro puro	5,65	2	2,82
Total	97,78	10	
<i>% de variação explicada: 70,7</i>			
<i>% de variação explicável: 94,2</i>			

De acordo com a ANOVA, a regressão quadrática realizada para os dados de eficiências de coluna das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente não foi estatisticamente significativa, pois a razão entre a média quadrática da regressão e a média quadrática dos resíduos ($MQ_{reg}/MQ_{res} = 2,41$) foi menor que o valor do teste F tabelado ($F_{5,5,95\%} = 5,05$). Porém, o modelo quadrático não apresentou falta de ajuste pela ANOVA, pois a razão entre a média quadrática da falta de ajuste e o erro puro experimental ($MQ_{faj}/MQ_{ep} = 4,08$) foi menor que o $F_{3,2,95\%}$ tabelado = 19,16. Isto implica que o modelo quadrático ajustado aos dados de eficiência de coluna obtidos para as diferentes condições de imobilização térmica do PMTDS sobre o suporte de sílica zirconizada explica de forma satisfatória as variações ocorridas nos resultados. Conforme a Tabela 19, aproximadamente 71 % das variações ocorridas nas respostas é explicada pelo modelo da Equação 17.

A ANOVA dos resultados de fator de assimetria para o pico do naftaleno, obtidos pelas fases Si-Zr(PMTDS), está apresentada na Tabela 20.

Tabela 20. Análise da variância do modelo quadrático ajustado aos fatores de assimetria para o pico do naftaleno obtidos pelas fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente.

Fonte de Variação (FV)	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (v)	Média quadrática (MQ)
Regressão	2,36	5	0,47
Resíduos	0,47	5	0,09
Falta de ajuste	0,45	3	0,15
Erro puro	0,02	2	0,01
Total	2,83	10	
<i>% de variação explicada: 83,3</i>			
<i>% de variação explicável: 99,8</i>			

A regressão quadrática realizada para os dados de fator de assimetria das fases Si-Zr(PMTDS) foi estatisticamente significativa, de acordo com a ANOVA. A razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos foi de 5,22, este valor é ligeiramente superior ao obtido pelo teste $F_{5,5,95\%}$, 5,05 (valor tabelado)¹⁶⁴. Além disso, o modelo proposto (Equação 18) não apresentou falta de ajuste, uma vez que a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro experimental foi menor que o valor tabelado do teste $F_{3,2,95\%}$, 15,0 vs. 19,16, respectivamente. Portanto, os dois modelos ajustados para os parâmetros eficiências de coluna e fatores de assimetria das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente são válidos para explicar as variações ocorridas nas respectivas respostas.

Para a determinação de uma condição ótima de imobilização do PMTDS sobre as partículas de sílica zirconizada, os dois modelos ajustados respectivamente para as eficiências de coluna e fatores de assimetria foram representados graficamente por superfícies de respostas, conforme pode ser observado na Figura 39.

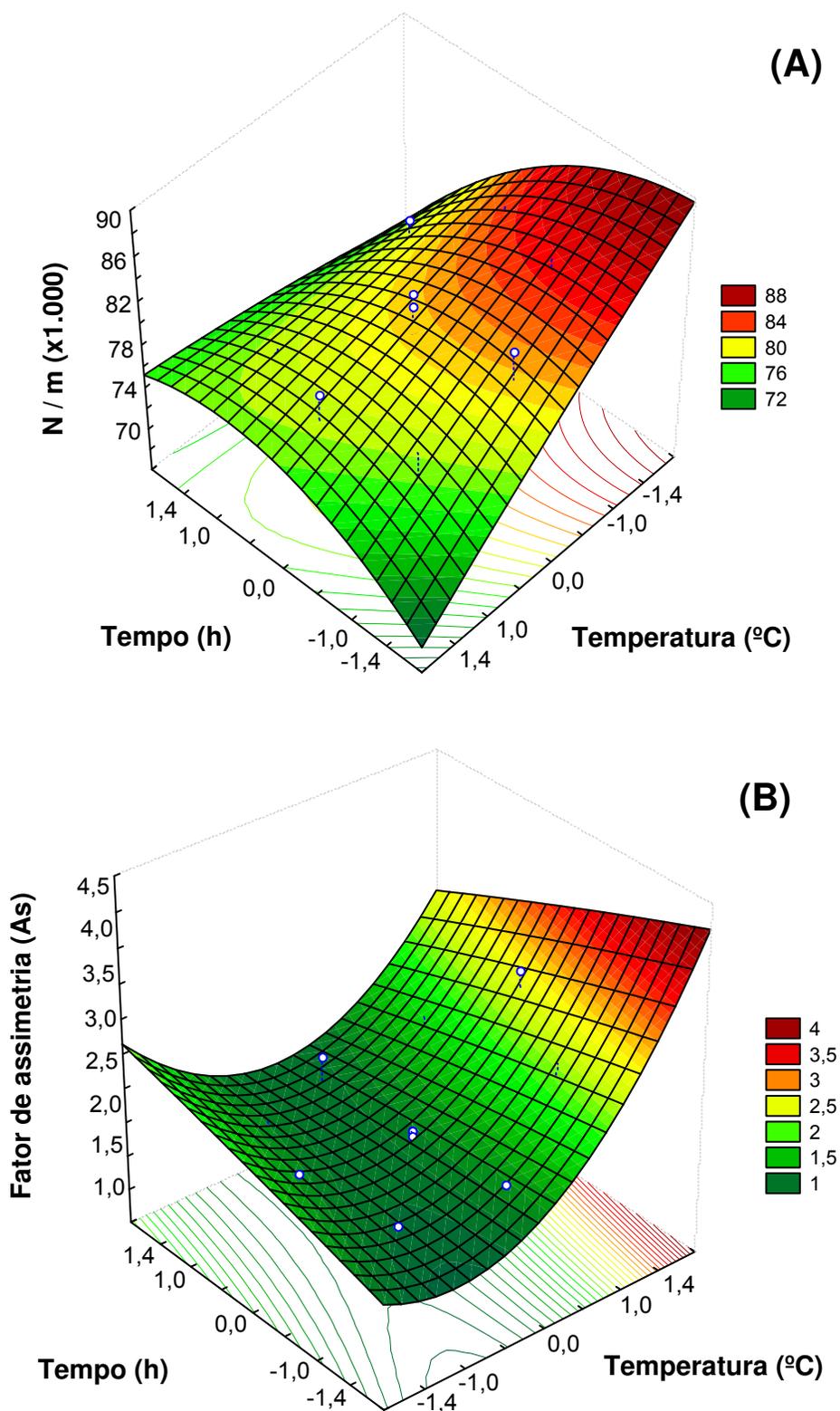


Figura 39. Superfícies de respostas da imobilização térmica de PMTDS sobre partículas de sílica zirconizada. (A) Eficiências de coluna e (B) fatores de assimetria, medidos para o pico do naftaleno.

A região vermelha do gráfico de eficiências de coluna indica as condições de imobilização onde se obtém fases Si-Zr(PMTDS) com melhor desempenho cromatográfico, superiores a 80.000 pratos m^{-1} . A região verde escura do gráfico de fatores de assimetria indica as condições de imobilização térmica que devem ser empregadas para se obter fases estacionárias com picos simétricos para compostos apolares. As condições ótimas de imobilização térmica das fases foram determinadas pela superposição das duas superfícies. A região ótima foi compreendida por eficiências de coluna superiores a 80.000 pratos m^{-1} e fatores de assimetria entre 0,9 e 1,1 para o pico do naftaleno. Para satisfazer estas condições, a região ótima foi delimitada por faixas de tempo e temperatura de imobilização, em valores reais, de 8 a 13 h e 75 a 105 °C, respectivamente. Como, teoricamente, qualquer ponto dentro desta região ótima representa uma condição de tempo e temperatura de imobilização que resultará em uma fase estacionária com excelente desempenho cromatográfico, a condição ótima foi definida como temperatura de 100 °C e tempo de imobilização de 12 h. Nestas condições, fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente foram preparadas para caracterizações físico-químicas e cromatográficas e estudos de estabilidade e aplicação.

4.8.4. Avaliação da imobilização térmica do PMTDS sobre sílica titanizada

As fases Si-Ti(PMTDS) foram obtidas de forma similar às fases Si-Zr(PMTDS), empregando o planejamento composto central para duas variáveis (Tabela 3). Os onze experimentos realizados correspondentes às diferentes condições de tempo e temperatura de imobilização previamente planejadas resultaram em onze diferentes fases estacionárias Si-Ti(PMTDS). Os resultados cromatográficos obtidos pelas fases estacionárias na separação das misturas-teste I e II estão apresentados na Tabela 21.

De uma forma geral, as fases Si-Ti(PMTDS) apresentaram desempenho cromatográfico inferior, em termos de eficiências de coluna, às fases baseadas em sílica zirconizada, na faixa de 55.000 a 69.000 pratos m^{-1} . Os compostos apolares foram eluídos nestas fases com fatores de assimetria de picos dentro da faixa aceitável, entre 0,8 e 2,0¹⁸⁶, como pode ser observado na Figura 40. A repetibilidade do preparo das fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas termicamente foi determinada pela realização dos experimentos 5, 6 e 7, empregando as mesmas condições de imobilização. O procedimento de imobilização térmica do PMTDS sobre a sílica titanizada apresentou boa repetibilidade, a estimativa de desvio padrão relativo (RSD) foi de

aproximadamente 3 % em termos de eficiência de coluna e de 8 % em termos de quantidade de PMTDS imobilizada (grau de recobrimento).

Tabela 21. Parâmetros cromatográficos das fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas termicamente de acordo com o planejamento composto central para duas variáveis.

Experimentos	Parâmetros cromatográficos					% PMTDS	τ (nm)
	N/L ^a	As ^a	As ^b	k ^{a,c}	Rs ^d		
1 – 80 °C / 8 h	57.800	1,6	–	1,0	2,4	6,9	0,28
2 – 120 °C / 8 h	64.900	1,2	1,8	1,9	3,0	13,8	0,63
3 – 80 °C / 16 h	59.300	0,9	3,6	1,3	2,6	11,9	0,52
4 – 120 °C / 16 h	63.600	1,1	2,8	2,1	3,2	14,4	0,66
5 – 100 °C / 12 h	69.300	0,8	1,3	1,3	2,9	12,2	0,54
6 – 100 °C / 12 h	68.300	1,1	2,4	1,5	3,0	11,6	0,50
7 – 100 °C / 12 h	65.600	1,2	2,3	1,7	3,3	13,3	0,60
8 – 72 °C / 12 h	55.300	1,3	1,8	1,3	2,5	10,9	0,47
9 – 128 °C / 12 h	65.000	1,3	2,6	2,4	3,5	15,7	0,74
10 – 100 °C / 6,4 h	56.000	1,2	1,8	0,9	2,2	8,3	0,34
11 – 100 °C / 17,6 h	65.100	1,0	–	1,6	3,1	12,4	0,56

^a Calculado para o pico do naftaleno; ^b Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^c t_M medido a partir do tempo de retenção da uracila; ^d Calculado para o par tolueno-naftaleno.

Todas as fases estacionárias resultantes dos experimentos do planejamento composto central separaram de forma apropriada todos os compostos da mistura-teste I (Figura 40). Além disso, a eluição destes compostos foi mais rápida, em média, que nas fases Si-Zr(PMTDS). Isto ocorreu devido à baixa quantidade de PMTDS imobilizada termicamente na sílica titanizada, como pode ser observado na Tabela 18 pelos baixos valores de espessura de camada e de fator de retenção (k). A menor reatividade da superfície do suporte de sílica titanizada pode ser o fator responsável por este baixo grau de recobrimento polimérico. As maiores percentagens de PMTDS foram obtidas pelas fases estacionárias imobilizadas em temperaturas mais elevadas, acima de 100 °C (experimentos 2, 4 e 9), indicando que o aumento da quantidade de PMTDS imobilizado no suporte é mais expressivo com o aumento da temperatura se

comparado ao aumento do tempo de imobilização. Nos referidos experimentos, observa-se pelos cromatogramas que os compostos apresentaram melhores fatores de separação.

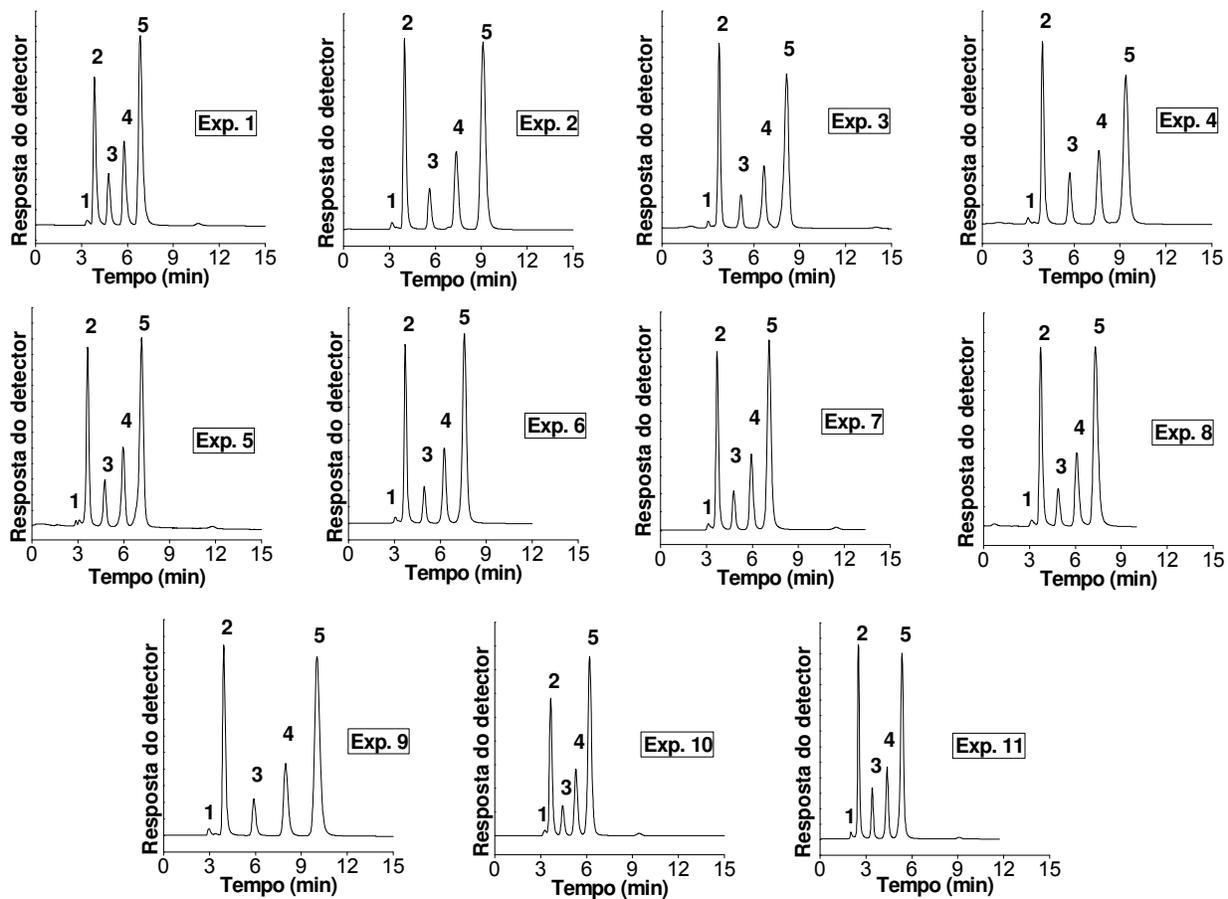


Figura 40. Cromatogramas da separação da mistura-teste I empregando as fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas termicamente. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); 0,2 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

O melhor recobrimento do suporte de sílica zirconizada com o PMTDS em temperaturas mais elevadas também pôde ser observado na separação dos compostos da mistura-teste II, Figura 41.

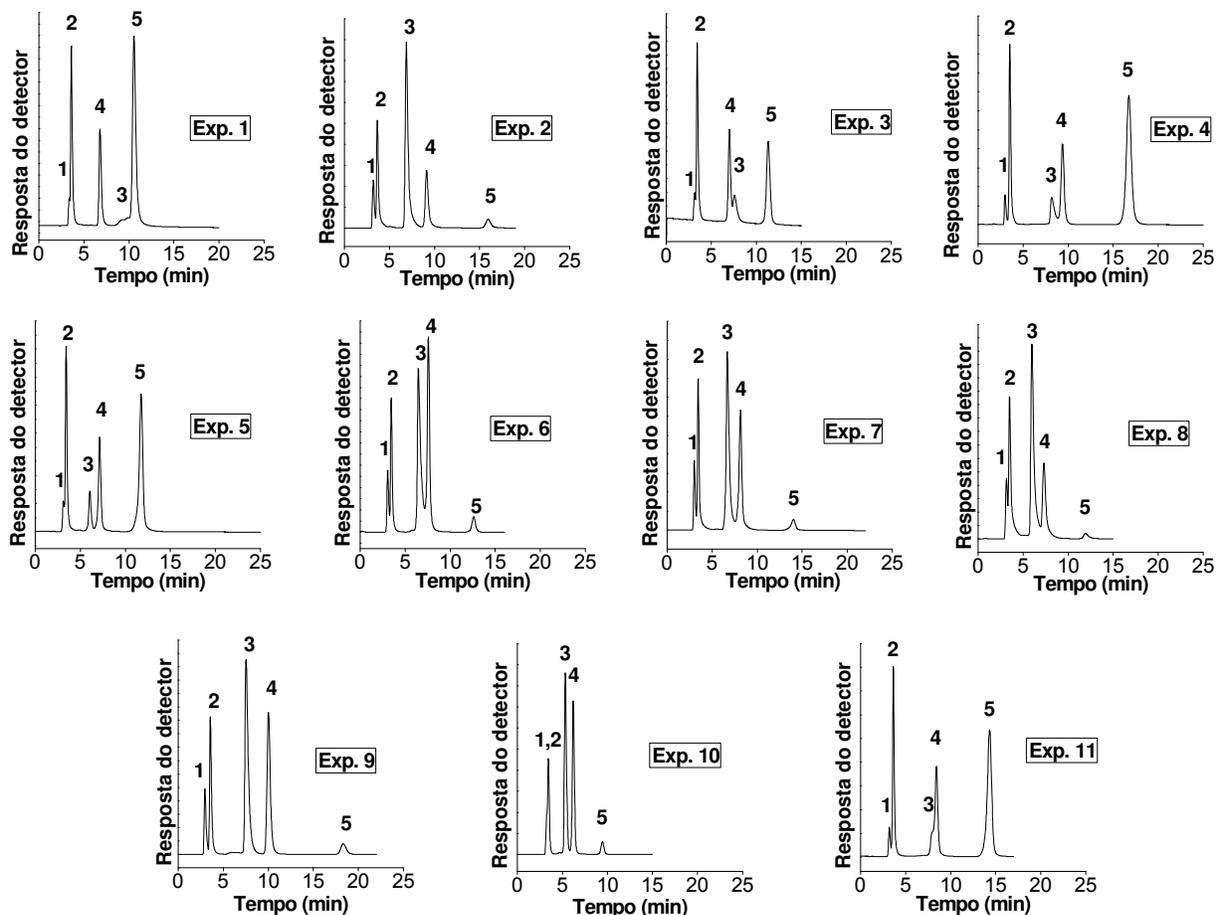


Figura 41. Cromatogramas da separação dos compostos da mistura-teste II pelas fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas termicamente. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); 0,2 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno e (5) acenafteno. A diferença nas intensidades dos picos de um mesmo composto nos cromatogramas se deve ao preparo de diferentes misturas-teste ao longo deste estudo.

As fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas a temperaturas maiores resultaram em eluições de picos menos assimétricos (com menor cauda) para o composto básico avaliado, a N,N-dimetilanilina. Nas fases imobilizadas a temperaturas inferiores a 100 °C, a interação da N,N-dimetilanilina com o sítios residuais do suporte foi tão acentuada que a sua ordem de eluição foi alterada com o naftaleno, como pode ser observado nos cromatogramas dos experimentos 1 e 3 da Figura 41. Esta interação forte da N,N-dimetilanilina com o suporte está relacionada principalmente com a quantidade reduzida de PMTDS na sílica titanizada e não com a reatividade do suporte. Nas fases com maior quantidade imobilizada de polímero os fatores de assimetria para a N,N-dimetilanilina foram bem menores que os obtidos pelas fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente, ao redor de 2.

As condições ótimas de tempo e temperatura de imobilização para o PMTDS sobre o suporte de sílica titanizada foram determinadas a partir dos resultados de eficiência de coluna e fator de assimetria para o pico do naftaleno obtidos para os experimentos do planejamento composto central delineado. Para tal, foram ajustados os respectivos modelos quadráticos, empregando um software de tratamento estatístico de dados¹⁸⁷. As equações que explicam as variações ocorridas na execução dos experimentos, no nível de 95 % de confiança, estão apresentadas abaixo:

$$N/m = 67,7 + 1,7x_1 + 3,0x_2 - 3,5x_1^2 - 3,4x_2^2 - 0,7x_1x_2 \quad \text{Equação 19}$$

$$As = 1,03 - 0,03x_1 - 0,14x_2 + 0,14x_1^2 + 0,03x_2^2 + 0,15x_1x_2 \quad \text{Equação 20}$$

Através da ANOVA foi verificada a validade destas equações para as eficiências de coluna e fatores de assimetria obtidas pelas fases Si-Ti(PMTDS) para o pico do naftaleno. A Tabela 22 apresenta a análise da variância do modelo ajustado para as eficiências das fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas termicamente segundo o planejamento composto central.

Tabela 22. Análise da variância do modelo quadrático ajustado às eficiências de coluna para o pico do naftaleno obtidas pelas fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas termicamente.

Fonte de Variação (FV)	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (v)	Média quadrática (MQ)
Regressão	201,68	5	40,34
Resíduos	33,56	5	6,71
Falta de ajuste	26,23	3	8,74
Erro puro	7,33	2	3,66
Total	235,24	10	
<i>% de variação explicada: 85,7</i>			
<i>% de variação explicável: 96,9</i>			

Pela ANOVA, foi possível observar que, no nível de 95 % de probabilidade, a regressão quadrática realizada para os resultados de eficiências de coluna foi estatisticamente significativa, indicando que a equação ajustada explica mais de 85 % das variações ocorridas

nas respostas. Além disso, o modelo da Equação 19 também não apresentou falta de ajuste para os dados, uma vez que o resultado da razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro experimental (2,39) foi inferior ao valor do teste $F_{3,2,95\%}$ tabelado (19,16).

A ANOVA para a equação ajustada aos fatores de assimetria obtidos pelas fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas termicamente está apresentada na Tabela 23.

Tabela 23. Análise da variância do modelo quadrático ajustado aos fatores de assimetria para o pico do naftaleno obtidos pelas fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas termicamente.

Fonte de Variação (FV)	Soma quadrática (SQ)	Graus de liberdade (v)	Média quadrática (MQ)
Regressão	0,34	5	0,07
Resíduos	0,13	5	0,02
Falta de ajuste	0,04	3	0,01
Erro puro	0,09	2	0,04
Total	0,47	10	
<i>% de variação explicada: 73,4</i>			
<i>% de variação explicável: 81,4</i>			

De acordo com a ANOVA, a regressão quadrática dos dados de fator de assimetria não foi estatisticamente significativa, no nível de 95 % de probabilidade, pois a razão entre as médias quadráticas da regressão e dos resíduos foi igual a 3,5 e, este valor é inferior ao valor tabelado do teste $F_{5,5,95\%} = 5,05$. Porém, quase toda a variação foi explicada pelo modelo da Equação 20 que, por sua vez, não apresentou falta de ajuste. A razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e do erro puro ($MQ_{faj}/MQ_{ep} = 0,25$) foi muito menor que o valor tabelado para o teste $F_{3,2,95\%} = 19,16$.

Desta forma, os dois modelos ajustados para as eficiências de coluna e fatores de assimetria obtidas pelas fases Si-Ti(PMTDS) foram válidos, sendo possível prever com confiabilidade as condições ótimas de imobilização. Para facilitar a determinação das condições ótimas de tempo e temperatura de imobilização, os modelos foram representados graficamente pelas respectivas superfícies de respostas, como mostrado na Figura 42.

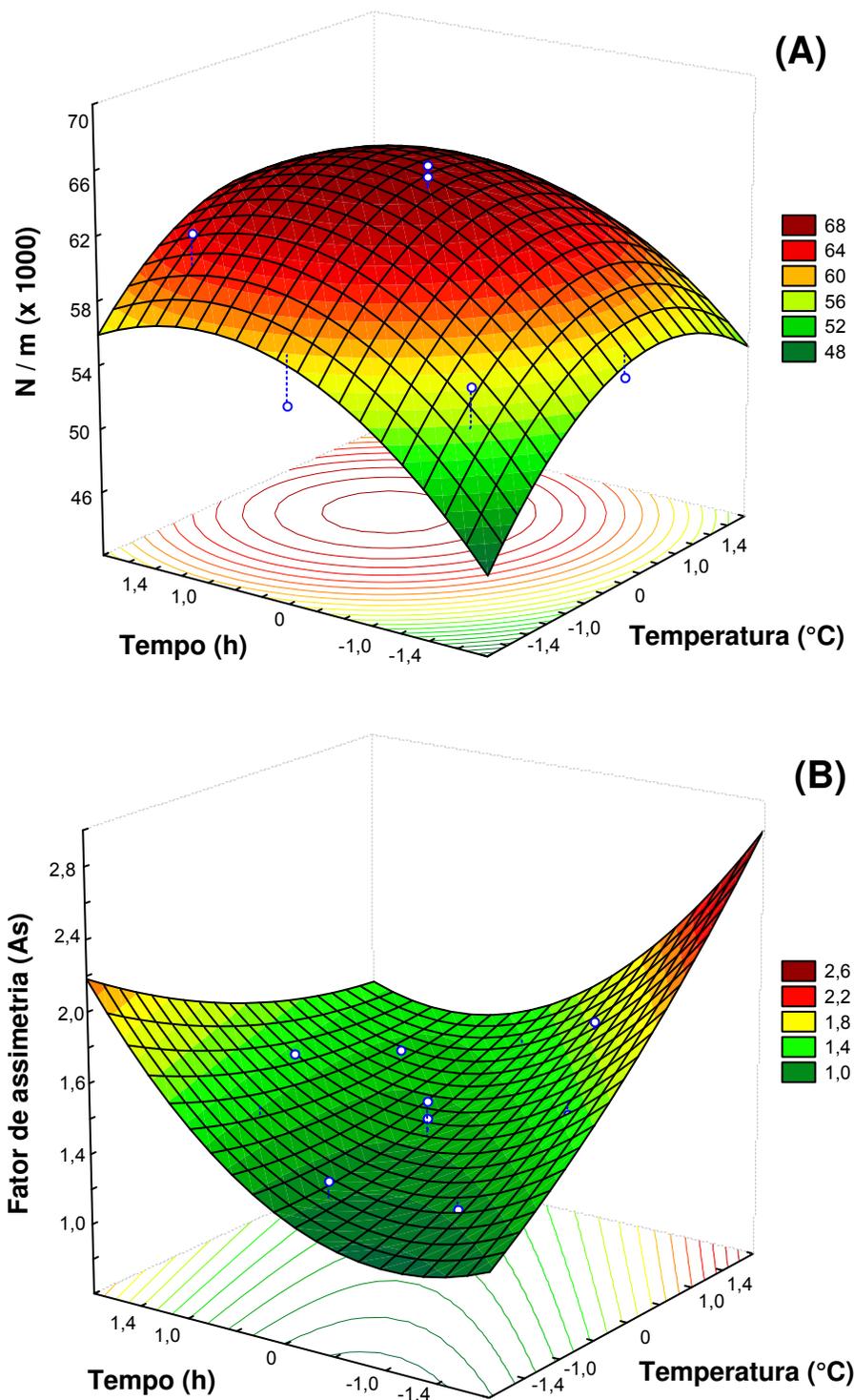


Figura 42. Superfícies de respostas da imobilização térmica de PMTDS sobre partículas de sílica titanizada. (A) Eficiências de coluna e (B) fatores de assimetria, medidos para o pico do naftaleno.

Observa-se pelo gráfico de eficiências de colunas que a condição ótima de tempo e temperatura de imobilização que resulta em uma máxima eficiência de coluna para as fases Si-

Ti(PMTDS) encontra-se dentro dos domínios experimentais estudados. Esta condição é representada pelo ápice da superfície, região vermelha escura na Figura 42A, que corresponde a aproximadamente 68.000 pratos m^{-1} , empregando tempo e temperatura de imobilização mais elevados. Porém, para se obter fases estacionárias que resultem em picos simétricos para compostos apolares, região verde escura da Figura 42B, é necessário empregar tempo de imobilização mais curto e temperatura de imobilização mais baixa. A otimização destas condições foi realizada pela superposição das duas superfícies delimitando uma região ótima, na qual se obtém fases estacionárias com eficiências de coluna superiores a 65.000 pratos m^{-1} e picos com fatores de assimetria entre 0,9 e 1,1. Esta região ótima, em valores reais foi delimitada pelas faixas de tempos e temperaturas de imobilização do PMTDS sobre a sílica titanizada de 8 a 12 h e 100 a 130 °C, respectivamente. Como qualquer ponto dentro desta região é estatisticamente equivalente, a condição ótima foi definida como temperatura de 120 °C e tempo de imobilização de 12 h. Esta condição mais extrema da região ótima foi escolhida devido a maior quantidade de PMTDS imobilizada sobre a sílica titanizada, resultando em uma melhor proteção do suporte e, conseqüentemente, picos menos assimétricos para a N,N-dimetilanilina, conforme apresentado pela Tabela 21 e Figura 41. Nestas condições, fases estacionárias Si-Ti(PMTDS) foram imobilizadas termicamente para testes físico-químicos e cromatográficos de caracterização, estudos de estabilidade e aplicação.

4.8.5. Imobilização de PMTDS por raios gama sobre sílica zirconizada

Nesta etapa, a imobilização do PMTDS nas sílicas metalizadas foi realizada pela radiação gama proveniente de uma fonte de cobalto-60. A radiação gama tem um alto poder ionizante e facilmente promove o entrecruzamento de cadeias poliméricas através da formação de radicais livres. Este entrecruzamento pode fornecer camadas poliméricas mais uniformes e, conseqüentemente, uma melhor proteção dos sítios ativos do suporte contra interações indesejáveis com componentes das amostras.

As fases estacionárias foram submetidas a diferentes doses de irradiação, as quais foram previamente definidas de acordo com trabalhos anteriores^{59,62,121} do LabCrom. Para as fases Si-Zr(PMTDS) foram avaliadas oito doses diferentes no intervalo de 50 a 120 kGy. A eficácia da radiação gama na imobilização do PMTDS sobre partículas de sílicas zirconizada, nas diferentes doses aplicadas, foi avaliada cromatograficamente pela separação das misturas-teste I e II. O grau de recobrimento polimérico, para cada dose de radiação aplicada, foi

determinado por análise elementar. Os resultados cromatográficos das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas por raios gama estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Parâmetros cromatográficos das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas por diferentes doses de raios gama.

Dose de irradiação (kGy)	Parâmetros cromatográficos					% PMTDS	τ (nm)
	N/L ^a	As ^a	As ^b	k ^{a,c}	Rs ^d		
50	69.800	0,9	3,7	3,6	4,7	19,3	0,90
60	73.300	1,1	3,9	3,9	4,8	19,7	0,93
70	66.400	1,2	3,7	4,1	4,4	19,9	0,94
80	69.300	1,3	4,4	4,2	4,5	19,9	0,94
90	68.600	1,2	3,8	4,4	4,5	20,3	0,96
100	60.500	0,9	3,9	4,5	4,5	20,6	0,98
110	59.800	0,7	3,5	4,7	4,3	21,6	1,06
120	68.800	1,0	4,8	4,8	4,7	22,0	1,09

^a Calculado para o pico do naftaleno; ^b Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^c t_M medido a partir do tempo de retenção da uracila; ^d Calculado para o par tolueno-naftaleno. Em cada dose de irradiação foram preparadas triplicatas das fases estacionárias.

A quantidade de PMTDS imobilizadas pela radiação gama nas partículas de sílica zirconizada são maiores, em média, que as obtidas para as fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas termicamente e auto-imobilizadas. Como mencionado anteriormente, o entrecruzamento das cadeias poliméricas do PMTDS fornece um grau de recobrimento superior comparado às outras formas de imobilização. A percentagem de PMTDS e o fator de retenção para o pico do naftaleno aumentam progressivamente com o aumento da dose de irradiação no material, resultando em camadas poliméricas mais espessas, como apresentado na Tabela 24. Esta maior espessura da camada de PMTDS na superfície da sílica zirconizada resultou em eficiências de colunas mais baixas, entre 60.000 e 73.000 pratos m^{-1} , quando comparadas às fases imobilizadas termicamente, devido ao processo mais lento de transferência de massa. Apesar de afetar a eficiência de coluna, o comportamento cromatográfico das fases de Si-Zr(PMTDS) não foi comprometido com a maior quantidade do polímero no suporte cromatográfico. De acordo com os cromatogramas da Figura 43, todas as fases Si-Zr(PMTDS) apresentaram separação adequada dos compostos da mistura-teste I, obtendo picos simétricos

e boa resolução entre os compostos. Somente a fase estacionária irradiada a 110 kGy apresentou fator de assimetria para o pico do naftaleno fora da faixa aceitável, segundo a literatura¹⁸⁶, provavelmente devido a algum problema proveniente da irradiação, uma vez que este valor é a média obtida por três colunas cromatográficas e, em nenhum dos casos, foi obtido fator de simetria acima de 0,9.

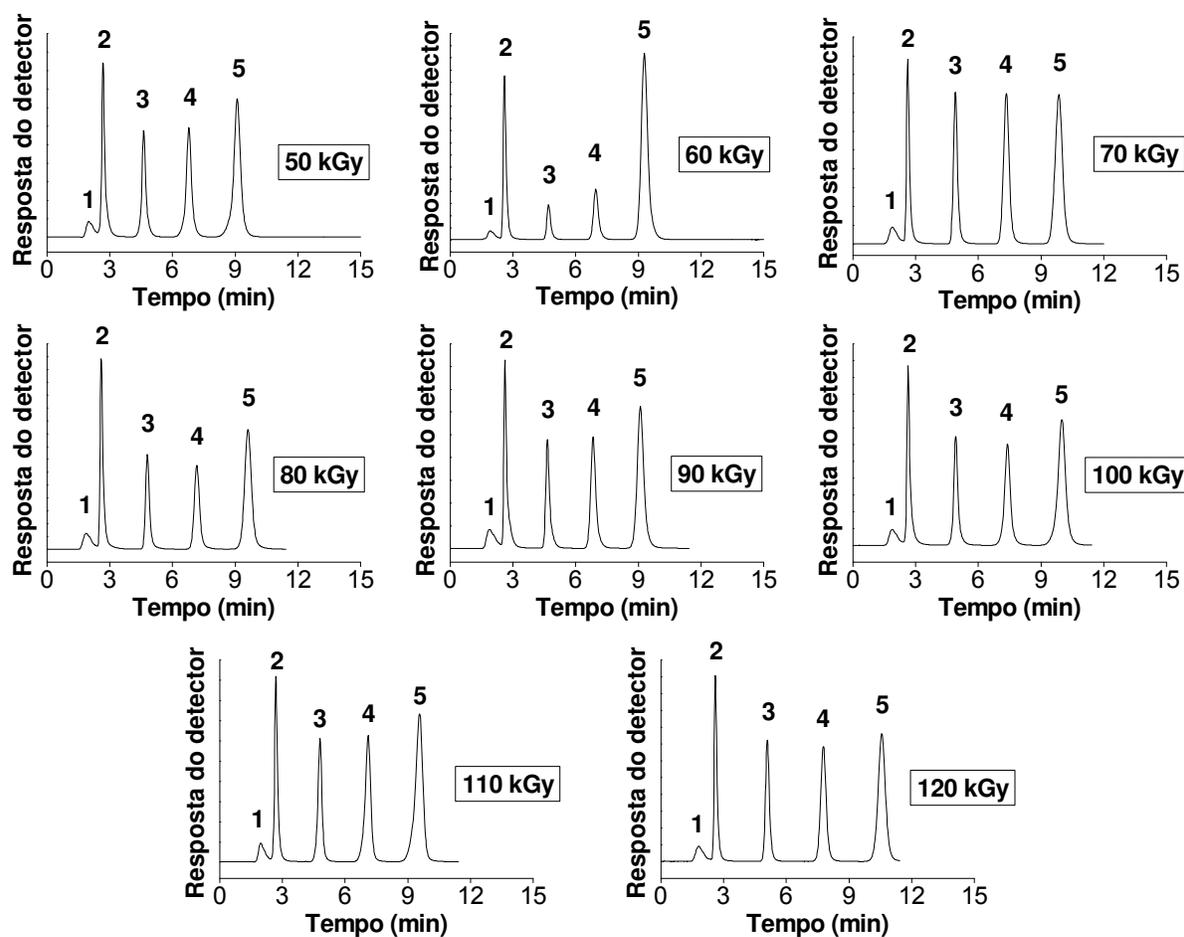


Figura 43. Cromatogramas da separação dos compostos da mistura-teste I pelas fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas por radiação gama. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

As eficiências de coluna para as fases Si-Zr(PMTDS) apresentaram valores aleatórios com aumento da dose de irradiação. De uma forma geral, as fases obtiveram eficiências de coluna por volta de 68.000 pratos m⁻¹, com exceção para as fases irradiadas a 100 e 110 kGy. A maior eficiência de coluna foi obtida pelas fases irradiadas a 60 kGy, em média, superior a 70.000 pratos m⁻¹.

Apesar da maior quantidade de PMTDS imobilizada pela radiação gama no suporte de sílica zirconizada alguns grupos reativos do suporte não foram recobertos pela camada polimérica, resultando em interações indesejáveis com os componentes polares da mistura-teste II. Esta interação residual resultou em caudas acentuadas principalmente para a N,N-dimetilanilina, composto básico da mistura, conforme apresentado nos cromatogramas da Figura 44.

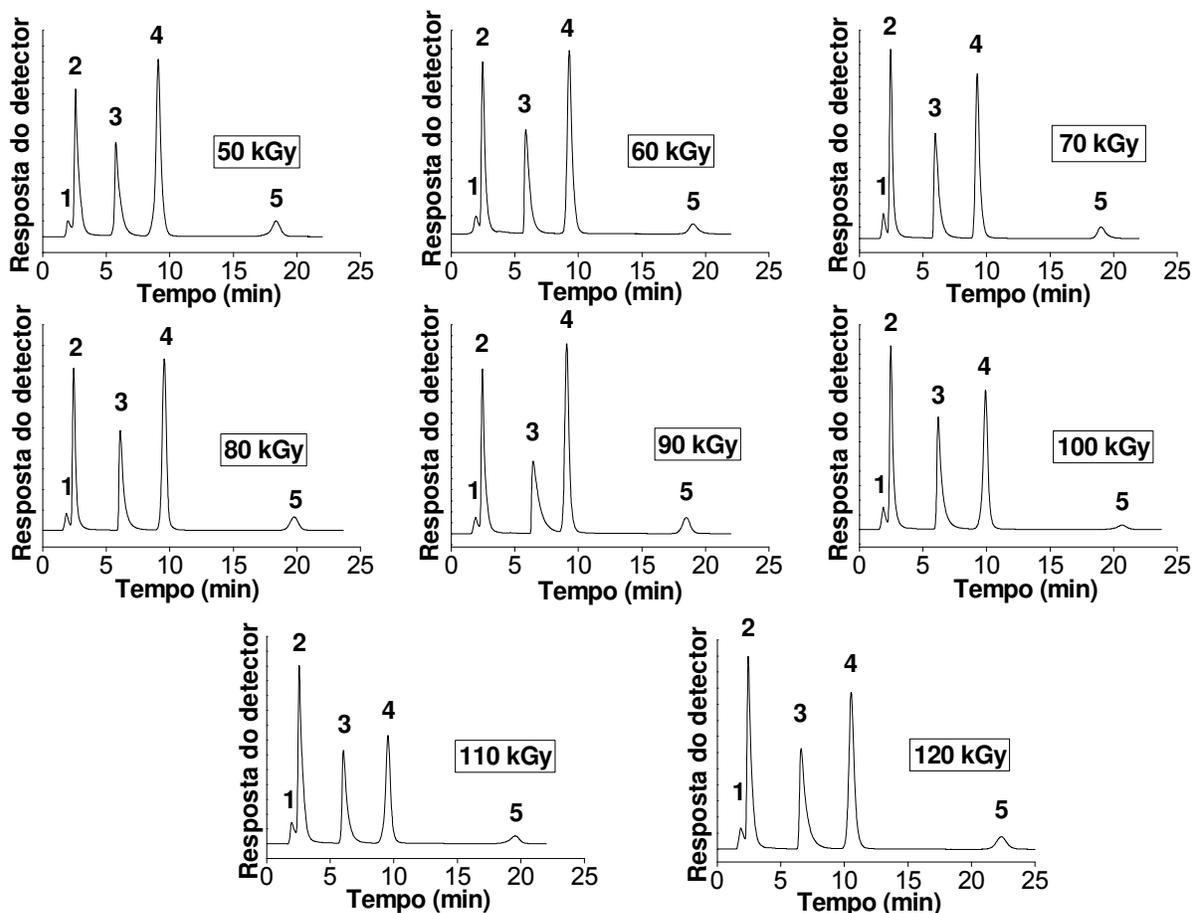


Figura 44. Cromatogramas da separação dos compostos da mistura-teste II pelas fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas por radiação gama. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno (5) acenafteo.

Observa-se pela Figura 44 que o pico da N,N-dimetilanilina apresentou caudas acentuadas para as fases Si-Zr(PMTDS), independentes da dose de irradiação aplicada. Apesar da maior percentagem de PMTDS, a fase Si-Zr(PMTDS) irradiada a 120 kGy resultou em interação mais intensa com o composto básico. Este fato pode estar associado à longa exposição do material à irradiação gama (altas doses), pois, além da possibilidade de aumento

da estrutura do polímero com o entrecruzamento das cadeias, a radiação gama pode, em alguns casos, promover a degradação da estrutura do polímero. A degradação de polissiloxanos pode resultar na formação de grupos silanóis residuais provenientes do rompimento de ligações Si-O-Si-C de suas estruturas. Com isto, o número total de grupos silanóis residuais aumenta e se tornam mais ácidos devido à presença de átomos de zircônio no suporte cromatográfico, uma vez que grupos silanóis adjacentes a traços de metais têm a sua acidez consideravelmente aumentada¹⁰³. A seletividade da fase de PMTDS imobilizado por radiação gama nas partículas de sílica zirconizada foi idêntica à obtida para as fases auto-imobilizadas e imobilizadas termicamente, mostrando o excelente comportamento cromatográfico das fases Si-Zr(PMTDS) independentemente do procedimento de imobilização aplicado. Para estudos de caracterizações físico-químicas e cromatográficas e avaliação da estabilidade química das fases Si-Zr(PMTDS), foi selecionada a fase irradiada a 120 kGy. Esta fase foi selecionada por apresentar bom desempenho cromatográfico e maior percentagem de PMTDS imobilizada no suporte de sílica zirconizada, resultando, teoricamente, em melhor recobrimento dos grupos silanóis.

4.8.6. Imobilização de PMTDS por raios gama sobre sílica titanizada

O PMTDS também foi imobilizado sobre partículas de sílica titanizada empregando radiação gama, proveniente de uma fonte de cobalto-60, por um irradiador industrial. Para tal, foram preparadas 5 (cinco) porções de fase sorvida de PMTDS sobre sílica titanizada e, cada uma destas porções, foi submetida a uma dose diferente de irradiação: 60, 80, 100, 120 e 140 kGy. A principal vantagem da radiação gama, em relação aos demais procedimentos de imobilização, é o seu alto poder ionizante que promove o entrecruzamento das cadeias poliméricas sobre o suporte, resultando em uma maior quantidade de polímero nas fases estacionárias, como visto anteriormente para as fases Si-Zr(PMTDS). Os resultados cromatográficos e o grau de recobrimento polimérico das fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas por radiação gama estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25. Parâmetros cromatográficos das fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas por diferentes doses de raios gama.

Dose de irradiação (kGy)	Parâmetros cromatográficos					% PMTDS	τ (nm)
	N/L ^a	As ^a	As ^b	k ^{a,c}	Rs ^d		
60	68.600	1,0	1,7	2,1	3,5	16,6	0,79
80	70.000	0,9	1,9	2,2	3,7	16,9	0,81
100	58.300	1,0	1,8	1,9	3,1	17,9	0,88
120	–	–	–	–	–	18,6	0,92
140	–	–	–	–	–	18,9	0,94

^a Calculado para o pico do naftaleno; ^b Calculado para o pico da N,N-dimetilanilina; ^c t_M medido a partir do tempo de retenção da uracila; ^d Calculado para o par tolueno-naftaleno. Em cada dose de irradiação foram preparadas triplicatas das fases estacionárias.

O desempenho cromatográfico de algumas das fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas por radiação gama foi similar ao obtido pelas fases estacionárias com o PMTDS imobilizado termicamente sobre o suporte de sílica titanizada e ao obtido pelas fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas por raios gama. No entanto, as fases estacionárias imobilizadas com doses mais baixas de irradiação apresentaram melhores eficiências de coluna. Por exemplo, a fase estacionária imobilizada a 80 kGy resultou na maior eficiência de coluna, em média, de 70.000 pratos m^{-1} . Por outro lado, a medida que se aumentou as doses de irradiação, o processo de transferência de massa nas fases foi prejudicado a ponto de não ser possível a separação dos componentes das misturas-teste I e II. Na dose de 100 kGy, ocorreu uma diminuição em valores absolutos dos parâmetros de retenção da fase, reduzindo também a resolução e o fator de separação dos picos. Nas fases imobilizadas a doses mais altas, tais como 120 e 140 kGy, não foi possível obterem boas fases estacionárias, pois as mesmas resultaram na eluição dos compostos da mistura-teste I na forma de picos duplos bastante alargados, conforme pode ser observado na Figura 45. Este comportamento das fases para a separação dos compostos indica perdas das características do recheio cromatográfico que possivelmente foram ocasionados por problemas na irradiação das fases, haja vista que todo o procedimento empregado para o preparo destas fases foi idêntico ao aplicado às demais fases estacionárias avaliadas neste trabalho. Desta forma, a obtenção de fases estacionárias com PMTDS imobilizados por raios gama sobre partículas de sílica titanizada fica limitada a aplicação de doses de irradiação gama, provenientes de uma fonte de cobalto-60, inferiores a 100 kGy.

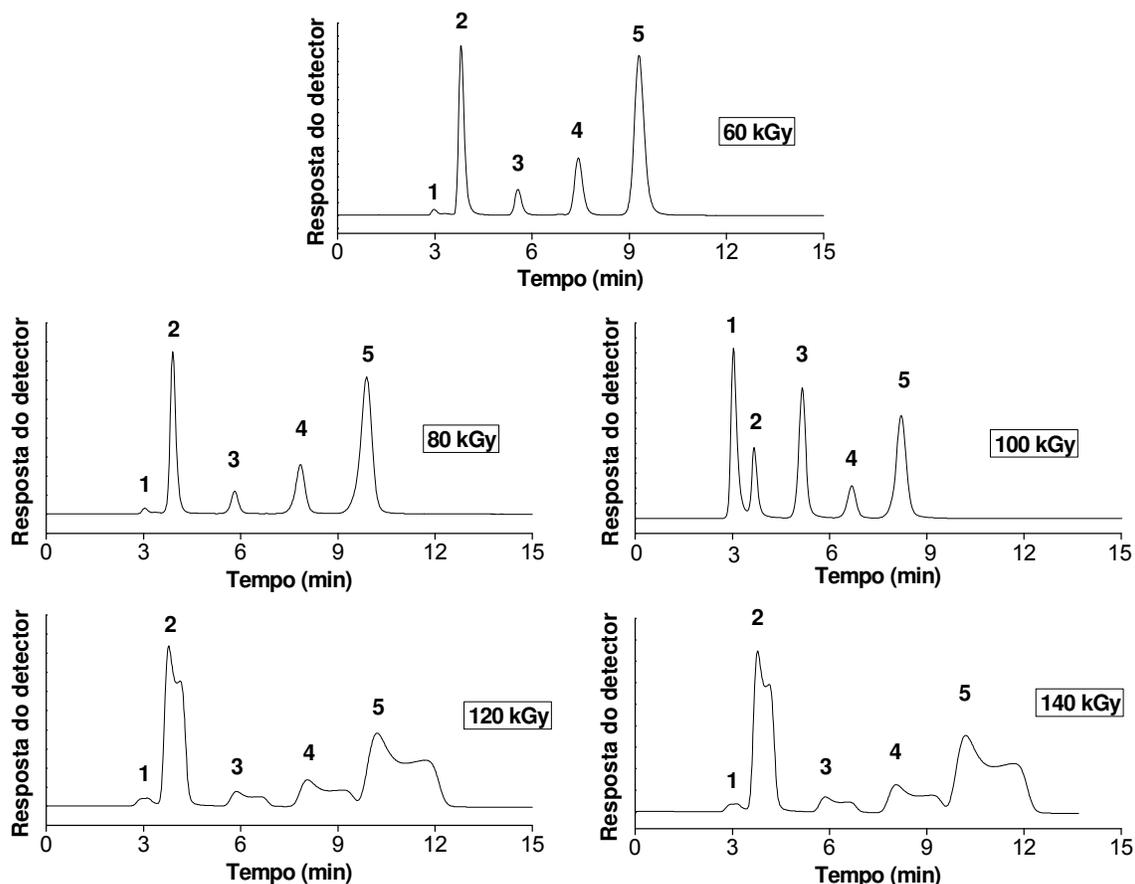


Figura 45. Cromatogramas da separação dos compostos da mistura-teste I pelas fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas por radiação gama. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); 0,2 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) benzonitrila, (3) benzeno, (4) tolueno e (5) naftaleno.

As fases imobilizadas a 60, 80 e 100 kGy resultaram em fatores de assimetria para compostos apolares adequados, como pode ser observado na Figura 45 e na Tabela 25. De uma forma geral, a quantidade de PMTDS imobilizada pela radiação gama sobre a sílica titanizada foi superior à quantidade do polímero imobilizada pelo tratamento térmico, resultando numa proteção mais eficiente do suporte cromatográfico às interações indesejáveis com componentes polares da mistura-teste. Apesar disto, a quantidade de PMTDS imobilizada na sílica titanizada ainda foi inferior à imobilizada na sílica zirconizada, indicando a maior reatividade dos grupos superficiais deste último suporte em comparação ao primeiro. Estes resultados podem ser comprovados pela Tabela 25 e também pelos cromatogramas para os compostos ácido e básico da mistura-teste II apresentados na Figura 46.

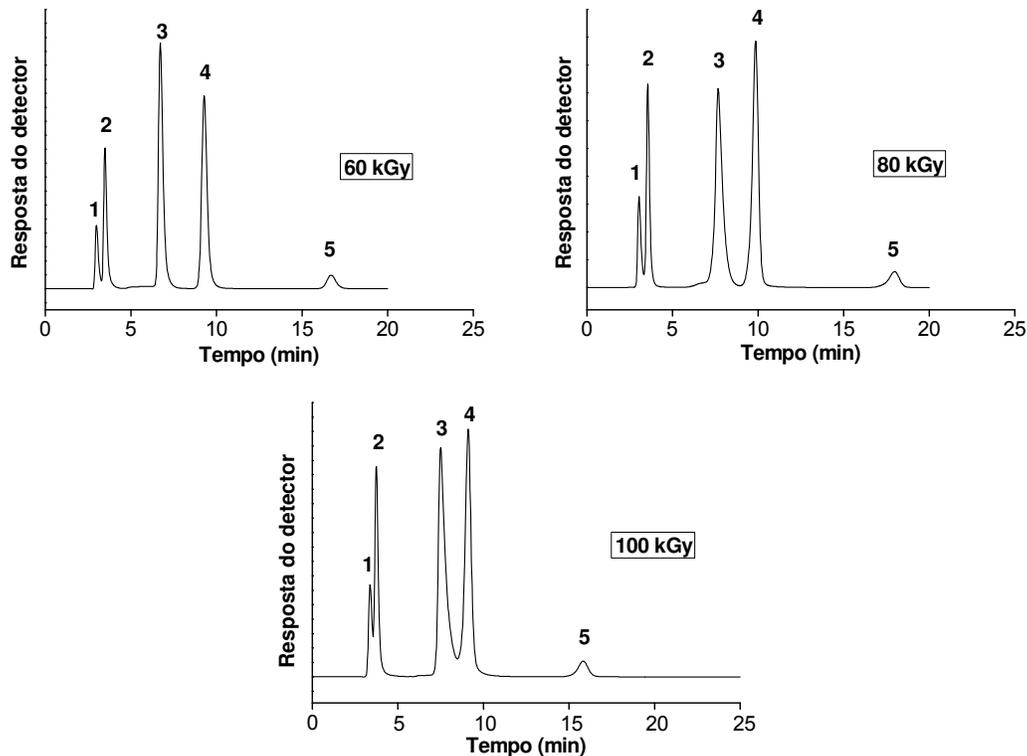


Figura 46. Cromatogramas da separação dos compostos da mistura-teste II pelas fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas por radiação gama. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (70:30, v/v); 0,2 mL min⁻¹; volume de amostra injetada: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 25 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) N,N-dimetilanilina, (4) naftaleno (5) acenafteno.

De acordo com os cromatogramas da Figura 46 as fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas nas doses mais baixas de raios gama apresentam excelente fator de simetria para o pico da N,N-dimetilanilina, similares aos obtidos para as fases baseadas em suportes de sílica nua¹³³. A menor reatividade dos grupos superficiais da sílica titanizada possibilita este menor efeito dos grupos silanóis na retenção, sobretudo, de compostos básicos. Quanto melhor o recobrimento da superfície da sílica titanizada, maior percentagem de PMTDS imobilizada, mais simétrico é o pico do composto básico. Porém, as fases Si-Ti(PMTDS) também apresentam características mais ácidas devido a presença da titânia no suporte cromatográfico, retendo mais fortemente a N,N-dimetilanilina principalmente nas fases com menor grau de recobrimento polimérico, como pode ser observado no cromatograma da fase estacionária imobilizada a 100 kGy. Além disso, em todos os cromatogramas das fases Si-Ti(PMTDS) pode ser observado a rápida eluição do composto ácido da mistura-teste II, o fenol, quase simultaneamente à uracila, composto não retido pela fase estacionária, indicando a característica ácida destas fases. As fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas a 80 kGy foram selecionadas para estudos de caracterização e estabilidade por apresentarem melhor desempenho cromatográfico.

4.8.7. Seletividade das fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS)

É importante ser relatado que a seletividade das fases estacionárias baseadas na imobilização do PMTDS sobre os suportes de sílica metalizada é praticamente idêntica à apresentada pelas fases baseadas na imobilização de PMTDS sobre suporte de sílica nua, Si(PMTDS). Tonhi¹³³ estudou o comportamento cromatográfico de fases estacionárias baseadas na imobilização do PMTDS sobre partículas de sílica nua, obtendo excelente desempenho para tais fases. A seletividade e os parâmetros de retenção apresentados neste trabalho pelas fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foram idênticos aos obtidos pelas fases de PMTDS imobilizado sobre a sílica nua, especialmente para compostos apolares. O desempenho cromatográfico das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) também foram similares aos obtidos pelas fases Si(PMTDS) em termos de eficiência de coluna, fator de assimetria para compostos apolares e resolução entre os picos. As principais diferenças foram observadas quanto ao comportamento de retenção diferenciado para compostos polares, principalmente básicos, devido à presença do zircônio e da titânia na estrutura do suporte cromatográfico, fornecendo um caráter mais ácido às fases estacionárias. Além disso, a quantidade de PMTDS imobilizada no suporte de sílica titanizada foi menor comparada à obtida na sílica zirconizada que, por sua vez, foi menor que a obtida na sílica nua¹³³. Este fato se deve, provavelmente, à diminuição da reatividade dos grupos silanóis com a incorporação dos óxidos metálicos. Apesar da menor quantidade de PMTDS na superfície da sílica titanizada, a eluição de compostos básicos nas fases Si-Ti(PMTDS) resulta em picos com caudas menores se comparados aos eluídos nas fases Si-Zr(PMTDS). Em alguns casos, as fases Si-Ti(PMTDS) apresentaram fatores de assimetria para compostos básicos similares aos obtidos por fases Si(PMTDS). As caudas mais acentuadas para picos de compostos básicos nas fases Si-Zr(PMTDS) estão associadas à alta atividade dos grupos silanóis, adjacentes aos átomos de zircônio no suporte cromatográfico, que não foram recobertos pela camada polimérica. Esta atividade dos grupos superficiais do suporte de sílica zirconizada, provavelmente relacionada à maior quantidade de óxido de metal depositada, foi bem maior que a dos grupos superficiais do suporte de sílica titanizada, e, por este motivo, resultou na interação mais forte com compostos básicos.

4.9. Caracterização físico-química das fases estacionárias

A caracterização físico-química das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) preparadas sob os diferentes procedimentos de imobilização foi realizada apenas para as fases estacionárias otimizadas ou as que apresentaram melhor desempenho cromatográfico, em cada um dos procedimentos estudados. Desta forma, as fases selecionadas para a caracterização e as respectivas nomenclaturas empregadas foram:

- Si-Zr(PMTDS) auto-imobilizada por 100 dias à temperatura ambiente – Si-Zr(PMTDS) AI;
- Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizada por 100 dias à temperatura ambiente – Si-Ti(PMTDS) AI;
- Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente a 100 °C por 12 h – Si-Zr(PMTDS) TT;
- Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente a 120 °C por 12 h – Si-Ti(PMTDS) TT;
- Si-Zr(PMTDS) imobilizada por raios gama a 120 kGy – Si-Zr(PMTDS) RG;
- Si-Ti(PMTDS) imobilizada por raios gama a 80 kGy – Si-Ti(PMTDS) RG.

4.9.1. Área superficial específica, volume específico e diâmetro médio de poros

Todas as fases estacionárias foram preparadas em quantidades superiores às necessárias para o enchimento das respectivas colunas cromatográficas, o excesso de material foi recolhido apropriadamente para os testes de caracterização. Portanto, cada amostra de fase estacionária caracterizada neste trabalho foi previamente submetida às etapas de imobilização, extração do PMTDS não imobilizado nos suportes, suspensão e enchimento, representando integralmente as características do material compactado dentro das colunas cromatográficas.

As características físicas das fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foram medidas pela adsorção/dessorção do nitrogênio. Os resultados estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26. Propriedades físicas das fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) e dos suportes de sílicas metalizadas.

Fases estacionárias	Área Superficial (m² g⁻¹)	Volume de poros (cm³ g⁻¹)	Diâmetro de poros (nm)
<i>Sílica zirconizada</i>	336 ± 7	0,68 ± 0,01	8,0 ± 0,5
Si-Zr(PMTDS) AI	177 ± 8	0,37 ± 0,01	6,2 ± 0,2
Si-Zr(PMTDS) TT	166 ± 2	0,36 ± 0,02	6,1 ± 0,1
Si-Zr(PMTDS) RG	102 ± 11	0,26 ± 0,01	5,8 ± 0,4
<i>Sílica titanizada</i>	292 ± 3	0,73 ± 0,05	9,5 ± 0,7
Si-Ti(PMTDS) AI	167 ± 5	0,41 ± 0,02	8,0 ± 0,2
Si-Ti(PMTDS) TT	186 ± 9	0,49 ± 0,01	8,4 ± 0,6
Si-Ti(PMTDS) RG	154 ± 9	0,43 ± 0,03	7,0 ± 0,9

A deposição do PMTDS ocorre, principalmente, nos poros dos suportes de sílicas zirconizada e titanizada. As áreas superficiais específicas das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) apresentaram valores similares, ao redor de 160 m² g⁻¹, com exceção para as fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas por raios gama que apresentou uma redução de aproximadamente 70 % do valor inicial da área superficial do suporte de sílica zirconizada. Esta tendência também foi acompanhada pelos volumes e diâmetros de poros, sugerindo que a maior quantidade de PMTDS imobilizada por raios gama ocorreu principalmente dentro dos poros da sílica zirconizada. De uma forma geral, as fases Si-Ti(PMTDS) apresentaram menor redução dos volumes de poros em relação ao volume de poro inicial do suporte, aproximadamente 40 %, enquanto que nas fases Si-Zr(PMTDS) auto-imobilizadas e imobilizadas termicamente esta redução foi de 55 %. Esta menor redução nas fases baseadas na sílica titanizada pode estar relacionada à menor quantidade de metal presente no suporte e/ou a menor quantidade de PMTDS imobilizada neste suporte.

4.9.2. Análises termogravimétricas

A estabilidade térmica das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foi avaliada por análises termogravimétricas. Independente do procedimento de imobilização aplicado a estabilidade térmica das fases Si-Zr(PMTDS) apresentou o mesmo perfil de perdas de massas ao longo da faixa de temperatura de 25 a 1.000 °C. O mesmo aconteceu para as fases Si-Ti(PMTDS) e, desta forma, somente um termograma de cada uma das fases estacionárias foram ilustrados na Figura 47. Em ambas as fases estacionárias as principais perdas de massas estão relacionadas à degradação do PMTDS, e a desidratação e desidroxilação dos grupos superficiais (Si-OH e Zr-OH/Ti-OH) do suporte cromatográfico (ver Figuras 20 e 26). A estabilidade das fases apresentou início de degradação (perdas de massas) em aproximadamente 200 °C, superior ao início da degradação do PMTDS (como visto na seção 4.5.1) que foi de 120 °C.

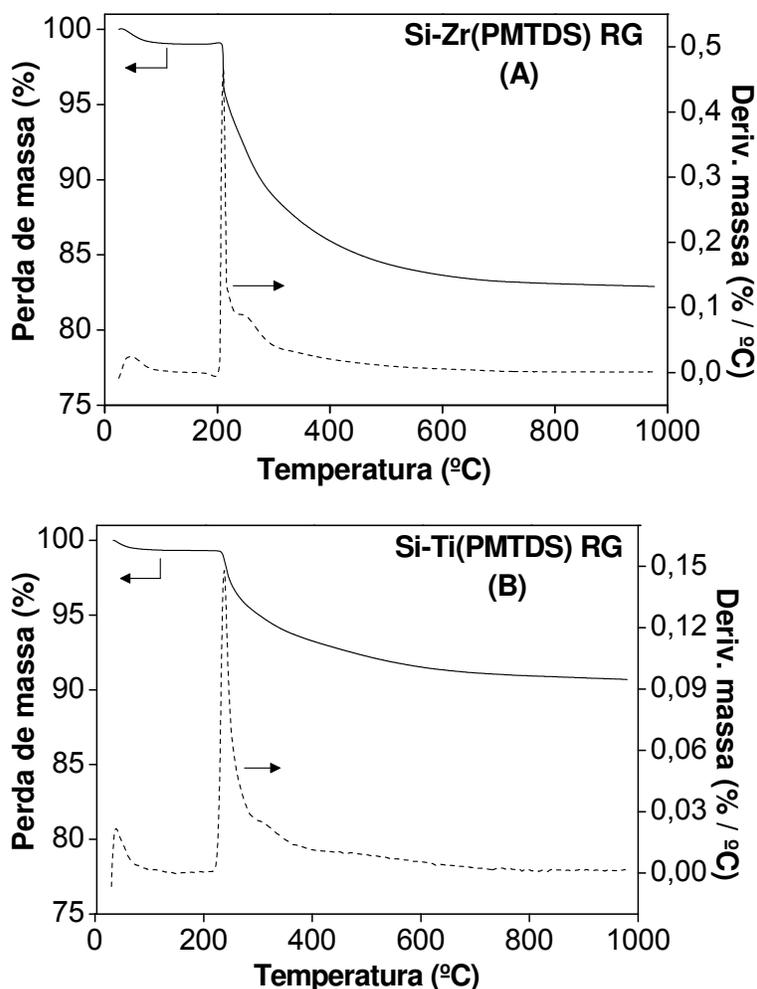
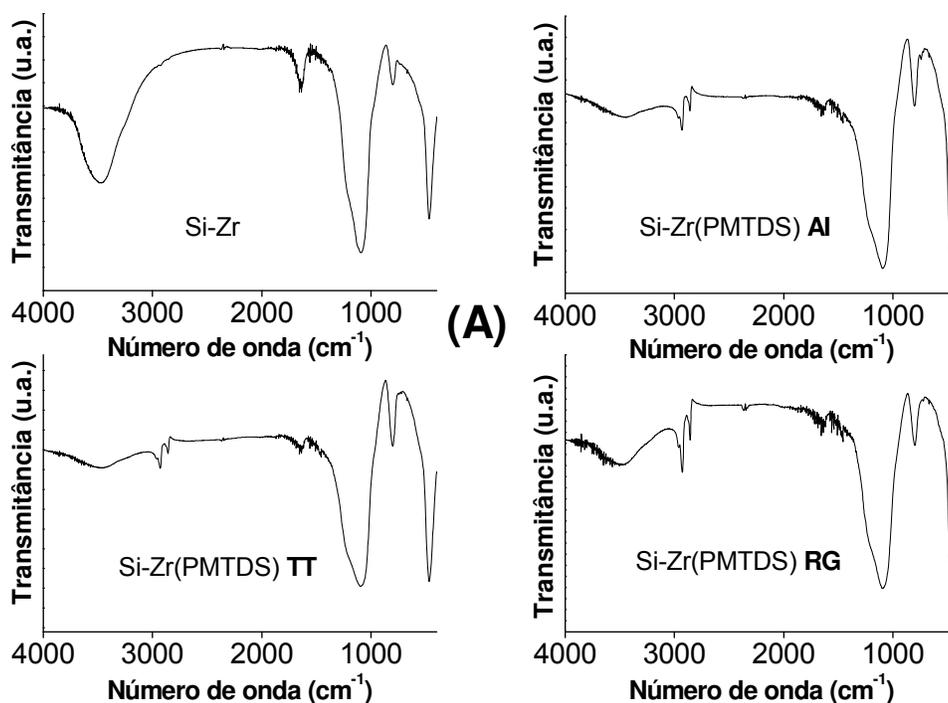


Figura 47. Termogramas típicos das fases (A) Si-Zr(PMTDS) e (B) Si-Ti(PMTDS).

4.9.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho

As fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foram caracterizadas também por espectroscopia no infravermelho para a determinação da presença de grupos funcionais característicos. A Figura 48 apresenta os espectros dos suportes de sílica zirconizada e sílica titanizada e das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) preparadas pelos diferentes procedimentos de imobilização.

De acordo com a Figura 48, a principal diferença entre os espectros dos suportes e das respectivas fases estacionárias é a presença de um tripleto na região de 2.900 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações CH_2 e CH_3 , com a imobilização do PMTDS. Nas fases com suporte de sílica zirconizada ocorre também a diminuição da intensidade da banda na região de 3.500 cm^{-1} , referente a vibrações de grupos OH e moléculas de H_2O adsorvidas na superfície do material, em comparação com o espectro do suporte. A redução deste sinal foi menos acentuada nas fases baseadas no suporte de sílica titanizada, indicando a presença de grupos OH – provenientes ou de grupos zirconóis (Zr-OH), ou titanóis (Ti-OH) e também de silanóis (Si-OH). Além disso, o pequeno ombro em 980 cm^{-1} referente à vibração de grupos silanóis livres permaneceram após a imobilização do PMTDS no suporte de sílica titanizada, sugerindo a presença de um grande número de grupos silanóis nas fases estacionárias Si-Ti(PMTDS).



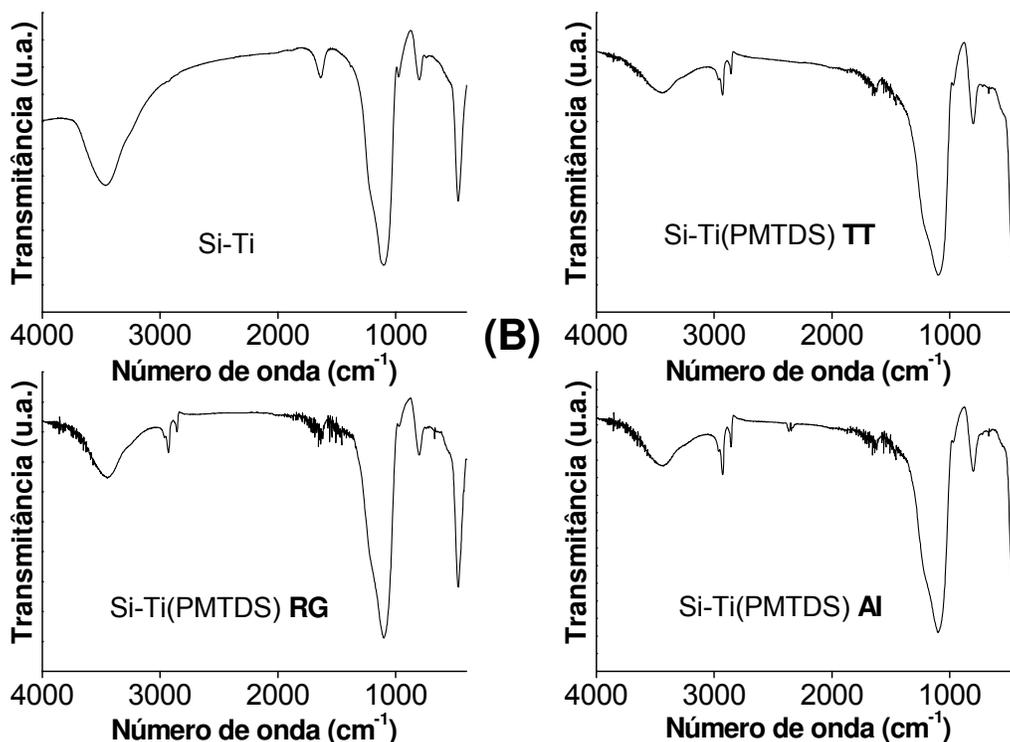


Figura 48. Espectros da região do infravermelho do suporte de sílica zirconizada e das fases Si-Zr(PMTDS) (A) e do suporte de sílica titanizada e das fases Si-Ti(PMTDS) (B).

4.9.4. Ressonância Magnética Nuclear de ²⁹Si

As espécies de silício presentes nas fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foram determinadas por espectroscopia de RMN de ²⁹Si empregando rotação em ângulo mágico com polarização cruzada (CP/MAS). A Figura 49 mostra os espectros de RMN CP/MAS de ²⁹Si para as fases Si-Zr(PMTDS) obtidas pelos diferentes procedimentos de imobilização e de uma fase Si(PMTDS) imobilizada termicamente nas condições otimizadas segundo Tonhi¹³³.

Os espectros de RMN de ²⁹Si apresentam um aumento da área dos picos na faixa de -10 a -30 ppm das fases baseadas em suporte de sílica zirconizada em comparação com a contraparte baseada em sílica nua. O PMTDS mostra ressonância em -21 ppm e a ocorrência crescente de picos em deslocamentos químicos diferentes nesta região indicam a formação de novas espécies de silício relacionadas ao PMTDS presentes nas fases estacionárias. Estes novos sinais são atribuídos a um número maior de interações do PMTDS com o suporte de sílica zirconizada, estas interações estão associadas às cadeias do PMTDS que estão fracamente ligadas ou fisicamente adsorvidas (D¹ e D^{1H}) e também quimicamente ligadas (D²) à

superfície do suporte¹⁸⁸. Ao que tudo indica, a presença de zircônio no suporte cromatográfico aumenta a atividade dos grupos superficiais do suporte, favorecendo a formação de um número maior de interações entre o PMTDS e a sílica zirconizada. Estes novos sinais bem como as espécies encontradas nos espectros das fases estacionárias preparadas neste trabalho estão apresentados na Figura 50.

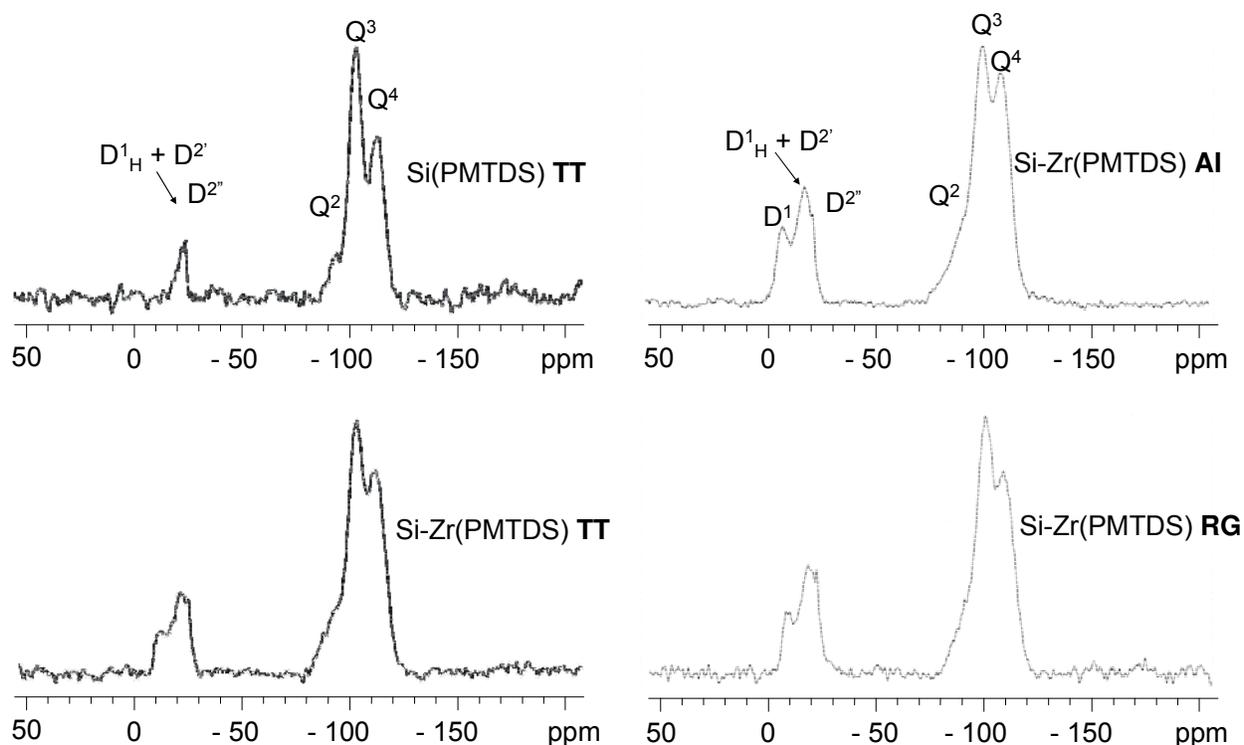


Figura 49. Espectros de RMN de ²⁹Si das fases Si-Zr(PMTDS) e de uma fase Si(PMTDS) imobilizada termicamente.

Outras espécies de silício foram detectadas nas fases Si-Zr(PMTDS) e Si(PMTDS), as quais são descritas como Qⁿ, onde *n* está relacionado ao número de ligações Si-O-Si¹⁸⁸. Nos espectros de RMN de ²⁹Si, o Q⁴ (tetrassiloxano), o Q³ (hidrossiloxano) e o Q² (diidrossiloxano) foram detectados a -110, -101 e -94 ppm, respectivamente. De uma maneira geral, as FE baseadas no suporte de sílica zirconizada apresentam uma redução das quantidades de grupos silanóis, redução da razão das espécies Q²/Q⁴ e Q³/Q⁴ em relação à FE baseada no suporte de sílica nua, como apresentado na Figura 49. A diferença deve estar relacionada à formação de ligações Si-O-Zr e do maior número de interações entre o PMTDS e o suporte de sílica zirconizada, os quais reduzem a razão entre estes sinais. Dentre as FE baseadas em sílica zirconizada, a obtida por auto-imobilização foi a que apresentou menor número de grupos silanóis (menor razão Q³/Q⁴), provavelmente devido ao longo tempo de sorção ao qual o

PMTDS fora submetido, alcançando de forma mais eficiente os grupos silanóis presentes em poros mais difíceis de serem acessados pelo polímero.

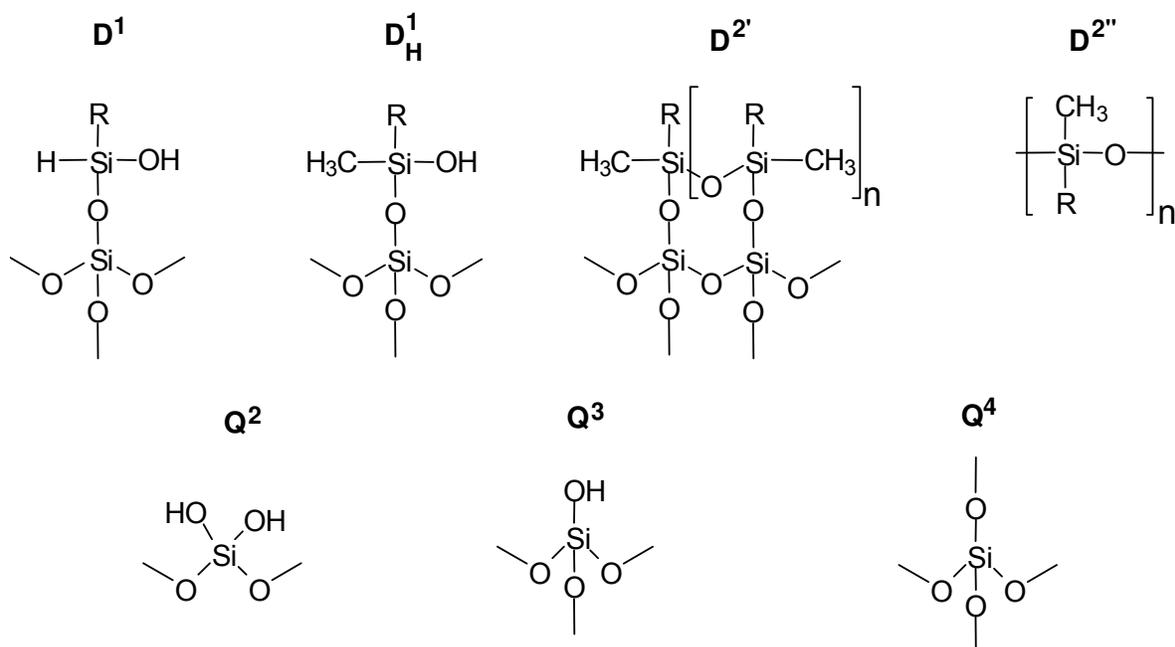


Figura 50. Espécies de silício presentes nas fases estacionárias.

Os espectros de RMN de ²⁹Si das fases Si-Ti(PMTDS), preparadas pelos diferentes procedimentos de imobilização, apresentaram as mesmas espécies de silício detectadas nas fases Si-Zr(PMTDS), como podem ser observados na Figura 51. No entanto, a menor área dos picos na região compreendida por -10 a -30 ppm nas fases Si-Ti(PMTDS) comparada às fases baseadas em suportes de sílica zirconizada sugerem um menor grau de interação entre o PMTDS e a sílica titanizada. Por sua vez, estes resultados corroboram com as avaliações cromatográficas destas fases, as quais apresentaram parâmetros de retenção, em números absolutos, inferiores à contraparte de sílica zirconizada. Apesar do menor grau de interação, provavelmente devido à menor reatividade dos grupos superficiais da sílica titanizada, observa-se nos espectros que foi possível detectar a presença de cadeias poliméricas adsorvidas fisicamente (D¹ e D_H¹) e também ligadas quimicamente neste suporte.

Outra característica importante das fases Si-Ti(PMTDS) foi a maior razão das espécies Q²/Q⁴ e Q³/Q⁴, em comparação às obtidas pelas fases Si-Zr(PMTDS), indicando a presença de um número maior de grupos silanóis geminais (Q²) e livres (Q³) nestas fases. No entanto, a menor reatividade destes grupos com a presença de titânia no suporte, comparada ao efeito da presença da zircônia, fornece caudas menos acentuadas para compostos básicos que as fases

Si-Zr(PMTDS), como visto cromatograficamente, e, em alguns casos, similares aos fatores de assimetria obtidos pelas fases Si(PMTDS). Comparadas à fase de PMTDS baseada em suporte de sílica nua, as fases Si-Ti(PMTDS) apresentaram razões Q^2/Q^4 e Q^3/Q^4 inferiores, sugerindo a presença de um número menor de grupos silanóis livres. Dentre os procedimentos de imobilização aplicados nas fases Si-Ti(PMTDS), o que apresentou a maior razão Q^3/Q^4 foi o fenômeno de auto-imobilização, sugerindo maior número de grupos residuais (não recobertos pela camada polimérica).

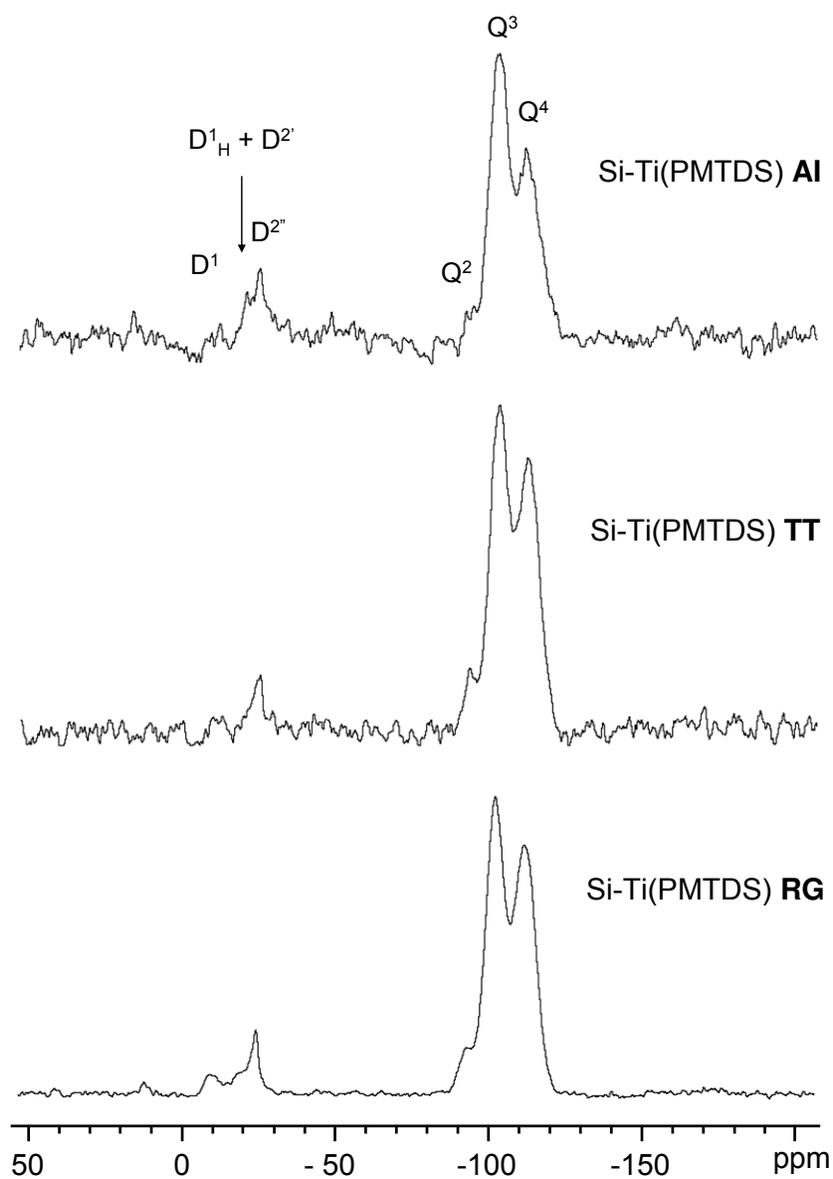


Figura 51. Espectros de RMN de ^{29}Si das fases Si-Ti(PMTDS).

4.10. Caracterização cromatográfica das fases estacionárias

Os métodos físico-químicos empregados na avaliação das fases estacionárias se fazem necessários para um melhor conhecimento das características superficiais destas fases, porém, são insuficientes e, de pequena relevância, para a prática cromatográfica. Complementarmente, testes empíricos simples e de caráter universal, possibilitando a avaliação de qualquer fase estacionária reversa, foram desenvolvidos para medir e especificar interações discretas entre compostos simples, a fase estacionária e a fase móvel. Alguns destes testes foram desenvolvidos por Engelhardt e Jungheim¹⁵⁸ e Tanaka e colaboradores¹⁵⁷. Estes autores propuseram misturas-teste bastante simples, que, quando analisadas em fases móveis adequadas, fornecem informações relevantes sobre as propriedades e a conveniência analítica da fase estacionária.

4.10.1. Mistura-teste de Engelhardt

As fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS), preparadas pelos diferentes procedimentos de imobilização, foram aplicadas na separação de alguns compostos da mistura-teste de Engelhardt e Jungheim¹⁵⁸ para a caracterização da atividade silanofílica (atividade dos grupos silanóis residuais) e da seletividade hidrofóbica (ou hidrofobicidade) destas fases. A Figura 52 apresenta os cromatogramas da separação dos compostos da mistura-teste pelas fases Si-Zr(PMTDS).

As fases Si-Zr(PMTDS) apresentaram algumas diferenças na eluição dos compostos da mistura de Engelhardt. A anilina foi eluída posteriormente ao fenol na fase imobilizada por radiação gama devido a maior atividade silanofílica desta fase em relação às fases auto-imobilizadas e imobilizadas termicamente. O fator de assimetria mais acentuado para o pico da N,N-dimetilanilina nas fases imobilizadas por radiação gama também confirma a maior atividade dos grupos residuais nestas fases, como mostrado na Figura 52.

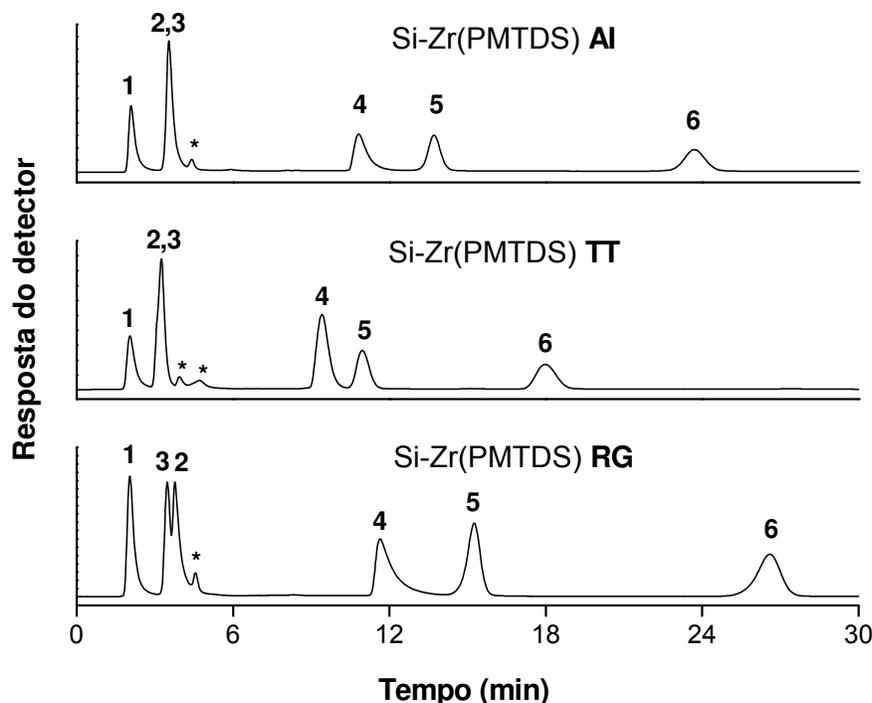


Figura 52. Cromatogramas da separação da mistura-teste de Engelhardt e Jungheim pelas fases Si-Zr(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (55:45, v/v); 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) anilina, (3) fenol, (4) N,N-dimetilanilina, (5) tolueno, (6) etilbenzeno e (*) impurezas.

Outros parâmetros cromatográficos avaliados pela mistura de Engelhardt foram a hidrofobicidade (medida pelo fator de retenção do etilbenzeno) e a seletividade hidrofóbica das fases Si-Zr(PMTDS) ($\alpha_{CH_2} = k_{etilbenzeno}/k_{tolueno}$). Estes valores estão dispostos na Tabela 27. Observa-se que as fases apresentaram seletividade hidrofóbica praticamente idêntica, enquanto que a hidrofobicidade das fases obtidas por radiação gama foi superior devido a maior quantidade de PMTDS imobilizada na sílica zirconizada. Apesar das fases imobilizadas por radiação gama apresentarem maior hidrofobicidade (maior grau de recobrimento polimérico) que as fases auto-imobilizadas e imobilizadas termicamente, o desempenho cromatográfico diante de compostos básicos foi inferior com alto fator de assimetria para a N,N-dimetilanilina, sugerindo uma maior quantidade de sítios residuais.

Tabela 27. Caracterização cromatográfica das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) pela mistura-teste de Engelhardt.

Fases	α_{CH_2}	$As_{(anilina)}/As_{(fenol)}$	$As_{(N,N-dimetilanilina)}$	$k_{etilbenzeno}$	% PMTDS
Si-Zr(PMTDS) AI	1,9	1,0	2,1	10,3	20,6
Si-Zr(PMTDS) TT	1,8	1,0	3,2	8,0	16,7
Si-Zr(PMTDS) RG	1,9	1,2	4,9	12,3	22,3
Si-Ti(PMTDS) AI	1,6	0,9	0,9	7,4	18,3
Si-Ti(PMTDS) TT	1,6	2,9	3,6	5,8	17,2
Si-Ti(PMTDS) RG	1,5	1,0	1,6	4,6	16,9

A separação da mistura-teste de Engelhardt e Jungheim pelas fases Si-Ti(PMTDS), imobilizadas pelos diferentes procedimentos, resultou em comportamentos diferentes de acordo com o grau de recobrimento das fases (quantidade de PMTDS imobilizada). A anilina foi eluída um pouco antes do pico fenol nas fases Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizada e imobilizada por raios gama, enquanto que na fase estacionária imobilizada termicamente a anilina apresentou cauda acentuada sendo eluída um minuto depois do fenol, como pode ser observado pelos cromatogramas da Figura 53. Além disso, o pico da N,N-dimetilanilina nas fases auto-imobilizadas e imobilizadas por raios gama apresentou fator de assimetria similar ao obtido em fases estacionárias baseadas em suportes de sílica nua. Nas fases Si-Ti(PMTDS) imobilizadas termicamente a atividade silanofílica foi extremamente alta, eluindo a N,N-dimetilanilina após o tolueno devido ao baixo recobrimento da superfície do suporte com a camada de PMTDS. A seletividade metilênica (α_{CH_2}) das fases com suportes de sílica titanizada foram muito similares entre si, apesar de apresentarem menor seletividade se comparadas à contraparte com suporte de sílica zirconizada, em números absolutos (Tabela 27). A menor seletividade metilênica e menor hidrofobicidade das fases Si-Ti(PMTDS), em comparação às fases Si-Zr(PMTDS), está associada a menor quantidade de PMTDS imobilizada na superfície da sílica titanizada.

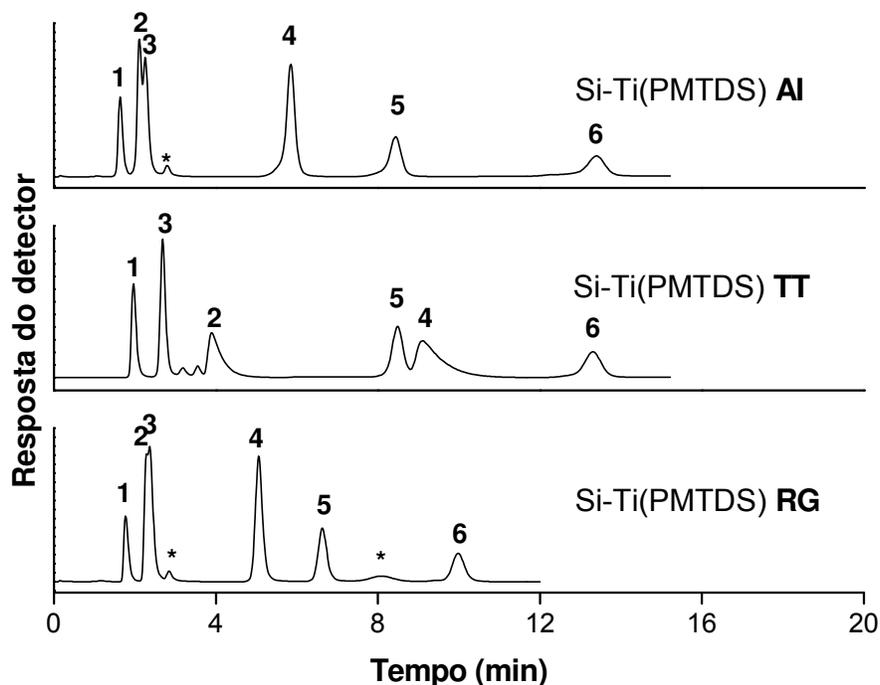


Figura 53. Cromatogramas da separação da mistura-teste de Engelhardt e Jungheim pelas fases Si-Ti(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (55:45, v/v); 0,2 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) anilina, (3) fenol, (4) N,N-dimetilanilina, (5) tolueno, (6) etilbenzeno e (*) impurezas.

4.10.2. Misturas-teste de Tanaka

O protocolo de caracterização desenvolvido por Tanaka e colaboradores¹⁵⁷ é um método bem estabelecido, o qual tem sido estudado por diversos grupos acadêmicos e muitos fabricantes para avaliar a qualidade de suas fases estacionárias. Os parâmetros cromatográficos das fases medidos pelas misturas de Tanaka são altamente relevantes para os cromatografistas. Dentre as propriedades avaliadas incluem-se: o recobrimento superficial, a seletividade hidrofóbica, a seletividade espacial, a capacidade de ligação de hidrogênio e a capacidade de troca iônica em pH 2,7 e 7,6. O protocolo de Tanaka foi usado neste trabalho para avaliar propriedades sutis das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) em separações cromatográficas. Os resultados encontrados para estas fases estacionárias foram comparados com bases de dados na literatura^{155,156}, na quais são apresentadas as propriedades de mais de 130 fases estacionárias comerciais diferentes, à base de sílica e zircônia.

A hidrofobicidade ($k_{\text{etilbenzeno}}$), a seletividade hidrofóbica (α_{CH_2}) e a seletividade espacial ($\alpha_{\text{T/O}}$) das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foram obtidas pela eluição da mistura A (uracila, butilbenzeno, pentilbenzeno, *o*-terfenila e trifenileno) do protocolo de Tanaka. Os

cromatogramas obtidos para as fases Si-Zr(PMTDS) preparadas pelos diferentes procedimentos de imobilização estão apresentados na Figura 54.

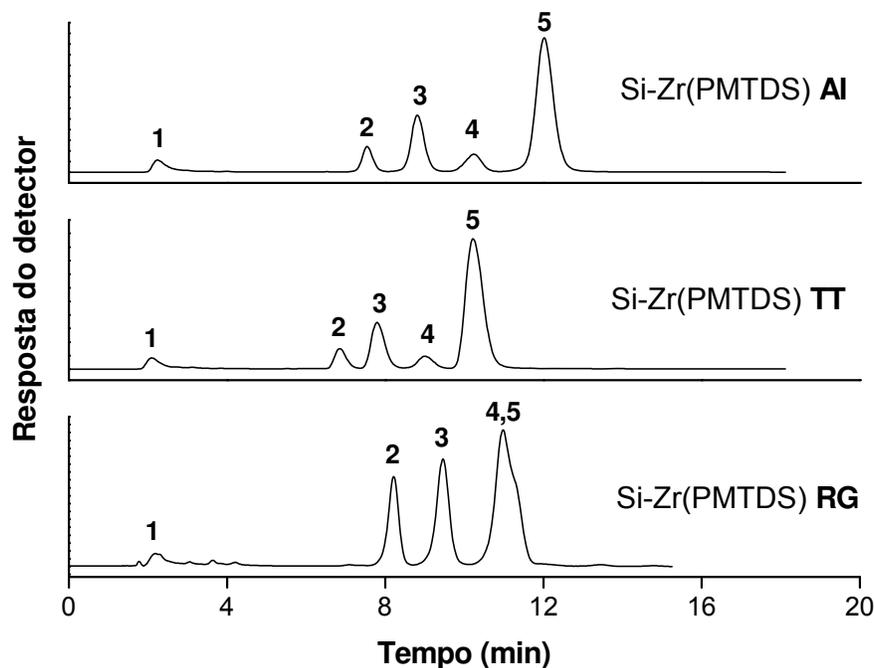


Figura 54. Cromatogramas da separação da mistura-teste A do protocolo de Tanaka pelas fases Si-Zr(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (80:20, v/v); $0,3 \text{ mL min}^{-1}$; volume de amostra: $5 \mu\text{L}$; detecção a 254 nm e temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Compostos testes: (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) pentilbenzeno, (4) *o*-terfenil e (5) trifenileno.

Nota-se nos cromatogramas da Figura 54 que os picos do butilbenzeno e pentilbenzeno, mesmo com uma alta percentagem do componente orgânico na fase móvel (80 %), apresentaram boa resolução em todas as fases Si-Zr(PMTDS), as quais forneceram seletividades hidrofóbicas (α_{CH_2}) idênticas (Tabela 28). A hidrofobicidade das fases foi dependente da quantidade de PMTDS imobilizado na superfície da sílica zirconizada, quanto maior a % PMTDS maior a hidrofobicidade. A seletividade estérica (α_{TIO}) das fases Si-Zr(PMTDS) foram dependentes do procedimento de imobilização aplicado. As fases auto-imobilizada e imobilizada termicamente apresentaram boa seletividade estérica devido à boa resolução entre os picos do *o*-terfenil e trifenileno, no entanto, não foi possível obter resolução adequada destes compostos nas fases imobilizadas por radiação gama. Provavelmente, o maior grau de entrecruzamento das cadeias do PMTDS obtido com a imobilização por raios gama sobre o suporte diminui o espaçamento entre as moléculas do PMTDS o suficiente para não se obter seletividade espacial apropriada. Engelhardt et al.¹⁸⁹ propuseram que um amplo

diâmetro de poros é essencial para que as fases estacionárias obtenham resolução para o *o*-terfenil e o trifenileno. Como mostrado na Tabela 26, as fases imobilizadas por radiação gama apresentaram diâmetro de poros bem menores que as fases imobilizadas termicamente e auto-imobilizadas. Este fato deve ter contribuído com a falta de seletividade espacial das fases Si-Zr(PMTDS) imobilizadas por radiação gama.

Tabela 28. Características cromatográficas das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) obtidas pelas misturas-teste de Tanaka.

Fases	k_{pb}	α_{CH_2}	$\alpha_{T/O}$	$\alpha_{C/P}$	$\alpha_{B/P}$ pH 7,6	$\alpha_{B/P}$ pH 2,7
Si-Zr(PMTDS) AI	3,0	1,2	1,2	1,1	–	–
Si-Zr(PMTDS) TT	2,7	1,2	1,2	0,9	–	–
Si-Zr(PMTDS) RG	3,3	1,2	1,0	1,1	–	–
Si-Ti(PMTDS) AI	1,9	1,0	1,0	0,6	9,9	1,6
Si-Ti(PMTDS) TT	2,4	1,0	1,2	0,9	8,4	1,9
Si-Ti(PMTDS) RG	2,2	1,2	1,1	0,6	15,1	2,9

(–) não foi possível a obtenção dos parâmetros.

As fases Si-Ti(PMTDS), independente do procedimento de imobilização, apresentaram seletividades hidrofóbicas muito similares às fases Si-Zr(PMTDS) (Tabela 28). Os valores obtidos para estas fases se encontram dentro da faixa determinada para fases estacionárias comerciais à base de C8 e C18 quimicamente ligados à superfície de sílica nua^{155,156}. Outra característica interessante das fases Si-Ti(PMTDS) foi a seletividade espacial (ou estérica). Somente a fase imobilizada termicamente apresentou resolução adequada entre os compostos da mistura-teste A do protocolo de Tanaka. Conforme observado na Figura 55, a baixa quantidade de PMTDS imobilizada na superfície do suporte de sílica titanizada pode ser o fator principal para a separação ineficiente destes compostos, uma vez que a fase móvel apresenta uma alta percentagem de componente orgânico.

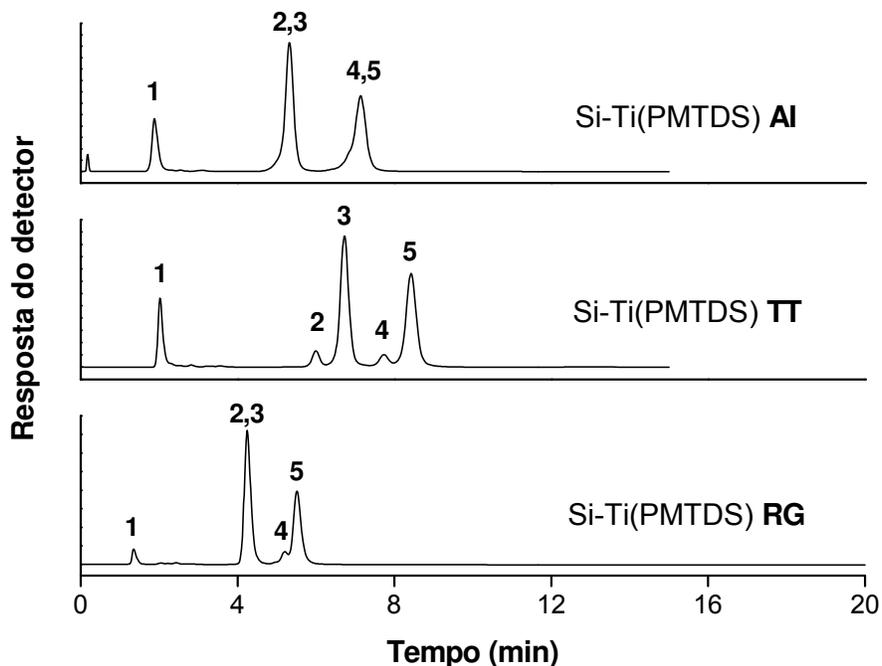


Figura 55. Cromatogramas da separação da mistura-teste A do protocolo de Tanaka pelas fases Si-Ti(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (80:20, v/v); 0,2 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) butilbenzeno, (3) pentilbenzeno, (4) o-terfenil e (5) trifenileno.

A capacidade de ligação de hidrogênio das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foi obtida pela razão dos fatores de retenção da cafeína e do fenol ($\alpha_{C/P}$), empregando a mistura-teste B do protocolo de Tanaka. Os resultados estão dispostos na Tabela 28. As fases Si-Zr(PMTDS) apresentaram uma alta capacidade de se fazer ligação de hidrogênio, praticamente co-eluindo os picos do fenol e da cafeína na fase imobilizada termicamente e invertendo a ordem de eluição nas fases imobilizada por raios gama e auto-imobilizada, como pode ser visto na Figura 56. As fases Si-Ti(PMTDS) apresentaram uma melhor separação da cafeína e do fenol devido à baixa capacidade de formação de ligação de hidrogênio (Figura 57), com valores similares aos obtidos por fases estacionárias comerciais^{155,156}. Como discutido anteriormente, o zircônio aumenta a atividade dos grupos residuais do suporte cromatográfico, os quais não foram recobertos pela camada de PMTDS, de forma mais acentuada que a proporcionada pelo titânio, acarretando no aumento da capacidade das fases baseadas no suporte de sílica zirconizada de fazerem ligações de hidrogênio.

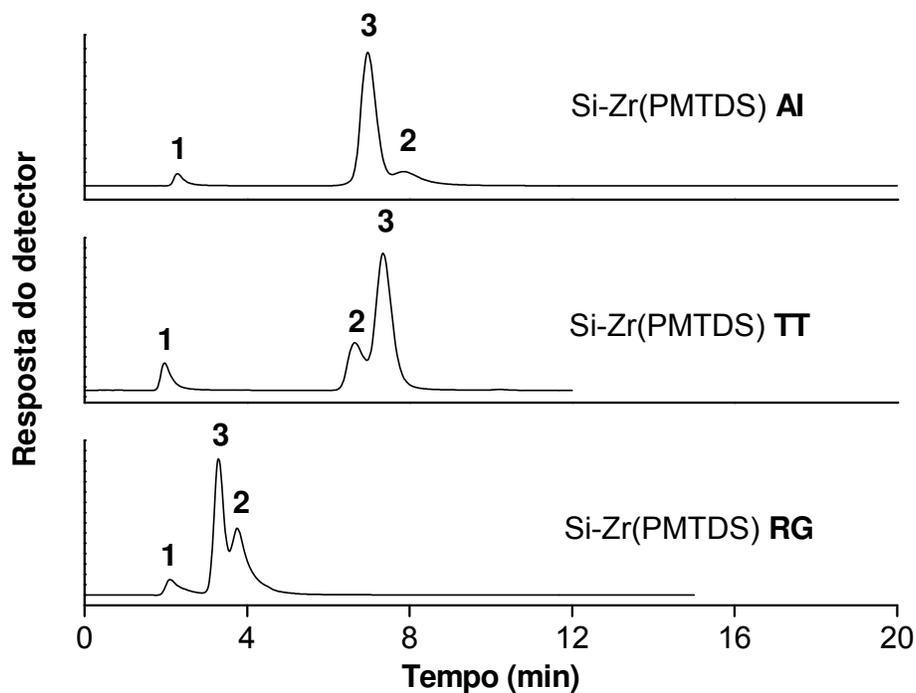


Figura 56. Cromatogramas da separação da mistura-teste B do protocolo de Tanaka pelas fases Si-Zr(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (30:70, v/v); 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) cafeína e (3) fenol.

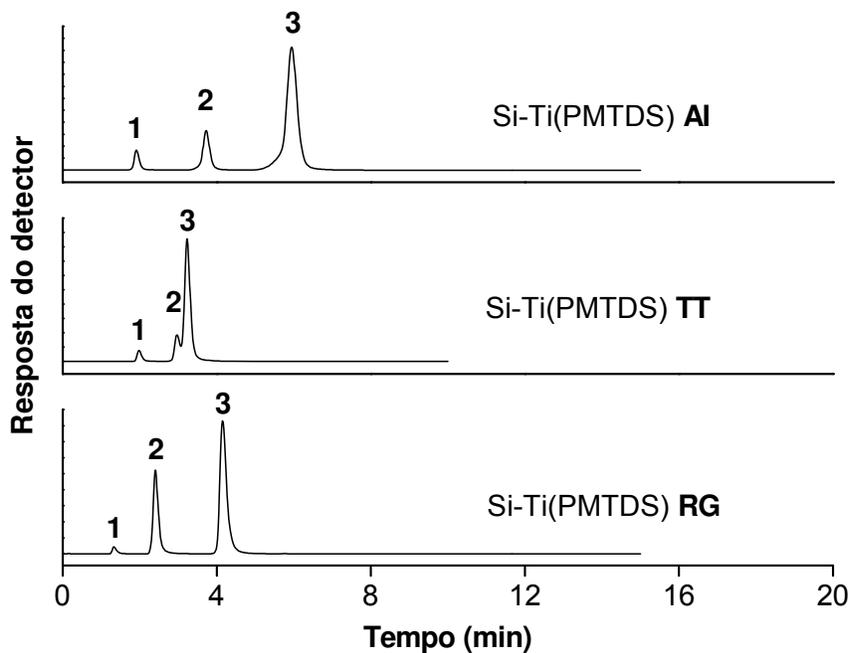


Figura 57. Cromatogramas da separação da mistura-teste B do protocolo de Tanaka pelas fases Si-Ti(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (30:70, v/v); 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) cafeína e (3) fenol.

As misturas-teste C e D do protocolo de Tanaka foram separadas pelas fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) para a determinação da atividade silanofílica total e da acidez dos grupos silanóis residuais das fases, respectivamente. Estas misturas são constituídas de um composto básico (benzilamina, $pK > 9$) e um composto ácido (fenol) que são analisados em fases móveis tamponadas com valores diferentes de pH, (mistura C: pH 7,6 e mistura D: pH 2,7).

As fases Si-Zr(PMTDS), independente do procedimento de imobilização, apresentaram atividade silanofílica total extremamente elevada. Em pH 7,6, a maioria dos grupos silanóis residuais se encontram desprotonados (Si-O^-), os quais interagiram fortemente com a benzilamina (que se encontra protonada nesta condição) pelo processo de troca iônica, retendo-a irreversivelmente, como mostrado na Figura 58. Esta forte interação está associada à presença do zircônio que direta (atuando como sítios ácidos de Lewis residuais) ou indiretamente (aumento da acidez de silanóis residuais adjacentes) impossibilitou a eluição do pico da benzilamina e os cálculos dos valores de $\alpha_{B/P}$, como mostrado na Tabela 28. No entanto, foi possível obter a eluição da benzilamina nas fases Si-Ti(PMTDS), apesar de terem apresentado caudas bastante acentuadas nestas fases (Figura 59). A atividade silanofílica das fases Si-Ti(PMTDS) ($\alpha_{B/P}$) estão apresentadas na Tabela 28. Estes resultados sugerem uma menor quantidade de grupos silanóis residuais nas fases Si-Ti(PMTDS). De acordo com os cromatogramas da Figura 59, as fases imobilizadas por raios gama apresentam a maior atividade silanofílica. Além disso, os valores de $\alpha_{B/P}$ determinados para as fases Si-Ti(PMTDS) são similares aos obtidos para fases comerciais baseadas em suportes de óxidos metálicos, como indicado na literatura para as fases estacionárias de zircônia-PBD^{155,156}.

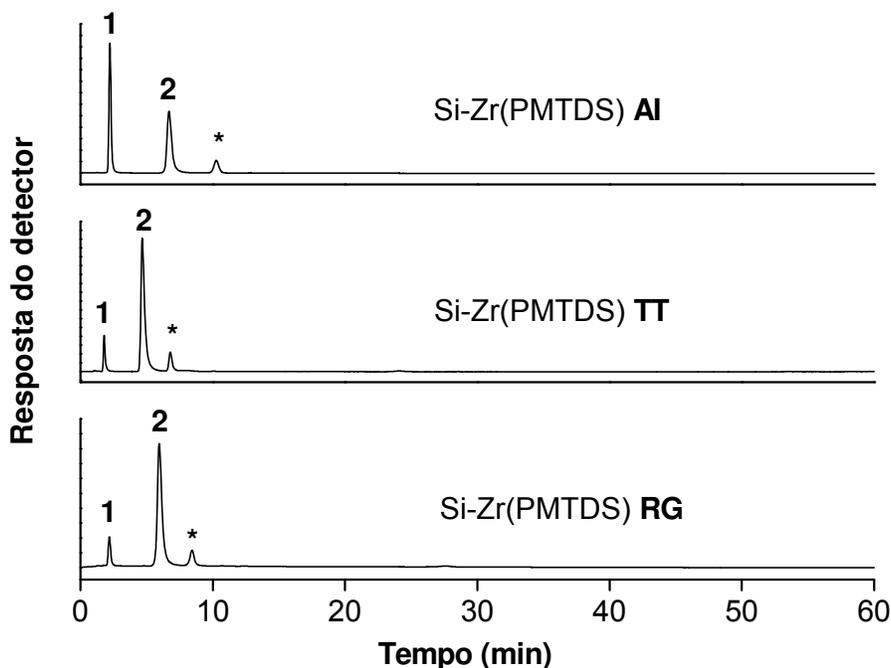


Figura 58. Cromatogramas da separação da mistura-teste C do protocolo de Tanaka pelas fases Si-Zr(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹ (30:70, v/v) pH 7,6; 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas.

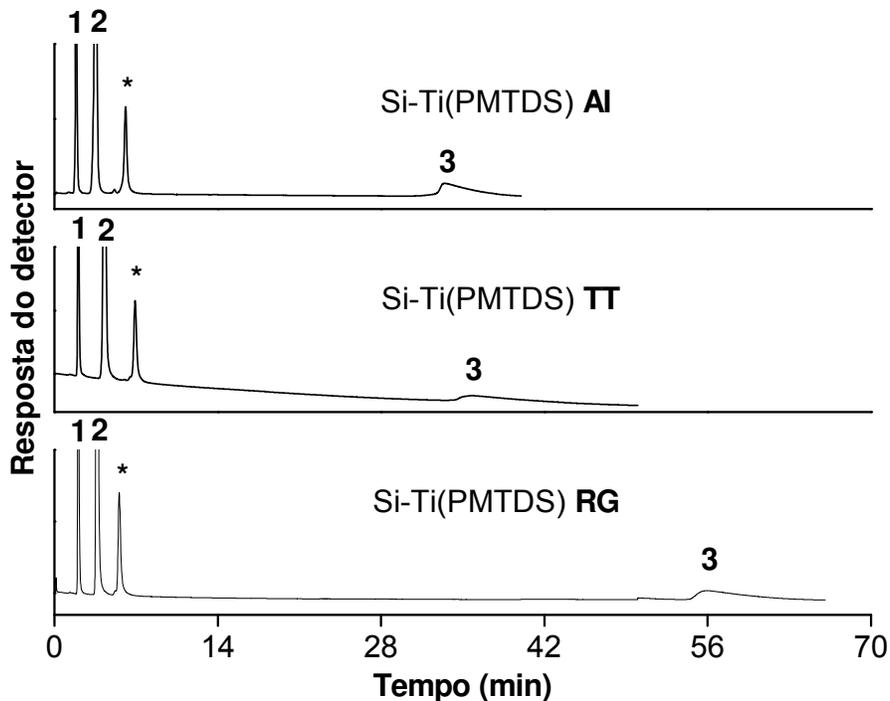


Figura 59. Cromatogramas da separação da mistura-teste C do protocolo de Tanaka pelas fases Si-Ti(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0,02 mol L⁻¹ (30:70, v/v) pH 7,6; 0,2 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas.

A acidez dos grupos silanóis residuais das fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foi avaliada pela separação da mistura-teste D do protocolo de Tanaka. Em meio ácido a pH 2,7, a benzilamina também não foi eluída nas fases com suporte de sílica zirconizada, ficando irreversivelmente retida na coluna cromatográfica (Figura 60). Isto implica que os grupos residuais são extremamente ácidos, sugerindo que um grande número destes grupos ainda está na forma desprotonada em pH 2,7 e interagiram com a benzilamina, a qual se encontra na forma catiônica nesta condição. Esta acidez, conforme mencionado em outras oportunidades, está relacionada à presença de átomos de zircônio adjacentes a grupos silanóis e também aos grupos zirconóis não recobertos pela camada polimérica nas fases Si-Zr(PMTDS), os quais atuam como fortes sítios de interações retendo irreversivelmente compostos altamente básicos, como a benzilamina.

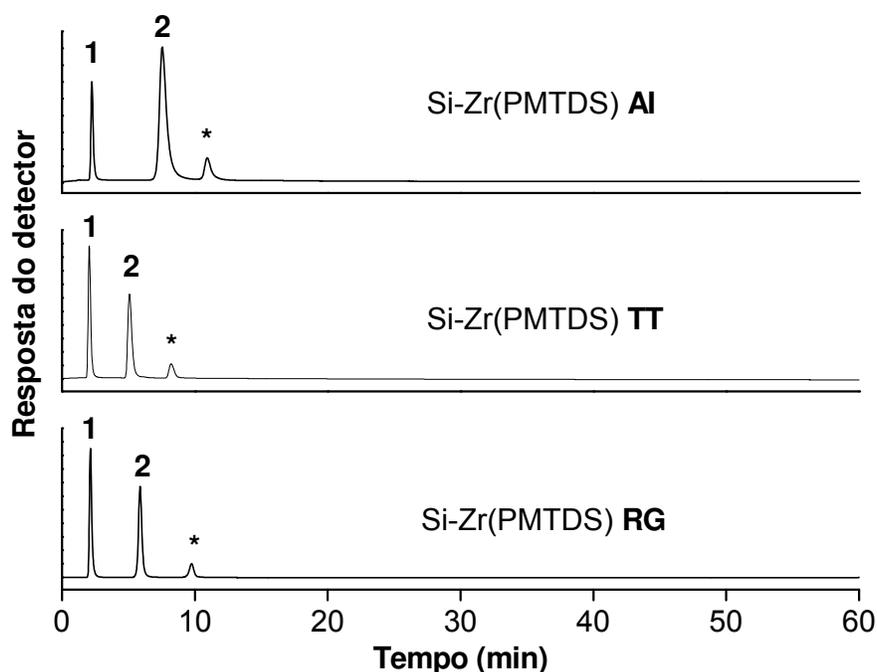


Figura 60. Cromatogramas da separação da mistura-teste D do protocolo de Tanaka pelas fases Si-Zr(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:KH₂PO₄/H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹ (30:70, v/v) pH 2,7; 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas.

A acidez dos grupos residuais foi muito menos acentuada nas fases Si-Ti(PMTDS), o tempo total de análise para a eluição da benzilamina em pH 2,7 pelas fases Si-Ti(PMTDS) foi inferior a 15 minutos (Figura 61). Os valores $\alpha_{B/P, 2,7}$ apresentados na Tabela 28 para as fases Si-Ti(PMTDS) são similares às fases estacionárias comerciais baseadas em suportes de sílica

nua com maior grau de impureza metálica, conforme mostrado no estudo de Euerby e colaboradores^{155,156}. A fase estacionária com PMTDS imobilizado por raios gama foi a que apresentou maior acidez dos grupos residuais, enquanto que a auto-imobilizada foi a que apresentou menor acidez, apresentando $\alpha_{B/P}$ 2,7 inferior a muitas fases disponíveis comercialmente à base de C8 ou C18 quimicamente ligado à sílica^{155,156}.

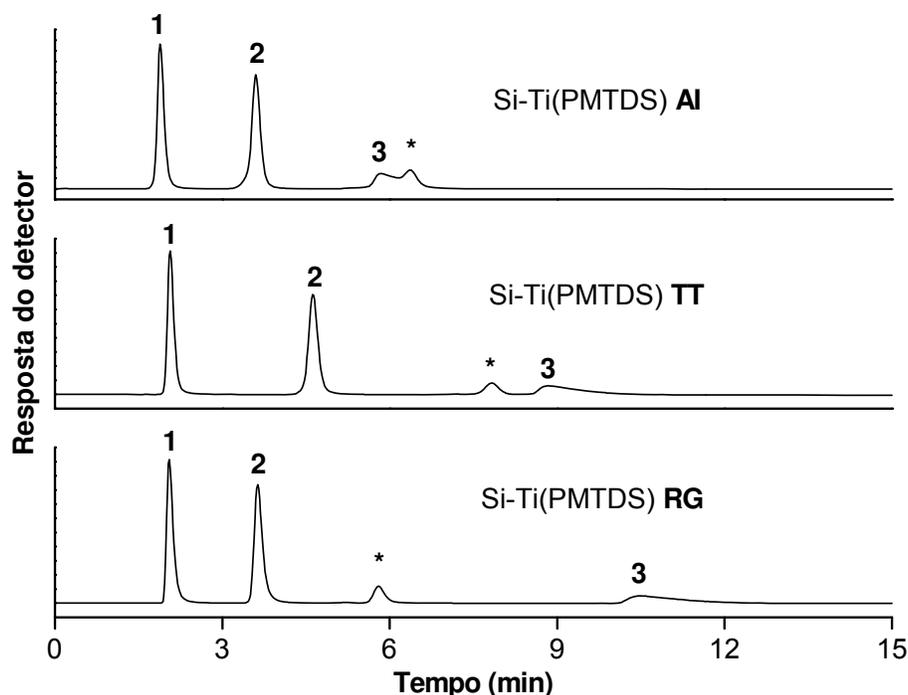


Figura 61. Cromatogramas da separação da mistura-teste D do protocolo de Tanaka pelas fases Si-Ti(PMTDS). Condições cromatográficas: fase móvel metanol:KH₂PO₄/H₃PO₄ 0,02 mol L⁻¹ (30:70, v/v) pH 2,7; 0,2 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; detecção a 254 nm e temperatura de 40 °C. Compostos testes: (1) uracila, (2) fenol, (3) benzilamina e (*) impurezas.

4.11. Estabilidade química das fases estacionárias

A estabilidade química das fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) foram avaliadas em condições alcalinas drásticas de análise. Esta avaliação é comumente realizada pela passagem contínua de uma fase móvel, em condições previamente definidas, através das colunas, avaliando periodicamente o desempenho cromatográfico por um analito-teste ou mistura-teste. Neste estudo, a fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (70:30, v/v) foi eluída através das colunas contendo as fases estacionárias a uma vazão de 1 mL min⁻¹, empregando uma temperatura de 50 °C, sendo avaliada quanto ao desempenho

cromatográfico pela mistura-teste II do LabCrom. Estes valores maiores de temperatura e de concentração do tampão da fase móvel foram utilizados para acelerar a degradação da fase estacionária, reduzindo o tempo total da avaliação e, principalmente, o volume de fase móvel. Estas condições permitem a obtenção mais rápida da estabilidade química das fases estacionárias, sem perdas de informações, comparadas a testes de estabilidades que empregam condições mais brandas de análise.

Para efeito de comparação, foi avaliada a estabilidade de fases estacionárias com PMTDS imobilizado, pelos mesmos procedimentos, sobre suporte de sílica nua – Si(PMTDS) – e, também, de quatro fases estacionárias comerciais com grupos C18 quimicamente ligados à superfície de sílica, empregando as mesmas condições de análise das fases com PMTDS imobilizadas sobre os suportes de sílicas metalizadas.

A estabilidade dos parâmetros de retenção das fases estacionárias foi avaliada pela medição periódica do fator de retenção (k) do acenafteno (analito-teste) com a passagem contínua da fase móvel a pH 10. Os resultados obtidos para cada uma das fases estacionárias avaliadas estão dispostos na Figura 62. A evolução do fator de retenção do acenafteno foi expressa em termos de volumes de coluna (V_{col}). Cada volume de coluna corresponde à quantidade de fase móvel necessária para preencher os espaços dentro da coluna cromatográfica não ocupados pela fase estacionária, $V_{col} = 0,40$ mL.

Os fatores de retenção do acenafteno apresentaram uma pequena redução nas fases com PMTDS imobilizado pelos diferentes procedimentos sobre as sílicas metalizadas e sílica nua, enquanto que nas fases comerciais permaneceram praticamente constantes. Esta pequena redução nos valores do fator de retenção nas fases estacionárias com suportes de sílicas nua, zirconizada e titanizada indica a perda de PMTDS. Apesar desta pequena redução do fator de retenção nas fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS), a separação cromatográfica não foi comprometida com o decorrer do experimento, como mostrado nos cromatogramas de uma destas fases antes e após o teste de estabilidade na Figura 63.

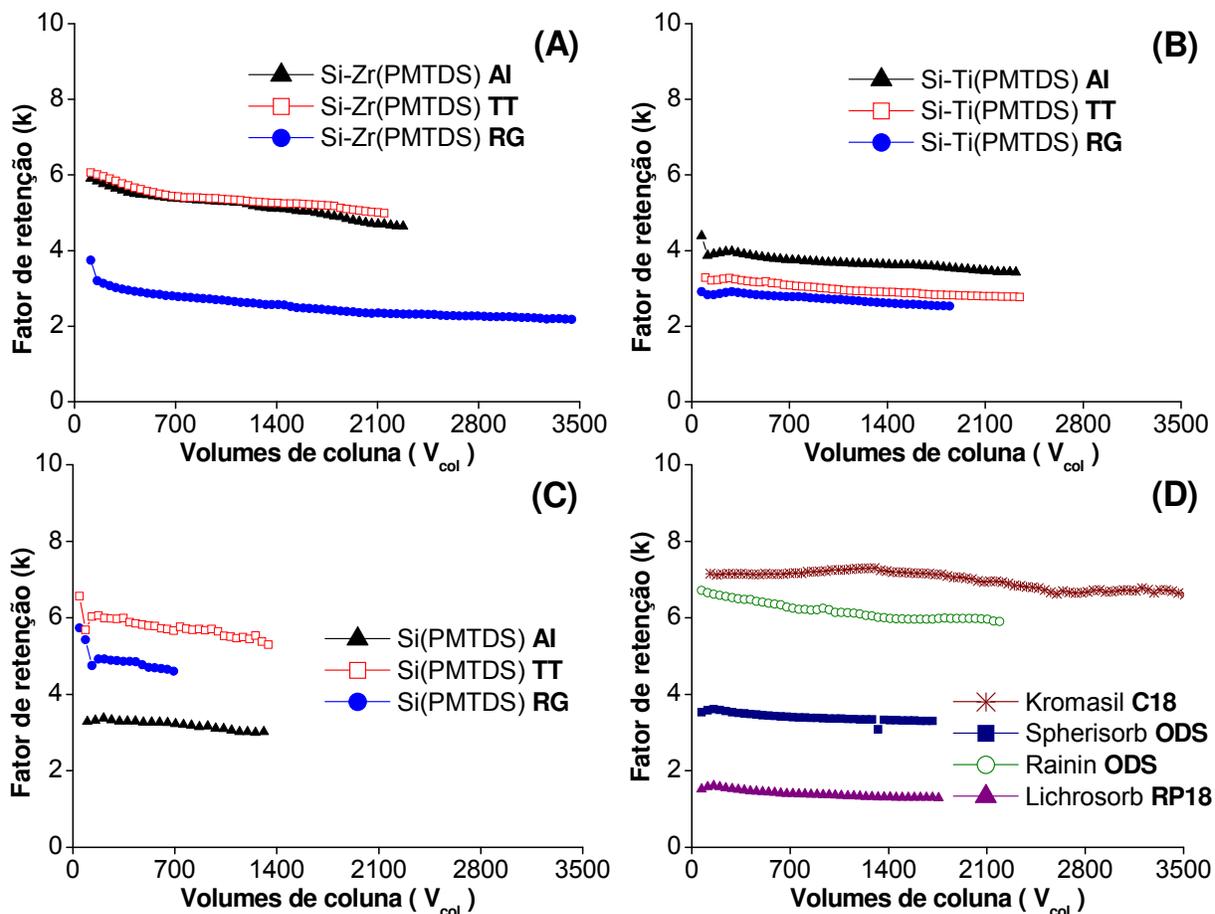


Figura 62. Variação do fator de retenção das fases (A) Si-Zr(PMTDS), (B) Si-Ti(PMTDS), (C) Si(PMTDS) e (D) comerciais quimicamente ligadas à base de C18 com a passagem de fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (70:30, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 1 µL; Temperatura do forno da coluna: 50 °C; detecção UV-vis a 254 nm. Analito-teste: acenafteno.

O fator de retenção não é a forma mais adequada de avaliação da estabilidade de fases estacionárias, pois se percebe claramente que o desempenho da fase estacionária no fim do teste não é mais o mesmo do início, apesar de ainda haver separação cromatográfica (Figura 63). Portanto, uma melhor medida da estabilidade de uma determinada fase estacionária é a perda de sua eficiência de coluna com a passagem da fase móvel. Quando a fase estacionária é submetida à eluição da fase móvel em condições mais drásticas ocorre, em um determinado momento, uma queda brusca da sua eficiência de coluna, à qual indica mudanças significativas no leito cromatográfico que o torna ineficiente para separações cromatográficas. Normalmente, esta queda brusca ocorre quando a eficiência da coluna atinge 50 % do seu valor inicial¹⁹⁰.

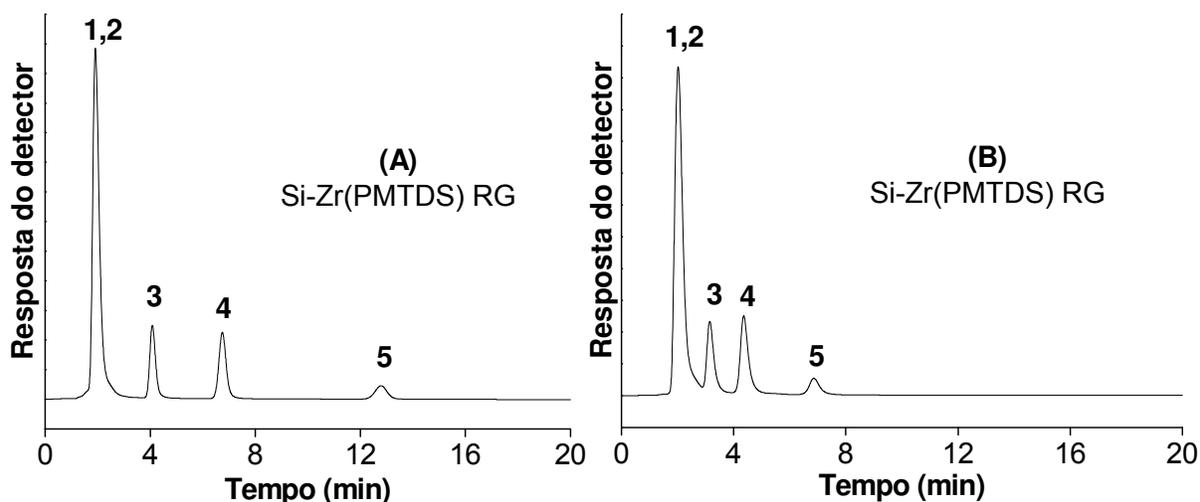


Figura 63. Cromatogramas da separação dos compostos da mistura-teste II, antes (A) e após (B) o teste de estabilidade, pela fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada por raios gama. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (70:30, v/v); vazão de 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra 1 µL; temperatura de 50 °C; detecção UV-Vis a 254 nm.

A Figura 64 apresenta o comportamento da eficiência de coluna das fases estacionárias com a passagem constante da fase móvel tamponada em pH 10. A eficiência de coluna foi medida para o pico do acenafteno eluído em cada uma das fases estacionárias. A estabilidade das fases estacionárias avaliadas neste estudo foi melhor determinada pela variação da eficiência em função do número de volume de coluna passado através das colunas cromatográficas. Empregando fase móvel tamponada a pH 10 e temperatura de 50 °C, as fases estacionárias baseadas na imobilização do PMTDS sobre sílica nua – Si(PMTDS) – não apresentaram praticamente nenhuma durabilidade nestas condições. A partir do início do teste, se inicia também a perda de eficiência de coluna das fases Si(PMTDS) e, em 200 V_{col} , a fase imobilizada termicamente perde sua habilidade de separação. As fases Si(PMTDS) auto-imobilizada e imobilizada por raios gama apresentaram estabilidades químicas idênticas, durando cerca de 50 V_{col} a mais que a fase imobilizada termicamente. Esta rápida queda de eficiência de coluna indica a rápida dissolução do suporte de sílica nas condições alcalinas drásticas e, conseqüentemente, perda de camada polimérica adsorvida e/ou ligada ao suporte.

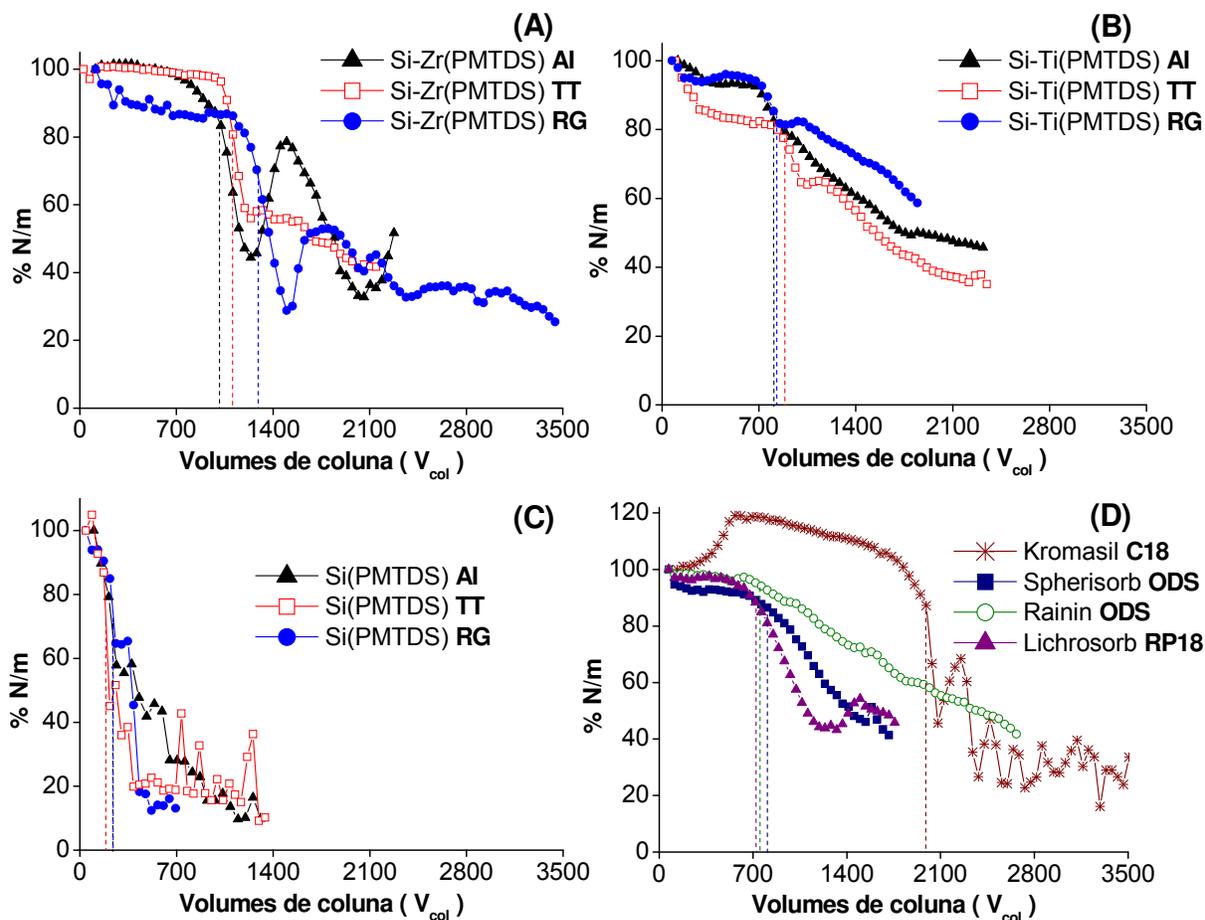


Figura 64. Variação da eficiência de coluna das fases (A) Si-Zr(PMTDS), (B) Si-Ti(PMTDS), (C) Si(PMTDS) e (D) comerciais quimicamente ligadas à base de C18 com a passagem de fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (70:30, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 1 μL; Temperatura do forno da coluna: 50 °C; detecção UV-vis a 254 nm. Analito-teste: acenafteno.

Em contrapartida, as fases estacionárias baseadas nos suportes de sílicas metalizadas apresentaram estabilidade muito maior, pelo menos quatro vezes superior, nas condições alcalinas de análise. As fases Si-Ti(PMTDS) apresentaram estabilidade química, mantendo bom desempenho cromatográfico, por mais de 800 V_{col} de fase móvel alcalina eluídos pelas colunas cromatográficas, a partir dos quais se observam uma ligeira queda da eficiência, indicando o início da degradação das fases estacionárias (Figura 64B). O procedimento de imobilização aplicado ao PMTDS sobre a sílica titanizada não apresentou influência significativa na estabilidade das respectivas fases. A fase Si-Ti(PMTDS) imobilizada por tratamento térmico apresentou estabilidade química por cerca de 80 V_{col} a mais que as fases auto-imobilizada e imobilizada por raios gama, as quais obtiveram estabilidades muito similares em pH 10.

As fases estacionárias com PMTDS imobilizado sobre a sílica zirconizada foram ainda mais estáveis, apresentando um longo platô de eficiência por mais de 1.000 V_{col}, como pode ser

visto na Figura 64A. A fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada por raios gama foi a que resultou na maior estabilidade química, resistindo a passagem de mais de 1.300 V_{col} eluídos pela coluna cromatográfica, enquanto que a fase imobilizada termicamente apresentou estabilidade por 1.100 V_{col} e a fase auto-imobilizada por cerca de 1.000 V_{col} . A maior estabilidade da fase imobilizada por raios gama está relacionada ao maior grau de entrecruzamento obtido para as cadeias do PMTDS sobre a sílica zirconizada, se comparado ao obtido pelos demais procedimentos de imobilização, fornecendo uma melhor proteção do suporte cromatográfico ao ataque da fase móvel alcalina.

Com estes resultados observa-se que a presença do óxido metálico, zircônia ou titânia, no suporte de sílica cromatográfica aumenta significativamente a resistência das fases estacionárias em condições alcalinas, prolongando, desta forma, o tempo de utilização das mesmas. Este aumento de estabilidade ficou entre quatro e seis vezes. Além disso, após o teste de estabilidade todas as colunas foram abertas e foi observada uma cavidade no topo das mesmas. Esta cavidade foi maior nas fases Si(PMTDS) devido a maior dissolução do suporte sílica, apresentando cerca de 20 mm de profundidade. As colunas contendo as fases com suporte de sílica metalizada apresentaram um pequeno vão, cerca de 3 a 5 mm de profundidade, devido à menor dissolução do suporte de sílica com a presença dos óxidos metálicos. As fases Si-Zr(PMTDS) foram mais estáveis que as baseadas em suporte de sílica titanizada, provavelmente, devido à maior quantidade de zircônio incorporado às partículas de sílica, cerca de 20 % (m/m) contra apenas 8 % (m/m) de titânio, fornecendo maior proteção ao suporte cromatográfico. Outro fator que pode ter contribuído para a maior estabilidade das fases Si-Zr(PMTDS) em relação às fases Si-Ti(PMTDS) é à formação de algumas ligações químicas entre o zircônio e a sílica (Si-O-Zr), as quais são mais estáveis que as interações fracas que governam as ligações entre o titânio e a sílica.

A estabilidade das fases estacionárias baseadas nos suportes de sílica metalizada foi comparada também à estabilidade de fases estacionárias disponíveis comercialmente. A estabilidade de quatro fases estacionárias de grupos C18 quimicamente ligado à sílica foi avaliada nas mesmas condições empregadas para as fases preparadas no laboratório. A fase Kromasil-C18 apresentava-se também capeada com grupos CH_3 , para melhor proteção do suporte cromatográfico. Esta fase foi justamente a que apresentou a maior resistência química nas condições avaliadas, sendo estável à eluição de mais de 2.000 V_{col} . As demais fases estacionárias comerciais, sem etapa de capeamento, apresentaram estabilidade química um pouco inferior às fases Si-Ti(PMTDS), por até 750 V_{col} , e bem menor que as fases Si-Zr(PMTDS). Em todas as colunas contendo as fases comerciais também foi observada uma

cavidade, de aproximadamente 10 mm de profundidade, devido à dissolução do suporte de sílica.

Outro parâmetro cromatográfico avaliado, em fase móvel tamponada em pH 10, foi o fator de assimetria para o pico do acenafteno obtido pelas diferentes fases estacionárias. A Figura 65 apresenta o comportamento do fator de assimetria em função do número de volumes de coluna obtido pela passagem da fase móvel a pH 10 para cada uma das fases estacionárias estudadas.

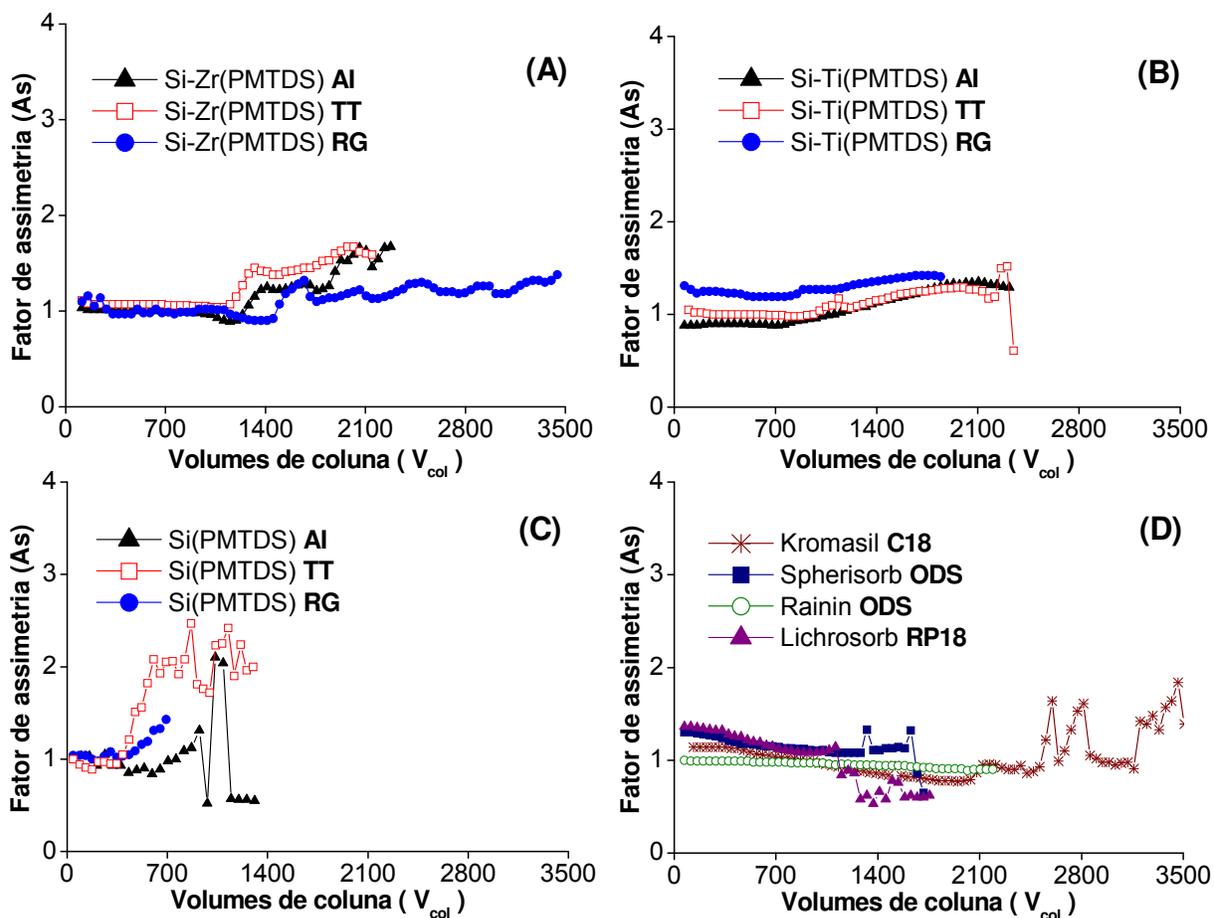


Figura 65. Variação do fator de assimetria para o pico do acenafteno obtido pelas fases (A) Si-Zr(PMTDS), (B) Si-Ti(PMTDS), (C) Si(PMTDS) e (D) comerciais quimicamente ligadas à base de C18 com a passagem de fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (70:30, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 1 µL; Temperatura do forno da coluna: 50 °C; detecção UV a 254 nm.

O comportamento do fator de assimetria (As) para o pico do naftaleno nas fases acompanha o comportamento da eficiência. A partir do momento que a fase estacionária perde a sua capacidade para análises cromatográficas ocorre uma desordem do fator de assimetria, aumentando ou reduzindo os seus valores. Esta desordem no comportamento dos valores de

As ocorre simultaneamente à queda abrupta dos valores de eficiência, como pode ser visto na Figura 65, principalmente para as fases baseadas em sílica zirconizada, sílica nua e para as fases comerciais. As fases Si-Ti(PMTDS) não apresentou muita desordem no comportamento dos seus fatores de assimetria, provavelmente devido ao recheio cromatográfico à pressão mais alta que as demais fases, nominalmente a 52 MPa contra 38 MPa. Desta forma, foi obtida uma melhor compactação do leito cromatográfico nestas fases, a qual não permitiu maiores rearranjos da fase estacionária dentro da coluna com a perda de sílica e de polímero no decorrer do teste de estabilidade. No entanto, observa-se que a partir de 750-800 V_{col} ocorreu um ligeiro e contínuo aumento do fator de assimetria nestas fases, independente do procedimento de imobilização aplicado. O mesmo ocorreu para os valores de eficiência de coluna destas fases que a partir de 750-800 V_{col} diminuiu gradativamente com a passagem da fase móvel alcalina a pH 10.

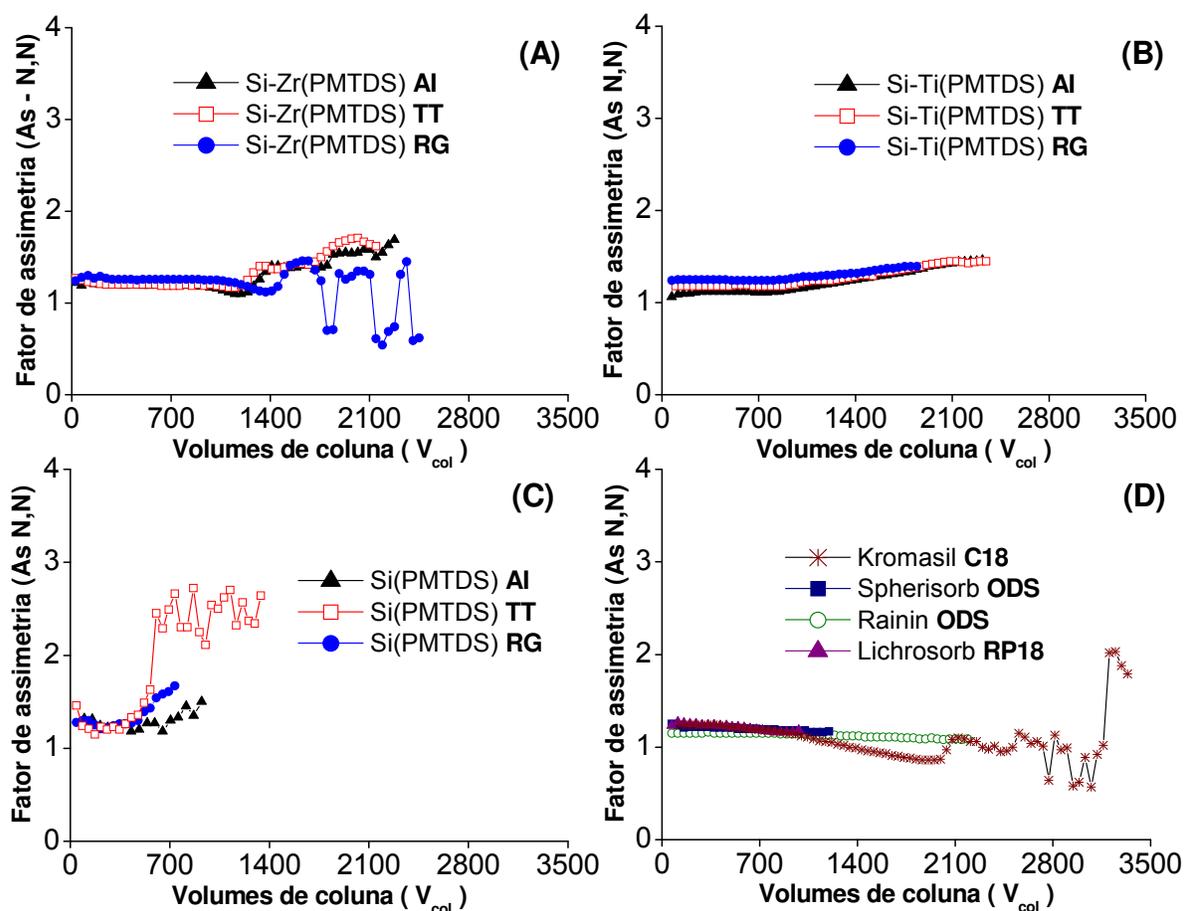


Figura 66. Variação do fator de assimetria para o pico da N,N-dimetilanilina obtido pelas fases (A) Si-Zr(PMTDS), (B) Si-Ti(PMTDS), (C) Si(PMTDS) e (D) comerciais quimicamente ligadas à base de C18 com a passagem de fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (70:30, v/v); vazão de 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 1 μ L; Temperatura do forno da coluna: 50 °C; detecção UV a 254 nm.

O comportamento do fator de assimetria para o pico do composto básico da mistura-teste II, a N,N-dimetilanilina, também foi avaliado com a passagem contínua da fase móvel metanol:0,050 mol L⁻¹ K₂CO₃/KHCO₃ a pH 10 (70:30, v/v), como pode ser visto na Figura 65. Nesta condição de pH, as interações indesejáveis entre a N,N-dimetilanilina e os grupos residuais presentes nas fases estacionárias são minimizadas, pois ambos os compostos se encontram desprotonados, resultando em uma separação governada principalmente por mecanismos de interações hidrofóbicas. Desta forma, o comportamento dos fatores de assimetria para a N,N-dimetilanilina obtidos nas fases preparadas no laboratório e, também, nas fases disponíveis comercialmente (Figura 66) é muito similar ao comportamento dos fatores de assimetria obtidos para o acenafteno (composto mais apolar da mistura), Figura 65.

A dissolução da sílica das fases estacionárias aumenta a proporção de polímero ou de grupos quimicamente ligados em relação ao suporte após o término do teste de estabilidade. Na Tabela 29 estão apresentados os valores de percentagem de PMTDS e de carbono das fases estacionárias, preparadas no laboratório e quimicamente ligadas, respectivamente, antes e após o teste de estabilidade. O aumento da % C (ou % PMTDS) das fases estacionárias no final do teste de estabilidade, em relação à percentagem antes do teste, indica a perda principalmente do suporte de sílica devido à sua dissolução na fase móvel alcalina. Desta forma, ocorre um aumento da proporção de material orgânico ligado ou imobilizado comparado com o material inorgânico (suporte), e, conseqüentemente, o aumento da % C nestas fases. De acordo com a Tabela 29, as fases Si(PMTDS) foram as que apresentaram a dissolução de maior quantidade do suporte de sílica devido ao maior aumento da % C, implicando em uma menor proteção do suporte nas condições avaliadas se comparada às demais fases. Por outro lado, quando ocorre uma diminuição da % C no final do teste, em relação à % inicial, implica que, com a passagem contínua da fase móvel, houve maior perda de material ligado ou imobilizado (C18 ou PMTDS) que do suporte cromatográfico. As fases com suporte de sílica metalizada e as fases comerciais perderam principalmente material orgânico nas condições drásticas de análise. As perdas de polímero nas fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS), após o término do teste, está relacionada a lixiviação do PMTDS fracamente adsorvido ao suporte pela fase móvel. Estes resultados sugerem que a presença das camadas de óxidos metálicos no suporte cromatográfico aumenta a resistência do mesmo em condições mais drásticas, haja vista a menor dissolução da sílica nas fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS). Os suportes cromatográficos das fases comerciais Rainin ODS, Spherisorb ODS e Lichrosorb RP18 apresentam alta percentagem de impurezas metálicas¹⁹¹ e, pelo mesmo motivo das fases com

suporte de sílica metalizada, resultaram em uma menor dissolução da sílica nas condições alcalinas avaliadas. Fases estacionárias com suportes de sílica de maior grau de pureza, como é o caso das fases Si(PMTDS), apresentam menor estabilidade química em condições alcalinas¹⁹⁰. Outro fator que influencia positivamente na estabilidade química de uma fase estacionária em condições mais drásticas é a realização da reação de capeamento após o preparo da fase, como visto para a fase Kromasil C18, a mais estável entre todas as avaliadas.

Tabela 29. Percentagem de material ligado ou imobilizado ao suporte cromatográfico, nas fases estacionárias preparadas no laboratório e comerciais, antes e após o teste de estabilidade.

Fases	% C antes	% C depois	% PMTDS antes	% PMTDS depois
Si(PMTDS) AI	16,6	21,1	23,7	30,1
Si(PMTDS) TT	17,1	19,8	24,4	28,3
Si(PMTDS) RG	17,2	20,4	24,6	29,1
Si-Zr(PMTDS) AI	14,4	13,5	20,6	19,3
Si-Zr(PMTDS) TT	14,9	14,8	21,3	21,1
Si-Zr(PMTDS) RG	15,6	11,5	22,3	16,4
Si-Ti(PMTDS) AI	11,5	7,5	16,4	10,7
Si-Ti(PMTDS) TT	13,8	10,8	19,7	15,4
Si-Ti(PMTDS) RG	14,1	9,3	20,1	13,3
Kromasil C18	20,0	19,0	–	–
Rainin ODS	10,8	10,0	–	–
Spherisorb ODS	5,2	4,2	–	–
Lichrosorb RP18	5,2	4,4	–	–

4.12. Estudos de aplicação das fases estacionárias

Algumas fases estacionárias preparadas pela imobilização do PMTDS sobre suportes de sílicas metalizadas, nas condições previamente otimizadas, foram aplicadas na separação de algumas classes de compostos, tais como agroquímicos e fármacos. A potencialidade destas fases foi avaliada pela capacidade de separação de compostos que normalmente são difíceis de serem separados e eluídos isocraticamente com boa eficiência em fases estacionárias disponíveis comercialmente. Em todas as avaliações, colunas cromatográficas, de 60 × 3,9 mm de d.i., foram recheadas com as fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) ou Si-Ti(PMTDS). Colunas comerciais recheadas com fases estacionárias quimicamente ligadas foram utilizadas para critério de comparação. As colunas empregadas para tal finalidade foram: Kromasil-C18, 5 μm de diâmetro de partículas em uma coluna de 125 × 4,6 mm; coluna monolítica Chromolith-RP18, 100 × 4,6 mm; e, Luna-C8, recheada com partículas de 5 μm em uma coluna com dimensões de 125 × 4,6 mm de d.i.

4.12.1. Separação de agroquímicos

A aplicabilidade da fase estacionária Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente a 100 °C por 12 h foi avaliada pela separação de seis agroquímicos de classes diferentes. Estes agroquímicos são comumente empregados para o controle de doenças e ervas daninhas nas culturas de laranja e soja, de extrema importância para a agricultura brasileira (ver Figura 13). O cromatograma da separação destes compostos pela fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente está ilustrado na Figura 67. Para efeito de comparação, uma fase estacionária comercial, Kromasil-C18, foi utilizada na separação destes agroquímicos, empregando as mesmas condições de análise da fase preparada no laboratório (Figura 67).

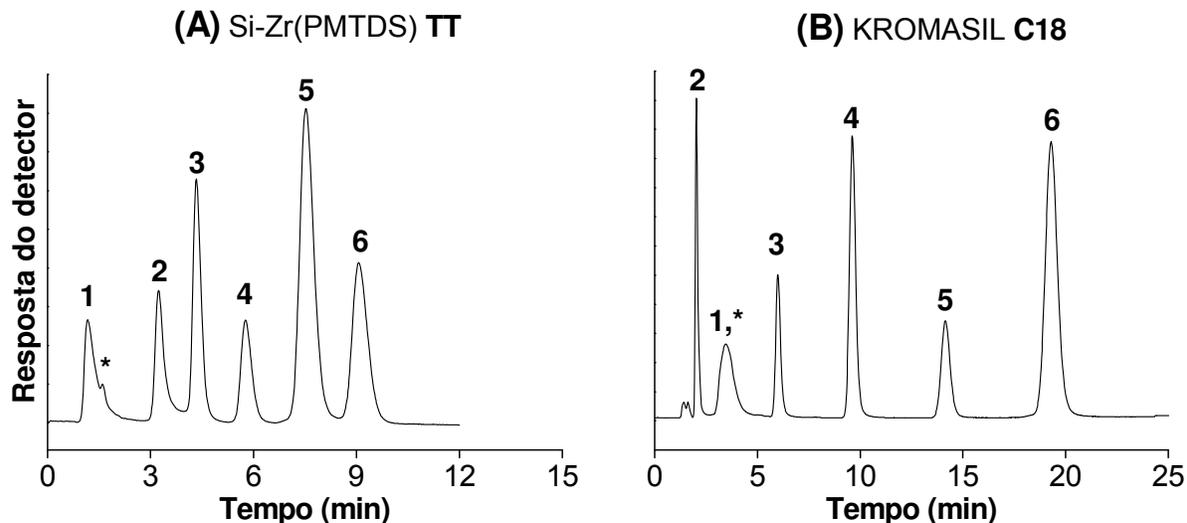


Figura 67. Cromatogramas da separação de uma mistura de agroquímicos pelas fases (A) Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente a 100 °C por 12 h e (B) Kromasil C18. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (50:50, v/v); vazão de (A) 0,3 mL min⁻¹ e (B) 0,8 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; temperatura de 25 °C; detecção UV a 254 nm. Compostos: (1) imazetapir, (2) cianazina, (3) carboxim, (4) atrazina, (5) diurom, (6) linurom e (*) produto de degradação do imazetapir. A diferença nas intensidades dos picos de um mesmo composto nos cromatogramas se deve ao preparo de diferentes misturas-teste ao longo deste estudo.

Apesar da utilização de uma coluna mais curta, 60 × 3,9 mm de d.i., a fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente apresentou uma separação com boa resolução para os seis agroquímicos, utilizando fase móvel neutra e isocrática (metanol:água 50:50, v/v). A fase comercial também apresentou uma excelente separação dos agroquímicos nestas condições, no entanto, o tempo total de análise foi praticamente o dobro do tempo gasto para a eluição destes compostos na fase Si-Zr(PMTDS), como pode ser observado na Figura 67, devido ao maior comprimento da coluna. O imazetapir (pico #1) foi o primeiro composto a ser eluído na fase Si-Zr(PMTDS), devido à característica mais ácida desta fase como revelado pelo protocolo de Tanaka, enquanto que na fase comercial normalmente é necessária a utilização de fases móveis mais ácidas, pelo menos a pH 3, para que a ordem de eluição seja mantida¹⁹². Estes resultados implicam que uma aplicação potencial da fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente é a separação de agroquímicos. Devido às características similares das fases Si-Zr(PMTDS), preparadas pelos diferentes procedimentos de imobilização, esta conclusão a respeito da aplicabilidade da fase imobilizada termicamente na separação de agroquímicos pode ser seguramente estendida às fases Si-Zr(PMTDS) auto-imobilizada e imobilizada por raios gama.

4.12.2. Separação de fármacos

A separação de quatro fármacos de características diferentes, duas drogas antiinflamatórias não esteroidais (paracetamol e ibuprofeno) e dois antidepressivos (lorazepam e alprazolam) (ver Figura 14), foi realizada pela fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada por raios gama a 120 kGy. Devido à alta capacidade de troca iônica das fases estacionárias baseadas em suportes de sílica zirconizada a separação destes fármacos, alguns dos quais possuem valores de pKa acima de 9, somente foi possível pela utilização de fases móveis com altos valores de pH. A Figura 68 mostra o cromatograma da separação das quatro drogas, empregando fase móvel metanol:0,020 mol L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 11 (50:50, v/v). Nesta condição de fase móvel, todos os compostos estão na sua forma livre e não interagem com os grupos residuais da fase Si-Zr(PMTDS) que estão completamente desprotonados, minimizando as caudas bem como o tempo de retenção dos picos dos fármacos (inferior a 10 minutos), conforme pode ser observado na Figura 68.

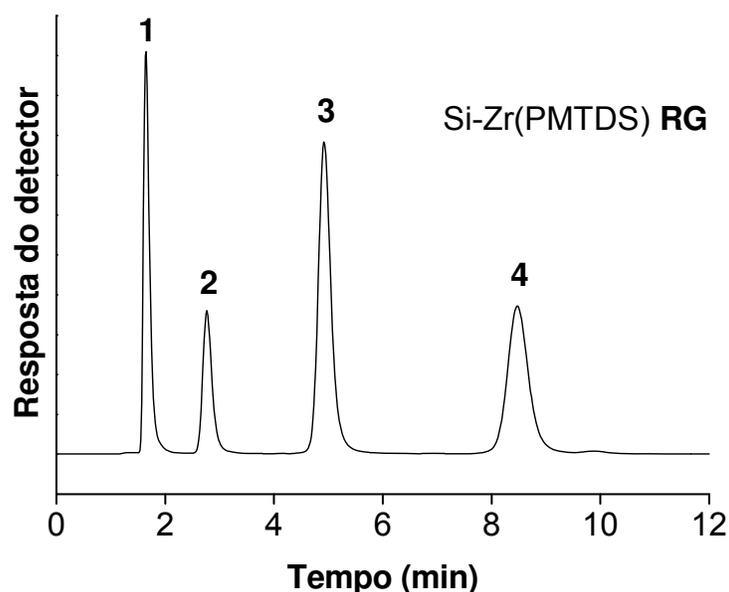


Figura 68. Cromatogramas da separação de uma mistura de fármacos pela fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada por raios gama a 120 kGy. Condições cromatográficas: fase móvel metanol:0,020 mmol L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄ a pH 11 (50:50, v/v); vazão de 0,3 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 μL; temperatura de 25 °C; detecção UV a 254 nm. Compostos: (1) paracetamol, (2) ibuprofeno, (3) lorazepam e (4) alprazolam.

A aplicabilidade das fases Si-Ti(PMTDS) foi avaliada na separação de fármacos de diferentes características, tais como: compostos altamente básicos e ácidos. Três misturas de fármacos foram separadas pela fase Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente a 120 °C por 12 h

e, também, por fases estacionárias comerciais, para efeito de comparação. Os cromatogramas da separação de uma mistura contendo três fármacos altamente básicos pela fase Si-Ti(PMTDS) e por uma fase contendo o grupo C8 quimicamente ligado à sílica estão apresentados na Figura 69.

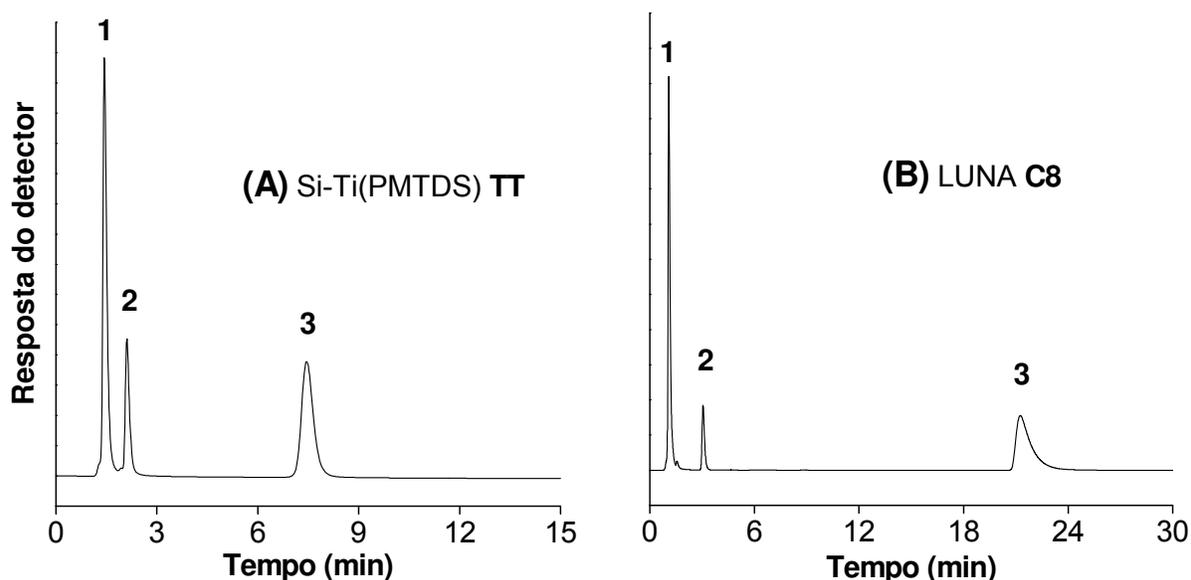


Figura 69. Cromatogramas da separação de uma mistura de fármacos básicos pelas fases (A) Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente a 120 °C por 12 h e (B) Luna C8. Condições cromatográficas: fase móvel (A) metanol:0,020 mol L⁻¹ K₂HPO₄/KH₂PO₄ a pH 12 (80:20, v/v) e (B) metanol:água a pH 7 (65,35, v/v); vazão de (A) 0,3 mL min⁻¹ e (B) 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; temperatura de 25 °C; detecção UV a 254 nm. Compostos: (1) cefalexina, (2) prilocaína e (3) amitriptilina.

A fase contendo o PMTDS imobilizado a 120 °C por 12 h separou satisfatoriamente com picos simétricos os três fármacos, conforme pode ser observado na Figura 69. Para tal, foi empregada uma fase móvel tamponada em pH 12, condição na qual não ocorre a contribuição dos grupos residuais no mecanismo de separação, pois todos os grupos residuais e os fármacos estão em suas formas desprotonadas. Esta condição é possível de ser empregada, uma vez que o suporte de sílica titanizada apresenta maior resistência e vida útil em condições alcalinas de fase móvel que o suporte de sílica nua. Além disso, a eluição destes fármacos na fase Si-Ti(PMTDS) foi bastante rápida, em menos de 9 minutos, enquanto que na fase comercial a análise foi muito demorada, acima de 20 minutos, apresentando cauda acentuada para o composto mais básico da mistura, a amitriptilina (Figura 69). Para a fase comercial foi utilizada uma fase móvel em pH 7, uma vez que a utilização de condições mais alcalinas provoca a destruição da coluna cromatográfica devido à dissolução mais rápida do suporte de sílica.

A separação de fármacos de características ácidas também foi avaliada pela fase Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente a 120 °C por 12 h. A mistura de fármacos foi constituída por três conservantes da classe dos benzodiazepínicos (metil-, propil- e butil-parabeno) comumente encontrados em formulações de diversos comprimidos. A mistura foi separada pela fase Si-Ti(PMTDS) e também por uma fase estacionária monolítica comercial à base de C18. Os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 70.

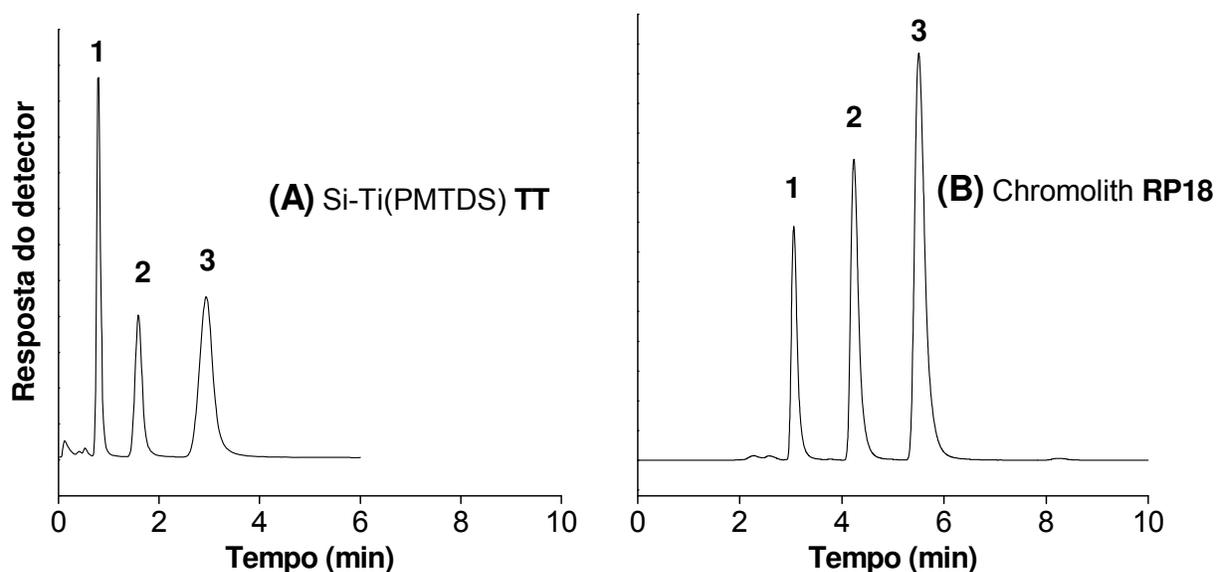


Figura 70. Cromatogramas da separação de uma mistura de fármacos ácidos pelas fases (A) Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente a 120 °C por 12 h e (B) Chromolith RP18. Condições cromatográficas: fase móvel (A) metanol:água (40:60, v/v) e (B) acetonitrila:água (50:50, v/v); vazão de (A) 0,3 mL min⁻¹ e (B) 0,6 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; temperatura de 25 °C; detecção UV a 254 nm. Compostos: (1) metil-, (2) propil-, (3) butil-parabeno. A diferença nas intensidades dos picos de um mesmo composto nos cromatogramas se deve ao preparo de diferentes misturas-teste ao longo deste estudo.

As duas fases estacionárias apresentaram boa separação com resolução adequada para os três compostos ácidos, resultando em eluições inferiores a 4 minutos nas fases Si-Ti(PMTDS) e a 7 minutos na fase comercial. Devido ao caráter mais ácido da fase Si-Ti(PMTDS) os parabenos foram eluídos como picos mais simétricos nesta fase (As entre 1,1 e 1,3) que na fase comercial à base de C18, na qual foram obtidas caudas para os três compostos (As > 1,5). Pode ser observado que a separação de compostos ácidos na fase Si-Ti(PMTDS) requer condições de fase móvel sem a utilização aditivos, como por exemplo metanol:água, comparável à separação de agroquímicos pela fase Si-Zr(PMTDS) imobilizada termicamente (seção 4.12.1.).

A separação de uma mistura de fármacos contendo um composto ácido (ácido acetilsalisílico) e dois ligeiramente básicos (paracetamol e cafeína) também foi avaliada pela fase Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente e comparada à separação obtida por uma fase comercial com grupo C8 quimicamente ligado à sílica. As duas fases apresentaram boa separação para os compostos, com eluições relativamente rápidas, como mostrado nos cromatogramas da Figura 71. Porém, a ordem de eluição foi diferente nas fases estacionárias, devido à maior acidez da fase Si-Ti(PMTDS), o ácido acetilsalisílico foi o primeiro composto a ser eluído nesta fase, enquanto que na fase comercial este composto foi o último a ser eluído, e, mesmo assim, sendo necessário a utilização de uma fase móvel em pH 2,5 para acelerar sua eluição.

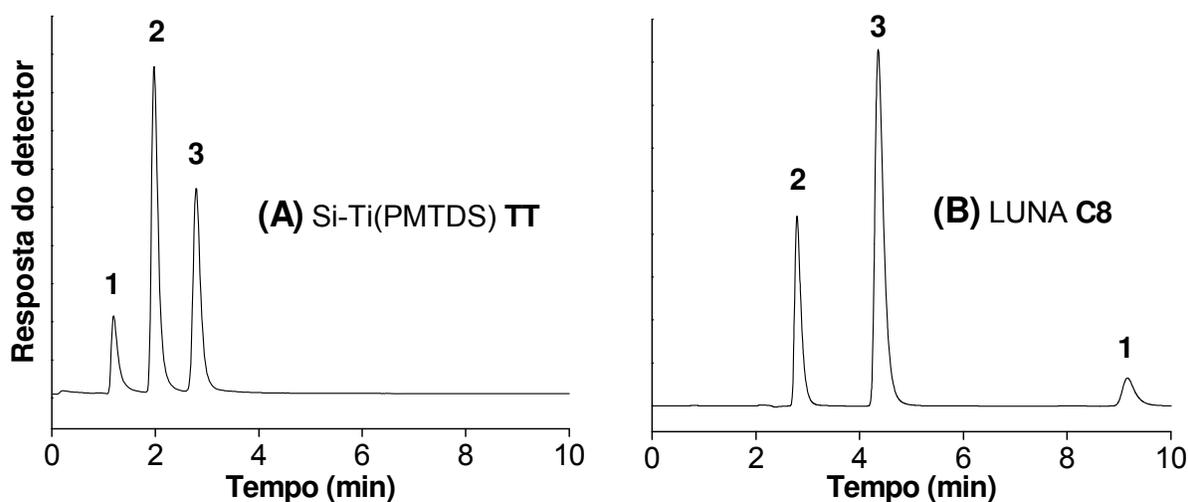


Figura 71. Cromatogramas da separação de uma mistura de fármacos pelas fases (A) Si-Ti(PMTDS) imobilizada termicamente a 120 °C por 12 h e (B) Luna C8. Condições cromatográficas: fase móvel (A) metanol:água (50:50, v/v) e (B) metanol:água pH 2,5 (30:70, v/v); vazão de (A) 0,3 mL min⁻¹ e (B) 1,0 mL min⁻¹; volume de amostra: 5 µL; temperatura de 25 °C; detecção UV a 254 nm. Compostos: (1) ácido acetilsalisílico, (2) paracetamol e (3) cafeína.

5. CONCLUSÕES

A imobilização do poli(metiltetradecilsiloxano), independente do tipo de procedimento realizado, sobre partículas de sílicas zirconizada e titanizada se apresenta como uma alternativa potencial para o preparo de fases estacionárias para utilização na CLAE-FR. As fases Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) são obtidas com excelente desempenho cromatográfico, em muitos casos, superiores aos das fases estacionárias baseadas em suportes de sílica nua e, também, fases estacionárias disponíveis comercialmente de mesmo tamanho médio de partículas. Os principais atrativos destas fases são a praticidade e o baixo custo de preparação, uma vez que necessitam de materiais e reagentes relativamente mais simples e mais baratos que os comumente empregados para a síntese de fases estacionárias quimicamente ligadas.

De acordo com os resultados cromatográficos obtidos, o PMTDS apresenta características estruturais muito apropriadas para ser utilizado como fase estacionária para a CLAE-FR. Os parâmetros de retenção dos diferentes compostos avaliados neste polímero apresentaram um compromisso interessante entre os obtidos em fases estacionárias baseadas em PMOS e PMODS, como pode ser conferido em outros trabalhos do grupo^{137,183}. Além disso, a presença de zircônio ou titânio na estrutura do suporte cromatográfico não afetou a seletividade das fases imobilizadas com o PMTDS. A ordem de eluição de compostos apolares é praticamente idêntica à obtida por fases contendo o PMTDS imobilizado sobre partículas de sílica nua. Porém, para compostos básicos, as fases apresentaram um desempenho cromatográfico limitado devido ao recobrimento não uniforme do suporte, resultando na exposição de grupos residuais de acidez aumentada, sejam grupos silanóis vizinhos aos átomos de zircônio ou titânio, ou, grupos zirconóis e titanóis que atuam como sítios ácidos de Lewis. As fases baseadas no suporte de sílica zirconizada apresentaram características mais ácidas que as fases à base de sílica titanizada, conforme comprovado pelos testes do protocolo de Tanaka e colaboradores¹⁵⁷, provavelmente associado à maior reatividade do zircônio.

Se por um lado, a presença do óxido metálico na estrutura do suporte cromatográfico resulta em maior acidez da fase estacionária, por outro, proporciona maior estabilidade e resistência do suporte à eluição de fase móvel alcalina. As fases estacionárias baseadas na sílica metalizada têm um aumento de mais de 400 % de vida útil em condições alcalinas drásticas se comparado à contraparte baseada em sílica nua. Entre as fases com suportes de sílica metalizada, as baseadas em sílica zirconizada se apresentaram 50 % mais estáveis que as fases baseadas em sílica titanizada. Esta maior estabilidade das fases à base de sílica

zirconizada em relação à titanizada está associada à estrutura dos respectivos suportes cromatográficos. De acordo com os resultados de caracterização dos suportes, a sílica zirconizada apresenta algumas ligações químicas que são mais estáveis, do tipo Si-O-Zr, entre a sílica e a zircônia, enquanto que no de sílica titanizada a ligação entre os dois óxidos é governada por interações fracas como, por exemplo; forças de van der Waals. Além disso, a quantidade de titânio foi bem menor, < 8 % de titânio, que a quantidade de zircônio incorporado à sílica, ~ 21 % de zircônio, apesar de ambos os materiais terem sido submetidos ao procedimento de dupla metalização.

As fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS), preparadas sob os diferentes procedimentos de imobilização, apresentam potencialidade na separação de diferentes classes de compostos, tais como de agroquímicos e de fármacos. Apesar de apresentarem características um pouco distintas, estas fases podem ser aplicadas a ocasiões similares, como em separações de compostos que normalmente são difíceis de serem obtidas em fases estacionárias disponíveis comercialmente. Um sumário das características e aplicabilidades das fases preparadas neste trabalho pode ser observado na Tabela 30.

Tabela 30. Características e aplicações das fases estacionárias Si-Zr(PMTDS) e Si-Ti(PMTDS) preparadas neste trabalho.

Fases estacionárias	Características	Aplicações
Si-Zr(PMTDS)	Estas FE apresentam desempenho cromatográfico para compostos apolares pelo menos similares ao obtido por FE disponíveis comercialmente de mesmo tamanho de partícula, 5 µm. As FE Si-Zr(PMTDS) possuem alta acidez, resultando em caudas acentuadas para compostos ligeiramente básicos, restando irreversivelmente aqueles altamente básicos. As FE auto-imobilizadas são mais simples de serem obtidas, no entanto, necessita de um tempo muito longo para alcançar boa repetibilidade dos parâmetros de retenção com a eluição contínua de FM. As FE imobilizadas por radiação gama são mais estáveis quimicamente em condições mais drásticas de FM devido ao maior grau de entrecruzamento das cadeias de PMTDS que, por sua vez oferecem melhor proteção do suporte ao ataque da FM. Porém, apresentam	Podem ser empregadas em separações de compostos apolares e com características ácidas, sem a necessidade de utilização de fases móveis em condições mais drásticas. No entanto, para serem aplicadas a separações de compostos básicos necessitam de utilização de fases móveis com valores de pH mais elevados, condição esta que é possível de ser empregada devido a maior estabilidade química destas fases, nominalmente entre pH 2 e 12, que as similares baseadas em suportes de sílica nua. Exemplo de aplicações que estas fases podem ser submetidas: hidrocarbonetos

	<p>desempenho cromatográfico inferior às demais e menor repetibilidade de preparo devido ao longo tempo de exposição à radiação, para as altas doses requeridas. As FE mais viáveis de serem preparadas e utilizadas são as imobilizadas termicamente, pois seu preparo é mais prático e repetível, além de apresentarem melhor desempenho cromatográfico.</p>	<p>poliaromáticos, diversas classes de agroquímicos e fármacos, etc.</p>
<p>Si-Ti(PMTDS)</p>	<p>Estas FE apresentam, em média, desempenho cromatográfico um pouco inferior às fases Si-Zr(PMTDS) para compostos apolares, no entanto, em alguns casos apresentam desempenho superior, inclusive ao obtido por fases baseadas em suportes de sílica nua, para compostos básicos devido a menor atividade de seus grupos residuais. Esta menor atividade dos grupos superficiais do suporte resulta também em uma menor quantidade imobilizada de PMTDS e menor estabilidade química em condições alcalinas, comparadas às fases Si-Zr(PMTDS). As fases Si-Ti(PMTDS) auto-imobilizadas são simples de serem preparadas, porém demandam de um tempo muito longo para que uma quantidade apropriada de PMTDS seja adsorvida ao suporte. As FE imobilizadas por radiação gama apresentam bom desempenho cromatográfico, porém, com baixa repetibilidade de preparo. As FE imobilizadas termicamente são preparadas de forma mais repetível, e assim como à contraparte com sílica zirconizada, são as mais atrativas quanto ao preparo para uso rotineiro no laboratório.</p>	<p>Podem ser empregadas em separações de compostos apolares e, também, com características ácidas e/ou ligeiramente básicas sem a necessidade de utilização de condições drásticas de fases móveis durante a análise. Para a aplicação em separações de compostos altamente básicos há a necessidade de utilização de fases móveis com valores de pH mais elevados. Assim como para as fases Si-Zr(PMTDS) apresentam maior estabilidade química em condições mais drásticas de FM, tais como entre pH 2 e 12. Exemplo de compostos possíveis de serem analisados nestas fases: hidrocarbonetos poliaromáticos, diversas classes de agroquímicos e fármacos, etc.</p>

Diante de todos os resultados e perspectivas obtidos neste trabalho, espero que “o degrau” que aqui foi construído contribua para que o próximo passo rumo ao desenvolvimento de uma fase estacionária melhor, para a cromatografia líquida de alta eficiência, seja ainda mais alto.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. H.A. Claessens, Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, **Trends Anal. Chem.** 20 (2001) 563-583.
2. E. Tonhi, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados, **Quim. Nova** 25 (2002) 616-623.
3. H. Engelhardt, G. Ahr, Properties of chemically bonded phases, **Chromatographia** 14 (1981) 227-233.
4. J.J. Kirkland, J.M. Henderson, Reversed-phase HPLC selectivity and retention characteristics of conformationally different bonded alkyl stationary phases, **J. Chromatogr. Sci.** 32 (1994) 473-480.
5. J.J. Kirkland, J.L. Glajch, R.D. Farlee, Synthesis and characterization of highly stable bonded phases for high-performance liquid chromatography column packings, **Anal. Chem.** 61 (1989) 2-11.
6. I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, Immobilized polysiloxanes as stationary phases for high-performance liquid chromatography and solid phase extraction, **Microchem. J.** 77 (2004) 191-198.
7. M. Petro, D. Berek, Polymers immobilized on silica gels as stationary phases for liquid chromatography, **Chromatographia** 37 (1993) 549-561.
8. C.B.G. Bottoli, Z.F. Chaudhry, D.A. Fonseca, K.E. Collins, C.H. Collins, Poly(alkylmethylsiloxanes) thermally immobilized on silica as stationary phases for high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 948 (2002) 121-128.
9. R. Ohmacht, M. Kele, Z. Matus, Polymer coated stationary phases for liquid chromatography, **Chromatographia** 28 (1989) 19-23.
10. M. Hanson, K.K. Unger, Polymer coatings as stationary phases in high performance liquid chromatography, **Trends Anal. Chem.** 11 (1992) 368-373.
11. V.R. Meyer, **Practical high-performance liquid chromatography**, 2^a ed., New York: Wiley, 1996.
12. L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, **Practical HPLC method development**, 2^a ed., New York: Wiley, 1997.
13. A. Berthod, Silica: backbone material of liquid chromatographic column packings, **J. Chromatogr.** 549 (1991) 1-28.
14. L.T. Zhuravlev, The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model, **Colloid Surface A** 173 (2000) 1-38.

15. C. Stella, S. Rudaz, J.L. Veuthey, A. Tchaplá, Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part I, **Chromatographia** 53 (2001) S113-S131.
16. J. Nawrocki, The silanol group and its role in liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 779 (1997) 29-71.
17. G. Fóti, C. Martínez, E.sz. Kováts, Role of unreacted silanols in the adsorption properties of derivatized silica, **J. Chromatogr.** 461 (1989) 243-258.
18. K.K. Unger, **Porous silica**, Amsterdam: Elsevier, 1979.
19. A.L. Khurana, C.T. Ho, Determination of surface silanols of silica-gels and HPLC bonded phases, **J. Liq. Chromatogr.** 11 (1988) 3205-3211.
20. K.K. Unger, K.D. Lork, B. Pfeleiderer, K. Albert, E. Bayer, Impact of acidic/hydrothermal treatment on pore structural and chromatographic properties of porous silicas: I. The conventional approach, **J. Chromatogr. A** 556 (1991) 395-406.
21. J. Nawrocki, Silica surface controversies, strong adsorption sites, their blockage and removal. Part II, **Chromatographia** 31 (1991) 193-205.
22. J. Nawrocki, A. Dabrowska, Nonpolar stationary phases for HPLC - Recent achievements, **Chem. Anal. (Warsaw)** 46 (2001) 781-811.
23. A. Nahum, C. Horvath, Surface silanols in silica-bonded hydrocarbonaceous stationary phases: I. Dual retention mechanism in reversed-phase chromatography, **J. Chromatogr.** 203 (1981) 53-63.
24. D.V. McCalley, Effect of organic solvent modifier and nature of solute on the performance of bonded silica reversed-phase columns for the analysis of strongly basic compounds by high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 738 (1996) 169-179.
25. J. Nawrocki, C. Dunlap, A. McCormick, P.W. Carr, Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, **J. Chromatogr. A** 1028 (2004) 1-30.
26. M.R. Buchmeiser, New synthetic ways for the preparation of high-performance liquid chromatography supports, **J. Chromatogr. A** 918 (2001) 233-266.
27. Y. Mao, B.M. Fung, Use of alumina with anchored polymer coating as packing material for reversed-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 790 (1997) 9-15.
28. J.J. Pesek, M.T. Matyska, Modified aluminas as chromatographic supports for high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 952 (2002) 1-11.
29. J. Nawrocki, C. Dunlap, J. Li, C.V. McNeff, A. McCormick, P.W. Carr, Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC, **J. Chromatogr. A** 1028 (2004) 31-62.

30. C.P. Jaroniec, M. Jaroniec, M. Kruk, Comparative studies of structural and surface properties of porous inorganic oxides used in liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 797 (1988) 93-102.
31. J. Li, P.W. Carr, Retention characteristics of polybutadiene-coated zirconia and comparison to conventional bonded phases, **Anal. Chem** 68 (1996) 2857-2868.
32. C.J. Dunlap, C.V. Mcneff, D. Stoll, P.W. Carr, Zirconia stationary phases for extreme separations, **Anal. Chem.** 73 (2001) 598A-607A.
33. M. Grün, A.A. Kurganov, S. Schacht, F. Schüth, K.K. Unger, Comparison of an ordered mesoporous aluminosilicate, silica, alumina, titania and zirconia in normal-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 740 (1996) 1-9.
34. J. Li, Y. Hue, P.W. Carr, Fast separations at elevated temperatures on polybutadiene-coated zirconia reversed-phase material, **Anal. Chem.** 69 (1997) 3884-3888.
35. J. Li, P.W. Carr, Effect of temperature on the thermodynamic properties, kinetic performance, and stability of polybutadiene-coated zirconia, **Anal. Chem.** 69 (1997) 837-843.
36. J. Li, P.W. Carr, Evaluation of temperature effects on selectivity in RPLC separations using polybutadiene-coated zirconia, **Anal. Chem.** 69 (1997) 2202-2206.
37. R. Majors, Column Watch: New chromatography columns and accessories at the 1993 Pittsburgh Conference, Part 1, **LC-GC N. Am.** 6 (1993) 196-&.
38. T.P. Weber, P.W. Carr, Comparison of isomer separation on carbon-clad microporous zirconia and on conventional reversed-phase high-performance liquid chromatography supports, **Anal. Chem.** 62 (1999) 2620-2625.
39. T.P. Weber, P.W. Carr, E.F. Funkenbusch, Evaluation of a zirconia-based carbon-polymer composite reversed-phase chromatographic support, **J. Chromatogr. A** 519 (1990) 31-52.
40. J. Zhao, P.W. Carr, A comparative study of the chromatographic selectivity of polystyrene-coated zirconia and related reversed-phase materials, **Anal. Chem** 72 (2000) 302-309.
41. J. Nawrocki, M.P. Rigney, A. McCormick, P.W. Carr, Chemistry of zirconia and its use in chromatography, **J. Chromatogr. A** 657 (1993) 229-282.
42. K. Tani, Y. Suzuki, Influence of titania matrix on retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 722 (1996) 129-134.
43. J. Winkler, S. Marmé, Titania as a sorbent in normal-phase liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 888 (2000) 51-62.
44. J.J. Pesek, M.T. Matyska, J. Ramakrishnan, Synthesis and characterization of titania based stationary phases using the silanization/hydrosilation method, **Chromatographia** 44 (1997) 538-544.
45. M. Pursch, D.L. Vanderhart, L.C. Sander, X. Gu, T. Nguyen, S.A. Wise, D.A. Gajewski, C30 self-assembled monolayers on silica, titania, and zirconia: HPLC performance, atomic force

microscopy, ellipsometry, and NMR studies of molecular dynamics and uniformity of coverage, **J. Am. Chem. Soc.** 122 (2000) 6997-7011.

46. Z. Jiang, Y. Zuo, R. Li, J.C. Yu, Chromatographic retention of polybutadiene coated titania stationary phase using quantitative structure-retention relationships, **Chem. Anal. (Warsaw)** 49 (2004) 551-560.

47. M. Waksmundzka-Hajnos, Properties of Florisil and its use in chromatography, **Chem. Anal. (Warsaw)** 43 (1998) 301-324.

48. Y. Akama, H. Kanno, Liquid chromatography separation of polycyclic aromatic hydrocarbons with cerium(IV) oxide as packing material, **Anal. Chim. Acta** 309 (1995) 153-156.

49. J. Zhao, P.W. Carr, Comparison of the retention characteristics of aromatic and aliphatic reversed phases for HPLC using linear solvation energy relationships, **Anal. Chem.** 70 (1998) 3619-3628.

50. R.M. Smith, Selectivity comparisons of polystyrene-divinylbenzene columns, **J. Chromatogr.** 291 (1984) 372-376.

51. J.V. Dawkins, L.L. Lloyd, F.P. Warner, Chromatographic characteristics of polymer-based high-performance liquid chromatography packings, **J. Chromatogr.** 352 (1986) 157-167.

52. C. Viron, P. André, M. Dreux, M. Lafosse, Evaluation of porous graphitic carbon as stationary phase for the analysis of fatty acid methyl esters by liquid chromatography, **Chromatographia** 49 (1999) 137-141.

53. E. Forgács, T. Cserhádi, High-performance liquid chromatographic retention behaviour of ring-substituted aniline derivatives on a porous graphitized carbon column, **J. Chromatogr. A** 600 (1992) 43-49.

54. E. Forgács, K. Valkó, T. Cserhádi, K. Magyar, Porous graphitized carbon and octadecylsilica columns in the separation of some monoamine oxidase inhibitory drugs, **J. Chromatogr. A** 631 (1993) 207-213.

55. J.A. Tarbin, G. Shearer, Improved high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of lasalocid in chicken tissues and egg using polymeric and porous graphitic carbon columns, **J. Chromatogr.** 579 (1992) 177-183.

56. C.E. Adeeyinwo, J.F. Tyson, S.O. Akapo, A. Furst, T.M. Khong, C.F. Simpson, F.F. Barretto, J.M. Slater, D.P. Ndiomu, C.F. Simpson, S.A. Black, G.P. Matthews, F.Y.K. Ghauri, C.F. Simpson, J.E. Mama, A.F. Fell, B.J. Clarck, Reduction of interference effects in flame atomic absorption spectrometry using flow injection techniques, **Anal. Proceed.** 26 (1989) 58-73.

57. S. Herón, A. Tchapla, Properties and characterizations of stationary and mobile phases used in reversed-phase liquid-chromatography, **Analisis** 21 (1993) 327-347.

58. D.A. Fonseca, K.E. Collins, C.H. Collins, Titanized silica-based stationary phases prepared with thermally and microwave-immobilized poly(methyloctylsiloxane), **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 209-215.

59. R.B. Silva, K.E. Collins, C.H. Collins, 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 (2000) 137-141.
60. R.B. Silva, C.H. Collins, Chromatographic evaluation of radiation-immobilized poly(methyloctylsiloxane) on titanium-grafted silica, **J. Chromatogr. A** 845 (1999) 417-422.
61. L.F.C. Melo, C.H. Collins, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, Stability of high-performance liquid chromatography columns packed with poly(methyloctylsiloxane) sorbed and radiation-immobilized onto porous silica and zirconized silica, **J. Chromatogr. A** 869 (2000) 129-135.
62. L.F.C. Melo, I.C.S.F. Jardim, Development of C8 stationary phases immobilized by γ -radiation on zirconized silica for high-performance liquid chromatographic applications, **J. Chromatogr. A** 845 (1999) 423-431.
63. W.A. Aue, P.P. Wickramanayake, Gas and liquid chromatography on silica-supported chromia layers, **J. Chromatogr.** 197 (1980) 21-29.
64. Q.H. Zhang, Y.Q. Feng, S.L. Da, preparation and characterization of silica-zirconia supports for normal-phase liquid chromatography, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 23 (2000) 1461-1475.
65. Y.Q. Feng, H.J. Fu, Q.H. Zhang, S.L. Da, Y.J. Zhang, Retention behavior of basic compounds on alkylphosphonate-modified magnesia-zirconia composite stationary phase in RPHPLC, **Chromatographia** 52 (2000) 165-168.
66. H.B. He, W.N. Zhang, S.L. Da, Y.Q. Feng, Preparation and characterization of a magnesia-zirconia stationary phase modified with β -cyclodextrin for reversed-phase high-performance liquid chromatography, **Anal. Chim. Acta** 513 (2004) 481-492.
67. J.D. Wan, Y.Q. Feng, Y.L. Hu, S.L. Da, Z.H. Wang, Preparation of mesopore zirconia-alumina composite and its application to normal HPLC support, **Chin. J. Chem.** 22 (2001) 1661-1663.
68. Y.L. Hu, Y.Q. Feng, S.L. Da, Chromatographic evaluation of alkylphosphonic acid-modified ceria-zirconia in reversed-phase HPLC, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 24 (2001) 957-971.
69. S. Kaneko, T. Mitsuzawa, S. Ohmori, M. Nakamura, K. Nobuhara, M. Masatani, Separation behaviour of silica-containing mixed oxides as column packing materials for liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 669 (1994) 1-7.
70. K. Ohta, Application of zirconium-modified silica gel as a stationary phase in the ion-exclusion chromatography of carboxylic acids: I. Separation of benzenecarboxylic acids with tartaric acid as eluent and with UV-photometric detection, **J. Chromatogr. A** 920 (2001) 69-77.
71. K. Ohta, Application of zirconium-modified silica gel as a stationary phase in the ion-exclusion chromatography of carboxylic acids: II. Separation of aliphatic carboxylic acids with pyromellitic acid as eluent and with suppressed conductimetric detection, **J. Chromatogr. A** 920 (2001) 181-191.

72. S. Kaneko, M. Mikawa, S. Yamagiwa, Interaction of amino-acids and silica-containing mixed-oxide surfaces in aqueous-solutions, **Chem. Lett.** 2 (1989) 209-212.
73. S. Kaneko, S. Ohmori, M. Mikawa, T. Yamazaki, M. Nakamura, S. Yamagiwa, Mutual separation of amino acids in aqueous solutions with silica-containing mixed-oxide gels, **Chem. Lett.** 11 (1992) 2249-2252.
74. S. Kaneko, T. Mitsuzawa, S. Ohmori, M. Nakamura, K. Nobuhara, M. Masatani, Silica-containing mixed-oxide gels prepared by a coprecipitation method as novel packing materials for liquid chromatography, **Chem. Lett.** 8 (1993) 1275-1278.
75. Q.H. Zhang, Y.Q. Feng, S.L. Da, Characterization and evaluation of magnesia-zirconia supports for normal-phase liquid chromatography, **Chromatographia** 50 (1999) 654-660.
76. Q.H. Zhang, Y.Q. Feng, S.L. Da, Preparation and characterization of zirconia-silica and zirconia-magnesia supports for normal-phase liquid-chromatography, **Anal. Sci.** 15 (1999) 767-772.
77. H. Dun, W. Zhang, Y. Wei, S. Xiuqing, Y. Li, L. Chen, Layer-by-layer self-assembly of multilayer zirconia nanoparticles on silica spheres for HPLC packings, **Anal. Chem.** 76 (2004) 5016-5023.
78. J. Ge, Y. Li, L. Chen, Characterization of TiO₂/SiO₂ based stationary phase for RP-HPLC, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 29 (2006) 2329-2339.
79. J.J. Kirkland, Development of some stationary phases for reversed-phase HPLC, **J. Chromatogr. A** 1060 (2004) 9-21.
80. I. Halasz, I. Sebestian, New stationary phase for chromatography, **Angew Chem. Int. Ed.** 8 (1969) 453-454.
81. E.F. Vansant, D. van der Voort, C. Vranken, **Characterization and chemical modification of the silica surface**, New York: Elsevier, 1997.
82. U.D. Neue, **HPLC columns: theory, technology and practice**, New York: John Wiley & Sons-VCH, 1997.
83. L.C. Sander, S.A. Wise, Recent advances in bonded phases for liquid chromatography, **Crit. Rev. Anal. Chem.** 18 (1987) 299-413.
84. J.E. Haky, A.R.B.M. Dunn, Comparison of polybutadiene-coated alumina and octadecyl-bonded silica for separations of proteins and peptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 541 (1991) 303-315.
85. K.K. Unger, N. Becker, P. Roumellotis, Recent developments in the evaluation of chemically bonded silica packings for liquid chromatography, **J. Chromatogr.** 125 (1976) 115-127.
86. G. Heinemann, J. Köhler, G. Schomburg, New polymer coated anion-exchange HPLC-phases - Immobilization of poly(2-hydroxy,3N-ethylenediamino)butadiene on silica and alumina, **Chromatographia** 23 (1987) 435-441.

87. M.J. Wirth, H.O. Fatunmbi, Horizontal polymerization of mixed trifunctional silanes on silica: A potential chromatographic stationary phase, **Anal. Chem.** 64 (1992) 2783-2786.
88. M.J. Wirth, H.O. Fatunmbi, Horizontal polymerization of mixed trifunctional silanes on silica. 2. Application to chromatographic silica gel, **Anal. Chem.** 65 (1993) 822-826.
89. R.W.P. Fairbank, M.J. Wirth, Role of surface-adsorbed water in the horizontal polymerization of trichlorosilanes, **J. Chromatogr. A** 830 (1999) 285-291.
90. L. Li, P.W. Carr, J.F. Evans, Studies of retention and stability of a horizontally polymerized bonded phase for reversed-phase liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 868 (2000) 153-167.
91. J.L. Glajch, J.J. Kirkland, Stable, sterically protected, monofunctional-silane bonded-phase columns for high-performance liquid-chromatography, **LC-GC N. Am.** 8 (1990) 140-150.
92. J.J. Kirkland, C.H. Dilks, J.W. Henderson, Technologies for an improved C18 stationary phase in reversed-phase HPLC separations, **LC-GC N. Am.** 11 (1993) 290-297.
93. S.O. Akapo, M.T. Matyska, J.J. Pesek, Retention characteristics and selected applications of cyclic siloxane-based octadecylsilyl bonded phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 773 (1998) 53-63.
94. J.E. O'Gara, B.A. Alden, T.H. Walter, J.S. Petersen, C.L. Niederländer, U.D. Neue, Simple preparation of a C8 HPLC stationary phase with an internal polar functional group, **Anal. Chem.** 67 (1995) 3809-3813.
95. J.E. O'Gara, D.P. Walsh, B.A. Alden, P. Casellini, T.H. Walter, Systematic study of chromatographic behavior vs alkyl chain length for HPLC bonded phases containing an embedded carbamate group, **Anal. Chem.** 71 (1999) 2992-2997.
96. J. Layne, Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases, **J. Chromatogr. A** 957 (2002) 149-164.
97. C.R. Silva, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, Chromatographic and column stability at pH 7 of a C18 dimethylurea polar stationary phase, **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 157-166.
98. J.J. Kirkland, M.A. van Straten, H.A. Claessens, Reversed-phase high-performance liquid chromatography of basic compounds at pH 11 with silica-based column packings, **J. Chromatogr. A** 797 (1998) 111-120.
99. J.J. Kirkland, J.D. Martosella, J.W. Henderson, C.H. Dilks Jr., J.B. Adams Jr., HPLC of basic compounds at high pH with a silica-based bidentate-C18 bonded-phase column, **Am. Lab.** 31, n° 22 (1999) 22-27.
100. Y.F. Cheng, T.H. Walter, Z. Lu, P. Iraneta, B.A. Alden, C. Gendreau, U.D. Neue, J.M. Grassi, J.L. Carmody, J.R. O'Gara, R.P. Fisk, Hybrid organic-inorganic particle technology: breaking through traditional barriers of HPLC separations, **LC-GC N. Am.** 18 (2000) 1162-1172.

101. M. Medenica, B. Jancic, D. Ivanovic, A. Malenovic, Experimental design in reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of imatinib mesylate and its impurity, **J. Chromatogr. A** 1031 (2004) 243-248.
102. J.J. Kirkland, M.A. van Straten, H.A. Claessens, High pH mobile phase effects on silica-based reversed-phase high-performance liquid chromatographic columns, **J. Chromatogr. A** 691 (1995) 3-19.
103. J. Nawrocki, D.L., W. Szczepaniak, Trace metal impurities in silica as a cause of strongly interacting silanols, **Chromatographia** 28 (1989) 143-147.
104. A. Nasal, P. Haber, R. Kaliszan, E. Forgács, T. Cserhádi, Polyethylene-coated silica and zirconia stationary phases in view of quantitative structure-retention relationships, **Chromatographia** 43 (1996) 484-490.
105. Z.T. Jiang, D.Y. Zhang, Y.M. Zuo, Retention behaviors of polybutadiene-coated titania and comparison to bonded phase based on linear solvation energy relationships, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 23 (2000) 1159-1169.
106. Y. Xiang, B. Yan, B. Yue, C.V. McNeff, P.W. Carr, M.L. Lee, Elevated-temperature ultrahigh-pressure liquid chromatography using very small polybutadiene-coated nonporous zirconia particles, **J. Chromatogr. A** 983 (2003) 83-89.
107. N.P. Lopes, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, Microwave-immobilized polybutadiene stationary phase for reversed-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 225-229.
108. N.P. Lopes, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, Influence of air on polybutadiene used in the preparation of stationary phases for high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 231-236.
109. L.S.R. Morais, I.C.S.F. Jardim, Characterization of a new stationary phase based on microwave immobilized polybutadiene on titanium oxide-modified silica, **J. Chromatogr. A** 1073 (2005) 127-135.
110. A. Kurganov, U. Trüding, T. Isaeva, K.K. Unger, Native and modified alumina, titania and zirconia in normal and reversed-phase high-performance liquid chromatography, **Chromatographia** 42 (1996) 217-222.
111. T.A. Anazawa, F. Carraro, K.E. Collins, I.C.S.F. Jardim, Stability of high-performance liquid chromatography columns packed with C₁ and C₈ polysiloxanes sorbed into porous silica particles, **J. Chromatogr. A** 697 (1995) 159-164.
112. E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins, High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(dimethylsiloxane) immobilized on silica, **J. Chromatogr. A** 1075 (2005) 87-94.
113. G. Schomburg, J. Köhler, H. Figge, A. Deege, U. Bien-Vogelsang, Immobilization of stationary liquids on silica particles by gamma-radiation, **Chromatographia** 18 (1984) 265-279.

114. T. Cserhádi, E. Forgács, Separation of pesticides on an octadecyl-coated alumina column, **Fresenius J. Anal. Chem.** 358 (1997) 558-560.
115. T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, Polymethyloctylsiloxane adsorbed on porous silica as a packing material for reversed-phase high-performance liquid-chromatography, **J. Liq. Chromatogr.** 17 (1994) 1265-1279.
116. T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, The chromatographic behavior of coated stationary phases with different silicas, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 21 (1998) 645-655.
117. K.E. Collins, M.L.M.M. Granja, R.G. Pereira Filho, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, The spatial distribution of poly(methyloctylsiloxane) deposited by solvent evaporation in the pores of HPLC silica particles, **Chromatographia** 45 (1997) 99-103.
118. C.B.G. Bottoli, K.E. Collins, C.H. Collins, Chromatographic evaluation of self-immobilized stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 987 (2003) 87-92.
119. C.B.G. Bottoli, C.R.M. Vigna, G. Fischer, K. Albert, K.E. Collins, C.H. Collins, Self-immobilization and/or thermal treatment for preparing silica-poly(methyloctylsiloxane) stationary phases, **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 217-223.
120. U. Bien-Vogelsang, A. Deege, H. Figge, J. Köhler, G. Schomburg, Syntheses of stationary phases for reversed-phase LC using silanization and polymer coating, **Chromatographia** 19 (1984) 170-179.
121. M.C.H. da Silva, I.C.S.F. Jardim, Preparation of a C-18 stationary phase immobilized by gamma radiation for use in high performance liquid chromatography, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 21 (1998) 2447-2458.
122. H.A. Claessens, M.A. van Straten, Review on the chemical and thermal stability of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 1060 (2004) 23-41.
123. J. Köhler, Poly(vinylpyrrolidone)-coated silica - a versatile, polar stationary phase for HPLC, **Chromatographia** 21 (1986) 573-582.
124. A. Kurganov, Y. Puchkova, V. Davankov, F. Eisenbeiss, Polyvinylpyrrolidone-coated silica packings for chromatography of proteins and peptides, **J. Chromatogr. A** 663 (1994) 163-174.
125. G. Schomburg, Polymer coating of surfaces in column liquid-chromatography and capillary electrophoresis, **Trends Anal. Chem.** 10 (1991) 163-169.
126. L. Janus, B. Carbonnier, A. Deratani, M. Bacquet, G. Crini, J. Laureyns, M. Morcellet, New HPLC stationary phases based on (methacryloyloxypropyl- β -cyclodextrin-co-N-vinylpyrrolidone) copolymers coated on silica. Preparation and characterization, **New J. Chem.** 27 (2003) 307-312.
127. B. Carbonnier, L. Janus, Y. Lekchiri, M. Morcellet, Coating of porous silica beads by *in situ* polymerization/crosslinking of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin for reversed-phase high-performance liquid chromatography applications, **J. Appl. Polym. Sci.** 91 (2004) 1419-1426.

- 128.** K.E. Collins, A.L.A. Sá, C.B.G. Bottoli, C.H. Collins, Thermal immobilization of poly(methyloctylsiloxane) in the pores of chromatographic silica, **Chromatographia** 53 (2001) 661-664.
- 129.** E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins, High-performance liquid chromatographic stationary phases based on polysiloxanes with different chain lengths thermally immobilized on silica supports **J. Chromatogr. A** 1119 (2006) 135-139.
- 130.** I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, T.A. Anazawa, Radiation immobilization of poly(methyloctylsiloxane) on silica for use in HPLC: a uniform layer model, **J. Chromatogr. A** 849 (1999) 299-307.
- 131.** E. Tonhi, K.E. Collins, C.H. Collins, High-performance liquid chromatographic stationary phases based on poly(methyloctylsiloxane) immobilized on silica: II. Chromatographic evaluation, **J. Chromatogr. A** 948 (2002) 109-119.
- 132.** A.J. Swallow, **Radiation chemistry – An introduction**, London: Longman, 1973.
- 133.** E. Tonhi, **Preparação de colunas para cromatografia líquida de alta eficiência recheadas com polissiloxanos (C1, C8 e C14) imobilizados sobre partículas de sílica porosa**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.
- 134.** E.B. Mano, **Introdução a polímeros**, São Paulo: Edgard Blücher, 1985.
- 135.** M.A. Kapor, **Preparação de fases estacionárias SiO₂(PMOS), sorvidas e imobilizadas por microondas para cromatografia líquida de alta eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2001.
- 136.** L.S.R. Moraes, **Preparação de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a partir de sílica titanizada e polibutadieno**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2003.
- 137.** C.B.G. Bottoli, **Sorção, imobilização e extração de polissiloxanos em sílicas porosas para uso em cromatografia líquida de alta eficiência**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2002.
- 138.** J.E. Hahy, S. Vemulapalli, L.F. Wieserman, Comparison of octadecyl-bonded alumina and silica for reversed-phase high-performance liquid chromatography, **J. Chromatogr. A** 505 (1990) 307-318.
- 139.** D.H. Reeder, J. Li, P.W. Carr, M.C. Flickinger, A.V. McCormick, Models for polybutadiene pore wall coatings in porous zirconia, **J. Chromatogr. A** 760 (1997) 71-79.
- 140.** J. Li, P.W. Carr, A study of the efficiency of polybutadiene-coated zirconia as a reversed-phase chromatographic support, **Anal. Chem.** 69 (1997) 2193-2201.
- 141.** J. Zhao, P.W. Carr, Synthesis and evaluation of an aromatic polymer-coated zirconia for reversed phase liquid chromatography, **Anal. Chem.** 71 (1999) 5217-5224.

142. I.C.S.F. Jardim, G.M.F. Pinto, K.E. Collins, C18 stationary phases sorbed on zirconized silica for use in HPLC, **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.** 25 (2002) 205-216.
143. C.F. Zuin, **Preparação e avaliação de fase estacionária C8 a partir de suporte de sílica modificada**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 1998.
144. D.A. Fonseca, **Fases estacionárias reversas baseadas em sílica titanizada, com poli(metiloctilsiloxano) imobilizado por diferentes tratamentos**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2003.
145. D.R. Magalhães, **Desenvolvimento de fases estacionárias de polaridade intermediária para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2005.
146. C.R. Silva, C. Airoidi, K.E. Collins, C.H. Collins, Stability evaluations of an octadecyl bonded phase based upon titanium-grafted silica, **LC-GC N.Am.** 22 (2004) 632-641.
147. C.R. Silva, C. Airoidi, K.E. Collins, C.H. Collins, Titanized silicas, modified by C18, as promising stationary phases for high pH separations, **J. Chromatogr. A** 1073 (2005) 155-162.
148. C.R. Silva, C. Airoidi, K.E. Collins, C.H. Collins, Preparation and characterization of a new C18 urea phase based on titanized silica, **J. Chromatogr. A** 1087 (2005) 29-37.
149. C.R. Silva, C. Airoidi, K.E. Collins, C.H. Collins, Influence of the TiO₂ content on the chromatographic performance and high pH stability of C18 titanized phases, **J. Chromatogr. A** 1114 (2006) 45-52.
150. K. Szabó, N.L. Ha, Ph. Schneider, P. Zeltner, E.Sz Kóvats, Monofunctional (dimethylamino)silane as silylating agent, **Helv. Chim. Acta** 67 (1984) 2128-2142.
151. http://www.unitedchem.com/pdf/NONREACTION_FLUIDS.PDF, acessado em julho de 2006.
152. C.A. Doyle, T.J. Vickers, C.K. Mann, J.G. Dorsey, Characterization of liquid chromatographic stationary phases by Raman spectroscopy. Effect of ligand type, **J. Chromatogr. A** 779 (1997) 91-112.
153. B. Lumley, T.M. Khong, D. Perrett, The characterisation of chemically bonded chromatographic stationary phases by thermogravimetry, **Chromatographia** 60 (2004) 59-62.
154. K. Krupczynska, B. Buszewski, P. Jandera, Characterizing HPLC stationary phases, **Anal. Chem.** 14 (2004) 226A-234A.
155. E. Cruz, M.R. Euerby, C.M. Johnson, C.A. Hackett, Chromatographic classification of commercially available reversed-phase HPLC columns, **Chromatographia** 44 (1997) 151-161.
156. M.R. Euerby, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed-phase liquid chromatographic columns using principal component analysis, **J. Chromatogr. A** 994 (2003) 13-36.

157. K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, Chromatographic characterization of silica-C-18 packing materials - correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase, **J. Chromatogr. Sci.** 27 (1989) 721-728.
158. H. Engelhardt, M. Jungheim, Comparison and characterization of reversed phases, **Chromatographia** 29 (1990) 59-68.
159. U.D. Neue, E. Serowik, P. Iraneta, B.A. Alden, T.H. Walter, Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: I. Assessment of the reproducibility of reversed-phase packings, **J. Chromatogr. A** 849 (1999) 87-100.
160. U.D. Neue, B.A. Alden, T.H. Walter, Universal procedure for the assessment of the reproducibility and the classification of silica-based reversed-phase packings: II. Classification of reversed-phase packings, **J. Chromatogr. A** 849 (1999) 101-116.
161. C.H. Collins, G.L. Braga, P.S. Bonato, **Fundamentos de cromatografia**, 4ª ed., Campinas: Editora da Unicamp, 2006.
162. A. Braithwaite, F.J. Smith, **Chromatography methods**, 4ª ed., London: Chapman and Hall, 1985.
163. T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, Experimental design and optimization, **Chemom. Intel. Lab. Syst.** 42 (1998) 3-40.
164. R.E. Bruns, B.B. Neto, I.S. Scarminio, **Como fazer experimentos**, 2ª ed., Campinas: Editora da Unicamp, 2003.
165. L.T. Kubota, Y. Gushikem, J.C. Moreira, Adsorption of chromium (VI) by titanium (IV) oxide coated on a silica-gel surface, **Analyst** 116 (1991) 281-283.
166. C.R.M. Peixoto, Y. Gushikem, N. Baccan, Selective spectrophotometric determination of trace amounts of chromium (VI) using a flow injection system with a microcolumn of zirconium(IV) oxide modified silica gel, **Analyst** 117 (1992) 1029-1032.
167. S.J. Gregg, K.S.W. Sing, **Adsorption, Surface Area and Porosity**, 2ª ed., London: Academic Press, 1982.
168. <http://www.cbe-sa.com.br>, acessado em Setembro de 2005.
169. Perkin Elmer, **User's manual elemental analysis**, Norwalk: Perkin Elmer, 1996.
170. K.E. Collins, A.C. Franchon, I.C.S.F. Jardim, E. Radanovic, M.C. Gonçalves, The effects of inner surface roughness of microbore column blanks on column performance, **LC-GC N. Am.** 18 (2000) 106-117.
171. D.A. Fonseca, H.R. Gutiérrez, K.E. Collins, C.H. Collins, Rapid method for evaluating reversed-phase high-performance liquid chromatography column stability, **J. Chromatogr. A** 1030 (2004) 149-155.

172. L.B. McCusker, F. Liebau, G. Engelhardt, Nomenclature of structural and compositional characteristics of ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts, **Pure Appl. Chem.** 73 (2001) 381-394.
173. B.L. Newalkar, J. Olanrewaju, S. Komarnemi, Microwave-hydrothermal synthesis and characterization of zirconium substituted SBA-15 mesoporous silica, **J. Phys. Chem. B** 105 (2001) 8356-8360.
174. M.S. Morey, G.D. Stucky, S. Schwarz, M. Fröba, Isomorphic substitution and postsynthesis incorporation of zirconium into MCM-48 mesoporous silica, **J. Phys. Chem. B** 103 (1999) 2037-2041.
175. E.R. Castellón, A.J. López, P.M. Torres, D.J. Jones, J. Rozière, M. Trombetta, G. Busca, M. Lenarda, L. Storaro, Textural and structural properties and surface acidity characterization of mesoporous silica-zirconia molecular sieves, **J. Solid State Chem.** 175 (2003) 159-169.
176. M.S. Wong, H.C. Huang, J.Y. Ying, Supramolecular-templated synthesis of nanoporous zirconia-silica catalysts, **Chem. Mater.** 14 (2002) 1961-1973.
177. F. Garbassi, L. Balducci, P. Chiurlo, L. Deiana, A study of surface modification of silica using EFX, DRIFT and NMR, **Appl. Surf. Sci.** 84 (1995) 145-151.
178. G.M. Ingo, C. Riccucci, G. Bultrini, S. Diré, G. Chiozzini, Thermal and microchemical characterisation of sol-gel SiO₂, TiO₂ and xSiO₂-(1-x)TiO₂ ceramic materials, **J. Therm. Anal. Calorim.** 66 (2001) 37-46.
179. A. Carati, G. Ferraris, M. Guidotti, G. Moretti, R. Psaro, C. Rizzo, Preparation and characterisation of mesoporous silica-alumina and silica-titania with a narrow pore size distribution, **Catal. Today** 77 (2003) 315-323.
180. X. Gao, I.E. Wachs, Titania-silica as catalysts: molecular structural characteristics and physico-chemical properties, **Catal. Today** 51 (1999) 233-254.
181. J. Zhang, Z. Liu, B. Han, Z. Li, G. Yang, J. Li, J. Chen, Preparation of silica and TiO₂-SiO₂ core-shell nanoparticles in water-in-oil microemulsion using compressed CO₂ as reactant and antisolvent, **J. Supercrit. Fluids** 36 (2006) 194-201.
182. J.E. Gonçalves, S.C. Castro, A.Y. Ramos, M.C.M. Alves, Y. Gushikem, X-ray absorption and EFX study of titanium mixed oxides synthesized by the sol-gel method, **J. Electron. Spectrosc.** 114 (2001) 307-311.
183. Z.F. Chaudhry, **Novas fases estacionárias para CLAE preparadas por imobilização térmica de PMODS sobre diferentes suportes de sílica**, Tese de Doutorado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2005.
184. C.R.M. Vigna, **Tratamento térmico na imobilização de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.
185. Y.S. Lipatov, **Colloid chemistry of polymers**, Amsterdam: Elsevier, 1988.

- 186. United States Pharmacopeia**, USP27-NF22 (2004) 1358-1359.
- 187.** Software Chemomatrix, disponível gratuitamente em <http://chemomatrix.iqm.unicamp.br/>, acessado em Outubro de 2004.
- 188.** S. Bachmann, L.F.C. Melo, R.B. Silva, T.A. Anazawa, I.C.S.F. Jardim, K.E. Collins, C.H. Collins, K. Albert, Synthesis and solid-state NMR investigations of radiation-immobilized polysiloxanes on bare, titanium-grafted, and zirconium-grafted silicas, **Chem. Mater.** 13 (2001) 1874-1879.
- 189.** H. Engelhardt, M. Nikolov, M. Arangio, Studies on shape selectivity of RP C18-columns, **Chromatographia** 48 (1998) 183-189.
- 190.** D.A. Fonseca, **Desenvolvimento de um novo procedimento de avaliação da estabilidade de fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2001.
- 191.** C.L. Ogaya, **Fases estacionárias de poli(metiloctilsiloxano) sorvido e imobilizado por tratamento térmico sobre sílicas de diferentes purezas e com diferentes pré-tratamentos**, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2004.
- 192.** A.M. Faria, L. Maldaner, C.C. Santana, I.C.S.F. Jardim, C.H. Collins, Poly(methyltetradecylsiloxane) immobilized onto silica for extraction of multiclass pesticides from surface waters, **Anal. Chim. Acta** 2006, *no prelo*.